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

Extração, determinação da composição fenólica e avaliação do potencial de desativação de espécies reativas de oxigênio e da atividade anti-inflamatória de resíduos de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino

Keityane Boone Bergamaschi

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

**Piracicaba
2016**

Keityane Boone Bergamaschi
Bacharel em Medicina Veterinária

**Extração, determinação da composição fenólica e avaliação do potencial de
desativação de espécies reativas de oxigênio e da atividade anti-inflamatória de
resíduos de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Bergamaschi, Keityane Boone

Extração, determinação da composição fenólica e avaliação do potencial de desativação de espécies reativas de oxigênio e da atividade anti-inflamatória de resíduos de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino / Keityane Boone Bergamaschi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
127 p. : il.

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

1. Resíduos agroindustriais 2. Metodologia de superfície de resposta 3. Compostos fenólicos 4. Atividade antioxidante 5. Atividade anti-inflamatória I. Título

CDD 664.805659
B493e

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

Ao meu esposo Pedro e meu filho Luiz Gustavo, meus grandes amores e pilares

OFEREÇO

Aos meus queridos pais Luiz e Adália, por todo apoio e amor incondicional

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á Deus por ter me dado força e a oportunidade superar as dificuldades, e com sua grandeza me auxiliou em todos os momentos.

Ao professor Dr. Severino Matias de Alencar, pela oportunidade de realização deste trabalho, por todo suporte oferecido e por sua grande amizade.

Á Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ-USP, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a minha formação.

Aos meus pais Luiz e Adália, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido esposo Pedro que me apoiou incondicionalmente nesta jornada, momentos difíceis, mas que com carinho e amor foram superados.

Ao meu filho Luiz Gustavo “Guga” minha maior riqueza esteve comigo na parte prática do doutorado e na escrita, posso dizer que este trabalho foi realizado em dupla.

Ao meu irmão Flaulles, meu sobrinho João e minha cunhada Eliane que mesmo longe me ofereceram apoio.

Ao casal João e Guia, cunhado e cunhada, padrinho e madrinha, amigo e amiga, compadre e comadre, que ofereceram seu carinho e amizade desde o primeiro dia em que nos conhecemos, o grande apoio nos momentos felizes e nos momentos difíceis e que difíceis, o apoio foi incondicional.

Ao casal Adão e Ercília, sogro e sogra, pelo apoio oferecido em todos os momentos e pelo grande carinho.

A Letícia sobrinha linda uma carinho imenso.

Aos sobrinhos Maria Clara, Filipe e Manoel Henrique, que apesar de estar longe à torcida sempre foi grande.

As cunhadas Solange, Paz e Ní pelo imenso carinho.

As meninas do Laboratório de Bioquímica e Análise instrumental da ESALQ-USP grandes mestres e doutoras Priscilla, Ana Paula, Adna, Ivani, Luciana, Tatiane, Juliana, Heloísa, Lucimara, Maria Augusta, Valéria, uma amizade linda que se formou ao longo dos anos, me acolheram com tanto carinho, só tenho a agradecer.

Aos amigos e padrinhos Ivani e Roberto, pela amizade e pelo carinho com a minha família.

A professora Dra. Rosangela “mãe” uma amiga que me ajudou e esteve comigo em um momento muito difícil de minha vida, me ajudando com todo seu carinho a vencer o obstáculo.

Aos professores e pós-docs Margarida, Gilberto e Luciana Ferracini, pessoas lindas e que contribuíram com a felicidade e alegria do laboratório.

A professora Dra. Carmen pelo carinho e amizade, e por ceder o laboratório para a realização de parte do trabalho.

A professora Dra. Thais pela colaboração na parte de estatística.

Ao Dr. Jair que ajudou na realização de parte deste trabalho, o meu muito obrigado.

Ao Professor Dr. Pedro Rosalen e a Dra Carina Denny (Universidade Estadual de Campinas - FOP) pela análise de atividade anti-inflamatória dos resíduos.

As indústrias de alimentos, CAP Agroindustrial e a Empresa Agrorosa, pela disposição em fornecer o material para o estudo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	21
1.1.1 Objetivo geral.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
Referências.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Caracterização dos resíduos agroindustriais.....	27
2.1.1 Película de amendoim.....	27
2.1.2 Resíduo de pimenta-rosa.....	28
2.1.3 Resíduo de pimenta-do-reino.....	29
2.2 Antioxidantes naturais.....	30
2.2.1 Compostos fenólicos.....	32
2.2.2 Formação das espécies reativas de oxigênio.....	36
2.2.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	37
2.2.4 Otimização da extração dos compostos bioativos.....	43
Referências.....	44
3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: PELÍCULA DE AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	55
3.1 Introdução.....	56
3.2 Material e Métodos.....	58
3.2.1 Coleta das amostras.....	58
3.2.2 Extração convencional: influência da temperatura e do tempo de extração na concentração de atividade antioxidante.....	59
3.2.3 Extração Subcrítica: influência da temperatura e da pressão na concentração de atividade antioxidante.....	60

3.2.4 Otimização das condições de extração de compostos bioativos pela metodologia de superfície de resposta.....	60
3.2.5 Atividade sequestrante do radical livre ABTS ^{•+}	63
3.3 Resultados e Discussão.....	63
3.3.1 Extrações selecionadas no processo de otimização.....	63
3.3.2 Sequestro do radical livre [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (ABTS ^{•+}).....	64
3.3.3 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da película de amendoim IAC886 e IAC505).....	65
3.3.4 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da pimenta-rosa.....	73
3.3.5 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da pimenta-do-reino.....	77
3.4 Conclusões.....	82
Referências.....	82
4 POTENCIAL ANTIRADICAL DE EXTRATOS DE RESÍDUOS DE AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO OBTIDOS POR DIFERENTES SISTEMAS DE SOLVENTES.....	87
Resumo.....	87
Abstract.....	87
4.1 Introdução.....	88
4.2 Material e Métodos.....	90
4.2.1 Coleta das amostras.....	90
4.2.2 Preparo das amostras.....	90
4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos nas condições selecionadas.....	91
4.2.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu.....	91
4.2.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	91
4.2.3.3 Capacidade sequestrante do radical peroxila.....	92
4.2.3.4 Capacidade sequestrante do radical ânion superóxido.....	92
4.2.3.5 Capacidade sequestrante do radical hipocloroso.....	93
4.2.3.6 Análise estatística.....	93
4.3 Resultados e Discussão.....	94
4.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu.....	94

4.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	96
4.3.3 Capacidade de Absorção de Radicais do Oxigênio.....	98
4.3.4 Capacidade desativação do ânion superóxido e ácido hipocloroso.....	99
4.3.5 Análise de agrupamento (“cluster”).....	101
4.4 Conclusões.....	102
Referências.....	102
5 COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS RESÍDUOS DE AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO.....	107
Resumo.....	107
Abstract.....	107
5.1 Introdução.....	108
5.2 Material e Métodos.....	110
5.2.1 Coleta das amostras.....	110
5.2.2 Preparo das amostras.....	110
5.2.3 Análises cromatográficas.....	111
5.2.3.1 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS).....	111
5.2.3.2 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC-MS).....	111
5.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (HPLC-RP).....	112
5.2.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	112
5.2.4.1 Crescimento celular.....	112
5.2.4.2 Viabilidade celular.....	113
5.2.4.3 Determinação da produção de TNF- α	113
5.2.4.4 Determinação da produção de óxido nítrico.....	113
5.3 Resultados e Discussão.....	114
5.3.1 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC-MS).....	114
5.3.2 Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (HPLC-RP).....	117
5.3.3 Atividade citotóxica e quantificação de TNF- α em produção de células RAW 264.7.....	120
5.4 Conclusões.....	122
Referências.....	122

RESUMO

Extração, determinação da composição fenólica e avaliação do potencial de desativação de espécies reativas de oxigênio e da atividade anti-inflamatória de resíduos de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino

O setor agroindustrial tem se expandido muito nos últimos anos, levando o país a um aumento na geração de resíduos agroindustriais, sendo que a maior parte deles ainda é descartada no meio ambiente, sem tratamento adequado, ou utilizada na alimentação animal, destinos que *a priori*, não geram ganhos econômicos para a agroindústria além de representarem gargalos logísticos e ambientais na sua disposição. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos otimizar o processo de extração de compostos bioativos, avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, por meio da desativação de espécies reativas de oxigênio, e anti-inflamatória, bem como determinar a composição fenólica dos resíduos agroindustriais a saber: película de amendoim (*Arachis hypogaea*) (cultivares IAC886 e IAC505), pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e pimenta-do-reino (*Piper Nigrum* L). O processo de otimização da extração de compostos antioxidantes foi realizado utilizando dois processos de extração, extração convencional e subcrítica, em delineamento composto central rotacional, utilizando como variáveis a temperatura e tempo e a pressão e temperatura, respectivamente, com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%. Durante o processo de otimização a atividade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro do radical ABTS. Os melhores resultados foram obtidos para a extração convencional com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%. A película de amendoim (IAC505) apresentou as maiores atividades antioxidantes (1.396,67, 580,44 e 859,89 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ em equivalentes de trolox, para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, respectivamente). A partir dos resultados obtidos para os solventes testados, utilizando a extração convencional, foram feitas outras análises de atividade antioxidante considerando o tempo e temperatura ideal de extração. Foram realizadas análises de avaliação da capacidade de redução de Folin-Ciocalteu e potencial de desativação dos radicais livres sintéticos (DPPH e ABTS) e espécies reativas de oxigênio (radicais peroxila, superóxido e ácido hipocloroso). O solvente de extração que apresentou melhores resultados em todos os ensaios foi o etanol 80%, sendo, portanto o solvente utilizado nas análises subsequentes. A partir da definição do melhor sistema extrator foram realizadas análises da composição fenólica, por meio das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (HPLC-RP), cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS), e avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória. Foram identificados nos resíduos estudados procianidinas B1 e B2, ácido *p*-cumárico, miricetina, ácido ferúlico, ácido sirínico, ácido sinápico, epicatequina e catequina. A pimenta-do-reino diminuiu significativamente os níveis de TNF- α e nitritos, reduzindo assim o processo inflamatório gerado. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que estes resíduos agroindústrias possuem grande potencial biológico, podendo assim ser melhores aproveitados tanto pela indústria de alimentos quanto pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; Metodologia de superfície de resposta; Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Atividade anti-inflamatória

ABSTRACT

Extraction, determine the phenolic composition and assessment of the potential deactivation of reactive oxygen species and anti-inflammatory activity of residue peanut skin, pink pepper and black pepper

The agribusiness sector has expanded greatly in recent years, leading the country to an increase in the generation of agro-industrial residues, even though most of them are still discarded in the environment without proper treatment, or used in animal feed, destinations that *a priori* do not generate economic gains for agribusiness besides representing logistical and environmental bottlenecks at your disposal. In this sense, the present study aimed to optimize the bioactive compounds extraction process, to evaluate *in vitro* the antioxidant activities, through the deactivation of reactive oxygen species, and anti-inflammatory as well as determine the phenolic composition of agro-industrial residues namely peanut skin (*Arachis hypogaea*) (IAC886 and IAC505 cultivars), pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and black pepper (*Piper nigrum* L). The optimization process of extraction of antioxidants was performed using two extraction processes, conventional extraction and subcritical on central composite design, using as variable temperature and time and the pressure and temperature, respectively, with solvents ethanol 80%, water and propyleneglycol 80%. During the optimization process the antioxidant activity was evaluated for the kidnapping method of ABTS radical. The best results were obtained for the conventional extraction with solvents ethanol 80%, water and propyleneglycol 80%. Peanut skin (IAC505) showed the highest antioxidant activity (1,396.67, 580.44 and 859.89 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ in Trolox equivalents, for solvents ethanol 80%, water and propyleneglycol 80%, respectively). From the results obtained for the solvents tested, using conventional extraction, other analyzes were done considering the antioxidant activity optimum time and temperature of extraction. Valuation analyzes were carried out of the Folin-Ciocalteu reduction capability and potential disabling of synthetic free radical (DPPH and ABTS) and reactive oxygen species (peroxyl radicals, superoxide and hypochlorous acid). The extraction solvent that showed better results in all tests was ethanol 80%, and therefore the solvent used in subsequent analyzes. From the definition of the best extraction system analyzes were made of phenolic composition by means of liquid chromatography techniques of high efficiency in analytic way (HPLC-RP), gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), and reviewed *in vitro* anti-inflammatory activity. They were identified at residues studied procyanidins B1 and B2, *p*-coumaric acid, myricetin, ferulic acid, syringic acid, sinapic acid, epicatechin, and catechin. The black pepper significantly reduces TNF- α and nitrite levels, thereby reducing the inflammatory process generated. The results of this study demonstrate that these agribusinesses waste have great biological potential, and thus can be best availed by both the food industry and the pharmaceutical industry.

