Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização *in vitro* de compostos bioativos de partes aéreas da cana-de-açúcar e sua capacidade antioxidante

Graziela Maniero Beloti

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

Piracicaba
2019

Graziela Maniero Beloti
Engenheira de Alimentos

Caracterização *in vitro* de compostos bioativos de partes aéreas da cana-de-açúcar e sua capacidade antioxidante

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CLAUDIO LIMA DE AGUIAR**

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

Piracicaba
2019

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

Beloti, Graziela Maniero

Caracterização in vitro de compostos bioativos de partes aéreas da cana-de-açúcar e sua capacidade antioxidante / Graziela Maniero Beloti. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

69 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Compostos fenólicos 2. Atividade antioxidante 3. Extração I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por todas oportunidades e graças concedias e sempre me orientar para o melhor caminho;

Aos meus pais Valdir e Helaine e a minha irmã Rafaela, por sempre me apoiarem em minhas escolhas, por estarem presente em cada etapa da minha vida e por serem meu maior exemplo;

Aos amigos queridos, os quais tive o privilégio de conhecer, Nathalia, Juliana Lorenz, Marina, Juliana Sartori, Gislene, Laís, Bruna, Felipe, Guilherme, João e Rafael, por toda ajuda durante o trabalho, mas principalmente pela amizade construída durante todos esses anos de convivência;

As amigas Aline, Micaele, Isabela e Débora por todo apoio e otimismo;

Aos técnicos do laboratório, Pedrinho, Sylvino e Rose pela ajuda sempre que foi preciso;

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar pelas oportunidades ao longo desses anos e pela confiança no meu trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por todas oportunidades;

Ao apoio financeiro concedido pelo CAPES;

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....6
ABSTRACT.....7
1 INTRODUÇÃO.....9
Referências.....10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....13
2.1 Cana-de-açúcar.....13
2.1.1 Compostos fenólicos – Flavonoides.....15
2.2 Antioxidantes.....18
2.2.1 Classificação e Mecanismo de Ação.....19
2.2.1.1 Antioxidantes Primários.....19
2.2.1.2 Antioxidantes Sinergistas.....20
2.2.1.3 Antioxidantes Removedores de Oxigênio.....20
2.2.1.4 Antioxidantes Biológicos.....21
2.2.1.5 Agentes Quelantes.....21
2.2.1.6 Antioxidantes Mistos.....21
2.2.2 Antioxidantes Sintéticos e Naturais.....22
2.2.2.1 Antioxidantes Sintéticos.....22
2.2.2.2 Antioxidantes Naturais.....24
2.2.3 Os Tipos e Aplicações Funcionais dos Antioxidantes.....26
2.2.3.1 Nutrientes Antioxidantes.....26
2.2.3.2 Enzimas Antioxidantes.....27
2.2.3.3 Flavonoides Antioxidantes.....27
2.2.3.4 Minerais antioxidantes.....28
Referências.....30
3 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE DIFERENTES SOLVENTES.....37
RESUMO.....37
ABSTRACT.....37
3.1 Introdução.....37
3.2 Material e Métodos.....39
3.2.1 Material vegetal.....39
3.2.2 Análise de Fenólicos Totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....40
3.2.3 Análise de Flavonoides Totais pelo método de complexação do alumínio.....41
3.2.4 Determinação da atividade antioxidante in vitro.....41

3.2.4.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH°). 41
3.2.5 Análise em cromatografia de camada delgada (CCD) 42
3.2.6 Espectros de absorção por espectrofotometria 43
3.2.7 Análise estatística 43
3.3 Resultados e Discussão 43
3.4 Conclusão 47
Referências 48
4 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO COM ETANOL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURA 51
RESUMO 51
ABSTRACT 51
4.1 Introdução 51
4.2 Material e Métodos 52
4.2.1 Material vegetal 52
4.2.2 Extração em fase sólida (SPE) 53
4.2.3 Análise de Fenólicos Totais pelo método de Folin-Ciocalteu 54
4.2.4 Análise de Flavonoides Totais pelo método de complexação do alumínio. 55
4.2.5 Determinação da atividade antioxidante in vitro 55
4.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH°). 55
4.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolíbdico (TAC) 56
4.2.6 Espectros de absorção por espectrofotometria 56
4.2.7 Análise de fenólicos por cromatografica líquida de alta performance por arranjo de diodo (HPLC/DAD) 57
4.2.8 Análises estatísticas 58
4.3 Resultados e Discussão 58
4.4 Conclusão 66
Referências 68

RESUMO

Caracterização *in vitro* de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar e sua capacidade antioxidante

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem sido foco de diversos estudos em relação ao seu conteúdo de compostos biologicamente ativos, especialmente flavonoides, os quais estão presentes em todas as partes da planta, sendo responsáveis por diversas ações farmacológicas, tais como antioxidante e antimicrobiana. A produção de cana-de-açúcar no Brasil para a safra 2018/19 está estimada em 620,41 milhões de toneladas. No entanto, durante a colheita da cana-de-açúcar, grande parte da planta, principalmente folhas do ponteiro, não apresenta aplicação industrial ou interesse econômico. Estima-se que são gerados 140 kg de palha por tonelada de cana-de-açúcar produzida. Esta palha atualmente fica no campo, trazendo alguns problemas para a plantação. A utilização de antioxidantes aumenta a estabilidade dos alimentos processados, e os sintéticos foram no passado a alternativa para a indústria de alimentos. No entanto a utilização dos antioxidantes sintéticos tem sido descartada em vários países por trazerem riscos à saúde, e por serem muito voláteis e facilmente decompostos a altas temperaturas. Deste modo, a pressão na busca de novas alternativas para a preservação de alimentos é constante, e a natureza química destas novas alternativas tem sido questionada. Hoje a busca por produtos de origem reconhecidamente natural é uma realidade. Resíduos de origem vegetal, como a palha da cana-de-açúcar, podem ser valiosas fontes de compostos que possuam princípios bioativos, a serem utilizados em diversas indústrias, como a de alimentos e a farmacêutica. Dado que a cana-de-açúcar é considerada uma planta alimentícia, suas folhas poderiam ser amplamente utilizadas na obtenção de compostos ativos para uso nutracêutico e/ou farmacológico; o que geraria uma vertente de utilização deste material. O intuito deste trabalho é a utilização do ponteiro da cana-de-açúcar (parte úmida) proveniente da colheita da cana-de-açúcar como material para a extração de compostos fenólicos com comprovada atividade antioxidante. O objetivo foi avaliar a eficiência da extração de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante *in vitro* a partir de testes do parâmetro solvente, utilizando etanol, acetato de etila, clorofórmio e hexano, e posteriormente do parâmetro tempo em 1hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas e 7 horas a temperatura de 50°C. O maior conteúdo de compostos fenólicos bem como maior atividade antioxidante foram observados para o extrato a partir do etanol como solvente extrator. O tempo e a temperatura também influenciaram os resultados, indicando uma maior extração de compostos fenólicos a partir do tempo 3 horas a 50°C.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, Atividade antioxidante, Extração

ABSTRACT

In vitro characterization of phenolic compounds from sugarcane aerial parts and their antioxidant capacity

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) has been the focus of several studies regarding its content of biologically active compounds, especially flavonoids, which are present in all parts of the plant, being responsible for several pharmacological actions, such as as antioxidant and antimicrobial. Sugarcane production in Brazil for the 2018/19 crop is estimated at 620.41 million tons. However, during sugarcane harvesting, much of the plant, especially pointer leaves, has no industrial application or economic interest. It is estimated that 140 kg of straw is generated per ton of sugar cane produced. This straw is currently in the field, bringing some problems to the plantation. Antioxidants are used in the food industry to prevent product changes, especially lipid oxidation, during processing and storage. However, the use of synthetic antioxidants has been ruled out in many countries because of their health risks, and also because they are very volatile and easily decomposed at high temperatures. Thus, the pressure to search for new alternatives for food preservation is constant, and the chemical nature of these new alternatives has been questioned. Today the search for products of recognized natural origin is a reality. Vegetable residues such as sugarcane straw can be valuable sources of compounds that have bioactive principles to be used in various industries, such as food and pharmaceutical. Given that sugarcane is considered a food plant, its leaves could be widely used to obtain active compounds for nutraceutical and / or pharmacological use; which would generate a use strand of this material. The purpose of this work is the use of the sugarcane pointer (wet part) from the sugarcane harvest as a material for the extraction of phenolic compounds with proven antioxidant activity. The objective was to evaluate the extraction efficiency of total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity in vitro from solvent parameter tests, using ethanol, ethyl acetate, chloroform and hexane, and after the time parameter in 1 hour, 2 hours, 3 hours, 5 hours and 7 hours at a temperature of 50 ° C. The highest content of phenolic compounds as well as the highest antioxidant activity were observed for ethanol extract as extraction solvent. Time and temperature also influenced the results, indicating a greater extraction of phenolic compounds from time 3 hours at 50 ° C.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant activity, Extraction

1 INTRODUÇÃO

O estudo de produtos naturais é uma das áreas mais tradicionais do setor químico brasileiro, face aos fatores históricos amplamente discutidos e à grande biodiversidade de nosso país (PUPO *et al*., 2007). As grandezas litorâneas, de sua flora e da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, favorecem a vocação do setor de pesquisas do Brasil para a química de produtos naturais.

No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se que cerca de 500 mil espécies ocupem todo o planeta, sendo que 50% são constituídas pelas angiospermas. Estas plantas alcançaram um desenvolvimento ímpar, dada a ocorrência de micromoléculas distintas e complexas e, possivelmente devido a essas características, sejam atribuídas a elas inúmeras propriedades biológicas. Sendo assim, as plantas constituem um enorme laboratório para a química de produtos naturais, tornando-se matéria-prima para corantes, medicamentos e cosméticos, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (MONTANARI e BOLZANI, 2001; FRANÇA *et al*., 2001).

Um exemplo é a biodiversidade da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), a qual possui diferentes origens, sendo algumas espécies da Oceania e outras asiáticas. Pelo seu enorme valor econômico e sua notável difusão geográfica, a cana-de-açúcar constitui no suporte da maior indústria agrícola do mundo (VILA, 2008).

A partir da cana-de-açúcar é possível produzir uma infinidade de produtos como: açúcar, álcool potável e/ou combustível, cachaça, alimentação animal (variedades forrageiras), produção de garapa ou caldo de cana servido imediatamente após a moagem (BRAZ, 2003).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), estima-se que a produção de cana-de-açúcar do país para a safra 2018/19 atinja 620,41 milhões de toneladas. Diante desses números de produção é de se esperar que haja um excedente de palha no canavial, o qual poderia ser utilizado para outros fins comerciais, considerando-se que de cada tonelada de cana-de-açúcar produzida 140 kg são de palha (BORBA, 2008).

Outro fato em questão é que desde 2014 a colheita da cana-de-açúcar está sofrendo modificações em função de restrições legais e ambientais contra o processo de queima em áreas mecanizáveis, essa proibição deu-se a partir do decreto de Lei Estadual 47.700 de 11 de março de 2003, regulamentando a Lei Estadual 11.241, de 19 de setembro de 2002. A “cana crua” é geralmente colhida mecanicamente, e deixa uma camada de palha (ponteiro, folhas secas e folhas verdes) sobre o solo (GUIMARÃES *et al*., 2008). Uma alternativa viável para este material vegetal seria destiná-lo à extração de compostos químicos úteis à química de produtos naturais.

Nakasone *et al*. (2005) têm isolado de produtos da cana-de-açúcar diversos compostos fenólicos com razoável atividade antioxidante quando comparados a um antioxidante comercial, 2- ou 3-tercbutil-4-hidroxianisol (BHA). Em trabalho publicado por Duarte-Almeida *et al.* (2006) há citações da atividade antioxidante de compostos isolados de produtos da cana-de-açúcar.

O controle da oxidação nos produtos naturais e na alimentação é um dos grandes problemas da preservação dos alimentos. A oxidação lipídica não só produz sabores e aromas desagradáveis, como diminui a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos devido à formação de produtos secundários. Para superar este problema, usam-se antioxidantes sintéticos, principalmente compostos fenólicos sintéticos como: BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHT (terbutilhidroxiquinona). Tais substâncias têm sido largamente utilizadas como antioxidantes na indústria de alimentos, contudo sua toxicidade tem sido alvo de estudos ao longo dos anos.

Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência da extração de compostos fenólicos das partes aéreas da cana-de-açúcar provenientes da colheita mecanizada quanto às suas capacidades antioxidantes em duas etapas:

a) Avaliar a eficiência dos solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol na extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* presente no ponteiro de cana-de-açúcar;

b) Avaliar a eficiência dos tempos de extração 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas e 7 horas na extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* a uma temperatura fixa, presente no ponteiro de cana-de-açúcar.

Referências

BORBA, P. S. Aproveitamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar na indústria sucroalcoeira. Monografia apresentada ao Eco-Lógicas: Concurso Catarinense de Monografias sobre Energias Renováveis e Eficiência Energética, promovido pelo Instituto IDEAL. Florianópolis, 2008.

BRAZ, H. Garapa boa deve vir de cana apropriada. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 27 ago. 2003. Suplemento Agrícola, p. 1-3.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** v. 5, n. 4, 22 p., 2019.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; VIDAL, A.; LINARES, A.F.; LAJOLO F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum L.*) juice. **Plant Foods and Human Nutrition,** v. 61,187–192 p., 2006.

FRANÇA, S.C.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.A.; PUGA, R.D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J.O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, 24 (1-4): 243-250, 2001.

GUIMARÃES, E. R.; MUTTON, M.A.; FERRO, M.I.T.; SILVA, J.A.; MUTTON, M.J.R. Níveis constitutivos de compostos fenólicos podem estar relacionados ‘a resistência da cana-de-açúcar a cigarrinhas das raízes. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, 1(3): 357-365, set. /dez. 2008.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova** [online]. .24(1): 105-111, 2001.

NAKASONE, Y.; KAWAKAMI, H.; ISHII, K.; SUEYOSHI, K.; TAKARA, K.; WADA, K.; KUWAE, I.; KUNINAKA, S. The changes in the phenolic glycosides from sugarcane juice during kokuto production in Okinawa. **Science Bulletin of the Faculty of Agriculture**, 52: 5-7, 2005.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova** [online]. 30(6): 1446-1455, 2007.

VILA, F.C.; COLOMBO, R.L.; TATIANA O. D. E.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidante (radical scavenging) activity of Saccharum officinarum L. **Journal of Brazilian Chemical Society**. [online].19(5): 903-908, 2008.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

Introduzida no Brasil no período colonial, a cana-de-açúcar, atualmente, apresenta grande importância socioeconômica, sendo fonte de matéria-prima para produção de muitos produtos e subprodutos, sendo o açúcar e álcool os principais produtos de interesse do mercado (ALVES; BACCHI, 2004).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma planta perene da família Poaceae e gênero *Saccharum*; sendo sua propagação feita por meio dos colmos com 2−3 gemas. O colmo é cilíndrico, ereto, fibroso e, rico em sacarose de acordo com a variedade (Figura 1). As folhas saem das bases dos nós, são alternas, de coloração verde, compreendem uma bainha com pelos lignificados (GODOY; TOLEDO, 1972).

Figura 1: Cana-de-açúcar (Saccharum spp.)
Fonte: Mundo da cana, 2011

A parte superior da cana-de-açúcar é composta por entrenós imaturos, o cartucho contendo o sistema apical e as folhas que ainda estão verdes. É nessa região da cana onde se encontram altos teores de açúcares redutores (glicose e frutose), baixos teores de sacarose, amido, aminoácidos, ácidos orgânicos, polissacarídeos totais e compostos fenólicos (STUPIELLO, 2000). Por ser a região com menor teor de sacarose, e pelos demais componentes citados causarem impactos negativos na fabricação de açúcar e álcool, como por exemplo precursão de cor, o que dificulta a cristalização da sacarose e a inibição da fermentação alcoólica, é feito o desponte no momento da colheita da cana-de-açúcar (STUPIELLO, 2000).

Tendo início no Brasil no século XVI, a cana-de-açúcar era colhida manualmente a partir da queima, que se tornou uma opção necessária para facilitar o trabalho dos cortadores e aumentar assim a produtividade. Mesmo com problemas de perda de açúcar por exsudação do caldo, a operação de queima pré-colheita se consolidou durante boa parte do século XX.

A partir do decreto de Lei Estadual 47.700 de 11 de março de 2003, regulamentando a Lei Estadual 11.241, de 19 de setembro de 2002, foi proibida a queima da cana-de-açúcar em áreas mecanizáveis, a “cana crua” colhida mecanicamente deixa um novo resíduo na lavoura, uma camada de palha (ponteiro, folhas secas e folhas verdes) sobre o solo (GUIMARÃES *et al*., 2008). A princípio, a palha deixada sobre o campo apresentou benefícios que se mostravam importantes na conservação do solo como no controle de ervas daninhas, umidade, temperatura, teor de matéria orgânica, nutrientes e erosão. Simultaneamente, a palha foi considerada um grande potencial de biomassa adicional podendo ser utilizada na cogeração de energia através da queima e também destinada para produção de etanol de segunda geração (CELENTE, 2016).

Porém, a camada de palha deixada sobre o solo em determinadas quantidades e condições pode favorecer a ocorrência de alguns problemas de doenças e pragas à cultura da cana como espécies de insetos-praga e plantas daninhas, como é o caso da infestação de cigarrinha em ambiente propício, ervas daninhas que sobrevivem e se propagam sob a palha e a podridão do abacaxi (Figura 2) em ambientes mais frios onde o fungo *Thielaviopsis paradoxa* afeta de forma significativa a brotação inicial o desenvolvimento e vigor dos brotos da cana-de-açúcar apresentando falhas e deixando o canavial com aspecto irregular e em alguns casos exigindo o replantio causando prejuízos ao produtor (COOPERCITRUS, 2019), ao passo que reduzem a ocorrência de outras plantas positivas, especialmente as fotoblásticas, favorecendo a necessidade de sua retirada (CELENTE, 2016). O aumento da quantidade de palha deixada sobre o campo pode ainda aumentar o tempo para a rebrota da cana soca (segundo corte da cana-de-açúcar) e ocasionar a saturação por potássio em solos que recebem aplicação de vinhaça, utilizada para aumentar a fertilidade do solo, reduzir da captação de água para irrigação e reduzir o uso de fertilizantes químicos (SORDI; MANECHINI, 2013).

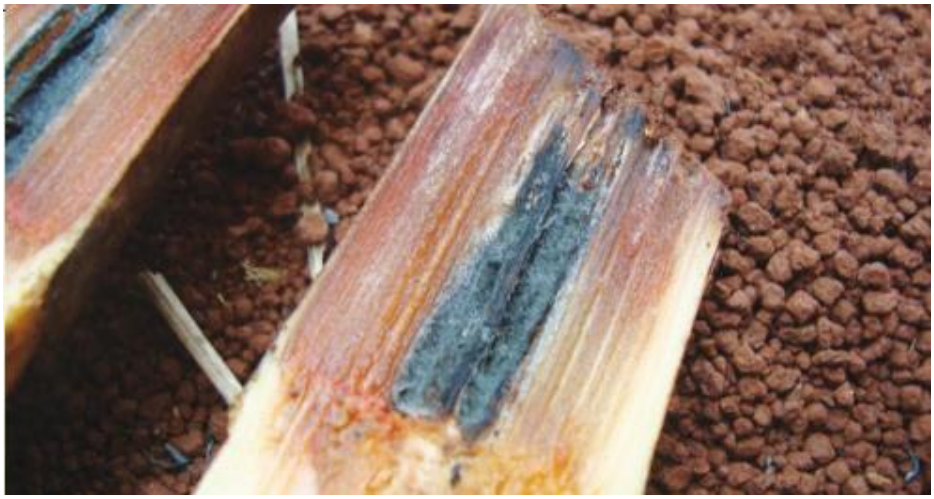

Figura 2: Podridão do abacaxi em cana-de-açúcar
Fonte: Revista Cultivar, 2016

Em estudo com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes quantidades de palha da cana-de-açúcar sobre as emissões de gases do efeito estufa (CO_2 (dióxido de carbono), CH_4 (metano) e NO_2 (óxido nitroso)) do solo, Signor (2014) observou que logo após a colheita da cana-de-açúcar, as emissões de CH_4 e CO_2 tiveram um aumento linear com o aumento da quantidade de palha deixada no solo. Contudo, esse comportamento desapareceu 6 ou 12 meses após a deposição da palha. Esse aumento pode estar relacionado com o aumento da atividade microbiana induzida pela deposição dos restos culturais. Já as emissões de NO_2, independente do tempo decorrido desde a deposição de palha sob o solo, não foram afetadas.

Outra alternativa viável para este material vegetal seria destiná-lo à extração de compostos químicos úteis à química de produtos naturais. As folhas da cana-de-açúcar, segundo Deschamps e Ramos (2002), Takara *et al*. (2007) e Nakasone *et al*. (2005), são especialmente ricas em compostos fenólicos. De uma forma geral, os compostos fenólicos constituem um grupo de metabólitos secundários que exerce papéis importantes nas plantas, como a proteção contra estresses ambientais (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989).

2.1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS – FLAVONOIDES

Os compostos fenólicos, quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (Figura 3), incluindo seus derivados (Figura 4). São originados do metabólito secundário das plantas, derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e também da tirosina (SHAHIDI; NACZK, 2004). Fenóis simples, flavonoides, ligninas e derivados do ácido benzoico entre outros, fazem parte da vasta variedade de compostos fenólicos existentes.

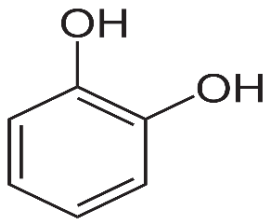

Figura 3: Estrutura química fenol

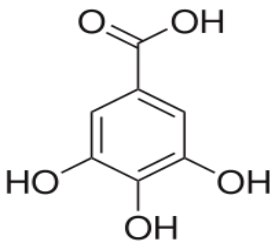

Figura 4: Estrutura química ácido gálico

Segundo Ribeiro *et al.* (2009), os flavonoides estão largamente difundidos na natureza e fazem parte da constituição da grande maioria das plantas. Dão-se de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos), estando presentes em todas as partes da planta desde a raiz até as flores e frutos, sendo encontrado nos vacúolos das células. Apresentam importantes propriedades farmacológicas atuantes no sistema biológico, como por exemplo, ação antioxidante, antialérgica e anticarcinogênica (YAO *et al*. 2004; MARKHAM, 1982).

Dispondo de uma diversidade de formas estruturais os flavonoides, que são derivados da flavona, compreendem 15 átomos de carbono em seu núcleo básico disposto na configuração C6-C3-C6, ou seja, dois anéis aromáticos ligados por três carbonos podendo ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes (Figura 5) (VILA, 2006).

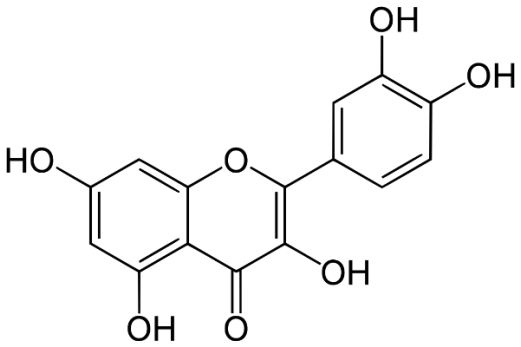

Figura 5: Estrutura química de um flavonoide

Na biossíntese das várias classes de flavonoides, eles podem sofrer algumas modificações, como: hidroxilação, adição ou redução, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonoides, dimerização (produzindo biflavonoides), glicosilação de grupos hidroxila (produzindo *O*-glicosídeos) ou do núcleo dos flavonoides (produzindo *C*-glicosídeos) (YAO *et al*., 2004; HARBORNE, 1994).

De acordo com seu processo de formação, os flavonoides, são classificados em 10 classes de compostos: flavonóis, flavonas, glicofavonas, antocianinas, leucoantocianidinas, auronas, chalconas, biflavonilas, isoflavonas e flavanonas (YAO *et al*., 2004). Devido a sua leve acidez e por serem compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, butanol e metanol e combinações de solventes com água (HARBORNE, 1984).

Em estudo com partes aéreas da cana-de-açúcar, Sartori *et al.* (2013) testou a influência de diferentes concentrações de solvente para extração, diferentes temperaturas e pH. Uma correlação positiva foi observada com aumento da temperatura e pH, com uma leve influência na proporção de solvente em água, constatando que os parâmetros citados influenciaram na extração de compostos fenólicos.

Segundo Payet *et al*. (2005) e Smith e Paton (1985), a cana-de-açúcar contém ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides. O interesse em polifenóis, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, tem crescido nos últimos anos devido à suas propriedades biológicas e seus possíveis papéis na prevenção de diversas doenças crônicas envolvendo estresse oxidativo, além do efeito protetor contra a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FUHRMAN; AVIRAM, 2002).

Na cana-de-açúcar as classes de flavonoides mais numerosas são as flavonas e seus derivados metilados e glicosados, encontrando tanto os *O*-glicosídeos como os *C*-glicosideos (SMITH, 1985; MCGHIE, 1993). Os flavonoides de folhas de diversas espécies de cana-de-açúcar têm sido estudados com propósitos de taxonomia e evolutivos nos últimos anos. Há também um interesse econômico na identificação dos flavonoides presentes, tanto do ponto de vista comercial (na clarificação do açúcar, por exemplo, uma vez que contribui com a mesma) quanto no que se refere ‘as atividades biológicas destes compostos’ (MABRY *et al*., 1984). No que corresponde aos interesses farmacêuticos, os flavonoides se destacam devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antivirais e antitumorais (PACKER *et al*., 1999).

Os flavonoides, em consequência da sua capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico, tem sido apontado como um potente antioxidante natural, isso graças aos grupos hidroxilas ligadas a estrutura do anel. Geralmente, esses compostos têm o poder de doar átomos de hidrogênio inibindo as reações em cadeia ocasionadas pelos radicais livres (RICE-EVANS *et al.*, 1996; BALASUNDRAM *et al*., 2006).

2.2 Antioxidantes

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação (perda de elétrons) de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. O termo antioxidante significa “que impede a oxidação de outras substâncias químicas”. No entendimento químico, antioxidantes são compostos aromáticos contendo no mínimo uma hidroxila. Nos compostos fenólicos, a atividade antioxidante se dá essencialmente as suas propriedades de oxido-redução, propriedades essas que desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, decompondo peróxidos ou quelando o oxigênio triplete e singlete (ANTUNES, CANHOS, 1984; BRENNA, PAGLIARINI, 2001; ZHENG, WANG, 2001; FENNEMA, 1993; SIMÃO, 1985).

Segundo a ANVISA (1961) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento. A FDA (Food and Drug Administration), define que antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos através do retardamento da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autoxidação. Em via de regra, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos.

Estudos mostram que a ingestão de substâncias antioxidantes diariamente pode produzir uma ação protetora eficaz contra os processos oxidativos que ocorrem de forma natural no organismo. Algumas doenças como câncer, diabetes, artrite, malária, doenças do coração, entre outras, podem estar relacionadas aos danos causados pelas substâncias reativas oxigenadas”, ou simplesmente ROS, que são formas de oxigênio extremamente reativas. Substâncias essas ligadas também com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (BRENNA, PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI, KARA, 2002). Portanto, as ROS’s são as diversas formas de oxigênio ativado (singlete), entre as quais os radicais livres estão inclusos.

Os radicais livres são espécies instáveis, que apresentam um número ímpar de elétrons na sua órbita externa e de meia vida curta, reagem velozmente com diversos compostos e alvos celulares, podendo danificar proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, se apropriando ou doando elétrons. Quando essas moléculas prejudiciais de radicais livres estão acima da capacidade protetora das defesas antioxidantes é que ocorre o estresse oxidativo. Por este motivo é que os radicais livres estão envolvidos em um grande número de doenças que afetam os seres humanos (MARCH, 1985; COOPER, 1995) e podem ser constituídas de várias maneiras. Fatores externos como fumaça de tabaco, solventes

orgânicos, radiações ionizantes e pesticidas, são fontes produtoras de radicais livres (YILDRIM; MAVI, KARA, 2002).

São exemplos de radicais livres: o radical hidroxila, os metais de transformação como ferro e o cobre, o ânion superóxido, o ácido nítrico e o ozônio.

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO

Os antioxidantes podem ser classificados em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos.

2.2.1.1 Antioxidantes Primários

Antioxidantes primários são os compostos fenólicos que estimulam a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, interrompendo a reação em cadeia através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas (Figura 6).

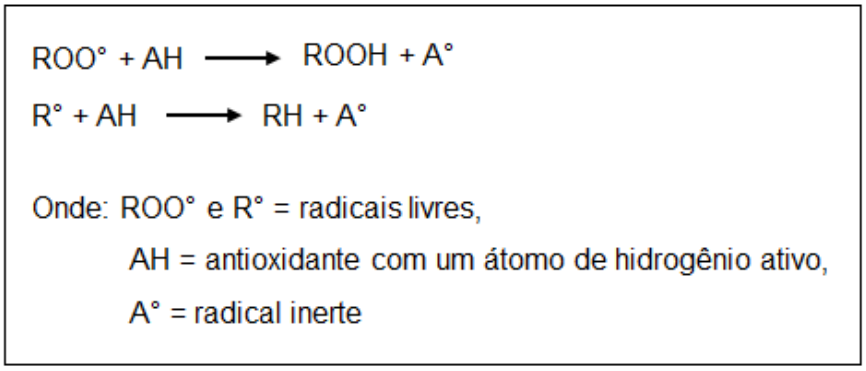

Figura 6: Mecanismo de ação dos antioxidantes primários
Fonte: RAMALHO e JORGE, 2006

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é subtraído pelos radicais livres ROO° e R° com maior facilidade que os hidrogênios. Formam-se assim espécies inativas para reação em cadeia e um radical inerte (A°) proveniente do antioxidante. Estabilizado por ressonância, esse radical não tem a capacidade de iniciar ou aumentar as reações oxidativas.

Os principais antioxidantes sintéticos e mais conhecidos desse grupo são: os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Já os antioxidantes naturais mais conhecidos são os tocoferóis (RAMALHO; JORGE, 2006).

2.2.1.2 Antioxidantes Sinergistas

Os antioxidantes sinergistas (Figura 7) são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, quando usados em combinações adequadas podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários. Alguns antioxidantes primários quando usados em combinações podem atuar sinergisticamente (RAMALHO; JORGE, 2006).

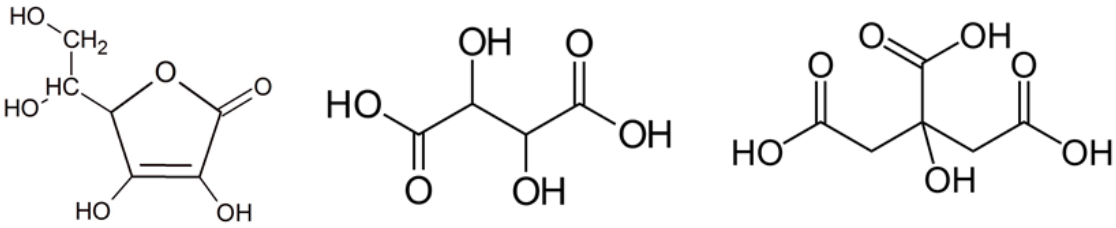

Figura 7: Ácido Ascórbico, Ácido Tartárico, Ácido Cítrico

2.2.1.3 Antioxidantes Removedores de Oxigênio

Os antioxidantes removedores de oxigênio, através de reações químicas estáveis, atuam na captura do oxigênio presente no meio, consequentemente, tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Um exemplo desse grupo de antioxidantes é o ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados (Figura 8). O ácido ascórbico também pode atuar como antioxidante sinergista na regeneração de antioxidantes primários (RAMALHO; JORGE, 2006).

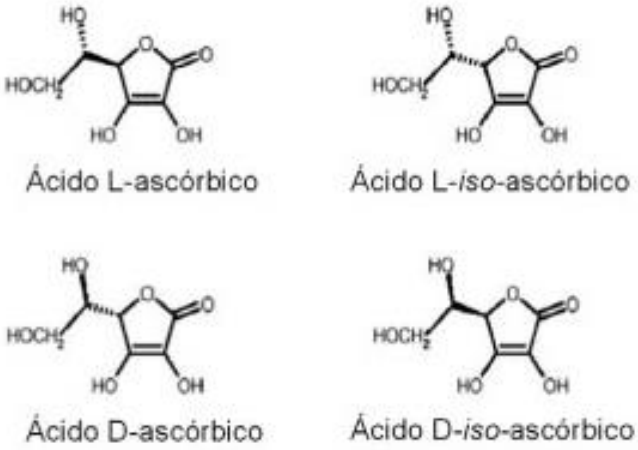

Figura 8: Formas isoméricas do Ácido Ascórbico

2.2.1.4 Antioxidantes Biológicos

Os antioxidantes biológicos removem oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício, as enzimas responsáveis por essa atuação são glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases (Figura 9) (RAMALHO e JORGE, 2006).