Keywords: Agro-industrial waste; Response surface methodology; Phenolic compounds; Antioxidant activity; Anti-inflammatory activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Produção de amendoim no Brasil.....	27
Figura 2 -	Estrutura química de um fenol simples.....	33
Figura 3-	Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido protocatéquico (b).....	34
Figura 4	Estruturas química do ácido ferúlico (a), ácido caféico (b) e ácido <i>o</i> -cumárico (c).....	35
Figura 5	Estrutura química das cumarinas.....	35
Figura 6 -	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	39
Figura 7 -	Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio.....	40
Figura 8 -	Aspecto dos resíduos coletados. (A) Película de amendoim IAC886, (B) Película de amendoim IAC505, (C) Resíduo de pimenta-rosa e (D) Resíduo de pimenta-do-reino.....	59
Figura 9 -	Gráficos de superfície de resposta do resíduo de película de amendoim IAC886. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%.....	71
Figura 10-	Gráficos de superfície de resposta do resíduo de película de amendoim IAC505. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%.....	72
Figura 11-	Gráficos de superfície de resposta do resíduo de pimenta-rosa. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%.....	76
Figura 12-	Gráficos de superfície de resposta do resíduo de pimenta-do-reino. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade	

	antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%.....	81
Figura 13-	Dendograma de agrupamento hierárquico por similaridade obtido através das análises de compostos fenólicos, DPPH, ABTS e ORAC dos resíduos de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa (P. Rosa) e pimenta-do-reino (P. Reino) nos solvente água (A), etanol 80% (E) e propilenoglicol 80% (P).....	101
Figura 14-	Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de película de amendoim IAC886 (A) e IAC505 (B).....	118
Figura 15-	Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de pimenta-rosa.....	119
Figura 16-	Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de pimenta-do-reino.....	119
Figura 17-	Efeito dos extratos de Pimenta-rosa, Pimenta-do-reino e película de amendoim IAC505 e IAC886 sobre a produção de TNF- α (A) e de nitritos (B) por estimulação com LPS. O sobrenadante da cultura foi analisado para TNF- α e produção de nitrito. Como controle, as células foram incubadas somente com o veículo. Os dados representam a média $\pm$ SE de valores em duplicata de três determinações de experimentos independentes. * p <0,01 foi calculado a partir de comparações com o LPS-estimulação, **p <0,05 foi calculado a partir de comparações com o LPS-estimulação e os valores das amostras e os valores das amostras. # p <0,01 foi calculado a partir de comparações com os valores LPS-estimulação e os controles (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Resíduos de película de amendoim IAC886 e IAC505, resíduo de pimenta-rosa e pimenta-do-reino.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis das variáveis independentes estudadas no processo de extração de antioxidantes.....	61
Tabela 2 -	Delineamento composto central rotacional, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na atividade antioxidante, pela extração convencional.....	62
Tabela 3 -	Delineamento composto central rotacional, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na atividade antioxidante pela extração subcrítica.....	62
Tabela 4 -	Atividade antioxidante de extratos de resíduos agroindustriais pelo método de sequestro do radical livre ABTS ^{•+}	64
Tabela 5 -	Resposta da atividade sequestrante do radical livre ABTS ^{•+} (μmol trolox.g ⁻¹) dos extratos da película de amendoim (IAC886 e IAC505), extração convencional e subcrítica.....	66
Tabela 6 -	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de película de amendoim IAC886.....	68
Tabela 7 -	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de película de amendoim IAC505.....	69
Tabela 8 -	Resposta de atividade sequestrante do radical livre ABTS ^{•+} dos extratos de pimenta-rosa, extração convencional e subcrítica.....	73
Tabela 9 -	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de pimenta-rosa.....	74
Tabela 10 -	Resposta de atividade sequestrante do radical livre ABTS ^{•+} dos extratos de pimenta-do-reino extração convencional e subcrítica.....	77
Tabela 11 -	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de pimenta-do-reino.....	79

Tabela 12 -	Capacidade redutora dos extratos resíduos agroindustriais – método Folin-Ciocalteau.....	94
Tabela 13 -	Atividade antioxidante de extratos de resíduos agroindustriais pelo método de sequestro do radical livre DPPH.....	97
Tabela 14 -	Desativação do radical peroxila pelo método da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	98
Tabela 15 -	Capacidade desativação do ânion superóxido e ácido hipocloroso dos extratos de resíduos agroindustriais obtidos com etanol 80%.....	100
Tabela 16 -	Tempos de retenção, porcentagem de cada componente e íons do espectro de massa dos compostos fenólicos silanizados identificados nos extratos dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e 505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos através da técnica de GC-MS.....	116

1 INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial tem se expandido muito nos últimos anos, levando o país a um aumento na geração de resíduos agroindustriais. A maior parte deles é descartada no meio ambiente, sem tratamento adequado, ou utilizada na alimentação animal, destinos que a priori, não geram ganhos econômicos para a agroindústria além de representarem gargalos logísticos e ambientais na sua disposição (YI et al., 2009). Nas últimas décadas a população mundial cresceu de maneira acentuada, aumentando também o interesse por estudos que proporcionem um melhor aproveitamento dos alimentos, visando à maximização dos recursos alimentícios, além da sustentabilidade do sistema agroindustrial produtivo (SANTOS, 2014).

Atualmente tem aumentado muito o interesse por antioxidantes naturais de extratos vegetais. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno), PG (galato de propila) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade, pois podem estar envolvidos em muitos riscos à saúde, incluindo câncer (MOHDALY et al., 2010; BREWER, 2011). Extratos de frutas, vegetais, cereais, sementes e seus resíduos são fontes potenciais de antioxidantes naturais, tais como o ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos (ALVES et al., 2010). Além dos antioxidantes endógenos (enzimas antioxidantes), o organismo também utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos. Estudos epidemiológicos, clínicos e de intervenção, demonstram, cada vez mais, evidências de que os antioxidantes podem prevenir ou diminuir o desenvolvimento de muitas doenças (BARREIROS; DAVID, 2006; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Além disso, tem sido demonstrado que os antioxidantes naturais têm uma ação importante na proteção enzimática e não enzimática contra a toxicidade induzida pelo estresse oxidativo (BREWER, 2011). O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos (VASCONCELOS et al., 2007), tais como tecido muscular e adiposo e células do fígado (GOLDFARB, 1993), tecido vascular (FENSTER et al., 2002) e tecido cerebral (KEYNES; GARTHWAITE, 2004). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, o que é função da idade, estado fisiológico e dieta (SHAMI; MOREIRA, 2004).

A literatura especializada tem demonstrado benefícios à saúde associados ao consumo de amendoim, incluindo a prevenção contra doenças cardiovasculares (FELDMAN, 1999), proteção contra o mal de Alzheimer e inibição de câncer (AWAD et al., 2000). Estes benefícios têm sido atribuídos principalmente ao fato do amendoim ser rico em ácidos graxos mono e poli-insaturados (KRIS-ETHERTON et al., 1999; BALLARD et al., 2009) e fitoquímicos, tais como resveratrol e outros compostos fenólicos (SOBOLEV; COLE, 1999; SANDERS; MCMICHAEL; HENDRIX, 2000).

Diante do exposto verifica-se que as partes dos vegetais desprezadas podem ser fontes de antioxidantes naturais, agindo isoladamente ou em sinergismo, na prevenção dos efeitos dos radicais livres no organismo e na deterioração oxidativa em alimentos (BALLARD et al., 2010). Dessa forma, muitos subprodutos de origem agroindustrial que contêm compostos bioativos com potencial aplicação como antioxidantes em alimentos (DENG et al., 2012), também podem apresentar atividade anti-inflamatória (DABAS et al., 2013), atividade antibacteriana (NAGARAJ et al., 2010), antiviral, anticancerígena e antialérgica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Nepote, Grosso e Guzman (2002) verificaram que a película de amendoim contém aproximadamente 150 mg de fenólicos totais por grama de matéria seca e desengordurada. Em outro estudo, Bergamaschi (2010) avaliou diferentes resíduos produzidos por agroindústrias de alimentos no Estado de São Paulo e encontrou altos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante no extrato etanólico e aquoso da película de amendoim. Dentre os compostos fenólicos já identificados na película de amendoim, seis pertencem a família das procianidinas do tipo A (LOU et al., 2004; CHUKWUMAH et al., 2012). Resultado semelhante foi observado por Oldoni et al. (2016), que também isolaram e identificaram duas procianidinas com atividade antioxidante. Os compostos encontrados na película de amendoim, dependendo da cultivar, podem apresentar propriedades farmacológicas como atividade antialérgica (WHITE et al., 2013), atividade anti-inflamatória (TATSUNO et al., 2012) e propriedades hipolipemiantes (BANSODE et al., 2014).

A pimenta-rosa é um dos mais nobres condimentos utilizados na culinária mundial e, seu consumo vem sendo estimulado desde a década de 80, principalmente em função da presença de substâncias fenólicas. As partes que apresentam propriedades biológicas são as cascas, as folhas e os frutos, tendo já sido encontradas as seguintes atividades biológicas: antidiarreica e anti-inflamatória (AMORIM; SANTOS, 2003; ROSAS et al., 2015), cicatrizante (LUCENA et al., 2006; LIPINSKI, 2008), antibacteriana (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005; SANTOS, 2007) e antifúngica (SANTOS et al., 2010). A

análise química revelou a presença de alto teor de tanino, biflavonoides e ácidos triterpênicos nas cascas e até 5% de óleo essencial formado por mono e sequiterpenos nos frutos e nas folhas (LORENZI; MATOS, 2008).

Os estudos fitoquímicos realizados com pimenta-do-reino ao longo das últimas décadas revelaram uma ampla variedade de metabólitos presentes nesta espécie, os quais se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcalóides, propenilfenóis, lignanas, neolignana, terpenos, flavonas dentre outros compostos, dos quais alguns são encontrados apenas nesta espécie (PARMAR et al., 1997). Estudos recentes com o gênero *Piper* demonstram forte ação contra os radicais livres e inibição do desenvolvimento da aterosclerose (AGBOR et al., 2012).

Os extratos de pimenta-do-reino têm sido também utilizados na medicina tradicional Chinesa para o tratamento de doenças reumáticas e de patologias do aparelho respiratório. Estudos prévios sugerem que estes extratos possuem constituintes com propriedades inibitórias frente à enzima ciclooxigenase-1, importante para a formação de prostaglandinas cuja relevância é mediar o desenvolvimento de processos inflamatórios, como o reumatismo (GEITZ et al., 1997). Saha e Verma (2015) evidenciaram que extratos do gênero *Piper* constituídas de amidas/alcalóides, principalmente de piperina, são promissores na inibição das enzimas ciclooxigenase-1 e lipoxigenase-5, fundamentais para o metabolismo do ácido araquidônico. A enzima lipoxigenase-5 é responsável pela formação de leucotrienos pro-inflamatórios.

Neste sentido, o estudo da otimização da extração de compostos bioativos, a avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, por meio da desativação de espécies reativas de oxigênio, e anti-inflamatória, bem como a composição química desses resíduos, tornam-se ferramentas essenciais para uma efetiva caracterização bioativa desses produtos naturais. A partir dos resultados obtidos espera-se criar subsídios para a reinserção destes resíduos, por meio da obtenção de extratos bioativos, que possam ser utilizados pelas indústrias de alimentos e farmacêutica.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo otimizar o processo de extração por meio da captura do radical livre ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico) e avaliação *in*

vitro de atividades antioxidantes e anti-inflamatória, bem como a composição química de três resíduos agroindustriais a saber: película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).

1.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar o processo de extração e seleção dos solventes por meio de dois tipos de extração: convencional e subcrítica, através da captura do radical livre ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico);
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos resíduos agroindustriais frente a radicais sintéticos e espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* frente à inibição da citocinina TNF- α e produção de óxido nítrico;
- Caracterização dos compostos fenólicos por meio de técnicas cromatográficas.

Referências

- AGBOR, G.A.; VINSON, J.A.; SORTINO, J.; JOHNSON, R. Antioxidant and antiatherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 64, n. 4, p. 387-391, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIN, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- AWAD, A.B.; CHAN, K.C.; DOWNIE, A.C.; FINK, C.S. Peanuts as a source of B-sitosterol, a sterol with anticancer properties. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 36, n. 2, p. 238-241, 2000.
- BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 8, p. 3064-3072, 2009.
- _____. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking, v. 120, n. 4, p. 1185-1192, 2010.

BANSODE, R.R.; RANDOLPH, P.; AHMEDNA, M.; HURLEY, S.; HANNER, T.; BAXTER, S.A.S.; JOHNSTON, T.A.; SU, M.; HOLMES, B.M.; YU, J.; WILLIAMS, L. L. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function, **Food Chemistry**, Barking, v. 148, n. 1, p. 24–29, 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action and potential applications. **Institute of Food Technologists**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, n. 1, p. 525–531, 2012.

DABAS, D.; SHEGOG, R.M.; ZIEGLER, G.R.; LAMBERT, J.D. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 19, n. 34, p. 6133-6140, 2013.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 617-622, 2005.

DENG, G.F.; LIN, X.; XU, X.R.; GAO, L.L.; XIE, J.F.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 260–266, 2013.

FELDMAN, E.B. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 953–954, 1999.

FENSTER, C.P.; WEINSIER, R.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity Research**, Boca Raton, v. 10, n. 9, p. 964-968, 2002.

GEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic action of the kava pyrone (+)-kavin prepared from *Piper methysticum* on human platelets. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 63, n. 1, p. 27-30, 1997.

GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. **Medicina & Science in Sports & Exercise**, New Jersey, v. 25, n. 2, p. 232-236, 1993.

KEYNES, R.G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischemic brain injury. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 4, n. 2, p.179-191, 2004.

KRIS-ETHERTON, P.M.; PEARSON, T.A.; WAN, Y.; HARGROVE, R.L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 1009–1015, 1999.

LIPINSKI, L.C. **Comparação da atividade cicatrizante na pele bovina entre fitoterápicos de uso tópico**. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 560 p.

LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects hongxiang. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 16, p. 2391–2399, 2004.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.; NASCIMENTO, M.M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIN, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 46-51, 2006.

MOHDALY, A.A.A.; SARHAN, M.A.; MAHMOUD, A.; FAWZY, M. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1019-1026, 2010.

NAGARAJ, M.; SANDHYA, V.; SUPRIYA, G.; MANJU, R.; KUMARI, P.; BOLE, S.; LATITHA, V.; KIRAN, B. Antioxidant and antibacterial activity of avocado (*Persea gratissima* Gaertner) seed extract. **World Applied Science Journal**, Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 695-698, 2010.

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 54, n. 4, p. 391–395, 2002.

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

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *piper*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

ROSAS, E.C.; CORREA, L.B.; PÁDUA, T.A.; COSTA, T.E.M.M.; MAZZEI, J.L.; HERINGER, A.P.; BIZARRO, C.A.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 15, p. S0378-8741, 2015.

SAHA, S.; VERMA, R. J. *In vitro* and in silico study of *Piper Nigrum* on cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and antioxidant enzymes. **Journal of Herbal Medicine**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 86-98, 2015.

SANDERS, T.H.; MCMICHAEL, R.W.; HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 4, p. 1243–1246, 2000.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.C.; DEALLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS, A.L.R. **Avaliação do sistema conservante em formulação com extrato hidroalcolólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae**. 2007. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANTOS, M.M. **Sustentabilidade e sustentação da produção de alimentos no Brasil**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2014. 208 p. (Agroindústria de Alimentos, 4).

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects; a review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SOBOLEV, V.S.; COLE, R.J. Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1435–1439, 1999.

TATSUNO, T.; JINNO, M.; ARIMA, Y.; KAWABATA, T.; HASEGAWA, T.; YAHAGI, N.; TAKANO, F.; OHTA, T. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n. 6, p. 909-916, 2012.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.F.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WHITE, B L.; GÖKCE, E.; NEPOMUCENO, A.I.; MUDDIMAN, D.C.; SANDERS, T.H.; DAVIS, J.P. Comparative proteomic analysis and IgE binding properties of peanut seed and test (Skin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 16, p. 3957–3968, 2013.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 609-614, 2003.

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização dos resíduos agroindustriais

2.1.1 Película de amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma leguminosa da família *Fabaceae*, originária da América do Sul, na região compreendida entre as latitudes 10° e 30° sul, com provável centro de origem na região que vai do noroeste da Argentina ao sul da Bolívia. O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) é a segunda leguminosa de maior importância mundial, e integra o gênero *Arachis*, juntamente com mais 80 espécies silvestres, anuais e perenes, que ocorrem no Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai. No Brasil, ocorre o maior número de espécies, sendo que 46 são exclusivamente brasileiras (FREITAS; PEÑALOZA; VALLS, 2003).

A região sudeste se destaca na produção dessa leguminosa, sendo responsável por mais de 96,67% do total produzido no país, e nas safras de 2012/13, a produção ficou entre 304,3 a 316,7 mil toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). Na Figura 1 destacam-se as áreas de maior produção de amendoim no Brasil, destacando-se o estado de São Paulo.

Figura 1 - Produção de amendoim no Brasil
Fonte: CONAB (2014)

O amendoim para consumo passa pelo processo de blanchamento, um sistema de retirada da película por processo mecânico, onde o amendoim é submetido a um tratamento térmico, que provoca a expansão do grão. Em seguida, é submetido ao resfriamento com injeção de ar frio, provocando a contração. A película se solta do endosperma (grão) e, na etapa seguinte, a película é retirada por abrasão (lixamento). Todas as etapas são realizadas sem contato manual (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA, 2011).

A película de amendoim é um subproduto de baixo valor econômico, e tem sido utilizada na alimentação animal ou é queimada para produção de energia. Estima-se que a produção mundial de película de amendoim seja em torno de 750.000 toneladas por ano (SOBOLEV; COLE, 2004). Um dos seus inconvenientes para utilização como ração animal é a elevada quantidade de taninos (proantocianidinas e procianidinas), pois os mesmos precipitam as proteínas, o que pode reduzir o valor nutricional (MULLINS; NESMITH, 1988). Por outro lado, as proantocianidinas encontradas na casca do amendoim podem proporcionar benefícios à saúde, pois podem ser utilizadas como antioxidantes ou antimicrobianos (YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2010).

2.1.2 Resíduo de pimenta-rosa

A família botânica *Anacardiaceae* é representada por 76 gêneros e 700 espécies. No Brasil ocorrem 15 gêneros e cerca de 70 espécies, as quais algumas possuem porte de árvores e outras de arbustos. Nos últimos anos, as espécies da família *Anacardiaceae* têm se mostrado promissoras na busca de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Os gêneros *Mangifera*, *Rhus*, *Anacardium* e *Schinus* destacam-se frente ao número de trabalhos feitos em relação à composição química e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente, de lipídios fenólicos e derivados. Dentre os flavonoides, os biflavonóides são os mais frequentes (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma planta pertencente à família *Anacardiaceae* conhecida popularmente como aroeira, pimenta-rosa, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, aroeira-do-brejo, aroeira precoce, cabuí, fruto-de-raposa, coração-de-bugre, fruto-de-sabiá, pimenta brasileira, aroeira-da-praia (LORENZI; MATOS, 2008). São muitos nomes para a pimenta-rosa, espécie nativa do Brasil e que foi introduzida em outras regiões da América do

Sul, América Central, Europa, Ásia e África (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005). É uma árvore mediana com 5 a 10 metros de altura, perenifólia, de copa larga e tronco revestido de casca grossa. Os frutos são globóides, aromáticos, adocicados e de coloração vermelha quando maduros.

A pimenta-rosa ocorre principalmente ao longo da mata atlântica, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, e seu plantio desponta como uma das alternativas para a diversificação agrícola. Os frutos de pimenta-rosa comercializados *in natura* são amplamente empregados na culinária mundial ou utilizados na produção de óleo essencial. O consumo vem sendo estimulado desde a década de 80, principalmente em função da presença de compostos fenólicos (LORENZI; MATOS, 2008). A pimenta-rosa tem sido utilizada nos últimos anos em substituição a pimenta-do-reino, sendo que há grande similaridade entre seus componentes químicos (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007). O resíduo de pimenta-rosa é formado a partir da seleção que ocorre nos frutos para a exportação, sendo composto por frutos, galhos, folhas.

Estudos químicos e biológicos feitos em espécies do gênero *Schinus*, descrevem a ocorrência de algumas substâncias dentre as quais se destacam os terpenóides, ácidos graxos e substâncias fenólicas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005). A pimenta-rosa é uma das plantas mais conhecidas popularmente no tratamento de inflamações uterinas (AMORIN; SANTOS, 2003) e na cicatrização de feridas e úlceras (BACCHI, 1986; MARTÍNEZ et al., 1996), tendo inclusive sido verificada sua ação antimicrobiana (BENDAOU et al., 2010) e atividade antioxidante (VELÁZQUEZ et al., 2003).

2.1.3 Resíduo de pimenta-do-reino

A família *Piperaceae* abrange uma das mais relevantes e antigas especiarias, a pimenta. A família botânica é classificada entre as mais primitivas famílias de Angiospermas, sendo constituída por 12 gêneros com um grande número de espécies, estimada entre 1.400 e 2.000, que habitam lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais. Compreendem um amplo número de espécies importantes economicamente, devido seu uso como condimento e medicinal (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991).

No Brasil, a família *Piperaceae* é encontrada em todos os estados. O principal gênero *Piper* compreende mais de 1000 espécies, sendo a principal a *Piper nigrum* L, comumente conhecida como pimenta-do-reino. É uma planta trepadeira originária das florestas de Kerala, sul da Índia. Especiaria comercializada mundialmente tornou-se importante nos primeiros

comércios estabelecidos entre a Europa e a Ásia. Utilizada como condimento em indústrias de carnes e conservas, torna uma das especiarias mais importantes utilizadas no preparo e processamento de alimentos, bem com nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (DYER et al., 2004; PRABHAKARAN, 2011).

A pimenta-do-reino, uma trepadeira, originária da Índia, possui flores sésseis, dispostas em espigas opostas às folhas, variando de comprimento e espessura, sendo que os frutos são globulares, vermelhos quando maduros e ao secarem possuem uma superfície grossa e rugosa (REITZ, 2003; GUIMARÃES; GIORDIANO, 2004). A produção em 2012 de pimenta-do-reino no Brasil foi de 55 mil toneladas, conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2012, sendo produzida principalmente nos estados do Pará, Espírito Santo e Bahia (ordem decrescente de produção). O resíduo de pimenta-do-reino é composto predominantemente pelo engace.

Muitas piperáceas têm sido utilizadas na alimentação e principalmente na medicina popular por possuírem diversas propriedades biológicas como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-helmíntica. Além dessas propriedades também se mostram eficientes no combate de radicais livres, com forte atividade antioxidante contra oxidação lipoproteica, o que inibe o desenvolvimento da aterosclerose (AGBOR et al., 2012). Nos últimos anos estudos demonstraram que essa especiaria é rica em vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), compostos como aminas/alcaloides (piperina e capsaína) e fenilalaninas (capsicina) (BONG et al., 2010). Estudos conduzidos por Agbor et al. (2012) mostraram que os extratos da folhas de três espécies de *Piper* (*P. nigrum*, *P. umbellatum* e *P. guineense*), quando adicionados na dieta de ratos, proporcionam redução do estresse oxidativo e protegem tecidos hepático, cardíaco e renal.

Dentre os compostos bioativos presentes nessa especiaria, o de maior relevância é a piperina. Este alcaloide promove uma ação efetiva sobre o sistema imunológico, diminuindo os efeitos da imunossupressão e age no sistema inflamatório reduzindo de maneira significativa as citocinas pró-inflamatórias (PISSINATE, 2006; BONG, 2010; ABBASI et al., 2010; SAHA; VERMA, 2015).

2.2 Antioxidantes naturais

Os vegetais, em ambientes naturais, estão cercados por um grande número de inimigos naturais. As plantas possuem sistemas de proteção contra esses agentes, sendo que existem compostos que funcionam como barreiras físicas que protegem contra patógenos e reduzem a

perda de água. A produção de compostos secundários ou metabólitos secundários, como os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, também desempenham respostas específicas contra ataques de patógenos (ROBARDS et al., 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009).

As plantas são fontes de alimentos energéticos, proteicos e de diversos outros compostos químicos, como os do metabolismo secundário, comumente chamados de fitoquímicos. Os compostos fenólicos são uma classe específica de fitoquímicos, composta por pelo menos 8.000 substâncias já descritas (FARAH; DONANGELO, 2006). Estes compostos atuam na regulação da maturação do fruto e estão presentes em alta concentração nas camadas mais externas das plantas tais como o casca, pele e película, protegendo o interior do fruto contra possíveis ataques de patógenos.

Os antioxidantes são classificados em dois grupos, os primários e os secundários. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável, um exemplo são os tocoferóis. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais. Alguns antioxidantes secundários, tais como ácido ascórbico podem regenerar antioxidantes primários atuando na reposição do átomo de hidrogênio, inibindo dessa forma o esgotamento dos antioxidantes primários importantes (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

O termo antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2000). Os compostos fenólicos têm sido amplamente estudados e seus compostos tem mostrado serem benéficos para a saúde humana (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Estudos demonstraram que o principal polifenol do chá verde, a epigallocatequina galato em conjugação com o ácido docosa-hexaenóico e o tetra-éster, foi capaz de combater o câncer de cólon (ZHONG et al., 2012).

O resveratrol, que pode ser encontrado em uvas, pistache, amendoim e frutas vermelhas vêm atraindo muito atenção por possuir um potente composto polifenólico com uma alta atividade antioxidante e que promove benefícios a saúde, principalmente no que se diz respeito com as enfermidades relacionadas com a idade, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas (MARQUES; MARKUS; MORRIS, 2009). Os taninos possuem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e as lipoxigenases *in vitro*, e são capazes de eliminar os radicais tais como os radicais hidroxil, superóxido e peroxil, radicais importantes no estado celular pró-oxidante (GYAMFI; ANIYA, 2002).

Os flavonoides agem na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280–320nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules e absorvem

intensamente a luz na região UV-B, enquanto permitem a passagem contínua dos comprimentos de luz visível (PACKER; HIRAMATSU; YOSHIKAWA, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009). As flavonas e flavonóis estão presentes em flores e nas folhas de todas as plantas verdes e absorvem luz em comprimentos de ondas mais curtos do que as antocianidinas. Entre os flavonoides comumente encontrados estão as antocianinas, catequinas, quercetina, kaempferol e miricetina (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Os antioxidantes naturais têm despertado grande atenção, devido principalmente a indícios de baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos e particularmente naqueles que se destinam a prevenir os efeitos deletérios provocados pelos radicais livres no organismo, bem como a deterioração de gorduras e outros constituintes dos alimentos (MOLYNEUX, 2004; FRANKEL; FINLEY, 2008).

Extratos de frutas, vegetais, cereais, sementes e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e em compostos fenólicos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH et al., 2005). Portanto, podem ser utilizados para a estabilização de produtos poliméricos, produtos petroquímicos, produtos alimentares, cosméticos e produtos farmacêuticos (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011).

2.2.1 Compostos fenólicos

As plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários, os quais são essenciais para o seu crescimento e reprodução. São encontrados em todas as partes dos vegetais, sendo distribuídos em quantidades diferentes em cada uma delas, podendo variar em diferentes populações de uma mesma espécie (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os compostos fenólicos representam um reflexo entre a planta e o ambiente, dessa forma a síntese desses compostos em relação a estrutura química, quantidade e proporção são afetadas diretamente pelas condições ambientais (estresse hídrico, temperatura, intensidade de radiação solar e ataque de patógenos) e pelas condições fisiológicas (tipo de cultivar, idade, desenvolvimento da planta) (VIZZOTTO; GOMES; PEREIRA, 2008; COHEN; KENNEDY, 2010).

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. As plantas produzem uma variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol e um grupo hidroxila funcional em um anel aromático (Figura 2). Os tipos e as variedades de polifenóis variam com o estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, manejo, processamento e armazenamento da matéria-prima. Devido à sua diversidade química, os

compostos fenólicos apresentam uma grande variedade de funções nos vegetais. A biossíntese pode ocorrer por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (SILVA, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 2 - Estrutura química de um fenol simples
Fonte: (BRAVO, 1998)

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo grupos funcionais (LEE et al., 2005). A estrutura química determina sua capacidade de atuar como sequestradores de radicais livres. O tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas são alguns dos parâmetros que determinam esta atividade antioxidante, possibilitando atuarem como agentes redutores, exercendo assim proteção ao organismo contra o estresse oxidativo. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelatação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Ribéreau-Gayon (1968) adotou a seguinte classificação para estes compostos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

A família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza apresenta-se em número reduzido, embora sejam encontrados com frequência. Neste grupo estão os fenóis simples (pirocatecol, hidroquinona e o resorcinol) e os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos e constituintes dos óleos essenciais.

Os polímeros, compostos fenólicos que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, são representados pelos taninos e as ligninas. Os taninos são compostos de alto peso

molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis (ácido gálico) e taninos condensados (catequina e leucoantocianidina). As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica e sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzoicos e cinâmico.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo o reino vegetal. Este grupo é dividido em ácidos fenólicos (ácido benzoico, cinâmico e seus derivados), flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999).

O termo “ácidos fenólicos” em geral designa fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional. São divididos em três grupos principais: os ácidos benzoicos, os ácidos cinâmicos e as cumarinas. O primeiro possui sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, caracterizando-se pela hidroxilação do carbono quatro do ácido benzoico. Os mais comumente encontrados é o ácido gálico e o ácido protocatéquico (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido protocatéquico (b)
Fonte: (STALIKAS, 2007)

O segundo grupo possui nove átomos de carbono (C6-C3), caracterizando-se pela hidroxilação do carbono quatro do ácido cinâmico. Os mais representativos são os ferúlico, ácidos, caféico e *o*-cumárico (Figura 4). As cumarinas (Figura 5) são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico.

Figura 4 - Estruturas química do ácido ferúlico (a), ácido caféico (b) e ácido *o*-cumárico (c)
Fonte: (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006)

Figura 5 - Estrutura química das cumarinas
Fonte: (RAMALHO; JORGE, 2006)

A atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos. A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, ocorre a conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as ligações duplas do anel (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e constituem a maior classe de fenólicos simples. São os pigmentos mais comuns depois da clorofila e carotenoides, encontrando-se presente em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta, na forma de glicosilada ou agliconas (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999). Protegem as células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintético e, por apresentarem propriedades absorptivas de ultravioleta, também protegem as plantas contra a radiação ultravioleta do sol (STALIKAS, 2007).

Estruturalmente, os flavonoides são substâncias aromáticas caracterizadas por apresentarem três anéis fundidos como unidade estrutural básica. Possui 15 átomos de carbono no esqueleto principal, do tipo $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$, no qual os dois anéis C_6 são necessariamente aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; LUXIMON-

RAMMA; BAHORUN; CROZIER, 2003). Os grupos hidroxila estão normalmente presentes nas posições 4, 5 e 7, podendo ser encontrados em outras posições. Os açúcares são muito comuns, e de fato a maioria dos flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos.

A diversidade estrutural e os benefícios à saúde promovidos por dietas baseadas em compostos fenólicos dependem da sua absorção e metabolismo, que são determinados pela estrutura química do composto, incluindo sua conjugação com outros fenólicos, grau de glicosilação, acilação, tamanho molecular, solubilidade, hidroxilação e metilação (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

2.2.2 Formação das espécies reativas de oxigênio

A transferência de elétrons é um do processo fundamental para a sobrevivência das células, entretanto o efeito colateral desse processo é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano oxidativo e consequentemente a formação de radicais livres, estes são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (ALVES et al., 2010). As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (SHAMI; MOREIRA, 2004).