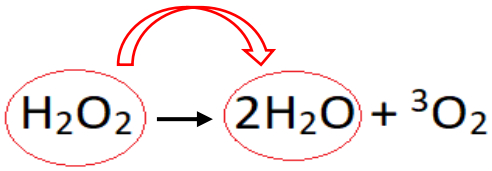

Figura 9: Catalase: converte o peróxido de hidrogênio em água

2.2.1.5 Agentes Quelantes

Os agentes quelantes/sequestrantes, complexam íons metálicos (cobre e ferro, principalmente) que catalisam oxidação lipídica, onde um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os agentes mais comuns são ácidos cítricos e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (Figura 10) (RAMALHO e JORGE, 2006).

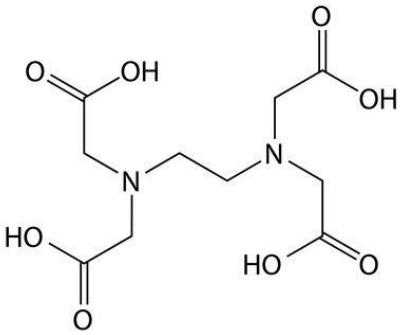

Figura 10: EDTA

2.2.1.6 Antioxidantes Mistos

Os antioxidantes mistos são compostos de plantas e animais que tem sido estudado como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (Figura 11) (RAMALHO; JORGE, 2006).

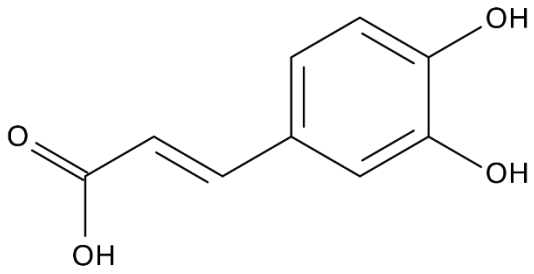

Figura 11: Ácido Caféico

2.2.2 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS

Antioxidantes sintéticos e naturais apresentam funções similares. Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos e os naturais são substancias bioativas que fazem parte da constituição de diversos alimentos, sendo que a utilização de antioxidantes sintéticos vem sendo questionada quanto a sua salubridade, visto que alguns estudos já tem demonstrado que essa classe de antioxidantes pode favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH *et al.*, 2001).

Presentes de forma natural ou intencional nos alimentos, os antioxidantes tem a função de atrasar o surgimento dos fenômenos de oxidação com o objetivo de manter suas características sensoriais intactas, não alterando e não produzindo cores, sabores e odores e não causando efeitos fisiológicos negativos. Os antioxidantes devem ser lipossolúveis, ativos em baixas temperaturas, econômicos e resistentes aos tratamentos em que o alimento seja submetido (ORDÓÑEZ *et al*., 2005).

2.2.2.1 Antioxidantes Sintéticos

BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHQ (terbutilhidroxiquinona) (Figura 12) são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica desses compostos permite a regeneração da molécula de aciglicerol através da doação de um próton a um radical livre, o qual acaba interrompendo o mecanismo de oxidação. Todavia, pode ocorrer a estabilização desses radicais livres sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO e JORGE, 2006).

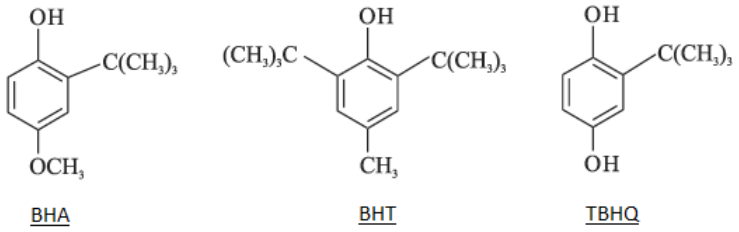

Figura 12: Estrutura química antioxidantes sintéticos

O **BHA** age como sequestrante de radicais peróxidos, sendo mais efetivo na eliminação da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais e é insolúvel em água. Sua eficiência, como na maior parte dos antioxidantes fenólicos, é limitada em sementes e óleos insaturados de vegetais. Apresenta pouca estabilidade em altas temperaturas, sendo efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

Apesar de possuir similaridades com o BHA, o **BHT** age como sinergista ou regenerador de radicais BHA, é facilmente vaporizado em altas temperaturas e insolúvel em água. Ambos podem conferir odor aos alimentos quando em altas temperaturas em condições de fritura por longo período (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

Segundo Wu *et al.* (1982) em trabalho realizado com extrato metanólico de alecrim (0,02%) em banha armazenada no escuto por 6, 14, 21, 28 e 36 dias através da determinação do índice de peróxido, foi possível confirmar a eficiência antioxidante do extrato de alecrim, sendo comparável ao BHT e superior ao BHA nas mesmas condições.

O **TBHQ**, em geral, é considerado mais eficaz em óleos vegetais que o BHA ou o BHT, é considerado também o melhor antioxidante para óleos de fritura por resistir a altas temperaturas, é ligeiramente solúvel em água e quando combinado com ácido cítrico há o aumento de sua eficiência em óleos vegetais (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

Lolos *et al*. (1999) em estudo sobre a estabilidade oxidativa da batata frita, observaram que após a fritura a adição de extrato de orégano como antioxidante retardou a oxidação do óleo absorvido pela batata, com resultados compatíveis ao TBHQ no período de 7 dias a 63°C de armazenamento.

Porém o uso desses antioxidantes em alimentos é limitado. O TBHQ, por exemplo, não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Europeia, no Brasil quem controla o uso desses antioxidantes é o Ministério da Saúde, que limita como concentrações máximas permitidas a 200mg/kg para o uso do BHA e TBHQ e a 100mg/g para o uso do BHT (LUZIA; JORGE, 2009).

Na Tabela 1, estão exemplificados alguns alimentos onde é permitido o uso dos antioxidantes sintéticos já citados e os limites máximo de adição de cada um deles

permitidos de acordo com a Resolução n° 04/88 – CNS/MS (Brasil, 1988), de 24 de novembro de 1988, vigente até a presente data.

Tabela 1: Utilização de antioxidantes sintéticos em alimentos

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODE SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100mL
BHA (BUTILHIDROXIANISOL)	Alimentos processados a base de cereais	0,02 sobre o teor de óleo
	Coco ralado	0,01 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,02
	Gomas de mascar	0,01 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,01
	Margarina	0,02
	Óleos e gorduras	0,02
	Produtos de cacau	0,02
BHT (BUTILHIDROXITOLUENO)	Alimentos processados a base de cereais	0,01 sobre o teor de óleo
	Coco ralado	0,01 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,02
	Gomas de mascar	0,05 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,01
	Margarina	0,02
	Óleos e gorduras	0,01
	Produtos de cacau	0,02
TBHQ (TERBUTILHIDROXIQUINONA)	Alimentos processados a base de cereais	0,02 sobre o teor de óleo
	Farinhas, extratos e flocos derivados da soja integral	0,02 sobre o teor de óleos e gorduras originais do produto
	Gomas de mascar	0,02 calculado sobre o teor da base gomosa
	Óleos e gorduras	0,02

Fonte: Conselho Nacional da Saúde. Resolução n° 04/88 – CNS/MS (Brasil, 1988),

2.2.2.2 Antioxidantes Naturais

Podendo ser extraídos de diversas matrizes alimentares ou orgânicas, ácidos fenólicos, tocoferóis e extratos de plantas com o alecrim e a sálvia estão entre os antioxidantes naturais mais utilizados. Estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos na forma de moléculas com capacidade de suspender a formação dos radicais livres. Devido a sua frequente demonstração de alta atividade antioxidante em sistemas *in*

vitro, essas substâncias têm sido consideradas como conservantes naturais em alimentos que tende a sofrer oxidação lipídica, conseguindo reduzir a velocidade de reações de oxidação desses compostos (RICE-EVANS *et al*., 1996; ZHENG, WANG, 2001).

Nos tocoferóis, sua atividade antioxidante é devida a sua capacidade de doar hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo assim a propagação em cadeia, além de depender de outros fatores como temperatura, composição e forma da gordura (emulsão, líquida) e concentração de tocoferóis. São encontrados de forma natural na maioria dos óleos vegetais, em alguns tipos de pescado e hoje em dia sendo fabricados por síntese. São quatro tipos de acordo com a localização dos grupos metila do anel: α, β, γ e δ (Figura 13) (RAMALHO; JORGE, 2006).

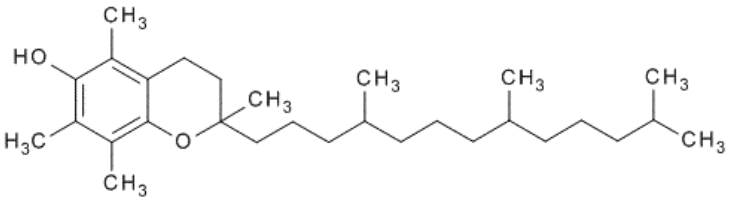

Figura 13: estrutura química do α-tocoferol (vitamina E)

Já nos ácidos fenólicos, as propriedades antioxidantes são conferidas pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. São divididos em grupos: um composto pelos ácidos benzoicos (possuem sete átomos de carbono) e outro composto pelos ácidos cinâmicos (possuem nove átomos de carbono, sendo sete os mais comuns no reino vegetal). Os ácidos fenólicos agem como sequestradores de radicais e, às vezes, como quelentes de metais, tanto na iniciação como propagação do processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006).Além da atividade antioxidante em alimentos e seu potencial no controle das reações de oxidação, os compostos fenólicos (Figura 14) podem ter propriedades fisiológicas desejáveis como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, entre outras (BALASUNDRAM *et al*., 2006). Diante disso, a visibilidade em estudar o potencial de extratos naturais com atividade antioxidante aumentou, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos que são amplamente utilizados pela indústria de alimentos para aumentar a vida útil de alimentos lipídicos (DURÁN; PADILLA, 1983).

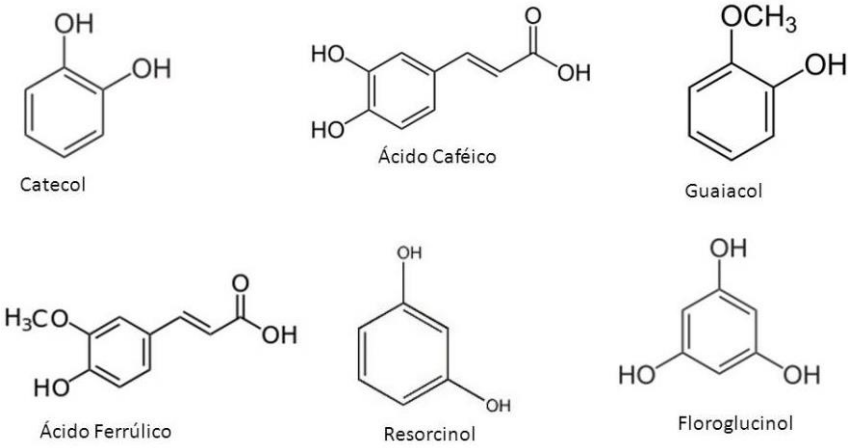

Figura 14: Estrutura química de alguns compostos fenólicos

Não sendo conveniente apenas para a indústria alimentícia, o uso de antioxidantes naturais pode ser destinado para qualquer outro setor onde seu produto possa sofrer processos oxidativos, como por exemplo cosméticos e produtos farmacêuticos (NEGRO *et al*., 2003). O grande interesse das indústrias, principalmente de alimentos, pelo uso dos antioxidantes naturais se dá principalmente por não serem tóxicos e por, muitas vezes, apresentarem benefícios a saúde (BONILLA *et al*., 1999).

2.2.3 Os Tipos e Aplicações Funcionais dos Antioxidantes

Por serem substâncias capazes de agir contra danos causados pelos efeitos do processo fisiológico de oxidação do tecido animal, enzimas (proteínas no corpo que ajudam as reações químicas) e nutrientes (vitaminas e minerais), também são antioxidantes.

2.2.3.1 Nutrientes Antioxidantes

Tendo em vista que cada nutriente é único em termos de estrutura e função antioxidante, a **vitamina E** é o nome genérico dado a todos os isômeros do α-tocoferol que manifestam atividade biológica, até o momento foram identificados 8 deles. Lembrando que isômeros tem duas ou mais moléculas com a mesma fórmula química e arranjos atômicos diferentes, sendo o α-tocoferol o mais disponível e conhecido isômero do mercado e o que te maior efeito no corpo.

O α-tocoferol, por ser solúvel em gorduras, está em uma posição única para defender as membranas das células, que em sua maioria são compostas de ácidos gordurosos,

provenientes dos danos causados pelos radicais livres, protegendo também as gorduras em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da oxidação (CATANIA *et al*. 2009).

Também conhecida como ácido ascórbico, a **vitamina C** é solúvel em água e por esse motivo busca por radicais livres em meio líquido, como o que está dentro da célula. A vitamina C funciona sinergicamente com a vitamina E para eliminar os radicais livres. Também regenera a forma estável da vitamina E (CATANIA *et al*. 2009).

O **betacaroteno** também é uma vitamina solúvel em água e ótima para buscar por radicais livres em uma concentração de oxigênio baixa, isso porque ela é vista como a melhor eliminadora do oxigênio singlete (uma forma energizada porem sem carga do oxigênio, toxica para as células). São 600 carotenoides identificados até o momento, sendo o betacaroteno o mais vastamente estudado.

Já o **selênio**, um mineral que necessita ser consumido em pequenas quantidades e sem o qual não conseguiríamos sobreviver, é um elemento essencial. É responsável pela formação do centro ativo de várias enzimas antioxidantes incluindo a glutationa peroxidase, enzima responsável pela detoxificação de peróxidos inorgânicos e orgânicos parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular (CATANIA *et al*., 2009). Os minerais manganês e zinco, similares ao selênio, são micromoléculas que também constituem uma parte essencial das várias enzimas antioxidantes.

2.2.3.2 Enzimas Antioxidantes

Atuando como linha primária de defesa na destruição dos radicais livres estão as enzimas antioxidantes **catalase** (CAT), **superóxido dismutase** (SOD) e **glutationa peroxidase** (GTx).

Primeiramente o SOD adiciona um elétron (reduz) o radical superóxido para formação do peróxido de hidrogênio e oxigênio. Então a CAT e a GTx trabalham ao mesmo tempo com a proteína glutationa para diminuir o peróxido de hidrogênio e gerar água. A enzima oxidante glutationa redutase é responsável por reduzir a glutationa oxidada. Em conjunto, elas consertam o DNA oxidado, reduzem a proteína oxidada e destroem lipídeos oxidados (BARBOSA *et al*., 2014).

2.2.3.3 Flavonoides Antioxidantes

Os compostos fenólicos, tais como os flavonoides estão entre os antioxidantes presentes mais ativos encontrados nos vegetais. Sua atuação como antioxidante se deve a

sua capacidade de sequestrar radicais livres em ambos os compartimentos celulares: hidrofílicos e lipofílicos. Os flavonoides doam átomos de hidrogênio e consequentemente inibem as reações em cadeia promovidas pelos radicais livres. Os mais pesquisados são a rutina, a naringenina, a quercetina e a miricetina.

Presente nas frutas e vegetais, a quercetina é o flavonoide mais abundante encontrado no vinho tinto. Pode impedir o processo de formação de radicais livres de três maneiras distintas: na iniciação através da interação com íons superóxidos, na formação de radicais hidroxil quelando íons de ferro e na peroxidação lipídica reagindo com radicais peroxi de lipídeos. Porém, ao reagir com ferro, a quercetina pode se tornar um pro-oxidante induzindo ao estresse oxidativo (GASPAR *et al*., 1993).

Encontrada nas plantas e frutas cítricas, a rutina é um tipo de flavonoide de grande interesse farmacológico para saúde humana por apresentar propriedades antialérgica, antibacteriana, anti-inflamatória, vasodilatador e antitumoral (SOUSA *et al*., 2015). A atividade antioxidante da rutina está relacionada com a sua estrutura química e propriedade redutora através da eliminação de espécies reativas de oxigênio como o radical peróxido, o ânion radical superóxido e o radical hidroxila (CAILLET *et al*., 2007; CALABRÒ *et al*., 2005), quelando os metais de transição e atuando tanto no início como na transmissão do processo de oxidação (PAULA *et al*., 2015).

Em estudos sobre a inibição dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio no DNA de linfócitos humanos, a quercetina, a rutina e a miricetina tiveram um efeito mais positivo que a vitamina C (NOROOZI *et al*., 1998).