As espécies reativas derivadas do oxigênio molecular exercem funções biológicas fundamentais no organismo, tais como a manutenção das funções normais das células equilíbrio do estado redox, sinalização celular, funcionamento do sistema imune e a defesa contra micro-organismos. Neste processo, normalmente são formados os radicais derivados das ERO (radical hidroxila, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete) (YU, 2005).

O organismo dispõe de um sistema antioxidante eficiente que consegue manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação dessas espécies. A manutenção desse equilíbrio ocorre através de sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GSH-Px e catalase - CAT), não-enzimáticos (glutathione e coenzima Q), exógenos (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides, entre outros) e cofatores (cobre, selênio, zinco, magnésio e ferro) (SIES, 1991). Entretanto, quando produzidos em excesso, ou se as defesas antioxidantes endógenas forem ineficientes, podem provocar oxidações de macromoléculas, como os lipídios, proteínas ou DNA, comprometendo

assim as funções celulares normais e levando a disfunções biológicas e doenças associadas, resultantes desse estresse oxidativo (HALLIWELL, 1994; VALKO et al., 2007; VASCONCELOS, 2007).

As ERO são produzidas durante reações de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, sendo, portanto este processo fundamental para a sobrevivência das células aeróbicas. A alta reatividade dessas espécies podem causar danos funcionais ao organismo, pois são constantemente formadas e também estão envolvidas como mensageiros secundários em muitas respostas fisiológicas, bem como em condições patológicas (HAMID et al., 2002).

Existem evidências de que o estresse oxidativo tem relevância nos processos de envelhecimentos, transformação e morte celular, podendo causar danos patológicos as células. Por outro lado as ERO desempenham papéis fisiológicos importantes, como controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose e fagocitose (HALLIWELL, 1994; VASCONCELOS et al., 2007).

2.2.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A diversidade de compostos bioativos faz com que seja necessário o desenvolvimento de diferentes ensaios *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante. Sob o ponto de vista químico não há como selecionar uma metodologia mais eficiente para a extração de todos ou uma classe específica de antioxidantes naturais. A natureza química desses compostos nos alimentos pode atingir extremos de polaridade, sendo que há ainda uma grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e em concentração distintas, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos (SHAHIDI; NACZK, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Os diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante são ferramentas que podem auxiliar na escolha das espécies de plantas para estudos químicos e farmacológicos. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida de forma precisa e quantitativa. Dessa forma, a procura por testes que sejam mais rápidos e eficientes vem ao longo dos anos gerando um grande número de métodos para avaliação da atividade de antioxidante, por meio de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

A capacidade de redução do Folin-Ciocalteu é um parâmetro importante na avaliação da capacidade antioxidante total de extratos. Os compostos fenólicos absorvem energia radiante na região do ultravioleta e esta característica fornece a base para quantificação espectrofotométrica desses fenólicos totais (SHAHIDI; ZHONG, 2015). O ensaio de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos em condições alcalinas. O ácido gálico é utilizado como padrão na análise de resultados e expresso como equivalentes de ácido gálico. No entanto, os resultados também podem ser expressos com outros padrões como a catequina, o ácido caféico, o ácido clorogênico e o ácido ferúlico, demonstrando assim que existe a necessidade de padronização dos resultados (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Este ensaio apresenta muitas vantagens, como a simplicidade e reprodutibilidade, entretanto apresenta algumas desvantagens como ser sensível ao pH, a temperatura e ao tempo de reação (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009), necessitando de condições reacionais adequadas para se obter resultados consistentes e confiáveis. Outro fator é que este método de avaliação não é específico, podendo haver a interferência de substâncias redutoras tais como os aminoácidos, açúcares e a vitamina C, podendo superestimar os valores da concentração de polifenóis totais (ROBARDS, 2003).

Diversos ensaios e ferramentas têm sido utilizados para medir a atividade antioxidante *in vitro*, tendo havendo avanços significativos no desenvolvimento de novos métodos nas últimas décadas. Os métodos podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, métodos indiretos. O primeiro caso é caracterizado pela competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante, pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres. Já a segunda categoria é caracterizada pela habilidade do antioxidante em sequestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa (HUANG; OU; PRIOR, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Dentre os métodos espectrofotométricos de avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, os mais utilizados são os ensaios de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e o de captura do radical livre ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico). Mais recentemente estão os métodos que envolvem as espécies reativas de oxigênio como ensaio da capacidade de absorção de radicais do oxigênio (ORAC), sequestro do radical ânion superóxido e sequestro do radical hipocloroso (MELO et al., 2015).

O princípio do ensaio do DPPH é a redução do radical livre estável orgânico de nitrogênio (2,2-difenil-1-picrilidrazil). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical

livre estável em virtude do elétron desemparelhado na molécula. Ao abstrair um radical de hidrogênio do antioxidante observa-se a diminuição da absorbância e a coloração passa do violeta para o amarelo, com absorção máxima 515-520nm, cuja reação está apresentada na (Figura 6) (BRANDWILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX; SONGKLANAKARIN, 2004).

Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante
Fonte: (MOON; SHIBAMOTO, 2009)

O ensaio do DPPH é simples, preciso e possui boa reprodutibilidade dos resultados, além de não envolver condições drásticas de temperatura e oxigenação. Entretanto, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados, dentre eles, o tipo e concentração do composto analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH e tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e maneira de se expressar os resultados (MOLYNEUX, 2004). Plank et al. (2012) conduziram um estudo para determinar a atividade antioxidante em uma variedade de alimentos e bebidas utilizando o ensaio de DPPH e observaram que o método foi válido para certos tipos de alimentos e que outros necessitou de ajustes na análise para a validação.

Os resultados do DPPH podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes de um padrão (Trolox), ou ainda como EC_{50} que representa a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Esse método foi introduzido como sendo um método fácil e preciso para uso em frutas e extratos vegetais (PINTO et al., 2008; ATMANI et al., 2009).

Apesar do ensaio de DPPH ser simples e não exigir tratamento especial na amostra, a sua sensibilidade pode ser afetada por vários fatores como o tipo de solvente utilizado na extração, presença e concentração de hidrogênio na amostra e o próprio reagente de DPPH.

Outro fator que gera uma grande limitação nessa análise é o espectro de sobreposição de compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda que o DPPH, como por exemplo, as antocianinas (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Outro método muito utilizado na determinação da atividade antioxidante é o método da captura do radical livre $ABTS^{•+}$ (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico). Este método foi usado pela primeira vez por Miller et al. (1993) e tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade na fase aquosa e lipídica e oferecer resultados reprodutíveis (MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006). Inicialmente o ensaio do ABTS foi baseado na ativação de metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para gerar o radical $ABTS^{•+}$, com ou sem a adição de antioxidantes no meio. Com o passar dos anos o método foi aperfeiçoado, sendo que o radical passou a ser gerado sem a presença de antioxidantes. O radical ABTS estável, que tem uma absorção cromóforo azul-verde, é formado pela reação de persulfato de potássio com ABTS para produzir o radical $ABTS^{•+}$ (Figura 7).

Figura 7 - Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio
Fonte: (MOON; SHIBAMOTO, 2009)

A atividade antioxidante é determinada pela descoloração do ABTS^{*+} , medindo-se a redução do radical a uma absorbância de 734nm (BIGLARI; ALKARKHI; EASA, 2008). A redução da absorbância na reação da mistura do radical ABTS^{*+} é comparada com atividade do antioxidante sintético Trolox (padrão), e os resultados são expressos em μmol de Trolox TEAC.g^{-1} (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

Essa metodologia pode avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica não sendo afetada pela força iônica do meio. A reação com doadores de hidrogênio apresenta baixa seletividade, e dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenóis e produtos de origem natural, a reação com radical ABTS^{*+} é muito lenta podendo influenciar no resultado (SURVESWARAN et al., 2007). Tian e Schaich (2013) relataram a limitação da aplicabilidade do ensaio de ABTS para determinar a atividade antioxidante, devido à sua incapacidade de avaliar a taxa de eliminação de radicais livres.

A desvantagem principal dos métodos descritos acima (radical DPPH e ABTS) é o fato de que esses radicais livres não são encontrados em alimentos ou sistemas biológicos, no entanto esses ensaios auxiliam na seleção de amostras que possuem potencial antioxidante capaz de desativar espécies reativas de oxigênio (ROS) (MACDONALD-WICKS et al., 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

O método de ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) mede a capacidade sequestrante do radical peroxil, o qual é gerado a partir da decomposição térmica do 2,2'-azobis- (2-amidino-propano) dicloridrato (AAPH) com o oxigênio atmosférico, e que reage com a fluoresceína (indicador fluorescente).

O radical peroxil é um oxidante comumente encontrado em sistemas biológicos, sendo menos reativo que o $\text{OH}^{\bullet}$, e possui um tempo de meia vida de segundos a nanosegundos (HALLIWELL, 1994). A perda de fluorescência é o indicador da extensão da decomposição, a partir da sua reação com o radical peroxil. Os indicadores fluorescentes mais utilizados são a fluoresceína e a diclorofluoresceína, por serem menos reativos e mais estáveis, quando comparados com a β -ficoeritina (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). No entanto, estudos demonstram que a fluoresceína pode sofrer reações secundárias indesejadas que podem afetar no resultado da análise, o que tem feito com que novas sondas fluorescentes sejam propostas (APAK et al., 2013).

A avaliação da atividade antioxidante neste ensaio ocorre através da inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil através de transferência de átomos de hidrogênio, ou seja, a diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo

decaimento da fluorescência no decorrer do tempo, sendo o trolox é utilizado como padrão (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Este método permite analisar tanto amostras vegetais quanto as biológicas em condições de pH 7,4 e temperatura de 37 °C, o que se aproxima das condições fisiológicas do organismo. Isto confere uma grande vantagem em relação a outros métodos de análise de atividade antioxidante (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Atualmente tem aumentado o interesse em métodos que avaliam a atividade antioxidante sob a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Essas espécies reativas são parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas por exercerem funções como, por exemplo, a fagocitose. Entretanto quando sua produção ocorre em excesso, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e reestabelecer o equilíbrio (VASCONCELOS et al., 2007). Assim, o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, o que favorece o acúmulo em excesso de radicais livres.

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é uma espécie reativa de oxigênio gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo através das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase (VASCONCELOS et al., 2007). Ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo, mas em meio aquoso é um oxidante fraco que pode gerar espécies reativas de nitrogênio.

A atividade de vários compostos antioxidantes pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido ou através da inibição da ação da xantina oxidase. O radical superóxido pode ser gerado por distintos sistemas enzimáticos, entre eles a reação catalisada pela enzima xantina oxidase, ou pelo sistema não enzimático através da reação de metassulfato de fenazina (PMS) com NADH e oxigênio molecular (VASCONCELOS et al., 2007). Atualmente esse radical é gerado *in vitro* por via não enzimática, através do sistema NADH/PMS (dinucleótido de β -nicotinamida e adenina /fenazina metassulfato). A capacidade de sequestro do radical é medida por meio da redução NBT (Cloro de nitroazul de tetrazólio) para diformazan, em pH 7,4 e temperatura ambiente (ALVES et al., 2010).

O radical hipocloroso é gerado no organismo por neutrófilos por meio da reação de íons cloro com o peróxido de hidrogênio catalisado pela mieloperoxidase, tornando-se um potente agente oxidante (ALVES et al., 2010). É uma espécie não radicalar, permeável a membrana e oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioéteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas, sendo mais seletivo do que o radical hidroxila,

oxidando ferro e proteínas (VASCONCELOS et al., 2007). Segundo Miyamoto et al. (2006), a produção desse radical constitui um mecanismo de defesa contra microrganismos, entretanto a produção excessiva pode gerar danos nos tecidos levando ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer e aterosclerose.

A crescente busca por substâncias bioativas nos últimos fez com que se desenvolvessem muitos métodos de avaliação de atividade antioxidante, cada um com suas particularidades. Segundo Karadag; Ozcelik; Saner (2009), não existe um método que seja padrão para se medir a capacidade antioxidante total, pois existem algumas limitações como: determinação de antioxidantes hidrófilos, problemas que ocorrem na determinação da reação do ponto final, a preocupação sobre a sensibilidade à luz dos iniciadores ou sondas, pH, possível interferência de componentes dos alimentos e o principal de que muitos desses métodos não tem demonstrado correlação com a habilidade dos compostos em inibir a deterioração oxidativa *in vivo*.

2.2.4 Otimização da extração dos compostos bioativos

O processo de extração de compostos bioativos tem sido alvo de estudo nos últimos anos, haja vista a necessidade de se desenvolver métodos e a escolha de solventes que produz a melhor resposta na extração dos compostos de interesse. Dessa forma, a eficácia da extração está intimamente ligada às características do solvente empregado, como polaridade, que pode afetar a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio. Ao mesmo tempo, a temperatura de extração, entre outros fatores, também são importantes (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Desta forma existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais. Dentre esses, podem ser citados os métodos tradicionais de extração utilizando solventes (como água, etanol, éter, acetato de etila, clorofórmio, hexano e metanol) e a extração supercrítica que mediante as mudanças na pressão e na temperatura transforma o dióxido de carbono (CO₂) em fluido supercrítico para a extração (REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Apesar da utilização de diferentes solventes no processo de extração e métodos para a determinação da atividade antioxidante, ainda não existe um procedimento metodológico universal (FRANKEL; MEYER, 2000).

A otimização de processos pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos. Os métodos tradicionais que otimizam um fator por vez demandam maior tempo, e podem ignorar as interações entre os vários fatores, podendo resultar em um modelo não real. Outra

desvantagem é a quantidade de experimentos necessária para realizar a pesquisa, o que eleva o tempo e os custos, bem como aumento no consumo de reagentes e materiais (BEZERRA et al., 2008). Assim, os processos estatísticos de otimização permitem que sejam levadas em consideração as interações (HAALAND, 1989).

A análise por superfície de resposta foi proposta por Box e Wilson na década de 50, método este que permite a avaliação dos efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta. Essa metodologia envolve um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, utilizadas para se encontrar uma relação funcional adequada entre a(s) resposta(s) de interesse e um conjunto de variáveis independentes, que são controláveis, no pressuposto de que existe esta relação funcional (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Nos últimos anos a aplicação dessa metodologia na otimização de procedimentos analíticos tornou-se comum, devido as suas vantagens em gerar uma grande quantidade de informações a partir de um pequeno número de experimentos e a possibilidade de avaliar o efeito da interação entre as variáveis sobre a resposta (BEZERRA et al., 2008).

Referências

- ABBASI, B.H. Conventional and modern propagation techniques in *Piper nigrum*. **Journal of Medical Plants Research**, Lagos, v. 4, n. 1, p. 7-12, 2010.
- AGBOR, G.A.; VINSON, J.A.; SORTINO, J.; JOHNSON, R. Antioxidant and antiatherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. **Experimental and Toxicological Pathology**, Jena, v. 64, n. 4, p. 387-391, 2012.
- AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Oxford, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIN, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K.M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity. **Pure and Applied Chemistry**, Kenya, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAOUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.

AWAD, A.B.; CHAN, K.C.; DOWNIE, A.C.; FINK, C.S. Peanuts as a source of B-sitosterol, a sterol with anticancer properties. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 36, n. 2, p. 238-241, 2000.

BACCHI, E.M. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 93-100, 1986.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 8, p. 3064-3072, 2009.

_____. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking v. 120, n. 4, p. 1185-1192, 2010.

BANSODE, R.R.; RANDOLPH, P.; AHMEDNA, M.; HURLEY, S.; HANNER, T.; BAXTER, S.A.S.; JOHNSTON, T.A.; SU, M.; HOLMES, B.M.; YU, J.; WILLIAMS, L. L. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function, **Food Chemistry**, Barking, v. 148, n. 1, p. 24-29, 2014.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, Amsterdam, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A.F.M.; EASA, A.M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 4, p. 1636–1641, 2008.

BONG, C.F.J. Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper Nigrum*. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 4, p. 2398-2404, 2010.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978. 653p.

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

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action and potential applications. **Institute of Food Technologists**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, n. 1, p. 525–531, 2012.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, n. 7, p. 620-643, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos**. Brasília, v. 1, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de *Anacardiaceae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Colombia University Press, 1981. 1262 p.

DABAS, D.; SHEGOG, R.M.; ZIEGLER, G.R.; LAMBERT, J.D. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 19, n. 34, p. 6133-6140, 2013.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 617-622, 2005.

DENG, G.F.; LIN, X.; XU, X.R.; GAO, L.L.; XIE, J.F.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 260–266, 2013.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **The Journal of Physiology**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. **Piper**: a model genus for studies of pytochemistry, ecology, and evolution. New York: Kluwer Academic, 2004. 583 p.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant of Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2006.

FELDMAN, E.B. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 953–954, 1999.

FENSTER, C.P.; WEINSIER, R.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity Research**, Boca Raton, v. 10, n. 9, p. 964-968, 2002.

FRANKEL, E.N.; FINLEY, J.W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 13, p. 4901–4908, 2008.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

FREITAS, F.O.; PENÃLOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. **O amendoim contador de história**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 12 p. (Documentos, 107).

GEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic action of the kava pyrone (+)-kavin prepared from *Piper methysticum* on human platelets. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 63, n. 1, p. 27-30, 1997.

GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, New Jersey, v. 25, n. 2, p. 232-236, 1993.

GÓMEZ-RUIZ, J.A.; LEAKE, D.S.; AMES, J M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, 2007.

GORDON, M.H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B.J. F.(Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

GYAMFI, M.A.; ANIYA, Y. Antioxidant properties of thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. **Biochemical Pharmacology**, Burlington, v. 63, n. 9, p. 1725–1737, 2002.

HAALAND, P.O. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989. 284 p.

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

_____. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HAMID, A.A.; SHAH, Z.M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterization of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, Barking, v. 77, n. 4, p. 465-469, 2002.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary**: handbook of bioactive compounds from plants. 2nd ed. London: Taylor & Francis, 1999. 976 p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Amendoim: produção, exportação e a safra 2011/2012. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 6, n. 11, p. 1-3, nov. 2011.

JEONG, S.M.; KIM, S.Y.; KIM, D.R.; JO, S.C.; NAM, K.C.; AHN, D.U.; LEE, S.C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3389–3393, 2004.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1991. 777 p.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food of Analytical Methods**, New York, v. 41, n. 2, p. 41-60, 2009.

KEYNES, R.G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischemic brain injury. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 4, n. 2, p.179-191, 2004.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, New York, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; PEARSON, T.A.; WAN, Y.; HARGROVE, R.L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 1009–1015, 1999.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in Brazil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, n.1, p. 131-137, 2005.

LIPINSKI, L.C. **Comparação da atividade cicatrizante na pele bovina entre fitoterápicos de uso tópico**. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 560 p.

LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects hongxiang. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 16, p. 2391–2399, 2004.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.; NASCIMENTO, M.M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIN, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 46-51, 2006.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v. 83, p. 496–502, 2003.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v. 86, n. 13, p. 2046–2056, 2006.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. Bioavailability and bio efficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 230S–242S, 2005.

MARQUES, F.Z.; MARKUS, M.A.; MORRIS, B.J. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 11, p. 2125–2128, 2009.

MARTÍNEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 52, n. 3, p. 171-174, 1996.

MARTINS, R. Amendoim: evolução da balança comercial paulista. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 3, 2006.

MELO, P.C.T.; VILELA, N.J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira de tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 154-157, 2005.

- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIS, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, London, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.
- MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G.R.; RETTORI, D.; AUGUSTO, O.; MEDEIROS, M.H. G.; MASCIO, P.D. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 2, p. 293-298, 2006.
- MOHDALY, A.A.A.; SARHAN, M.A.; MAHMOUD, A.; FAWZY, M. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1019-1026, 2010.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, Songkla, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.
- MULLINS, J.T.; NESMITH, C. Nitrogen levels and yeast viability during ethanol fermentation of grain sorghum containing condensed tannins. **Biomass**, New York, v. 16, n. 2, p. 77–87, 1988.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Basel, v. 1054, n.1, p. 95-111, 2004.
- NAGARAJ, M.; SANDHYA, V.; SUPRIYA, G.; MANJU, R.; KUMARI, P.; BOLE, S.; LATITHA, V.; KIRAN, B. Antioxidant and antibacterial activity of avocado (*Persea gratissima* Gaertner) seed extract. **World Applied Science Journal**, Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 695-698, 2010.
- NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 54, n. 4, p. 391–395, 2002.
- NISS, A.M.; DICKHUTH, H.H.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. **Exercise Immunology Review**, Champaign, v. 5, p. 22-56, 1999.
- OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P.L.; DA SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.F.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306-312, 2016.
- PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. Orlando: Academic Press, 1999. 269 p.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *piper*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PEREIRA, G.I.S.; PEREIRA, R.G.F.A.; BARCELOS, M.F.P.; MORAIS, A.R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 852-857, 2003.

PINTO, J.S.S.; LANÇAS, F.M. Design, construction and evaluation of a simple pressurized solvent extraction system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 913-917, 2009.

PISOSCHI, A.M.; NEGULESCU, G.P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry and Analytical**, Sunnyvale, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2011.

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. 2006. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PLANK, D.W.; SZPYLKA, J.; SAPIRSTEIN, H.; WOOLLARD, D.; ZAPF, C.M.; LEE, V.; CHEN, C.Y.; LIU, R.H.; TSAO, R.; DÜSTERLOH, A.; BAUGH, S. Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 95, n. 6, p. 1562–1569, 2012.

PRABHAKARAN N, K.P. **Agronomy and economy of black pepper and cardamom: the “king” and “queen” of spices**. London: Elsevier Science, 2011. 366 p.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W.H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

REITZ, R. *Piperaceae*. In: _____. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2003. p. 4-7.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968. 254 p.

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

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography. Series A**, Amsterdam, v. 1000, n. 1/2, p. 657–691, 2003.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, p. 401-436, 1999.

RODRIGUES; M.I.; LEMMA, R.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SAHA, S.; VERMA, R. J. *In vitro* and in silico study of *Piper Nigrum* on cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and antioxidant enzymes. **Journal of Herbal Medicine**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 86-98, 2015.

SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenolicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, Guatemala, n. 329, p. 29-40, 2002.

SANDERS, T.H.; MCMICHAEL, R.W.; HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 4, p. 1243–1246, 2000.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.C.; DEALLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS, A.L.R. **Avaliação do sistema conservante em formulação com extrato hidroalcolico de *Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae**. 2007. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANTOS, M.M. **Sustentabilidade e sustentação da produção de alimentos no Brasil**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2014. 208 p. (Agroindústria de Alimentos, 4).

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects; a review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publ., 1995. 331p.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

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

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

SILVA, D.M.L.; CAMARGO, P.B.; MARTINELLI, L.A.; LANÇAS, F.M.; PINTO, J.S. S.; AVELAR, W.E.P. Organochlorine pesticides in Piracicaba river basin (São Paulo/Brazil): a survey of sediment, bivalve and fish. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 214-219, 2008.

SOARES, L M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOBOLEV, V.S.; COLE, R.J. Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 47, n. 4, p. 1435–1439, 1999.

_____. Note on utilization of peanut seed test. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Washington, v. 84, n. 1, p.105-111, 2004.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, Easton, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

STÖHR, J.R.; XIAO, P.G.; BAUER, R. Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 75, n. 2/3, p. 133-139, 2001.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, Barking, v. 102, n. 3, p. 938–953, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TATSUNO, T.; JINNO, M.; ARIMA, Y.; KAWABATA, T.; HASEGAWA, T.; YAHAGI, N.; TAKANO, F.; OHTA, T. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 35, n. 6, p. 909-916, 2012.

TIAN, X.; SCHAICH, K.M. Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the trolox equivalent antioxidant capacity assay with ABTS⁺. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 61, p. 23, p. 5511–5519, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Biochemistry & Cell Biology*, Lismore, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.F.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH, D.E.; BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Firenze, v. 74, n. 1/2, p. 91-97, 2003

VIZZOTTO, M.; GOMES, C.B.; PEREIRA, M.C. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em frutas de pessegueiro cv. Ametista submetidos a diferentes manejos de pragas e de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: INCAPER; Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.

WHITE, B L.; GÖKCE, E.; NEPOMUCENO, A.I.; MUDDIMAN, D.C.; SANDERS, T.H.; DAVIS, J.P. Comparative proteomic analysis and IgE binding properties of peanut seed and test (Skin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 16, p. 3957–3968, 2013.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 609-614, 2003.

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

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1/2, p. 199–206, 2005.

_____. Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 1337–1344, 2010.

3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO

Resumo

A agroindústria obteve nos últimos anos um desempenho notável no setor produtivo. Em função de todo este crescimento, tem havido a geração de milhões de toneladas de resíduos agroindustriais que podem ocasionar problemas ambientais se não for dado um destino correto. Atualmente a busca por alternativas econômicas que possam reutilizar esses resíduos, e agregar valor a cadeia de produção de alimentos, tem sido constante. Os processos de extração e os sistemas de solventes que têm sido utilizados para a extração de compostos fenólicos, exercem um papel importante no preparo da amostra, na averiguação experimental e na análise qualitativa. Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar a metodologia de superfície de resposta para se determinar as condições ótimas de extração de compostos fenólicos antioxidantes dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino. Os resíduos de película de amendoim foram coletados no primeiro semestre de 2011 e os de pimenta-rosa e do reino no segundo semestre de 2011. O processo de otimização da extração foi realizado por meio da utilização de duas extrações distintas: convencional, utilizando os parâmetros de tempo e temperatura (21,8; 30; 50; 70 e 78,2 minutos e 24,75; 35; 60; 85; 95,25 °C) e subcrítica utilizando os parâmetros de temperatura e pressão (55,6; 73; 115; 157 e 174,4 °C e 18,8; 25; 40; 55; 61,2 Kg/cm²), para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%. O delineamento do tipo DCCR (Composto Central Rotacional) com ponto central, utilizando a metodologia de superfície de resposta. A atividade antioxidante dos extratos foi medida por meio da análise de atividade sequestrante do radical livre ABTS. Os maiores valores de atividade antioxidante foram encontrados na extração convencional e em relação aos solventes, o etanol 80% apresentou os melhores resultados. Os extratos da película de amendoim IAC886 e IAC505 apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante, principalmente quando extraídos no solvente etanol 80%, 1.391,17 e 1.400,18 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente. Já para os solventes água e propilenoglicol 80%, os valores da película foram de 546,04 e 587, $\mu\text{mol.g}^{-1}$ e 805,94 e 817,39 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente. Os resíduos de pimenta-rosa e pimenta-do-reino apresentaram os maiores resultados no solvente etanol 80% (924,57 e 229,20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente). O resíduo de pimenta-do-reino mostrou resultado no solvente propilenoglicol 80% igual ao solvente etanol 80% (219,20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), entretanto a pimenta-rosa não apresentou resultado tão expressivo nesse solvente (482,29 $\mu\text{mol.g}^{-1}$). No solvente água os resíduos de pimenta-rosa e pimenta-do-reino apresentaram atividades de 641,71 e 104,89 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Processo de extração resíduos agroindustriais; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos

Abstract

Agribusiness obtained in recent years a remarkable performance in the productive sector. Because of all of this growth, there have been generating millions of tons of agro-industrial waste that can cause environmental problems if not given a correct destination. Currently the search for economic alternatives that can reuse their waste, and add value to the food production chain, has been steady. The extraction processes and solvent systems that have been used for the extraction of phenolic compounds play a role important in the preparation of

the sample, the experimental investigation and qualitative analysis. This work aimed to evaluate the antioxidant activity of agro-industrial waste peanut skin (IAC886 and IAC505), pink pepper and black pepper, using the optimization of the antioxidant compounds extraction process. Waste peanut skins were collected in the first half of 2011 and the pink pepper and black pepper in the second half of 2011. The extraction of the optimization process was conducted through the use of two separate extractions: simple, which was used as time and temperature parameters (21.8; 30; 50; 70 to 78.2 minutes and 24.75; 35; 60; 85; 95.25 °C) and subcritical with the following temperature and pressure parameters (55.6; 73; 115; 157 and 174.4 °C and 18.8; 25; 40; 55; 61.2 kgf/cm²), and three solvents (ethanol 80% water and propyleneglycol 80%). A central composite rotatable design (CCRD) with central point was employed for extraction studies using surface methodology. The antioxidant activity of the extracts was measured by the scavenging activity analysis of free radical ABTS. The highest antioxidant activity values were obtained for the simple extraction and in relation to solvents, ethanol 80% in comparison to others. Peanut skin IAC886 and IAC505 showed the best results of antioxidant activity, especially in the solvent ethanol 80% (1,391.17 and 1,400.18 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), respectively, while for the solvent water and propyleneglycol 80% (546.04 and 587.11 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) and (817.39 and 805.94 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), respectively. The residues pink pepper and black pepper did better in the solvent ethanol 80% (924.57 and 229.20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), but the residue black pepper obtained result in solvent propyleneglycol 80% equal to solvent ethanol 80% (219.20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), as the pink pepper did not show as significant result in this solvent (482.29 $\mu\text{mol.g}^{-1}$). Solvent in the water residues pink pepper and black pepper obtained the following results (641.71 and 104.89 $\mu\text{mol.g}^{-1}$).

Keywords: Extraction process waste agro-industrial; Antioxidant activity; Phenolics compounds

3.1 Introdução

A indústria de alimentos ao longo de toda a sua cadeia produtiva gera milhões de toneladas de resíduos agroindustriais que podem ocasionar problemas ambientais se não reutilizados de maneira correta. Dessa forma, existe um grande apelo para se pesquisar tecnologias que possibilitem sua utilização, uma vez que são ricos em compostos bioativos (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007).