2.2.3.4 Minerais antioxidantes

Constantemente, o estresse oxidativo é associado às fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese. Enzimas antioxidantes que antagonizam esse processo, dependentes de selênio e zinco, estão em níveis baixos nas células tumorais (GRIOGOLO *et al*., 1998). Além do selênio, o zinco é citado na literatura como um mineral antioxidante compreendido nos mecanismos celulares de defesa contra os radicais livres (ALFIERI *et al*., 1998; YIIN; LIN, 1998).

Há demonstrações de que tumores exibem menores concentrações da enzima superóxido dismutase dependente de zinco e cobre em comparação aos tecidos normais (GRIOGOLO *et al*., 1998). O selênio é um elemento traço essencial para seres humanos e animais, porém em níveis reduzidos nas células e tecidos ocasiona menores concentrações da enzima antioxidante glutationa peroxidase e consequentemente resulta em uma mais suscetibilidade das células e do organismo aos danos oxidativos ocasionados pelos radicais

livres (SCIESZKA *et al*., 1997). A literatura demonstra que a falta de selênio é um importante fator na predisposição no surgimento de tumores (FIALA *et al*., 1998). Além disso, o selênio pode interagir com as vitaminas A e E na prevenção do desenvolvimento de tumores (DELMAS-BEAUVIEUX *et al*., 1996).

Porém é recomendada cautela na administração desse mineral aos seres humanos, uma vez que resultados demonstraram que a suplementação do selênio pode aumentar os processos de carcinogênese (BIRT, 1986).

A *Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine* (Comitê de Nutrição e Alimentos do Instituto de Medicina), que é um conselho da *National Academy of Sciences* (Academia Nacional de Ciências), em abril de 2000, alertou sobre os problemas de saúde causados pelas altas doses de antioxidantes. Desde 1941, a *Food and Nutrition Board* determina quantidades e tipos de nutrientes que são necessários para uma dieta saudável. Para cada tipo de nutriente é estabelecida uma Quantidade Dietética Recomendada (RDA), que é um objetivo de ingestão diário para 98% dos indivíduos saudáveis em um nível de ingestão máximo tolerável, ou seja, é a quantidade máxima de um nutriente que pode ser ingerido a cada dia sem riscos ou efeitos contrários à saúde. Na Tabela 2 estão algumas recomendações feitas no relatório de 2000 chamado de “ingestão Dietética de Referência para vitamina C, vitamina E, selênio e carotenoides”.

Tabela 2: Ingestão dietética de referência para vitamina E, vitamina C, betacaroteno e selênio

Antioxidante	RDA (adultos)	Nível máximo	Comentário
Vitamina E	15 mg	1,070mg de vitamina E natural 785mg de vitamina E sintética	Quantidades maiores prejudicam a coagulação do sangue, aumentando a probabilidade de hemorragia.
Vitamina C	Mulheres: 75mg Homens: 90mg	2 mil mg	Quantidades maiores podem levar a diarreia e outros distúrbios gastrintestinais. Superdosagens pode levar ao câncer, arteriosclerose e pedras nos rins.
Betacaroteno	Nenhum	Nenhum	Altas dosagens tornam a pele laranja-amarelada (hiperbetacarotemia), mas não há toxicidade. Entretanto, as pesquisas indicam que não é recomendável o uso de doses de betacaroteno além do que já existe em uma multivitamina e na sua dieta regular.
Selênio	55mcg	400 mcg	Doses maiores podem causar a perda de cabelos, rachaduras na pele, fadiga, distúrbios gastrintestinais e anormalidades no sistema nervoso.

Fonte: Food Ingredients Brasil n°6, 2009

Referências

ALFIERI, M. A.; LEUNG, F. Y.; GRACE, D. M. Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. **Biological Trace Element Research**, London, v.61, n.1, p.33 - 39, 1998.

ALVES, L. R. A.; BACCHI, M. R. P. Oferta de exportação de açúcar no Brasil. **RER, Rio de Janeiro**, vol. 42, n. 1, p. 9 – 33, 2004.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. Aditivos em Alimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984.

ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 4. ed. atual. e ampl. Viçosa: UFV-Universidade Federal de Viçosa, 2008.

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

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimáticas de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, vol. 44, n. 3, 2014.

BIRCH, A. E. et al. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **J. Agric. Food Chemistry**, Chicago: v.49, p. 4502 - 4507, 2001.

BIRT, D. F. Update on the effects of vitamins A, C, and E and selenium on carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.183, n.3, p.311 - 320, 1986.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**. v. 66, p. 209 - 215. 1999.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001.

CALABRÒ, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; STANCANELLI, R.; RANERI, D.; CATANIA, S.; et al. The rutin/β-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **J. Pharm Biomed Anal**. p. 1019. 2005.

CAILLET, S.; YU, H.; LESSARD, S.; LAMOUREUX, G.; AJDUKOVIC, D.; LACROIX, M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. **Food Chemistry**. 100(2). p. 542 - 552. 2007.

CELENTE, V. Contexto da palha de cana no Brasil: Atuação do Projeto SUCRE (Sugarcane Renewable Electricity). Comunicação do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). 2016.

COOPER, K. H. La Revolución de los antioxidantes. Barcelona: Martinez Roca. p. 254. 1995.

COOPERCITRUS – COPERATIVA DE PRODUTORES RURAIS. Tecnologia: caminho para produção sustentável. ano 33, n. 388, p. 15. 2019.

DELMAS-BEAUVIEUX, M. C.; PEUCHANT, E.; COUCHOURON, A.; CONSTANS, J.; SERGEANT, C.; SIMONOFF, M.; PELLEGRIN, J. L.; LENG, B.; CONRY, C.; CLERC, M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or b-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.64, n.1, p.101 - 107, 1996.

DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular das forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p.1634 - 1639, 2002.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**. Sevilla: v. 44, n. 2, p. 101 - 106, 1993.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FIALA, E. S.; STARETZ, M. E.; PANDYA, G. A; EL-BAOUMY, K.; HAMILTOM, S. R. Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation. *Carcinogenesis*, New York, v.15, n.4, p.597 - 604, 1998.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Polyphenols and flavonoids protect LDL against atherogenic modifications. **In Handbook of Antioxidants**, 2nd ed., revised and expanded; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Dekker: New York, p. 167 - 187. 2002.

GASPAR, J.; LAIRES, A.; MONTEIRO, M.; LAUREANO, O.; RAMOS, E.; RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis,** Oxford, v.8, n.1, p.51-55, 1993.

GODOY, O. P.; TOLEDO, F. F. Plantas extrativas: cana-de-açúcar, amendoim, girassol, mamona, soja. Piracicaba: ESALQ, v.1. 1972.

GRIGOLO, B.; LISIGNOLI, G.; TONEGUZZI, S.; MAZZETTI, I.; FACCHINI, A. Copper/zinc superoxide dismutase expression by different human osteosarcoma cell lines. **Anticancer Research**, Athens, v.18, n. 2A, p.1175 - 1180, 1998.

GUIMARÃES, E. R.; MUTTON, M.A.; FERRO, M.I.T.; SILVA, J.A.; MUTTON, M.J.R. Níveis constitutivos de compostos fenólicos podem estar relacionados ‘a resistência da cana-de-açúcar a cigarrinhas das raízes. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, p. 357 - 365, 2008.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Ann.Rev. Plant Physiol**. 40:347 - 369. 1989.

HARBORNE, J. B. The Flavonoids. New York: Chapman & Hall, p. 676. 1994.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), vol. 69, n. 1, São Paulo, 2009.

LOLOS, M.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C. Oxidative stability of potato chips: effect of frying oil type, temperature and oxidants. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1.524 - 1.528, 1999.

MABRY, T.J.; LIU, Y-L.; PEARCE, J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN. J.; MARKHAM, K.R.; PATON, N.H.; SMITH, P. New Flavonoids from Sugarcane (Saccharum). **Journal of Natural Products**, p.127 - 130, 1984.

MARCH, J. Advanced Organic Chemistry. 3 ed. New York: Wiley. p. 1346. 1985.

MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. New York: Academic Press, p. 113. 1982.

MCGHIE, T. K. Analysis of sugarcane falvonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 634. p. 107 - 122. 1993.

NAKASONE, Y.; KAWAKAMI, H.; ISHII, K.; SUEYOSHI, K.; TAKARA, K.; WADA, K.; KUWAE, I.; KUNINAKA, S. The changes in the phenolic glycosides from sugarcane juice during kokuto production in Okinawa. **Science Bulletin of the Faculty of Agriculture**, 52: 5-7, 2005.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresour Technol**. v. 87, p. 41–44. 2003.

NOOROZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M. E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes**. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**, v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.

ORDÓÑEZ J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, p. 294. 2005.

PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. Antioxidant food supplements in human health. Orlando: Academic Press, p. 511. 1999.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; HIROTA, B. C. K.; CAMPOS, R.; OLIVEIRA, V. B.; KALEGARI, M.; SILVA, C. B.; SILVA, G. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Potencial antioxidante in vitro das folhas da Bauhinia ungulata L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 2, p. 217 - 222, 2015.

PAYET, B.; CHEONG, A.S.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** p. 10074 - 10079, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, vol. 29, n. 4, São Paulo, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20. n. 7, p. 933 - 956. 1996.

SARTORI, A. S. S.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de Influência na extração de compostos Fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Bioscience Journal**, v. 9, n. 2, p. 297 - 307. 2013.

SCIESZKA, M.; DANCH, A.; MACHALSKI, M.; DROZDZ, M. Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia. **Neoplasma**, Bratislava, v.44, n.6, p.395 - 397, 1997.

SIGNOR, D.; PISSIONI, L. L. M.; CERRI, C. E. P.; Emissões de gases do efeito estufa pela deposição de palha de cana-de-açúcar sobre o solo. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 113 - 122 Instituto Agronômico de Campinas. 2014.

SHAHIDI, F; NACZK, M. Phenolics in food and neutraceuticals. Boca Raton: CRC, p. 542. 2004.

SIMÃO, A. M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. São Paulo: Nobel, p. 274. 1985.

SMITH, P.; PATON, N.H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Review,** p. 117-142, 1985.

SORDI, R.A.; MANECHINI, C. Utilization of trash: a view from the agronomic and industrial perspective. **Scientia Agricola**, v.70, p.1 - 2, 2013.

SOUSA, J. R.; FARIAS, M. Y. V.; LEMOS, C. M. G. F.; SILVA, J. A.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Avaliação da casca de Passiflora eduliscomo fonte de flavonoides. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n. 2, p. 556 - 563, 2015.

STUPIELLO, J.P. Pontas de cana: problema industrial? **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.18, p.12, 2000.

TAKARA, K.; USHIJIMA, K.; WADA, K. Phenolic compounds from sugarcane molasses. **Journal ¿ of Oleo Science,** 56(11):611-4, 2007.

VILA F. C. Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de açúcar. (Saccharum officinarum L.), 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo,SP, 2006.

WU, J. W.; LEE, M. I. I.; HO, C. T.; CHANG, S. S. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from Rosemary. **Journal Am Oil Chemistry Soc**. v. 59, p. 339 - 345, 1982.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113 - 122, 2004.

YIIN, S.J., LIN, T.H. Effects of metallic antioxidants on cadmium-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v.28, n.1, p.43 - 50, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. J. Agric. Food **Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4083 - 4089, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5165 - 5170, 2001.

3 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE DIFERENTES SOLVENTES

RESUMO

Uma extração eficiente é o ponto chave para obtenção de êxito nos estudos dos compostos fenólicos presentes nas matrizes vegetais, no caso, no ponteiro de cana-de-açúcar. A eficiência da extração é dependente de diversos fatores. Um dos principais parâmetros a serem definidos para realização de qualquer método convencional de extração é a escolha do solvente. A solubilidade dos compostos fenólicos alvo é gerida pela polaridade do solvente empregado. O objetivo foi avaliar a eficiência da extração de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante *in vitro* do ponteiro de cana-de-açúcar a partir de testes de diferentes solventes. O maior conteúdo de compostos fenólicos bem como maior atividade antioxidante foram observados para o extrato a partir do etanol como solvente extrator.

Palavras-chave: Solvente, Polaridade, Eficiência

ABSTRACT

Efficient extraction is the key to successful studies of phenolic compounds present in plant matrices, in this case, the sugarcane pointer. Extraction efficiency is dependent on several factors. One of the main parameters to be defined for carrying out any conventional extraction method is the choice of solvent. The solubility of the target phenolic compounds is managed by the polarity of the solvent employed. The objective was to evaluate the efficiency of extraction of total phenolics, total flavonoids and in vitro antioxidant activity of the sugarcane pointer from tests of different solvents. The highest content of phenolic compounds as well as the highest antioxidant activity were observed for ethanol extract as extraction solvent.

Keywords: Solvent, Polarity, Efficiency

3.1 Introdução

A extração é um importante passo para a separação, identificação, e utilização de compostos bioativos de fontes naturais. Dentre as diversas técnicas de extração, a extração com solventes é o método mais empregado, onde o sucesso dessa técnica está diretamente relacionado com o solvente utilizado e a aplicação de maceração e/ou calor (AZMIR *et al*., 2013). Encontrar um único método de extração que seja adequado não é uma tarefa fácil (ANTOLOVICH *et al*. 2000). O rendimento da extração de compostos fenólicos a partir de fontes naturais é motivado principalmente pelas condições que o processo de extração sólido-líquido é submetido. A extração sólido-líquido pode ser definida como um fenômeno de transporte de massa no qual componentes contidos em uma matriz sólida deslocam-se para o solvente na qual está imersa.

Esse processo pode ser dividido em duas etapas. A primeira, de maneira mais rápida, envolvendo a transferência direta do soluto da superfície da matéria-prima devido a

sorção do solvente. E a segunda, que acontece de maneira mais lenta, corresponde à difusão molecular do soluto no interior da matéria-prima para o solvente. Fatores como coeficiente de difusão, coeficiente de participação dos componentes extraídos do sólido para o solvente, o tipo de solvente, assim como seu volume, tamanho e geometria das partículas sólidas, também interferem nessas etapas (AZMIR *et al*., 2013).

De acordo com Cowan (1999), a eficiência da extração está relacionada principalmente com a escolha do solvente. A polaridade do composto a ser extraído é o fator mais importante nessa decisão, visto que a natureza química dos compostos alvo variam desde as mais simples até as altamente polarizadas, assim como suas quantidades variam de vegetal para vegetal (MATTOS, 2013). A afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, segurança ambiental e toxicidade para humanos, também são fatores que devem ser considerados na seleção do solvente para extração de compostos fenólicos.

Para analisar a extração de compostos fenólicos se faz necessária a utilização de solventes de diferentes polaridades. Segundo Julkunen-Tiitto (1985), fontes vegetais com predominância de compostos fenólicos denotam maior rendimento no processo de extração com solventes polares, devido à solubilidade.

Metanol, etanol, acetona, água, etil acetato e, em menor grau, propanol, dimetilformamide, e suas combinações são frequentemente usados para extração de compostos fenólicos (ANTOLOVICH *et al*., 2000). Na tabela 3 estão apresentados alguns exemplos de solventes utilizados para extração de compostos bioativos. A US food and Drug Administration, a fim de garantir a qualidade alimentar dos produtos extraídos, recomenda a utilização de solventes orgânicos ambientalmente seguros e de grau não tóxico (BARTNICK *et al.*, 2014).

Tabela 3: Solventes usados para extração de diferentes compostos bioativos

Água	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Dicloro-metanol	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonóis
Taninos	Polifenóis	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Saponinas	Flavonoides	Saponinas				
Terpenoides	Terpenoides	Taninos				
	Alcaloides	Flavonas				
		Polifenóis				

Fonte: Cowan (1999)

Para extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais, a utilização de água e etanol, assim como suas misturas, são os solventes mais frequentemente utilizados. Os

principais fatores que dão preferência a utilização esses solventes estão ligados à sua grande disponibilidade em relação aos demais solventes e por dissolverem facilmente diversos compostos fenólicos (ALOTHMAN et al., 2009), além da baixa toxicidade e por serem recomendados em extrações em alimentos (CHEN et al., 2015).

Em pesquisa realizada com folhas de “sambong” (*Blumea balsamífera*), também conhecida como cânfora Ngai, Nessa et al. (2014), determinaram a atividade antioxidante das folhas mediante extração com éter, clorofórmio e metanol. O extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante, seguido pelo extrato de clorofórmio e do extrato etéreo.

Pode-se dizer então, que a solubilidade em determinado solvente é uma característica de cada composto, o que explica a inexistência de um único método universal de extração.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Os ponteiros de cana-de-açúcar provenientes da colheita mecanizada foram inicialmente desfibrados e homogeneizados através de um conjunto desintegrador-homogeneizador. Após, 500g do material desfibrado foram submetidos ao método de prensa hidráulica (TANIMOTO, 1964) com o objetivo de extrair o caldo do ponteiro e separá-lo do material fibroso. O caldo do ponteiro foi desprezado. O material fibroso (bagaço úmido) resultante da prensa foi colocado em estufa com ventilação forçada a 105°C até massa constante. Posteriormente, esse material seco foi moído em um moinho de facas Mod. Fibrex (São Paulo/SP) e peneiras com malha de 0,394” para promover maior acessibilidade às fibras das folhas e melhorar a extração com solventes orgânicos de compostos químicos presentes nas células vegetais. A partir desse material seco foram feitos os extratos do ponteiro de cana-de-açúcar.

Para o teste de eficiência da extração, foram utilizados quatro diferentes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol (grau analítico). A escolha dos solventes a serem testados foi feita de acordo com a polaridade de cada um (Tabela 4). A partir de então, os ponteiros de cana-de-açúcar foram submetidos as extrações com os diferentes solventes em aparelho Soxhlet.

Tabela 4: Constantes físicas dos solventes utilizados para extração

Solvente	Massa Molar	Densidade (g/mL)	Polaridade	P.F.(°C)	P.E. (°C)
Hexano	86	0,66	0	-100	69
Clorofórmio	119,39	1,484	1,04	-63,5	62
Acetato de Etila	88,11	0,902	4,3	-84	76,5 – 77,5
Etanol	46,07	0,794	5,2	-117,3	78,5

Fonte: CEMPEQC, Instituto de Química Unesp

Para cada teste de extração foram adicionados 300mL do solvente no balão de fundo redondo e 3g da amostra do ponteiro de cana-de-açúcar seco e triturado foram pesados em cartuchos de papel filtro e acondicionados no extrator (Figura 15). Após a extração, os extratos resultantes foram concentrados em rotaevaporador. Os extratos concentrados foram acondicionados em tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados em freezer a temperatura de -20°C. Os extratos foram submetidos as análises subsequentes para comparação da extração quanto a natureza de cada solvente utilizado.

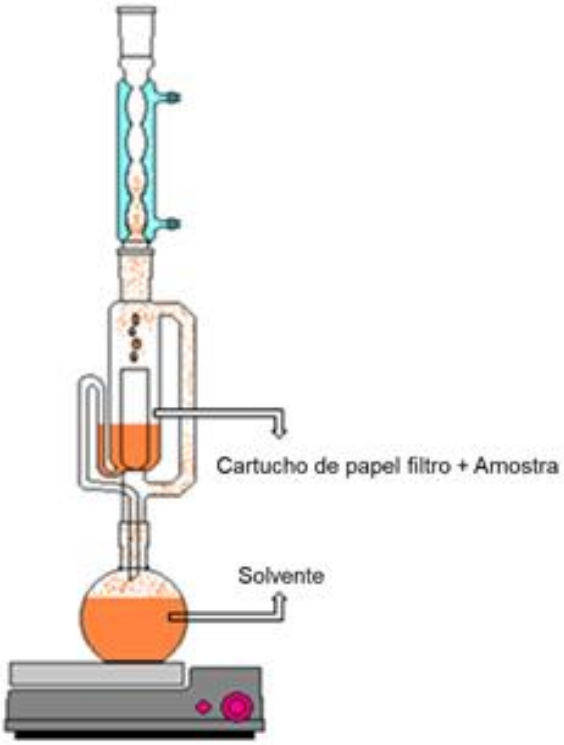

Figura 15: Conjunto extrator Soxhlet

3.2.2 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

O teor de compostos fenólicos (JULKUNEN-TIITTO, 1985) nos extratos foi determinado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos, o reagente de Folin-Ciocalteu de coloração amarelada, que contém uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fusfotungstico, forma um complexo de coloração azul. Alíquotas de 1mL dos extratos foram misturadas a 0,5mL do reagente de Folin–Ciocalteau (1:10, v/v). Após 40 minutos de reação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 2,5mL de carbonato de sódio 20% (m/v) foi adicionado para interromper a reação. As misturam foram homogeneizadas e os comprimentos de onda lidos a 725 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão). Os teores de fenólicos totais foram calculados contra curva de calibração de ácido gálico a uma concentração máxima de 0,1 mg mL^{-1}. A partir da curva de calibração obteve-se a equação da reta, a qual foi utilizada para os cálculos dos teores de fenólicos totais presentes em cada extrato. Para determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes solventes, as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3 ANÁLISE DE FLAVONOIDES TOTAIS PELO MÉTODO DE COMPLEXAÇÃO DO ALUMÍNIO

Os conteúdos de flavonoides totais (MARBY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram determinados a partir de uma mistura de 0,5mL de extrato, 4,3mL de etanol 70% (v/v), 0,1mL de solução 2% de cloreto de alumínio (m/v) e 0,1mL de solução 1 M de acetato de sódio. As misturas foram homogeneizadas e mantidas em repouso por 40 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de reação, a leitura da absorbância foi feita a 415 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão). A curva de calibração foi realizada com solução de rutina (0,05g de rutina em etanol 70% (m/v)) nas concentrações 0, 10,15, 20, 30, 40, 45 e 50 $\mu g\ mL^{-1}$. Para determinação de flavonoides totais nos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes solventes, as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

3.2.4.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH°)

A atividade antioxidante dos extratos de cana-de-açúcar a partir de diferentes solventes foi testada por meio da capacidade de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH°), utilizando a metodologia descrita por Rufino (2007). O radical livre DPPH é

solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é adicionado a essa solução metanólica de DPPH°, o radical livre é reduzido, e com isso, a coloração violeta muda para amarela. Essa mudança foi medida em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão) a 517 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical. A técnica consistiu na incubação de 0,3mL da solução metanólica de DPPH° 0,3mM com 0,5mL do extrato e 3mL de etanol 95% (v/v) por 40 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Foi preparada uma solução "controle", porém substituindo 0,5mL do extrato por 0,5mL do solvente utilizado para diluir o extrato. Para solução "branco" foi utilizado etanol. O percentual de captação do radical DPPH° foi calculado em termos da porcentagem e expresso na forma de atividade antioxidante (AA%), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\textbf{\% Atividade Antioxidante} = 100-((A_{amostra}-A_{branco}) * 100) / A_{controle})$$

Onde: $A_{amostra}$ é a absorbância da solução DPPH (extratos); A_{branco} é a absorbância do solvente sem adição de DPPH; $A_{controle}$ é a absorbância da solução referência de DPPH metanol). Para determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH° nos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar, as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

O princípio da CCD é baseado na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial desses componentes quando arrastados pela fase móvel (solvente) sobre uma camada delgada adsorvente. Para os extratos do ponteiro de cana-de-açúcar, a análise de CCD foi realizada em placas de sílica gel K6F 60A pré-revestidas de 20 x 20 cm (0,25 mm de espessura) obtidas da Whatman Co. (USA). Primeiramente as placas foram ativadas em estufa à 100°C por 60 minutos. Com o auxílio de um capilar cada extrato foi aplicado como ponto sobre a placa. A câmara reveladora foi previamente saturada por 30 minutos com o auxílio de um papel filtro, utilizando clorofórmio e metanol (15:1 v/v) como fase móvel. A placa foi desenvolvida em câmara vertical, à temperatura ambiente, até a altura de aproximadamente 16cm a partir do ponto de partida (Figura 16). Depois de seca, a visualização da placa foi feita pela aspersão de solução de revelador ρ-anisaldeído, sendo em seguida seca em estufa à 100°C por 2 minutos (MEDIC-SARIC *et al*., 2004).

Figura 16: Câmara vertical para desenvolvimento da CCD

3.2.6 ESPECTROS DE ABSORÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA

As medidas de absorção para os extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes solventes foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1cm, por meio de um espectrofotômetro UV-Visível Mini 1240 (Shimadzu Co., Japão), com varredura no intervalo de 200 – 600 nm e resolução de 1 nm. O extrato foi utilizado concentrado.

3.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos resultados da caracterização dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes solventes foram diferenciadas pelo teste de Tukey a 99% de confiança utilizando o software R. Também foram realizados testes de correlação entre as variáveis estudadas utilizando o coeficiente de Correlação do Produto de momentos de Pearson, ou simplesmente Coeficiente de Pearson (r), que reflete a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. É um índice adimensional com valores situados -1,0 e 1,0.

3.3 Resultados e Discussão

O teor de compostos fenólicos de um extrato sofre diversas influências como a sua composição, origem, condições de armazenamento e o pré-tratamento da matéria prima do

qual é proveniente, da mesma forma que a polaridade e o tipo de solvente utilizado também exercem influências durante a extração (ROCKENBACHI *et al*., 2008).

Após a extração, os extratos foram submetidos as análises de fenólicos totais, de flavonoides totais e análise da atividade antioxidante in vitro DPPH°. Os resultados obtidos para essas análises encontram-se na Tabela 5, onde os rendimentos estão mostrados conforme o aumento da polaridade dos solventes usados na extração.

Tabela 5: Caracterização dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar quanto aos teores de compostos fenólicos, flavonoides, e atividade antioxidante in vitro, expressos como média± desvio padrão.

Extrato	Fenólicos (g L^{-1})	Flavonoides (g L^{-1})	DPPH° (%)
Hexano	0,234±0,02^{c}	1,778±0,03^{c}	11±0,1^{d}
Clorofórmio	0,262±0,01^{c}	2,441±0,3^{bc}	27±0,3^{c}
Acetato de etila	0,828±0,04^{b}	2,820±0,2^{b}	48±0,3^{b}
Etanol	1,756±0,02^{a}	4,659±0,4^{a}	83±0,1^{a}

Médias de n=3 ± desvio padrão.
Letras iguais na vertical indicam não haver diferença estatística pelo Teste de Tukey a 1% de significância.

Analisando o rendimento em ordem crescente de polaridade, pode-se observar que o hexano, o clorofórmio e o acetato de etila apresentaram baixos rendimentos. Nota-se que o etanol apresentou o melhor potencial de extração para análise de fenólicos totais (1,756±0,02 g L^{-1}) e para a análise de flavonoides (4,659±0,4 g L^{-1}), indicando que os compostos bioativos presentes no ponteiro de cana-de-açúcar apresentam características mais polares. A polaridade do solvente é eficiente na solubilização de compostos semelhantes entre si em função das características hidrofílicas e lipofílicas, isto é, compostos bioativos com características polares terão maior afinidade com solventes polares. O mesmo ocorre para o grupo de compostos apolares, que são extraídos de forma mais eficiente por solventes apolares (ANDRADE, 2011).

De acordo com Tiwari et al. (2011) substâncias fenólicas tem maiores afinidades por solventes mais polares, como etanol e acetato de etila, como mostram os resultados obtidos neste estudo. A polaridade do solvente utilizado interfere na extração, podendo extrair, por exemplo, flavonoides livres no extrato em acetato de etila ou flavonoides glicosilados no extrato em etanol (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Moreira et al. (2012), detectaram variações nos teores de fenóis totais e flavonoides e na atividade antioxidante de extratos de *Baccharis trimera,* conhecida como carqueja, utilizando hexano, acetato de etila e etanol como solventes extratores. Ao final, concluiu que o uso de solventes polares como o etanol

e o acetato de etila extraíram maiores quantidades de substâncias fenólicas com atividade antioxidante.

Em estudos para analisar o melhor solvente extrator de compostos fenólicos e atividade antioxidante em alimento, Vizzotto e Pereira (2011), testaram diferentes solventes com pouca, intermédia e alta polaridade. O solvente de menor polaridade, o hexano, não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que não foi capaz de extrair os compostos fenólicos da amora-preta. Enquanto o solvente de alta polaridade, o etanol, foi o mais eficiente nas extrações.

Embora os extratos sejam da mesma espécie vegetal, o processo de extração e a utilização de diferentes solventes é importante para detectar a diferença dos teores de fenólicos e flavonoides totais, uma vez que os fenólicos influenciam diretamente na capacidade antioxidante, onde é possível verificar que quanto maior o teor de fenólicos totais, maior será atividade antioxidante do extrato em questão (LIMA et al., 2012), como pode ser conferido na Tabela 5. A correlação de Pearson entre a concentração de flavonoides e DPPH foi forte positiva (r = 0,978), assim como entre fenólicos e DPPH (r = 0,984). O extrato em etanol se destacou por apresentar o maior valor de atividade antioxidante, com um consumo de (83±0,1%) do radical DPPH°.

A fim de elucidar uma prévia identificação de compostos fenólicos com capacidade antioxidante nos extratos obtidos a partir de diferentes solventes, foi realizada a análise de CCD. A CCD é uma técnica bastante utilizada em análises preparativas e como um importante instrumento para isolamento de compostos naturais com atividade biológica (HARBONE, 1984; HOSTETTMANN et al., 2003).

Após a revelação da placa onde os extratos foram aplicados (Figura 17), foi possível observar que as frações resultantes de cada extrato revelam grande diversidade de compostos fenólicos de diferentes classes, formando várias bandas. Também foi possível observar que todas as bandas foram igualmente reveladas, contudo diferem na quantidade/concentração. O extrato em etanol (3) apresentou uma coloração visualmente mais forte e o extrato em hexano (4) cores visualmente mais claras, indicando assim uma maior quantidade/concentração de compostos fenólicos no extrato em etanol. Devido a configuração final da placa, não foi possível estabelecer os valores de referência (Rf) para cada extrato.

Figura 17: Cromatograma resultante da análise de CCD. Revelador ρ-anisaldeído. 1- clorofórmio, 2- acetato de etila, 3- etanol e 4- hexano

Esse comportamento pode ser comprovado pela análise dos espectros de absorção por espectrofotometria através dos espectros de absorção na região UV-Visível, com varredura no intervalo de 200 – 600 nm, obtidos a partir dos extratos em diferentes solventes (Figura 18). É possível observar a formação de picos de absorbância na faixa de comprimento de 280 nm - 350 nm, que correspondem aos comprimentos onde se encontram os compostos fenólicos e os flavonoides, onde temos: 280 nm para os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (ácido vanílico e ácido gálico) e para catequina e epicatequina (flavonóis) (TOALDO et al., 2015); 300 nm para ácido salicílico e ácido p-cumárico (VAN LEEUW et al., 2014); 320 para derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico e caféico) (TOALDO et al., 2015); e 360 nm para os flavonóis miricetina, quercetina e rutina (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010), o que sugere a presença de alguns desses compostos fenólicos nos extratos analisados.

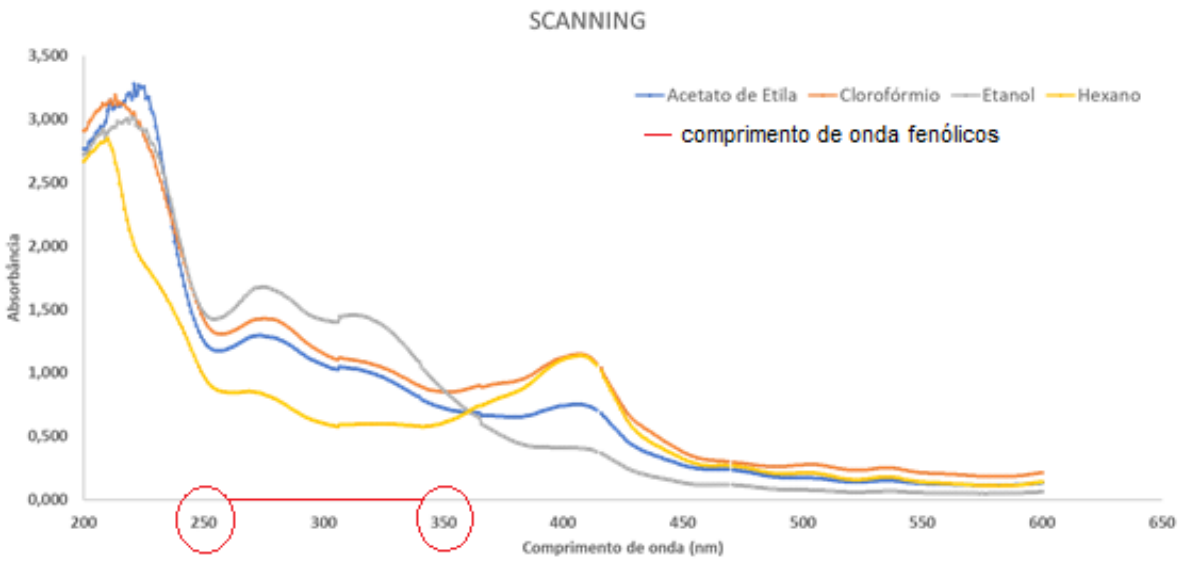

Figura 18: Espectros de absorção máxima em função do comprimento de onda dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes solventes

De modo geral, nota-se que os perfis dos espectros dos extratos são semelhantes, havendo diferença na concentração dos compostos químicos extraídos e não na composição desses compostos. Nota-se também que para os picos de absorbância na faixa de comprimento que compreende os compostos fenólicos e flavonoides, o extrato em etanol é o que contém maior concentração desses compostos.