Os resíduos originados pelas agroindústrias apresentam variações, pois podem ser compostos por cascas, sementes, caroços, polpas, engaces, peles, entre outros. Por exemplo, no caso da pimenta-rosa, muitas pimentas são rejeitadas na seleção para a exportação. Estes resíduos são compostos por vitaminas, minerais, fibras, compostos antioxidantes e nutrientes essenciais para o bom funcionamento do organismo humano. No entanto eles são desperdiçados na grande parte das fábricas e indústrias (MARTINS; FARIAS, 2002; BALASUNDRAN; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Assim, resíduos agroindustriais apresentam grande potencial de reuso, o que pode minimizar o desperdício de alimentos. Estudos demonstram que as maiores concentrações de

nutrientes como vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides encontram-se justamente nas sementes e nas cascas, partes que geralmente são rejeitadas pela indústria (ABRAHÃO et al., 2010; AYALA-ZAVALA et al., 2011).

Nos últimos anos houve um aumento significativo de trabalhos sobre a busca por antioxidantes naturais, quer seja para aplicação na indústria de alimentos ou para elaboração de alimentos funcionais, haja vista este ser também um apelo da sociedade atual (MARTINS, 2011). Assim, a otimização do processo de extração de compostos bioativos torna-se muito importante para que estes objetivos sejam atingidos.

Os processos de extração e os sistemas de solventes utilizados para a extração de compostos fenólicos exercem um papel importante no preparo da amostra, na averiguação experimental e na análise qualitativa desses compostos. Nos últimos anos, tecnologias para recuperar tais compostos foram desenvolvidas visando à redução do tempo de processo, diminuição do uso de solventes orgânicos, aumento da eficiência da extração, proporcionando assim redução dos custos de processo e menor impacto ambiental (HUANG et al., 2013; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015).

A extração assistida por ultrassom, que é um sistema que utiliza a energia acústica e solvente para promover o processo de extração dos compostos de interesse da matriz vegetal, vem sendo utilizada em uma gama de compostos alimentares, tais como pigmentos, aromas, antioxidantes e outros compostos orgânicos e minerais (MINJARES-FUENTES et al., 2014). O mecanismo de extração envolve o fenômeno de difusão, em que ocorre a formação de bolhas de cavitação que proporciona um melhor rompimento celular através da formação de micro jatos perto da superfície sólida da célula do vegetal, o que permite a maior penetração do solvente na matriz celular. Dessa forma a taxa de transferência de massa desse processo pode ser afetada pela intensidade da onda sonora, tempo de exposição à frequência sonora e temperatura do processo (CHEMAT; ZILL; KHAN, 2011; TAO et al., 2014).

A extração com solvente pressurizado é uma técnica que utiliza temperatura e pressões elevadas para obter extratos em um pequeno intervalo de tempo. A temperatura elevada possibilita uma melhor solubilização do composto, aumentando as taxas de difusão e dessa forma ocorre o enfraquecimento das interações soluto-matriz. A alta pressão permite trabalhar com solvente acima do seu ponto de ebulição, acelerando assim o processo de extração total (JENTZER et al., 2015).

O rendimento da extração está intimamente ligado ao tipo de solvente utilizado. Na extração de compostos fenólicos os solventes alcoólicos são os mais utilizados, assim como as misturas entre solventes alcoólicos e água, pois a água proporciona um aumento da polaridade

do solvente, e com isso maiores teores de compostos fenólicos podem ser extraídos (WIJEKOON et al., 2011; HUSSAIN et al., 2012).

Diante dessas condições, torna-se necessário estudar as condições mais adequadas para a recuperação de compostos bioativos de resíduos agroindustriais, haja vista ser ainda matrizes pouco exploradas. A metodologia de superfície de resposta é constituída por ferramentas matemáticas e estatísticas utilizadas para modelar e analisar problemas para os quais desejamos respostas, que são influenciadas por várias variáveis. A principal finalidade é determinar as condições operacionais ótimas para o sistema ou determinar uma região do espaço fatorial, em que as especificações operacionais sejam satisfeitas. A validação da presença da curvatura no modelo é baseada na análise dos pontos centrais para os fatores codificados (MONTGOMERY, 2001).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi utilizar a metodologia de superfície de resposta a fim de determinar as condições ótimas para extração de compostos fenólicos antioxidantes de três resíduos agroindustriais a saber: película de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta das amostras

As amostras de película de amendoim das cultivares Runner IAC 886 e IAC 505 foram fornecidas pela CAP Agroindustrial, localizada em Dumont-SP, no primeiro semestre de 2011. A película foi obtida através do processo de blanchamento. Neste processo, a película é separada do endosperma (grão) por um aumento da temperatura, o que promove a expansão do grão. Na sequência, a temperatura é diminuída com ar frio, ocorrendo à contração do endosperma. A soltura da película ocorre por meio de um processo de abrasão (lixamento), todo este processo foi realizado pela indústria.

O resíduo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e resíduo de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) da variedade Cingapura, foram fornecidas pela Empresa Agrorosa Ltda, localizada em São Mateus-ES, no segundo semestre de 2011. O aspecto visual dos resíduos coletados pode ser vistos na Figura 8.

No laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, os resíduos foram limpos, congelados e submetidos ao processo de liofilização, sendo na sequência armazenados a -18 °C.

Figura 8 – Aspecto dos resíduos coletados: (A) Película de amendoim IAC886, (B) Película de amendoim IAC505, (C) Resíduo de pimenta-rosa e (D) Resíduo de pimenta-do-reino

3.2.2 Extração convencional: influência da temperatura e do tempo de extração na concentração de atividade antioxidante

A extração convencional foi preparada conforme descrito por Bloor (2001), com algumas modificações. Inicialmente pesou-se 0,5 g de cada resíduo liofilizado e moído e, então se adicionou 5 mL dos seguintes solventes: água destilada, propilenoglicol:água destilada (80:20 v/v) e etanol:água destilada (80:20 v/v). As extrações foram conduzidas em banho-maria nas temperaturas de 24, 35, 60, 85 e 95°C, durante os tempos de 21, 30, 50, 70 e 78 minutos, permanecendo ainda na sequência por mais 15 minutos em banho de ultrasson

(180 W), a temperatura ambiente. Após estes procedimentos, foi feita a filtração em papel *whatman* nº 3 e o sobrenadante recolhido e armazenado em frasco âmbar para as análises subsequentes. Todos os extratos foram preparados em triplicata.

3.2.3 Extração Subcrítica: influência da temperatura e da pressão na concentração de atividade antioxidante

A extração por líquido pressurizado foi preparada conforme descrito por Silva et al. (2008) e Pinto e Lanças (2009), com algumas modificações. O extrator com fluido pressurizado foi carregado com os seguintes solventes: água destilada, propilenoglicol:água destilada (80:20 v/v) e etanol:água destilada (80:20 v/v), utilizando várias pressões (55, 73, 115, 157 e 174 Kgf/cm²) e diferentes temperaturas (18, 25, 40, 55 e 61 °C). O volume do solvente foi proporcional ao volume da cela de extração. O tempo total do processo foi uma fração do tempo utilizado pelos processos convencionais (minutos), devido à maximização das taxas de transferência de massa, possibilitada pela alta pressão e temperatura adequada.

3.2.4 Otimização das condições de extração de compostos bioativos pela metodologia de superfície de resposta

Para ambas as extrações (convencional e subcrítica), o delineamento experimental foi do tipo composto central rotacional. Os níveis das variáveis estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes estudadas no processo de extração de antioxidantes

Fator	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
Extração convencional					
Temperatura (° C)	24,75	35	60	85	95,25
Tempo (minutos)	21,8	30	50	70	78,2
Extração subcrítica					
Temperatura (° C)	55,6	73	115	157	174,4
Pressão (Kgf/cm ²)	18,8	25	40	55	61,2

* $\alpha=1,41$

Algumas variáveis podem influenciar o processo de extração, dentre elas, as mais relevantes são o solvente e a sua concentração, a temperatura e o tempo de extração. Nesse estudo foram considerados os efeitos das variáveis independentes: solventes, temperatura e o tempo de extração sobre a variável dependente (atividade antioxidante, medida por meio do método ABTS).

Os fatores foram tempo e temperatura, na extração convencional e tempo e pressão na extração subcrítica, com três repetições nos pontos centrais, totalizando 11 ensaios para cada extração, realizados de forma aleatória. O delineamento utilizado está apresentado nas Tabelas 2 e 3. Após a análise dos efeitos principais e interações, os resultados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa Statistica 10. Foi utilizado o método de regressão dos quadrados mínimos para ajustar modelos matemáticos seguindo a equação:

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

Onde:

Y resposta predita;

β_0 constante;

β_i coeficiente linear;

β_{ii} coeficiente quadrático;

β_{ij} coeficiente de interação das variáveis i e j;

$X_i X_j$ variáveis independentes.

A adequação do modelo foi feita através do teste F e, coeficiente de determinação (R^2) obtidos por meio da análise de variância (ANOVA). As superfícies de resposta foram determinadas para cada solvente a uma significância de 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Delineamento composto central rotacional, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na atividade antioxidante, pela extração convencional

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	35 (-1)	30 (-1)
2	85 (+1)	30 (-1)
3	35 (-1)	70 (+1)
4	85 (+1)	70 (+1)
5	60 (0)	50 (0)
6	60 (0)	50 (0)
7	60 (0)	50 (0)
8	24,75 (-1,41)	50 (0)
9	60 (0)	78,2 (+1,41)
10	95,25 (+1,41)	50 (0)
11	60 (0)	21,8 (-1,41)

Tabela 3 – Delineamento composto central rotacional, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na atividade antioxidante pela extração subcrítica

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (Kgf/cm²)
1	73 (-1)	25 (-1)
2	157 (+1)	25 (-1)
3	73 (-1)	55 (+1)
4	157 (+1)	55 (+1)
5	115 (0)	40 (0)
6	115 (0)	40 (0)
7	115 (0)	40 (0)
8	55,6 (-1,41)	40 (0)
9	115 (0)	61,2 (+1,41)
10	174,4 (+1,41)	40 (0)
11	115 (0)	18,8 (-1,41)

3.2.5 Atividade sequestrante do radical livre ABTS^{•+}

A atividade antioxidante foi avaliada por meio do método ABTS [2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], conforme metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009). O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM), incubados à temperatura de 25 °C e protegido da luz, durante um período de 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,200$ a $\lambda = 730\text{nm}$. A atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais foi determinada pela descoloração do ABTS. Assim, uma alíquota de 20 μL dos extratos dos resíduos agroindustriais foi colocada em uma microplaca e adicionada de 220 μL da solução do radical ABTS. Após incubação por seis minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em uma leitora de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices) a $\lambda = 730\text{ nm}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ de resíduo.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Extrações selecionadas no processo de otimização

No processo de otimização da extração dos compostos antioxidantes dos resíduos agroindustriais foram definidas as melhores condições, sendo que a extração convencional foi a que apresentou os melhores resultados. Assim, as condições de extração utilizadas nesta etapa foram as seguintes:

- Película de amendoim cultivares Runner (IAC886 e IAC505)
 - extração com etanol 80% (v/v): temperatura de 60 °C e tempo de 20 minutos
 - extração com água destilada: temperatura de 90 °C e tempo de 20 minutos
 - extração com propilenoglicol 80% (v/v): temperatura de 90 °C e tempo de 20 minutos
- Pimenta-rosa
 - extração com etanol 80% (v/v): temperatura de 90 °C e tempo de 20 minutos
 - extração com água destilada: temperatura de 90 °C e tempo de 50 minutos
 - extração com propilenoglicol 80% (v/v): temperatura de 90 °C e tempo de 50 minutos

- Pimenta-do-reino

- extração com etanol 80% (v/v): temperatura de 85 °C e tempo de 50 minutos
- extração com água destilada: temperatura de 80 °C e tempo de 50 minutos
- extração com propilenoglicol 80% (v/v): temperatura de 80 °C e tempo de 50 minutos

3.3.2 Sequestro do radical livre [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (ABTS^{•+})

O método espectrofotométrico de captura do radical ABTS fornece resultados reprodutíveis, permitindo analisar uma ampla faixa de compostos, tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica (WOJDYLO et al., 2007).

Os resultados da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS, dos extratos dos resíduos agroindustriais da película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante de extratos de resíduos agroindustriais pelo método de sequestro do radical livre ABTS^{•+}

Resíduos agroindustriais	Equivalentes $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
Película de amendoim (IAC886)	1.382,67 $\pm$ 1,178Ab	539,27 $\pm$ 0,538Bc	512,19 $\pm$ 0,736Cb
Película de amendoim (IAC505)	1.396,62 $\pm$ 1,257Aa	580,44 $\pm$ 0,785Cd	859,89 $\pm$ 1,517Ba
Pimenta-rosa	931,00 $\pm$ 0,284Ac	639,57 $\pm$ 0,378Ba	484,07 $\pm$ 0,939Cc
Pimenta-do-reino	226,22 $\pm$ 0,314Ad	98,89 $\pm$ 0,628Cd	223,20 $\pm$ 0,817Bd

Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada). Letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Estatisticamente a extração com o solvente etanol 80% apresentou os maiores resultados para o sequestro do radical ABTS, quando comparado com os solventes propilenoglicol 80% e água. O extrato etanólico da película de amendoim IAC505 e IAC886 foram superiores em relação aos demais resíduos, (1.396,62 e 1.382,67 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente), enquanto que para os solventes água e propilenoglicol 80% os resultados

foram de 539,27 e 512,19 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente. A capacidade antioxidante do resíduo da película de amendoim possui atividades para o sequestro do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ que variam de 59,10 a 103,8 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, conforme Bansode et al. (2014). Este estudo também demonstrou que a tonalidade da película de amendoim pode estar correlacionada com o conteúdo de compostos fenólicos. Assim, os resultados da atividade antioxidante para a película de amendoim das cultivares Runner IAC886 e IAC505 (Tabela 4) são significativamente superiores aos do estudo relatado acima.

O resíduo de pimenta-rosa apresentou valores de 931,00 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ no solvente etanol 80%, atividade esta maior que quando comparado aos extratos obtidos pelos solventes água (639,57 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) e propilenoglicol 80% (484,07 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) ($P < 0,05$).

O resíduo da pimenta-do-reino apresentou maiores atividades no solvente etanol 80% (226,22 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$), seguido do propilenoglicol 80% (223,20 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) e a água (98,89 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) ($P < 0,05$). Os valores de atividade antioxidante encontrados por Biazotto (2014) em frutos de pimenta-rosa e pimenta-do-reino, utilizando como solvente o metanol, foi de 663,74 e 111,27 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente.

3.3.3 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da película de amendoim (IAC886 IAC505)

Os resultados da resposta da atividade sequestrante do radical livre $\text{ABTS}^{\cdot+}$ dos extratos da película de amendoim (IAC886 e IAC505), extração convencional e subcrítica, encontram-se na Tabela 5.