3.4 Conclusões

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

Solventes de diferentes polaridades utilizados para o processo de extração dos compostos fenólicos do ponteiro de cana-de-açúcar foi um importante parâmetro para se detectar a variação da concentração nos extratos.

Os conteúdos totais de fenólicos e flavonoides do ponteiro de cana-de-açúcar do extrato em etanol diferiu significativamente em nível de ($p \leq 0,001$) dos extratos em acetato de etila, clorofórmio e hexano.

A análise de atividade antioxidante pelo método DPPH° apresentou resultados positivos para todos os extratos analisados. O extrato em etanol apresentou o maior consumo do radical DPPH° com maior atividade antioxidante.

Referências

ANDRADE, K. S. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (Coffea arabica L.). 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry.** v.115, n.3, p.785 - 788, 2009.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES, E. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst,** v. 125, p. 989-1009, 2000.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. v. 117, p. 426 - 436, 2013.

BARTNICK, D.; MOHLER, C.; HOULIHAN, M. Methods for the production of food grade extracts: Google Patents 2004.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543 - 550, 2015.

COWAN, M. M.; Plant product as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology: Reviews**. vol. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 - 105, 1998.

HARBONE, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2 ed. London: Chapman and Hall. p. 288. 1984.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: Edufscar, p. 151. 2003.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.** v. 33, n. 2, p. 213 - 217, 1985.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (Euterpe edulis Martius). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 321 - 326. 2012.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultravioleta spectral analysis of flavonoids. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer – Verlag. p. 33 – 36. 1970.

MATTOS, G. Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de eugenia pyriformis cambess usando diferentes solventes. p. 34, Trabalho de conclusão de curso, Campo Mourão, 2013.

MEDIC-ŠARIC, M.; JASPRICA, I.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MORNAR, A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. **Croatica Chemica Acta**, v. 77, n. 1-2, p. 361 - 366, 2004.

MOREIRA, V. E.; GASPARETTO, C. M.; CHIBLI, L. A.; VIEIRA, C. D-V.; SOUSA, O. V. Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae). **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 38, n. 3 e 4, p. 223 – 229, 2012.

NESSA, F.; ISMAIL, Z.; MOHAMED, N.; HARIS, M. R. H. M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 243 - 252, 2004.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da capacidade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127. p. 1 – 4, 2007.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Sciencia**, p. 98 – 106, 2011.

TOALDO, I. M. et al. Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipidperoxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, n. 173, p. 527 - 535, 2015.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (Rubussp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p.1209 – 1214, 2011.

VAN LEEUW, R.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMESB, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 36, p. 40 - 50, 2014.

WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction ofantioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, p. 134 - 140, 2010.

4 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO COM ETANOL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURA

RESUMO

Tempo e temperatura também são parâmetros importantes a serem otimizados para a extração de compostos fenólicos presentes em matrizes vegetais, neste caso, o ponteiro da cana-de-açúcar. Durante a extração, a temperatura pode afetar compostos bioativos de diferentes maneiras, onde o conteúdo fenólico total tende a diminuir com o aumento da temperatura. O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação desses compostos. Longos períodos de tempo podem aumentar a possibilidade de oxidação de fenol. Objetivou-se avaliar a eficiência de extração de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante in vitro do ponteiro da cana-de-açúcar a partir de ensaios com tempos e temperaturas constantes. Os tempos e a temperatura influenciaram os resultados, indicando maior extração de compostos fenólicos a partir de um período (tempo) de 3 horas a 50 ° C.

Palavras-chave: Tempo, Temperatura, Extração

ABSTRACT

Time and temperature are also important parameters to be optimized for the extraction of phenolic compounds present in plant matrices, in this case, the sugarcane pointer. During extraction, temperature may affect bioactive compounds in different ways, where the total phenolic content tends to decrease with increasing temperature. Extraction time also considerably affects the recovery of these compounds. Long periods of time may increase the possibility of phenol oxidation. The objective was to evaluate the extraction efficiency of total phenolics, total flavonoids and in vitro antioxidant activity of the sugarcane pointer from tests with different times and constant temperature. The times and temperature influenced the results, indicating greater extraction of phenolic compounds from a period (time) of 3 hours at 50 ° C.

Keyword: Time, Temperature, Extraction

4.1 Introdução

Além da natureza do solvente, outros fatores também podem contribuir para eficiência da extração por métodos convencionais, como por exemplo temperatura e tempo (XU e CHANG, 2007).

Altas temperaturas podem aumentar a eficiência da extração devido a maior taxa de difusão e solubilidade dos analitos em solvente, onde o calor torna as paredes celulares permeáveis, aumenta os coeficientes de solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminui a viscosidade dos solventes. Entretanto elevadas temperaturas também podem afetar a atividade dos extratos degradando os compostos fenólicos. Dessa forma, as extrações de compostos fenólicos e antioxidantes, de maneira geral, são administradas entre 20 e 60°C (PINELO et al., 2005).

Com o objetivo de otimizar a extração de compostos antioxidantes da microalga *Spirulina platensis*, Herrero et al. (2005), utilizaram para extração hexano, éter de petróleo, etanol e água, assim como temperaturas e tempos distintos. Ao final, altas temperaturas de extração apresentaram influência em todos os resultados. Já a influência do tempo foi quase insignificante. O etanol foi o solvente que forneceu maiores rendimentos com atividade antioxidante.

Curtos períodos de extração podem não ser suficientes para a completa transferência dos solutos para o solvente. Todavia, longos períodos de tempo de extração em altas temperaturas podem oxidar os compostos fenólicos presentes na matéria-prima (XU e CHANG, 2007). Segundo Shahidi e Naczk (1995) o tempo de extração deve variar de 1 minuto a 24 horas.

Ao estudar a *Tabernaemontana catharinensis*, uma espécie arbórea, Sari (2016) analisou diferentes tempos, temperaturas e solventes para determinar a melhor condição de extração de compostos bioativos. Ao final o extrato que apresentou maior teor de compostos fenólicos bem como atividade antioxidante ocorreu em 30 minutos, 65°C e tendo o etanol como solvente extrator.

Santana et al. (2013), também analisaram a influência das variáveis solvente, tempo e temperatura na extração de compostos fenólicos totais utilizando sementes de maracujá amarelo. A combinação de variáveis que apresentou melhor extração de composto fenólicos totais foi o extrato etanólico a 80% em temperatura de 70°C durante 40 minutos.

Apesar dos desafios, como por exemplo longos tempos de análise, requerimento de solventes de alto grau de pureza, e muitas vezes tóxicos, evaporação de grande quantidade de solvente, baixa seletividade da extração e exposição a luz e ao oxigênio possibilitando a ocorrência de degradações, a extração convencional é a técnica mais empregada na extração de compostos fenólicos devido principalmente à sua simplicidade e relativo baixo custo, uma vez que não precisa de uma instrumentação complexa e de custo elevado (AZIMIR et al., 2013).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

Os ponteiros de cana-de-açúcar foram inicialmente desfibrados e homogeneizados, através de um conjunto desintegrador-homogeneizador. Esse material desfibrado (úmido) foi submetido a extração. Em cinco elernmeyers foram pesados 5g do ponteiro desfibrado e

adicionado 50mL de etanol 95% PA em cada um. Após, foram acondicionados em banho-maria a 50°C. Foram testados cinco tempos diferentes de extração: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas e 7 horas (Figura 19). Foi realizada agitação de forma manual dos elernmeyers em todos os tempos. Ao final de cada tempo de extração, o extrato resultante foi filtrado em chapéu chinês, concentrado em rotaevaporador, acondicionado em tubo de ensaio com tampa de rosca e armazenado em freezer a -20°C.

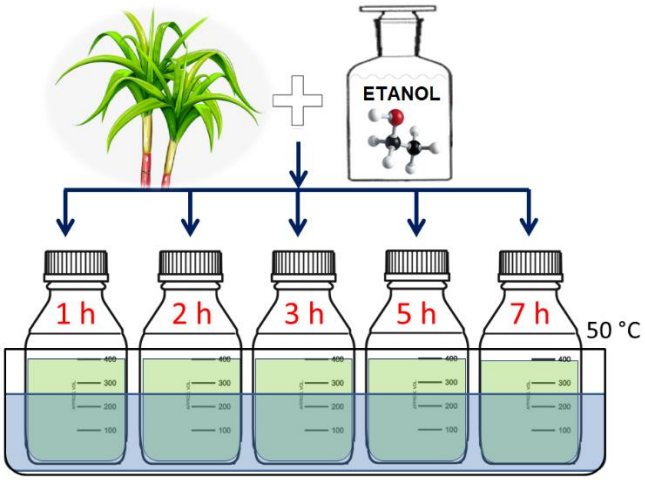

Figura 19: Extração em banho-maria a 50°C em diferentes tempos

4.2.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Para os extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes tempos foi realizada a extração SPE, uma técnica de separação sólido-líquido muito utilizada na purificação de compostos fenólicos para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas. A fase sólida, também denominada de sorvente, compõe o recheio de um cartucho na forma de seringa com os mesmos mecanismos de retenção idênticos aos envolvidos em cromatografia líquida em coluna. A extração em fase sólida foi realizada utilizando cartuchos Oasis HLB com o objetivo de remover interferentes (açúcares, clorofila e fenóis) dos extratos a serem analisados.

A primeira etapa para o procedimento de purificação dos compostos fenólicos dos extratos envolve a aplicação de 1mL de metanol seguido de 1mL de água ultrapura para o condicionamento do sorvente presente no interior do cartucho. Em seguida, foi feita a retenção do analito no cartucho através da aplicação de 2mL do extrato do ponteiro de cana-de-açúcar. Após foi realizada a limpeza do cartucho através da aplicação de 3mL de água ultrapura para a retirada dos interferentes menos retidos que os analitos, esta etapa

também pode ser chamada de lavagem ou *clean-up.* Por último foi realizada a eluição do analito com a aplicação de 5mL de metanol (Figura 20). Os extratos foram acondicionados em tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados em freezer a -20°C.

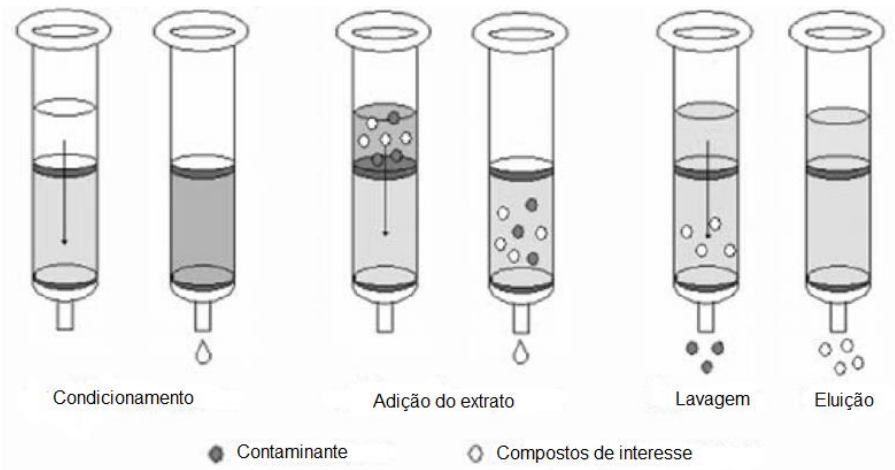

Figura 20: Etapas da SPE
Fonte: Extração em fase sólida (SPE); Fernando Lanças; 2004

4.2.3 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

O teor de compostos fenólicos (JULKUNEN-TIITTO, 1985) nos extratos foi determinado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos, o reagente de Folin-Ciocalteu de coloração amarelada, que contém uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fusfotungstico, forma um complexo de coloração azul. Alíquotas de 1mL dos extratos foram misturadas a 0,5mL do reagente de Folin–Ciocalteau (1:10, v/v). Após 40 minutos de reação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 2,5mL de carbonato de sódio 20% (m/v) foi adicionado para interromper a reação. As misturam foram homogeneizadas e os comprimentos de onda lidos a 725 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão). Os teores de fenólicos totais foram calculados contra curva de calibração de ácido gálico a uma concentração máxima de 0,1 mg mL^{-1}. A partir da curva de calibração obteve-se a equação da reta, a qual foi utilizada para os cálculos dos teores de fenólicos totais presentes em cada extrato. Para determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes tempos, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4 ANÁLISE DE FLAVONOIDES TOTAIS PELO MÉTODO DE COMPLEXAÇÃO DO ALUMÍNIO

Os conteúdos de flavonoides totais (MARBY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram determinados a partir de uma mistura de 0,5mL de extrato, 4,3mL de etanol 70% (v/v), 0,1mL de solução 2% de cloreto de alumínio (m/v) e 0,1mL de solução 1 M de acetato de sódio. As misturas foram homogeneizadas e mantidas em repouso por 40 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de reação, a leitura da absorbância foi feita a 415 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão). A curva de calibração foi realizada com solução de rutina (0,05g de rutina em etanol 70% (m/v)) nas concentrações 0, 10,15, 20, 30, 40, 45 e 50 $\mu g\ mL^{-1}$. Para determinação de flavonoides totais nos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes tempos, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

4.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH°)

A atividade antioxidante dos extratos de cana-de-açúcar a partir de diferentes tempos foi testada por meio da capacidade de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH°), utilizando a metodologia descrita por Rufino (2007). O radical livre DPPH é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é adicionado a essa solução metanólica de DPPH°, o radical livre é reduzido, e com isso, a coloração violeta muda para amarela. Essa mudança foi medida em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão) a 517 nm, indicando a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical. A técnica consistiu na incubação de 0,3mL da solução metanólica de DPPH° 0,3mM com 0,5mL do extrato e 3mL de etanol 95% (v/v) por 40 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Foi preparada uma solução “controle”, porém substituindo 0,5mL do extrato por 0,5mL do solvente utilizado para diluir o extrato. Para solução “branco” foi utilizado etanol. O percentual de captação do radical DPPH° foi calculado em termos da porcentagem e expresso na forma de atividade antioxidante (AA%), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\textbf{\% Atividade Antioxidante} = 100-((A_{amostra}-A_{branco}) * 100) / A_{controle})$$

Onde: $A_{amostra}$ é a absorbância da solução DPPH (extratos); A_{branco} é a absorbância do solvente sem adição de DPPH; $A_{controle}$ é a absorbância da solução referência de DPPH

metanol). Para determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH° nos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolíbdico (TAC)

Para determinação da capacidade antioxidante total dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar foi utilizado o método de complexação pelo fosfomolibdênio descrito por Prieto et al. (1999). Esse método fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido. Em tubo de ensaio, alíquotas de 0,1mL do extrato foi adicionado a 0,1mL da mistura reativa compreendida de ácido sulfúrico 3M, fosfato monobásico de sódio 0,1M e molibdato de amônio a 0,03M. Os tubos de ensaio hermeticamente fechados, foram levados a banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, realizou-se a adição de 2mL de água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu Co., Japão) a 695 nm. Os resultados foram expressos em AAR% (ácido ascórbico), a partir da expressão:

$$\textbf{AAR\% (ácido ascórbico)} = [(A_{extrato} - A_{branco}) / (A_{ácido\ ascórbico} - A_{branco})] \times 100$$

Onde: AAR% (ácido ascórbico) é a atividade antioxidante relativa, expressa em porcentagem; $A_{extrato}$ é a absorbância do extrato testado; A_{branco} é a absorbância do branco preparada com água ultrapura acrescido de 1mL da mistura reativa; $A_{ácido\ ascórbico}$ é a absorbância da solução referência a uma concentração de 200 µg/mL de ácido ascórbico.

4.2.6 ESPECTROS DE ABSORÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA

As medidas de absorção para os extratos do ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes tempos foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1cm, por meio de um espectrofotômetro UV-Visível Mini 1240 (Shimadzu Co., Japão), com varredura no intervalo de 200 – 600 nm e resolução de 1 nm. O extrato foi utilizado concentrado.