A atividade antioxidante para a película de amendoim utilizando a extração convencional, com os solventes água e propilenoglicol 80%, proporcionou valores de até 546,04 e 805,94 (IAC886) e 587,11 e 817,39 $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ (IAC505), respectivamente (Tabela 4). Entretanto, a maior atividade antioxidante para este resíduo foi alcançada quando foi utilizado o solvente etanol 80%, na extração convencional, cujos resultados encontrados foram de 1.391,17 e 1.400,18 $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ de película de amendoim para as cultivares IAC886 e IAC505, respectivamente.

Tabela 5 – Resposta da atividade sequestrante do radical livre ABTS^{•+} ($\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) dos extratos da película de amendoim (IAC886 e IAC505), extração convencional e subcrítica

Resíduo de película de amendoim IAC886						
Ensaio	Convencional			Subcrítica		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
1	869,48	387,71	404,38	671,06	264,75	224,17
2	1.045,33	415,83	427,81	586,94	213,50	281,25
3	972,60	398,65	189,27	604,00	188,50	309,17
4	1.190,33	366,88	281,46	443,41	185,17	247,08
5	789,79	389,79	107,13	627,53	306,83	275,25
6	770,00	390,83	108,17	605,18	301,00	280,42
7	787,71	392,92	106,50	628,71	296,00	289,58
8	982,83	428,33	316,95	534,00	236,00	362,50
9	921,17	229,90	170,52	305,76	278,08	425,83
10	1.323,67	546,04	805,94	334,00	128,92	253,75
11	1.391,17	377,81	524,69	404,59	328,50	350,83

Resíduo de película de amendoim IAC505						
Ensaio	Convencional			Subcrítica		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
1	546,22	391,56	448,50	442,82	277,25	533,33
2	1.110,40	413,22	402,67	396,94	215,17	496,67
3	467,33	401,00	151,56	479,88	182,67	651,67
4	1.286,40	328,22	399,33	398,71	186,83	562,08
5	434,56	391,00	103,09	334,59	391,00	567,92
6	435,67	387,22	106,20	382,82	387,22	542,92
7	433,44	387,67	104,87	362,82	387,67	595,42
8	1.181,51	427,11	388,22	629,88	198,92	502,50
9	1.309,51	231,56	195,44	580,47	399,75	661,25
10	1.344,18	587,11	817,39	332,82	98,50	572,08
11	1.400,18	357,67	435,44	437,53	335,58	592,50

Na extração subcrítica, quando comparada a extração convencional, os resultados para a película de amendoim foram menores em todos os solventes testados. Assim, as maiores atividades antioxidante para a extração com água foram de 306,83 e 399,85 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, de 425,83 e 661,25 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ para o propilenoglicol 80% e de 671,06 e 629,88 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ para o etanol 80%, para as películas das variedades IAC886 e IAC505, respectivamente.

A eficiência da extração de compostos fenólicos por líquido pressurizado depende de vários parâmetros, que podem ser ajustáveis (RAVERCHON; MARCO, 2006), mas precisam ser controlados para maximizar os benefícios dessa técnica. Segundo Pereira e Meireles (2010); Ibanez et al. (2012); Cavalcanti e Meireles (2012); Herrero et al. (2013) e De Melo et al. (2014), os principais parâmetros que influenciam a eficiência da extração são: densidade, pressão, temperatura e vazão do solvente.

Segundo Cowan (1999) a eficiência da extração depende principalmente da escolha do solvente. O solvente metanol e as misturas de metanol/água são os solventes mais utilizados para extração de substâncias fenólicas (TSAO, 2010; NOUR et al., 2014). Outros solventes tais como acetona, acetato de etila, etanol e misturas de solventes também têm sido utilizados, mas geralmente promovem baixo rendimento. A adição de água ao solvente contribui para criar um meio moderadamente polar, favorecendo a extração de polifenóis (LAPORNIK et al., 2005). Assim, vários fatores podem ter influenciado em um menor valor de atividade antioxidante para a extração subcrítica.

Para a extração dos compostos antioxidantes deste trabalho foi feita a escolha por solventes, que apesar de não serem os melhores extratores, são aqueles que apresentam baixa toxicidade e/ou pouco ou nenhum potencial de poluição ambiental, haja vista o grande volume de solventes utilizados. Isto é importante, pois o principal é a utilização pela indústria de alimentos e/ou farmacêutica.

Tendo em vista que as maiores atividades foram obtidas para a extração convencional, nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados de análise de variância do resíduo de película de amendoim (IAC886 e IAC505) para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%.

Tabela 6 – Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de película de amendoim IAC886

Fatores	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor P
Solvente Água					
<i>Temperatura (L)</i>	1	3303,11	3303,11	1299,87	0,000768
<i>Tempo (L)</i>	1	7622,27	7622,27	2999,59	0,000333
<i>Temperatura (Q)</i>	1	12617,28	12617,28	4965,28	0,000201
<i>Tempo (Q)</i>	1	11220,49	11220,49	4415,60	0,000226
Temperatura x tempo	1	896,90	896,90	352,95	0,002821
Falta de ajuste	3	7327,30	2442,43	961,17	0,001039
Erro puro	2	5,08	2,54		
Total	10				
Solvente Propilenoglicol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	81264,7	81264,7	114258,8	0,000009
<i>Tempo (L)</i>	1	92905,8	92905,8	130626,4	0,000008
<i>Temperatura (Q)</i>	1	213606,2	213606,2	300332,1	0,000003
<i>Tempo (Q)</i>	1	43098,7	43098,7	60597,1	0,000017
Temperatura x tempo	1	1181,7	1181,7	1661,4	0,000601
Falta de ajuste	3	78157,0	26052,3	36629,8	0,000027
Erro puro	2	1,4	0,7		
Total	10	472930,2			
Solvente Etanol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	95804,1	95804,1	810,05	0,001232
<i>Tempo (L)</i>	1	21548,2	21548,2	182,19	0,005444
<i>Temperatura (Q)</i>	1	128796,2	128796,2	1089,01	0,000917
<i>Tempo (Q)</i>	1	131300,5	131300,5	1110,18	0,000900
Temperatura x tempo	1	438,4	438,4	3,707	0,194066
Falta de ajuste	3	142885,1	47628,4	402,71	0,002478
Erro puro	2	236,5	118,3		
Total	10	462327,6			

(L) Linear e (Q) Quadrático.

Tabela 7 – Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de película de amendoim IAC505

Fatores	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor P
Solvente Água					
<i>Temperatura (L)</i>	1	3817,15	3817,15	895,352	0,001115
<i>Tempo (L)</i>	1	8048,63	8048,63	1887,16	0,000529
<i>Temperatura (Q)</i>	1	17053,92	17053,92	4000,16	0,000250
<i>Tempo (Q)</i>	1	14978,78	14978,78	3513,42	0,000285
Temperatura x tempo	1	2229,94	2229,94	523,05	0,001906
Falta de ajuste	3	11570,74	3856,91	904,67	0,001104
Erro puro	2	8,53	4,26		
Total	10	70857,29			
Solvente Propilenoglicol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	81663,1	81663,1	33538,6	0,000030
<i>Tempo (L)</i>	1	51140,8	51140,8	113859,0	0,000048
<i>Temperatura (Q)</i>	1	277235,3	277235,3	21003,2	0,000009
<i>Tempo (Q)</i>	1	34015,1	34015,1	13969,8	0,000072
Temperatura x tempo	1	21551,9	21551,9	8851,2	0,000113
Falta de ajuste	3	45201,6	15067,2	6188,0	0,000162
Erro puro	2	4,9	2,4		
Total	10	477848,8			
Solvente Etanol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	95804,1	95804,1	810,05	0,001232
<i>Tempo (L)</i>	1	21548,2	21548,2	182,19	0,000917
<i>Temperatura (Q)</i>	1	128796,2	128796,2	1089,01	0,005444
<i>Tempo (Q)</i>	1	131300,5	131300,5	1110,18	0,000900
Temperatura x tempo	1	438,4	438,4	3,70	0,194066
Falta de ajuste	3	142885,1	47628,4	402,71	0,002478
Erro puro	2	236,5	118,3		
Total	10	462327,6			

(L) Linear e (Q) Quadrático.

Os modelos quadráticos gerados para os solventes água, propilenoglicol 80% e etanol 80%, na extração convencional do resíduo de película de amendoim (IAC886 e IAC505), apresentaram falta de ajuste, conforme pode ser visualizado nas tabelas 6 e 7. Os valores encontrados para a atividade antioxidante na extração subcrítica foram menores quando comparados aos valores da extração convencional.

Pode-se observar no resíduo das películas uma tendência para temperaturas mais amenas. Assim, os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos para os solventes etanol 80% (temperatura de 60 °C e tempo de 20 minutos); água (temperatura de 90 °C e tempo de 20 minutos) e propilenoglicol 80% (temperatura de 90 °C e tempo de 20 minutos). Isto demonstra que a película de amendoim necessita de um menor tempo (20 minutos) para que seus componentes ativos sejam extraídos. De fato, com maiores tempos de extração observou-se uma menor atividade antioxidante (Figuras 9 e 10).

Na extração subcrítica, quando foi utilizada a temperatura de 174,4 °C observou-se que os resultados apresentados foram duas vezes menores quando comparados a extração convencional. Assim, pode-se inferir que o aumento da temperatura pode ter levado a degradação dos compostos antioxidantes.

Figura 9 – Gráficos de superfície de resposta do resíduo de película de amendoim IAC886. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%

Figura 10 – Gráficos de superfície de resposta do resíduo de película de amendoim IAC505. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%

3.3.4 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da pimenta-rosa

Os resultados da resposta da atividade sequestrante do radical livre ABTS^{•+} do extrato do resíduo de pimenta-rosa, para as extrações convencional e subcrítica, encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Resposta de atividade sequestrante do radical livre ABTS^{•+} ($\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) do extrato de pimenta-rosa, extração convencional e subcrítica

Ensaio	Convencional			Subcrítica		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
1	338,00	42,43	49,45	199,11	196,29	208,39
2	882,43	361,57	177,55	564,80	288,67	298,25
3	186,12	121,95	44,21	236,33	136,29	160,86
4	775,29	345,50	176,36	616,36	221,52	258,81
5	138,62	153,14	54,57	274,11	327,71	403,67
6	141,95	157,67	53,38	276,33	313,42	400,31
7	140,95	151,48	53,86	279,67	310,57	399,48
8	145,52	109,33	75,05	174,58	253,90	300,78
9	464,43	131,21	92,79	438,58	349,62	350,12
10	924,57	641,71	482,29	560,36	412,00	428,21
11	472,64	339,79	263,71	380,80	346,76	387,00

O solvente etanol 80%, na extração convencional, apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante ($924,57 \mu\text{mol.g}^{-1}$), enquanto que os solventes água e propilenoglicol 80% foram de 641,71 e $482,29 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados de atividade na extração subcrítica para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% ($616,36$, $412,00$ e $428,21 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente) foram menores que quando comparados com a extração convencional. Na Tabela 9 estão apresentados os dados da análise de variância da atividade antioxidante para o resíduo de pimenta-rosa, quando da extração convencional (solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%).

Tabela 9 – Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de pimenta-rosa

Fatores	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor P
Solvente Água					
<i>Temperatura (L)</i>	1	209717,4	209717,4	20429,48	0,000049
<i>Tempo (L)</i>	1	6668,8	6668,8	649,64	0,001536
<i>Temperatura (Q)</i>	1	44301,1	44301,1	4315,56	0,000232
<i>Tempo (Q)</i>	1	1916,8	1916,8	186,73	0,005313
Temperatura x tempo	1	2284,6	2284,6	222,55	0,004463
Falta de ajuste	3	37304,4	12434,8	1211,33	0,000825
Erro puro	2	20,5	10,3		
Total	10	300633,3			
Solvente Propilenoglicol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	87298,5	87298,5	243555,8	0,000004
<i>Tempo (L)</i>	1	7676,2	7676,2	21415,9	0,000047
<i>Temperatura (Q)</i>	1	38801,6	38801,6	108253,4	0,000009
<i>Tempo (Q)</i>	1	5996,0	5996,0	16728,4	0,000060
Temperatura x tempo	1	4,1	4,09	11,4	0,077559
Falta de ajuste	3	46997,1	15665,71	43706,1	0,000023
Erro puro	2	0,7	0,36		
Total	10	181217,1			
Solvente Etanol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	624615,5	624615,5	213936,3	0,000005
<i>Tempo (L)</i>	1	9180,5	9180,5	3144,4	0,000318
<i>Temperatura (Q)</i>	1	244625,5	244625,5	83786,4	0,000012
<i>Tempo (Q)</i>	1	172568,0	172568,0	59106,1	0,000017
Temperatura x tempo	1	500,4	500,4	171,4	0,005784
Falta de ajuste	3	11152,9	3717,6	1273,3	0,000785
Erro puro	2	5,8	2,9		
Total	10	970514,0			

(L) Linear e (Q) Quadrático.

Os modelos quadráticos gerados para os solventes água, propilenoglicol 80% e etanol 80% de pimenta-rosa apresentaram falta de ajuste. Como os valores encontrados para a atividade antioxidante na extração subcrítica foram menores quando comparados aos valores da extração convencional, optou-se em apenas demonstrar na Tabela 9 os dados para a extração convencional.

Os modelos gerados na extração convencional demonstram que havia a necessidade de se aumentar a temperatura e o tempo de extração. Entretanto, quando se elevou a temperatura para 174,4 °C na extração subcrítica, houve uma redução de 50% nos valores de do radical ABTS.

O aumento de temperatura na extração subcrítica demonstrou ser ineficiente na extração dos compostos antioxidantes, enquanto que na extração convencional as temperaturas apresentaram falta de ajuste (Figura 11).

Figura 11 – Gráficos de superfície de resposta do resíduo de pimenta-rosa. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%

O solvente etanol 80%, independente da temperatura e tempo de extração, exibiu a maior capacidade de sequestro do radical ABTS, demonstrando que os compostos presentes na pimenta-rosa possuem maior afinidade por este solvente.

Segundo Naczk e Shahidi (2004), soluções aquosas de etanol, metanol, acetona, propilenoglicol, e em diferentes concentrações, são as mais utilizadas para a extração de compostos fenólicos. Assim, a eficácia de extração dependerá da polaridade dos polifenóis presentes na amostra, bem como do grau de polimerização e da interação com outros constituintes. De fato, Pérez-Jiménez et al. (2008) ressaltam que para uma maior eficiência do processo de extração deve-se combinar pelo menos dois ciclos de extração, utilizando-se soluções de solventes orgânicos aquosos, com diferentes polaridades, de modo a extrair compostos com diferentes estruturas químicas.