4.2.7 ANÁLISE DE FENÓLICOS POR CROMATOGRAFICA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE POR ARRANJO DE DIODO (HPLC/DAD)

As técnicas de análise por HPLC oferecem a chance de analisar simultaneamente todos os compostos de interesse juntos com seus derivados e possíveis produtos de degradação (STALIKAS, 2007). O princípio de funcionamento da cromatografia líquida é dado a partir do transporte contínuo do solvente líquido (fase móvel) com o auxílio de uma bomba até a coluna cromatográfica (fase estacionária), a amostra é inserida no sistema através de um sistema de injeção automático. As diferentes interações entre as moléculas presentes na amostra e a fase estacionária fazem com que estas tenham tempos de retenção diferentes no sistema, fazendo com que seja possível separar os compostos presentes na amostra (Figura 21).

A identificação dos compostos fenólicos foi feita utilizando o método descrito por Vila (2006), utilizando um cromatógrafo líquido modelo HPLC Shimadzu com detector de UV/DAD. A coluna utilizada foi do tipo C18 e com fase móvel: Solvente A: ácido fórmico a 0,2% em água ultrapura e Solvente B: acetonitrila a um fluxo de 1,0mL/min e temperatura da coluna de 40°C. O gradiente da fase móvel foi de: 0-8 min.: 10-13% B; 8-25 min.: 13-20% B; 25-40 mim.: 20-40% B; 40-45 min.: 40-60% B; 45-50 min.: 60-10% B; 50-65 min.: 10% B. O volume de injeção do extrato foi de 10 µL.

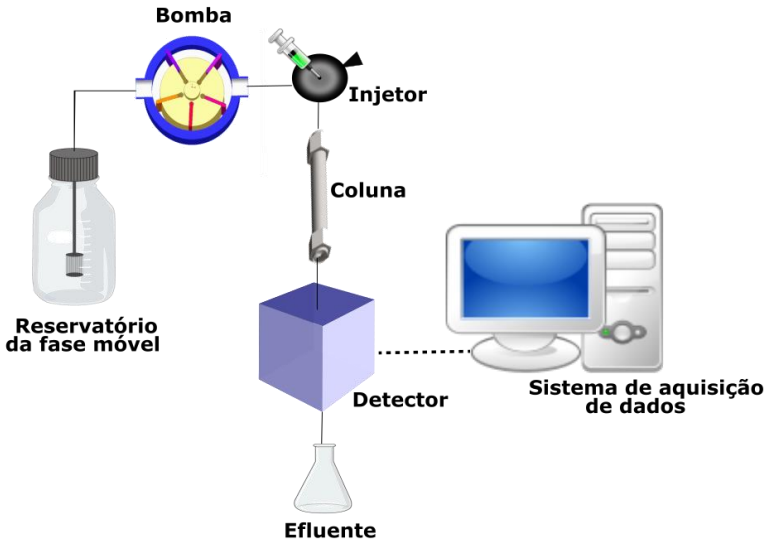

Figura 21: Esquema simplificado de análise por HPLC

4.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias dos resultados da caracterização dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes tempos foram diferenciadas pelo teste de Tukey a 99% de confiança utilizando o software R. O perfil do espectro UV-Visível foi utilizado para a análise de componentes principais (PCA) com o intuito de diferenciar os tratamentos através do software R usando a biblioteca FactorMiner e o Ggplot2.

4.3 Resultados e Discussão

A busca por um modelo de extração prático e eficiente é um sistema contínuo nas avaliações de compostos fenólicos, onde vários parâmetros devem ser observados, além da influência do solvente há também a influência do tempo e da temperatura de extração (Carvalho et al., 2007).

A escolha da temperatura para a extração dos compostos fenólicos presentes no ponteiro de cana-de-açúcar foi determinada após os resultados obtidos na Tabela 5. Definido o etanol como o melhor solvente extrator, a temperatura de 50°C foi utilizada por ficar abaixo do ponto de ebulição do etanol (78,4°C), não interferindo assim na volatilização dos compostos fenólicos durante a extração e por estar de acordo com a pesquisa de Pinelo et al. (2005), que determina a faixa de temperatura entre 20 e 60°C para extração de compostos fenólicos de fontes vegetais.

A partir de então, os ponteiros de cana-de-açúcar em etanol foram submetidos a extrações em diferentes tempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas e 7 horas em banho-maria com agitação manual a 50°C. A escolha dos tempos de extração foi determinada com o objetivo de analisar a concentração de compostos fenólicos em longos períodos de tempo, visto que na literatura é muito comum a utilização apenas de curtos períodos de tempo para extração em fontes vegetais.

Após extração e *clean-up* dos extratos etanólicos de cinco tempos diferentes, foram realizadas as análises de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante *in vitro* DPPH° e TAC. Os resultados para essas análises encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Caracterização dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar quanto aos teores de compostos fenólicos, flavonoides, e atividade antioxidante in vitro, expressos como média± desvio padrão.

Extrato	Fenólicos (g L^{-1})	Flavonoides (g L^{-1})	DPPH° (%)	TAC (%)
1 hora	0,555±0,01[c]	1,19±0,1[b]	48±0,5[a]	30±0,4[b]
2 horas	0,712±0,02[b]	1,72±0,05[a]	44±0,9[b]	27±0,3[b]
3 horas	0,832±0,04[a]	1,96±0,03[a]	49±0,4[a]	41±0,1[a]
5 horas	0,567±0,01[c]	1,76±0,1[a]	47±1,5[ab]	33±0,3[ab]
7 horas	0,762±0,01[ab]	1,69±0,01[a]	47±1,2[ab]	28±0,2[b]

Médias de n=3 ± desvio padrão.
Letras iguais na vertical indicam não haver diferença estatística pelo Teste de Tukey a 1% de significância.

Observando o rendimento em ordem crescente dos tempos, é possível notar que houve aumento na concentração de compostos extraídos até o tempo 3 horas, variando as concentrações após esse tempo. Para o teor de fenólicos totais, o tempo 3 horas apresentou maior concentração (0,832±0,04 g L^{-1}). Assim como se observou para o teor de flavonoides totais, onde o tempo 1 hora apresentou menor concentração (1,19±0,1 g L^{-1}).

O tempo de extração pode afetar a recuperação dos compostos fenólicos, onde esse período deve variar de 1 minuto a 24 horas. Longos períodos de extração podem elevar a possibilidade de oxidação dos fenólicos, necessitando que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema (Shahidi e Naczk, 1995).

Em pesquisa com frutas vermelhas extraídas em metanol, etanol e água, em tempos de 1, 12 e 24 horas, Andreo et al. (2006) evidenciaram que na extração em água o teor de compostos fenólicos diminuiu com o passar do tempo, enquanto que com os solventes metanol e etanol houve o aumento do teor de compostos fenólicos com o passar do tempo.

Com o objetivo de otimizar a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva, Spigno et al. (2007) investigaram a cinética de extração de 1 a 24 horas a 45 e 60°C, e o efeito de solvente etanol com diferentes teores de água na produção e qualidade de fenóis e poder antioxidante. A extração foi um processo lento, com maiores rendimentos a 60°C do que a 45°C, e com degradação térmica aparente dos constituintes após 20 horas. A concentração de fenóis diminuiu para um teor de água acima de 50% do etanol. O poder antioxidante foi altamente correlacionado a concentração total de fenóis e não foi influenciado pelo teor de água do etanol, sugerindo que essa variável influenciou apenas a quantidade, mas não a natureza dos compostos extraídos.

O uso de altas temperaturas pode ser favorável para extração de fenólicos. O calor pode tornar as paredes celulares permeáveis aumentando a solubilidade e a taxa de difusão

dos compostos para o solvente, facilitando dessa forma a extração. Entretanto, a combinação de elevadas temperaturas de extração com longos períodos podem degradar os compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2014). A diminuição do teor de compostos fenólicos pode ser causada pelo próprio processo de extração, através da volatilização de compostos e da secagem que provoca degradação química e enzimática (ANDREO *et al*., 2006). De modo geral, para os teores de fenólicos totais e flavonoides totais, o tempo 1 hora foi o que apresentou o menor teor de extração para todas as análises e todos os tempos.

Para os resultados obtidos nos testes da atividade antioxidante DPPH° e TAC, observa-se que o porcentual antioxidante apresentado em ambas as análises variou entre os extratos analisados. No método utilizando o sequestro do radical livre DPPH°, o extrato 3 horas se destacou por apresentar o maior valor de atividade antioxidante, com um consumo de 49% do radical DPPH°. Para o método TAC o extrato 3 horas (41±0,1%) também apresentou maior valor de capacidade antioxidante quando comparado aos demais extratos. Apesar da variação de valores obtidos, as respostas aos métodos de capacidade antioxidante se mostraram positivos.

Através da análise dos espectros de varredura da região UV-Visível dos extratos etanólicos de ponteiro de cana-de-açúcar de diferentes tempos, feitos na faixa de 200-600 nm, para identificação do perfil de cada extrato, observa-se que há similaridade nos picos de absorbância próximos dos comprimentos na faixa de 260 - 470 nm, como pode ser observado na Figura 22.

Como já mencionado anteriormente, cada comprimento de onda é específico para cada grupo de compostos, temos: 280 nm para os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (ácido vanílico e ácido gálico) e para catequina e epicatequina (flavonóis) (TOALDO et al., 2015); 300 nm para ácido salicílico e ácido p-cumárico (VAN LEEUW *et al*., 2014); 320 para derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico e caféico) (TOALDO *et al*., 2015); e 360 nm para os flavonóis miricetina, quercetina e rutina (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010), o que sugere a presença de alguns desses compostos fenólicos nos extratos analisados.

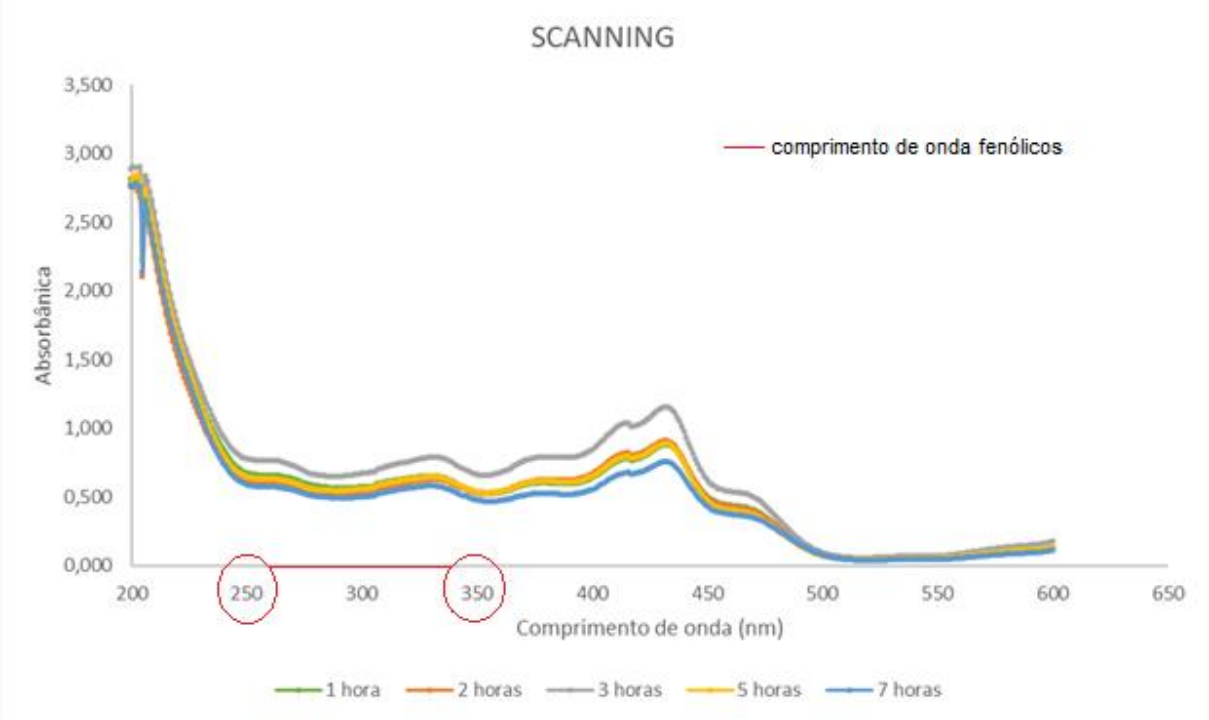

Figura 22: Espectros de absorção máxima em função do comprimento de onda dos extratos etanólicos do ponteiro de cana-de-açúcar nos tempos de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas e 7 horas

De acordo com a análise do comportamento dos espectros dos extratos é possível observar que não há diferença na composição dos compostos extraídos e sim na concentração desses compostos em cada extrato analisado. A partir dos comprimentos de onda obtidos pela análise de espectros de absorção, foi realizada a análise multivariada PCA, onde foi possível observar uma separação de 97,48% para os tempos utilizados. A partir dos espectros de absorção máxima, foi realizada a análise de fenólicos HPLC/DAD com o propósito de comprovar os perfis dos compostos extraídos. Foram analisados extratos etanólicos do ponteiro de cana-de-açúcar de três tempos distintos de extração: 1 hora (mínimo), 3 horas (intermediário) e 7 horas (máximo).

O espectro UV-Vis fornecido pelo DAD possibilita a detecção de uma ampla faixa de tipos de metabólitos e fornece dados sobre as classes desses metabólitos, através de espectro característico e absorbância máxima.

Os resultados das análises por HPLC dos extratos etanólicos de ponteiro de cana-de-açúcar indicam, através dos picos de concentração, a presença de cinco compostos fenólicos majoritários para os extratos. Dados espectrais de todos os picos dos extratos analisados foram acumulados na faixa de 200 – 400 nm. Na Tabela 7 são mostrados os tempos de retenção e a área para os compostos em cada um dos cinco picos majoritários referente aos tempos de extração analisados.

Tabela 7: Áreas das composições fenólicas dos extratos do ponteiro de cana-de-açúcar correspondentes aos cinco picos majoritários encontrados nos cromatogramas (Figura 23)

Extrato	1 (Rt: 10.7 min)	2 (Rt: 11.7 min)	3 (Rt: 21.2 min)	4 (Rt: 26.4 min)	5 (Rt: 34.9 min)
1 hora	67.764	47.335	116.218	56.103	75.344
3 horas	81.898	56.674	131.688	65.223	106.190
7 horas	95.290	45.726	156.530	68.184	88.202

Analisando os resultados nota-se que houve similaridade nos cinco picos majoritários pois apresentaram o mesmo tempo de retenção (Rt), ou seja, para cada um dos três extratos analisados a identificação dos picos dos compostos ocorreram no mesmo tempo. Entretanto, observa-se diferença entre as áreas dos picos majoritários para cada tempo de extração utilizado. Quando feita a análise dos tempos em relação aos Picos obtidos, o extrato 7 horas apresentou as maiores áreas (Picos 1, 3 e 4) indicando aumento desses compostos no extrato durante a extração, independente da sua concentração. Já o extrato de 1 hora apresentou as menores áreas (Picos 1, 3, 4 e 5), indicando assim baixa extração dos compostos presentes nesse extrato.

O Pico 3 possui maior área para os três extratos analisados. Para o extrato de 7 horas, o Pico 3 representa 11,14% da área total de todos os picos encontrados para esse extrato, no extrato de 3 horas, o pico 3 representa 10,3% da área total de todos os picos encontrados para esse extrato e para o extrato 1, o pico 3 representa 10,7% da área total de todos os picos. Essas porcentagens indicam que esse composto provavelmente é o que se tem em maior quantidade nos extratos etanólicos do ponteiro de cana-de-açúcar.

Em estudos, Abbas *et al.*, (2014), caracterizaram o perfil fenólico de folhas de cana-de-açúcar por HPLC/DAD, utilizando como fase móvel ácido acético 2% e metanol. Os resultados revelaram a presença de vários compostos fenólicos, indicados em 12 picos majoritários, sendo eles: ácido gálico (Rt: 10.97 min, pico 1) catequina (Rt: 16.03 min, pico 2), ácido clorogênico (Rt: 19.56 min, pico 3), ácido caféico (Rt: 22.17 min, pico 4), ácido ferúlico (Rt: 24.13 min, pico 5), epicatequina (Rt: 28.04 min, pico 6), ácido elágico (Rt: 32.17 min, pico 7), ácido cumárico (Rt: 36.17 min, pico 8); rutina (Rt: 38.11 min, pico 9), quercitrina (Rt: 41.05 min, pico 10), isoquecitrina (Rt: 43.39 min, pico 11) e quercetina (Rt: 47.83 min, pico 12). Onde o composto de maior área é observado no pico 5.

Nas Figuras 23, 24 e 25 encontram-se os perfis cromatográficos dos extratos 1 hora, 3 horas e 7 horas de extração com seus respectivos espectros juntamente com os espectros dos cinco picos majoritários encontrados em cada extrato.

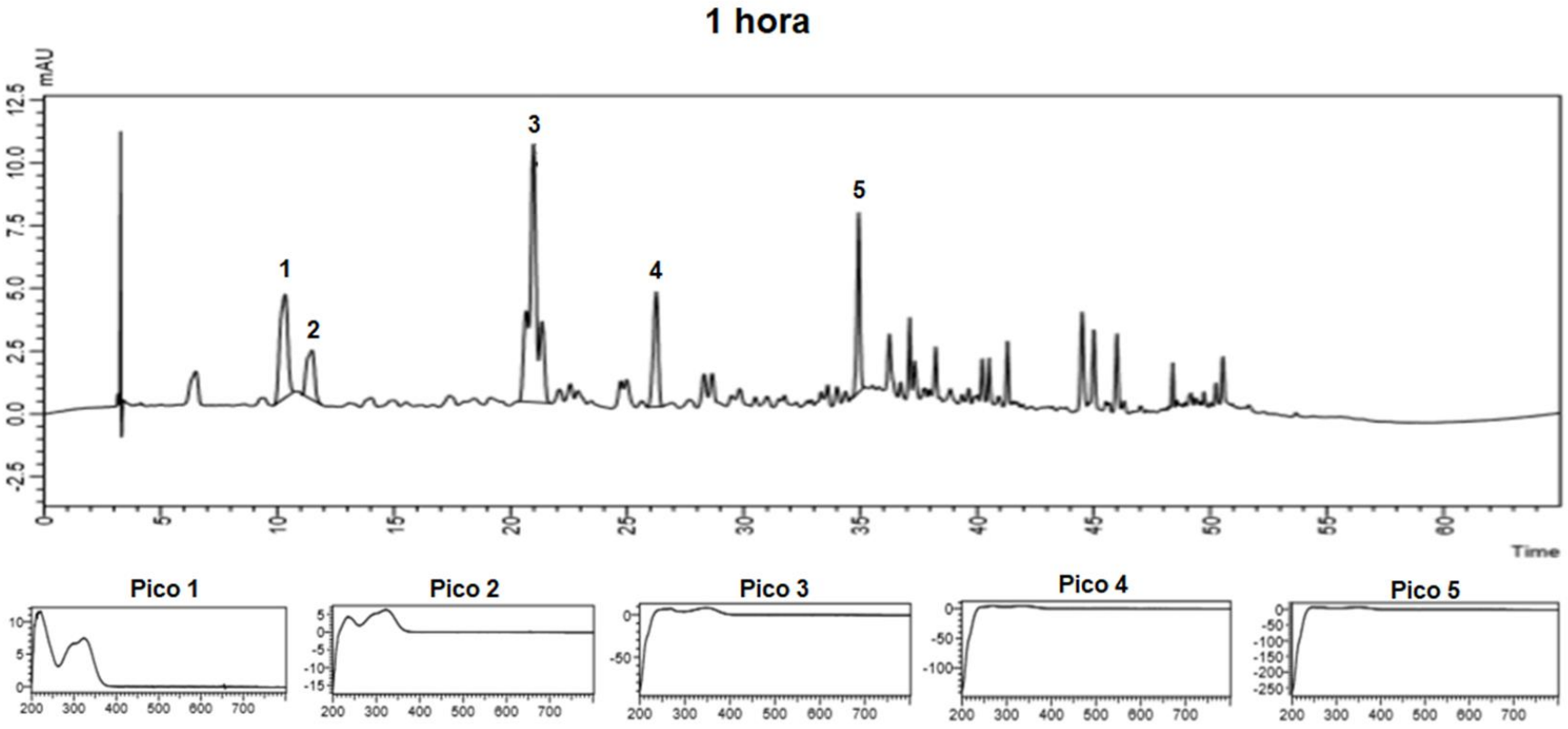

Figura 23: Perfil cromatográfico referente ao tempo 1 hora de extração do extrato do ponteiro de cana-de-açúcar e seus respectivos espetros dos picos majoritários

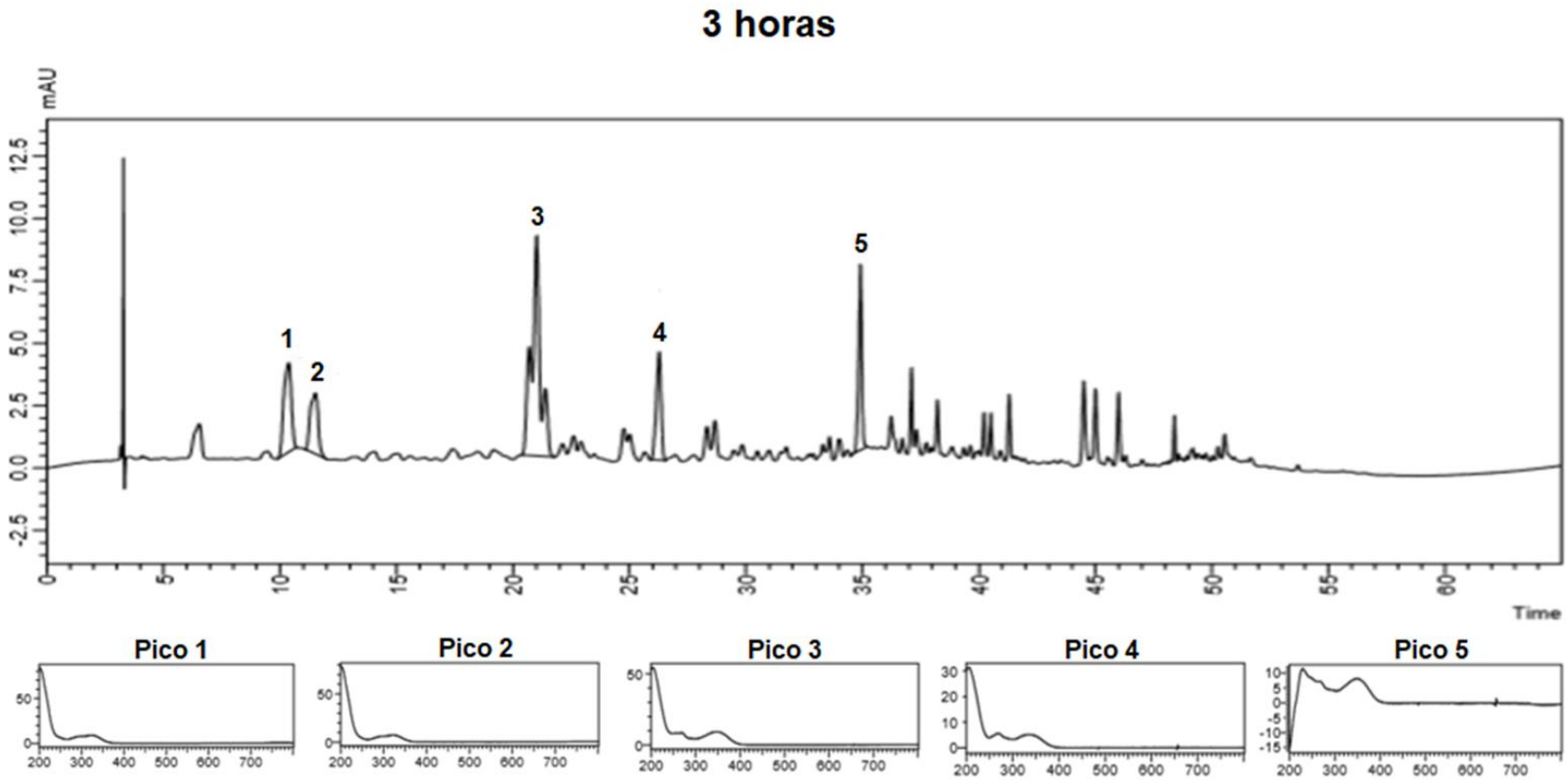

Figura 24: Perfil cromatográfico referente ao tempo 3 horas de extração do extrato do ponteiro de cana-de-açúcar e seus respectivos espetros dos picos majoritários

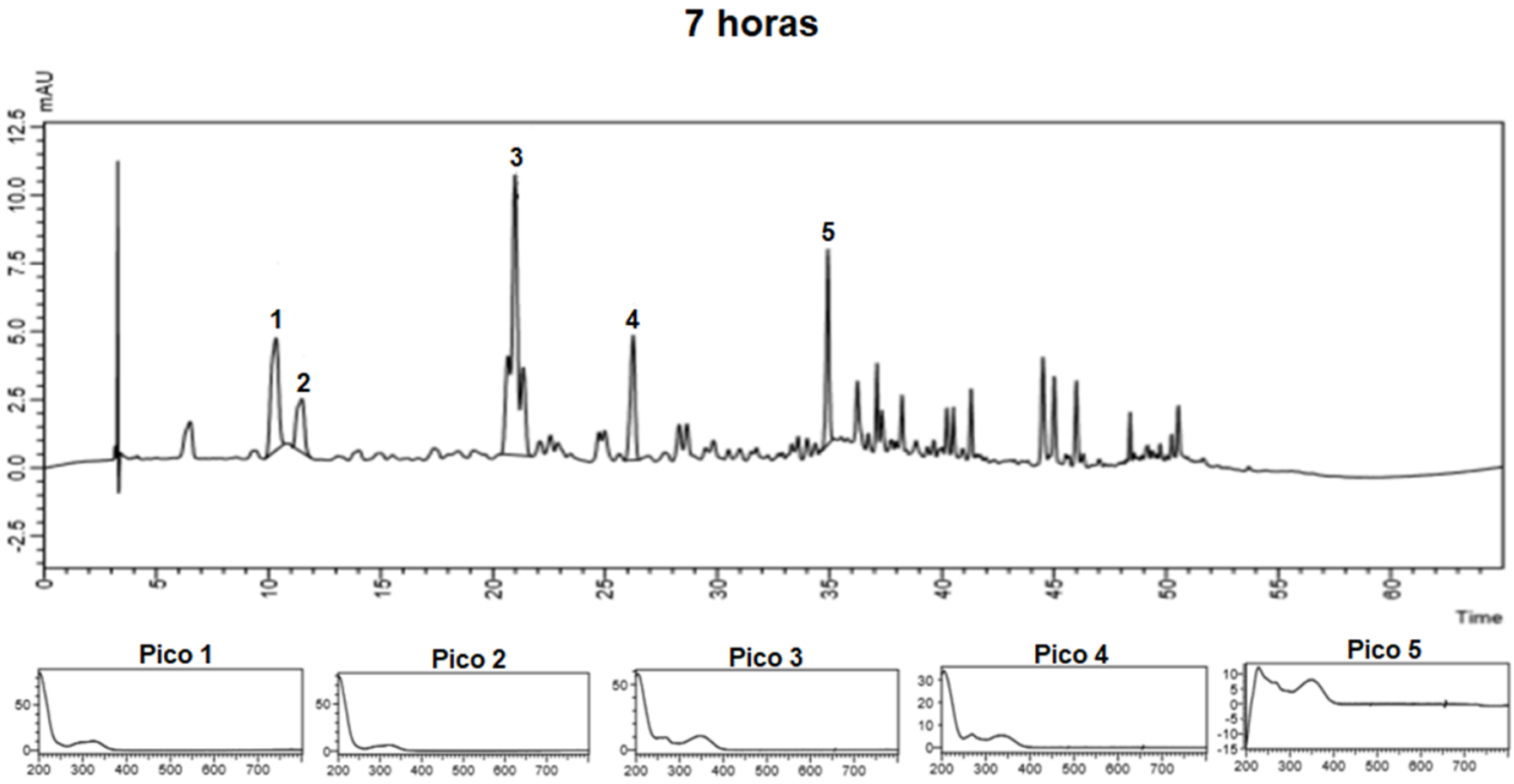

Figura 24: Perfil cromatográfico referente ao tempo 7 horas de extração do extrato do ponteiro de cana-de-açúcar e seus respectivos espetros dos picos majoritários

Embora a análise por HPLC tenha detectado picos majoritários de compostos fenólicos presentes em cada extrato, após análise dos perfis cromatográficos, pode-se notar que esses picos estão com valores muito baixos, tanto que os perfis dos espectros não ficaram elucidativos, mostrando que a avaliação do método não foi eficiente. Isso pode ter ocorrido devido à baixa concentração dos extratos analisados.

A diferença existente entre os métodos de quantificação por HPLC e por espectrofotômetro é o tipo de compostos fenólicos que será quantificado. Em análises por HPLC é feita somente a quantificação de compostos fenólicos simples enquanto por espectrofotômetro é feita a quantificação de compostos fenólicos de cadeias longas (> C_{18}). Diferenças no teor de compostos fenólicos extraídos para os tempos 3 e 7 horas podem ser observadas para essas duas análises. Na quantificação por espectrofotômetro, o teor de compostos fenólicos foi maior para o tempo 3 horas, enquanto na quantificação por HPLC o tempo 7 horas apresentou as maiores áreas para os compostos extraídos.

Os resultados mostram que o tempo de extração pode ser significativo. A explicação é dada pelo favorecimento da ação física, que provoca a agitação das moléculas do solvente, aumentando a energia do meio e consequentemente a produção de calor. O conjunto desses fatores, associados a um tempo prolongado de extração, podem favorecer a liberação de compostos bioativos aderidos na matriz vegetal , como também a quebra de ligações moleculares, disponibilizando, como por exemplo, compostos fenólicos, onde após a quebra da cadeia longa ocorre a formação de ácidos fenólicos de cadeia simples que se tornam mais disponíveis (CROFT, 1998; LIMA, 2012). Desse modo, pode-se explicar as maiores áreas de alguns picos majoritários para o tempo 7 horas na análise por HPLC.

4.4 Conclusões

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

A utilização de diferentes tempos no processo de extração dos compostos fenólicos do ponteiro da cana-de-açúcar foi um parâmetro importante para se detectar o índice de variação nos extratos.

Os conteúdos de fenólicos e flavonóides totais, no extrato durante 1 hora foi o que apresentou os menores resultados, pelas análises por espectrofotômetro e HPLC.

Na quantificação por HPLC o tempo de 7 horas apresentou as maiores áreas dos compostos extraídos.

As análises de atividade antioxidante *in vitro* DPPH° e TAC apresentaram resultados positivos em todos os extratos analisados.

Referências

ABBAS, S. R.; SABIR, M. S.; AHMAD, S. D.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Food Chemistry. v. 147, p. 10 - 16, 2014.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração**. - B. CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). Farmacognosia da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acidsa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 435 - 442, 1998.

HERRERO, M.; ÁLVAREZ, P. J. M.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, n. 93, p. 417–423, 2005.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.** v. 33, n. 2, p. 213 - 217, 1985.

LIMA, C.P.; CUNICO, M.M.; MIYAZAKI, C.M.S.; MIGUEL, O.G.; CÔCCO, L.C.; YAMAMOTO, C.I.; MIGUEL, M.D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (Euterpe edulisMartius). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n. 2, p. 321 - 326, 2012.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultravioleta spectral analysis of flavonoids. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer – Verlag. p. 33 – 36. 1970.

OLIVEIRA, D. S. Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2014.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J.; Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111 - 2117, 2005.

PRIETO. P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenium complex:specific aplication to the determination of vitamin E. **Analitycal Biochemistry**, n. 269, p. 337 - 341, 1999.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da capacidade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127. p. 1 – 4, 2007.

SARI, R. Otimização da extração de compostos fenólicos e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano das folhas de (Tabernaemontana catharinensis). 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L. R.; REIS, S. L. R.; SILVA, A. M. O.; COSTA, A. M.; MANCINI FILHO, J. Influência das variáveis solvente, temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais em sementes de maracujá gerada no processamento industrial. Nutrire, São Paulo, v. 38, p. 75, 2013.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolic compounds in cereals and legumes. In: Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. **Technomic Publ. Co. Inc.**, Lancaster. p. 331, 1995.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERO, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics**. Journal of Food Engineering,** Amsterdam, v. 81, p. 200 - 208, 2007.

STALIKAS C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonóides. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268 - 3295, 2007.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. L.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L.; CUNHA, H. P.; SILVA, E. L.; BORDIGNON, M. T. Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipidperoxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, n. 173, p. 527 - 535, 2015.

VAN LEEUW, R.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMESB, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 36, p. 40 - 50, 2014.

VILA, F.C. Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar. São Paulo. p. 36 Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.

XU, B. J.; CHANG, S. K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v.72, p. 159 - 166, 2007.

WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, p. 134 - 140, 2010.