3.3.5 Modelo experimental da extração convencional e subcrítica da pimenta-do-reino

Os resultados da resposta da atividade antioxidante do extrato do resíduo de pimenta-do-reino, obtido pelas extrações convencional e subcrítica, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Resposta de atividade sequestrante do radical livre ABTS⁺ ($\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$) do extrato de pimenta-do-reino, extração convencional e subcrítica

Ensaio	Convencional			Subcrítica		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%	Etanol80%	Água	Propilenoglicol 80%
1	94,89	50,67	80,89	50,60	10,98	40,37
2	140,67	67,11	152,00	100,16	76,81	100,81
3	95,11	39,78	43,33	53,60	16,60	32,08
4	202,67	70,22	200,00	83,38	53,79	70,83
5	165,42	91,64	204,86	61,16	29,63	60,98
6	164,53	93,87	218,31	65,82	26,50	62,33
7	166,31	96,98	219,20	68,93	27,33	61,69
8	135,78	52,22	52,89	28,16	16,50	32,36
9	111,56	76,22	119,33	58,04	54,31	100,35
10	229,11	104,89	114,00	81,93	64,52	98,69
11	74,00	46,89	87,33	59,04	38,58	60,81

Os valores de atividade antioxidante encontrado para o resíduo de pimenta-do-reino foram de maneira geral menor quando comparados aos resíduos de película de amendoim e pimenta-rosa. Os solventes etanol 80% e propilenoglicol 80%, na extração convencional, apresentaram as melhores atividades antioxidante (229,11 e 219,20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente), enquanto que o solvente água foi de 104,89 $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

Novamente, os resultados encontrados na extração subcrítica para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (100,16, 76,81 e 100,81 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente) foram menores que na extração convencional. Na extração convencional, os resultados de atividade antioxidante foi de maneira geral, 198% maior que quando comparado com a extração subcrítica.

Como os valores encontrados para a atividade antioxidante na extração subcrítica foram menores quando comparados aos valores da extração convencional, optou-se mostrar apenas os dados da extração convencional. Na Tabela 11 estão apresentados os dados da análise de variância da atividade antioxidante para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%.

Tabela 11 – Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e tempo dos solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% (extração convencional) na atividade antioxidante do resíduo de pimenta-do-reino

Fatores	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor P
Solvente Água					
<i>Temperatura (L)</i>	1	1839,97	1839,97	255,78	0,003887
<i>Tempo (L)</i>	1	141,33	141,33	19,64	0,010194
<i>Temperatura (Q)</i>	1	694,85	694,85	96,59	0,047314
<i>Tempo (Q)</i>	1	2171,41	2171,41	301,86	0,003296
Temperatura x tempo	1	49,00	49,00	6,81	0,120778
Falta de ajuste	3	734,64	244,882	34,04	0,028672
Erro puro	2	14,38	7,19		
Total	10	5129,31			
Solvente Propilenoglicol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	12356,95	12356,95	494,19	0,002017
<i>Tempo (L)</i>	1	387,02	387,02	15,47	0,058952
<i>Temperatura (Q)</i>	1	22679,88	22679,88	907,04	0,001101
<i>Tempo (Q)</i>	1	16110,10	16110,10	644,30	0,001548
Temperatura x tempo	1	1830,13	1830,13	73,19	0,013389
Falta de ajuste	3	4023,72	1341,24	53,64	0,018357
Erro puro	2	50,01	25,00		
Total	10	48864,09			
Solvente Etanol 80%					
<i>Temperatura (L)</i>	1	10178,80	10178,80	12850,39	0,000078
<i>Tempo (L)</i>	1	1663,24	1663,24	2099,79	0,000476
<i>Temperatura (Q)</i>	1	316,90	316,90	400,07	0,002490
<i>Tempo (Q)</i>	1	7910,92	7910,92	9987,28	0,000100
Temperatura x tempo	1	954,19	954,19	1204,64	0,000829
Falta de ajuste	3	98,30	32,77	41,37	0,023695
Erro puro	2	1,58	0,79		
Total	10	22895,53			

(L) Linear e (Q) Quadrático.

Quando se analisaram os modelos gerados para os solventes água, propilenoglicol 80% e etanol 80% do resíduo de pimenta-do-reino, pode-se verificar que apresentaram falta de ajuste (Tabela 11). Os menores valores de falta de ajuste foram observados para os solventes água e etanol 80%. Os resultados observados na Figura 12 demonstram a necessidade de se aumentar a temperatura e o tempo de extração, como já observado para o resíduo de pimenta-rosa.

Segundo Spigno et al. (2007), o tempo e a temperatura de extração são parâmetros que devem ser melhorados a fim de diminuir o tempo e custo do processo de extração. Entretanto alguns autores, embora concordem que a temperatura pode favorecer a extração de alguns compostos antioxidantes, ressaltam que pode ocorrer degradação desses compostos com possível diminuição ou inativação da ação antioxidante (YILMAZ; TOLEDO, 2006; PINELO et al., 2005).

Figura 12 – Gráficos de superfície de resposta do resíduo de pimenta-do-reino. Extração convencional – efeito da temperatura e tempo na atividade antioxidante - (A) solvente água, (B) solvente propilenoglicol 80% e (C) solvente etanol 80%. Extração subcrítica – efeito da temperatura e pressão na atividade antioxidante – (D) solvente água, (E) solvente propilenoglicol 80% e (F) solvente etanol 80%

3.4 Conclusões

Os resultados obtidos por meio do processo de otimização dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino permitiram identificar diferenças entre a atividade antioxidante dos extratos produzidos sob os diferentes níveis das faixas de temperatura e pressão estudados. A extração com etanol 80% foi a que apresentou os melhores resultados para a atividade antioxidante, tanto na extração convencional quanto na subcrítica.

Assim, considerando que nos resíduos agroindustriais existe uma diversidade de polifenóis com polaridades diferentes, a utilização de solventes combinados com temperatura e tempo de extração possibilita uma extração mais eficiente dos constituintes bioativos.

Referências

ABRAHÃO, S.A.; PEREIRA, R.G.F.A.; DUARTE, S.M.S.; LIMA, A.R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E.B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Oxford, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.

AYALA-ZAVALA, J.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOXCARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; WASIM SIDDIQUI, M.D.; DÁVILA-AVIÑA, J.E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, Toronto, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 335, p. 3-14, 2001.

CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Fundamentals of supercritical fluid extraction. In: JANUS, Z.P. (Ed.). **Comprehensive sampling and sample preparation**. Oxford: Academic Press, 2012. p. 177-133.

CHEMAT, F.; ZILL, E.H.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, New Jersey, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DE MELO, M.M.R.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal of Supercritical Fluids**, Cincinnati, v. 92, p. 115-176, 2014.

GONZÁLEZ-CENTENO, M.R.; COMAS-SERRA.F.; FEMENIA A.; ROSSELLÓ C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 506-514, 2015.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, New Jersey, v. 43, p. 1-9, 2013.

HUANG, H.; HSU, C.; YANG, B.B.; WANG, C. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, New Jersey, v. 33, n. 1, p. 54-62, 2013.

HUSSAIN, A.I.; CHATHA, S.A.S.; NOOR, S.; KHAN, Z.A.; ARSHAD, M.U.; RATHORE, H.A.; SATTAR, M.Z.A. Effect of extraction techniques and solvent systems on the extraction of antioxidant components from peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hulls. **Food Analytical Methods**, Silver Spring, v. 5, n. 4, p. 890-896, 2012.

IBANEZ, E.; HERRERO, M.; MENDIOLA, J.A.; CASTRO-PUYANA, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria and invertebrates. In: HAYES, M. (Ed.), **Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications**. New York: Springer, 2012. p. 55-98.

JENTZER, J.B.; ALIGNAN, M.; VACA-GARCIA, C.; RIGAL, L.; VILAREM, G. Response surface methodology to optimize accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, Barking, v. 166, p. 561-567, 2015.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola: revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S.I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, Toronto, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M.C.; MEZA-VELÁZQUEZ, J.A.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 106, p. 179-189, 2014.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 4th ed. New York: Wiley, 2001. 26 p.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 53, p. 133-139, 2014.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 3, n. 3, p. 340-372, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZRUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Toronto, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, 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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

PINTO, J.S.S.; LANÇAS, F.M. Design, construction and evaluation of a simple pressurized solvent extraction system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 913-917, 2009.

RAVERCHON, E.; MARCO, I.D. Review: supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, Cincinnati, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plants Foods for Human Nutrition**, New York, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

SILVA, D.M.L.; CAMARGO, P.B.; MARTINELLI, L.A.; LANÇAS, F.M.; PINTO, J.S. S.; AVELAR, W.E.P. Organochlorine pesticides in Piracicaba river basin (São Paulo/Brazil): a survey of sediment, bivalve and fish. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 214-219, 2008.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

TAO, Y.; WU, D.; ZHANG, Q.A.; SUN, D.W. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 706-715, 2014.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, Cambridge, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

WIJEKOON, M.M.J.O.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, n. 4/5, p. 615-619, 2011.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 41-44, 2006.

4 POTENCIAL ANTIRADICAL DE EXTRATOS DE RESÍDUOS DE AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO OBTIDOS POR DIFERENTES SISTEMAS DE SOLVENTES

Resumo

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, e apresentam vários efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. Nos últimos anos houve um crescente interesse sobre o estresse oxidativo e a busca por compostos bioativos, sendo estes temas recorrentes em estudos de prevenção de doenças cardiovasculares, distúrbios que acometem o sistema nervoso e câncer. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, extraídos de forma convencional com solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%. Os extratos dos resíduos agroindustriais foram avaliados *in vitro* quanto a capacidade de redução de Folin-Ciocalteu e o potencial de desativação dos radicais livres sintéticos (DPPH e ABTS) e espécies reativas de oxigênio (radicais peroxila, superóxido e ácido hipocloroso). De acordo com os resultados obtidos, pode observar que dentre os solventes utilizados, o etanol 80% foi o que obteve a maior concentração de compostos antioxidantes. Entre os resíduos avaliados, a película de amendoim (IAC505 e IAC886) foi o que apresentou as maiores atividades antiradical frente a todos os métodos avaliados, com exceção da desativação do radical superóxido e ácido hipocloroso. No sequestro do ânion superóxido e ácido hipocloroso, o extrato da pimenta-do-reino foi 2,5 e 7,6 vezes mais ativa, respectivamente, que o extrato da película de amendoim. A partir dos resultados encontrados pode-se constatar que estes resíduos possuem compostos fenólicos com alto potencial antioxidante, passíveis então de serem utilizados industrialmente ou para elaboração de alimentos funcionais.

Palavra-chave: Resíduos agroindustriais; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos; solventes

Abstract

Phenolic compounds are commonly found in edible and inedible plants, and has multiple biological effects, including antioxidant activity. In recent years, there has been a growing interest in oxidative stress and the search for bioactive compounds, which is a recurring theme in studies of prevention of cardiovascular diseases, disorders that affect the nervous system and cancer. This study aimed to analyze and determine the antioxidant capacity of agro-industrial waste peanut skin (IAC886 and IAC505), pink pepper and black pepper, extracted by means of solvents ethanol 80%, water and propyleneglycol 80%. Extracts of the agro-industrial waste were evaluated *in vitro* for the ability to reduce the Folin-Ciocalteu, scavenging activity of DPPH radical, ABTS radical and oxygen absorption capacity (ORAC). According to the results, can see that from the solvents used ethanol 80% was the one that had the highest concentration of antioxidant compounds. However the skin peanut residue (IAC505 and IAC886), and regardless of whether solvent system, showed the highest antioxidant activity against all methods evaluated. From the results found you can see that these residues have phenolic compounds with high antioxidant potential, which could then be used industrially or for the preparation of functional foods.

Keyword: Agro-industrial residues; Antioxidant activity; Phenolic compounds; Solvents

4.1 Introdução

Nos últimos anos houve um aumento crescente sobre o tema estresse oxidativo, bem como a busca por compostos bioativos que possam prevenir os seus efeitos deletérios, os quais estão associados com doenças cardiovasculares, distúrbios que acometem o sistema nervoso e câncer. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, quando sua produção é excessiva, estão envolvidas na patogênese de várias doenças humana. Entretanto, há evidência de que o consumo de alguns alimentos, suplementos alimentares e bebidas (chás, vinhos, sucos, entre outros) proporcionam uma redução do dano oxidativo nos sistemas biológicos (LOIZZO et al., 2015). Assim, pode-se concluir que o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Os antioxidantes são compostos que podem atrasar ou inibir a oxidação dos lipídios ou outras moléculas por inibição a iniciação ou propagação de reações na cadeia de oxidação, podendo diminuir ou prevenir os efeitos adversos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HALIWELL, 1995; VELIOGLU et al., 1998; HUANG et al., 2005; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Quando adicionado a alimentos, antioxidantes minimizam o ranço, retardam a formação de produtos de oxidação tóxicos, mantêm a qualidade nutricional e aumentam a vida de prateleira (JADHAY et al., 1996). De acordo com esta definição, nem todos os compostos antioxidantes envolvidos em uma reação química são antioxidantes, apenas aqueles que são capazes de proteger o alvo da oxidação cumprem esse critério (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Os antioxidantes endógenos funcionam por meio de sistemas enzimáticos como, por exemplo, a glutathione peroxidase, catalase e a superóxido dismutase, ou não enzimaticamente, como a glutathione, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (PIETTA, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Existem duas categorias básicas de antioxidantes, a sintética e a natural. O interesse sobre os antioxidantes naturais tem aumentando devido à sua segurança presumida, potencial nutricional e efeitos biológicos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Estudos epidemiológicos demonstram que uma ingestão diária de antioxidantes naturais na dieta (vitaminas, carotenoides e fenólicos) pode auxiliar na proteção contra algumas doenças (STEFFEN et al., 2003).

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, e possuem vários efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante. A atividade antioxidante desses compostos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e arquitetura da estrutura química (OSAWA, 1994; KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Essas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, em razão da ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias. Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis sobre espécies reativas de oxigênio, eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenoides, apresentarem ação pró-oxidante (FARAH; DONANGELO, 2006; SOUZA et al., 2007).

Extratos de frutas, ervas aromáticas, legumes, cereais, nozes, entre outros vegetais são ricos em compostos fenólicos e tem cada vez mais despertado o interesse pela indústria alimentos e farmacêutica. A película de amendoim contém altas concentrações de antioxidantes naturais, ou seja, compostos polifenólicos que podem ser extraídos e potencialmente utilizado em uma grande variedade de aplicações alimentares e farmacêuticas (BALLARD et al., 2010; OLDONI et al. 2016). A película de amendoim têm sido utilizada a muitos anos na medicina tradicional chinesa para o tratamento de hemorragias e bronquite crônica (WANG et al., 2007).

Nas últimas décadas foram realizados estudos fitoquímicos que demonstraram que a pimenta-do-reino é rica em retinol, ácido ascórbico e em minerais como ferro, potássio e possui uma ampla variedade de metabólitos que se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcaloides, propenilfenalinas e outros raramente encontrados em outras espécies, os quais quando isolados têm apresentado importantes ações biológicas, especialmente anti-inflamatória e antioxidante (BONG et al., 2010).

A pimenta-rosa apresenta uma característica chamada de pungência a qual é atribuída a capsaicina, sendo que este composto é acumulado principalmente na parte interna do fruto e suas características conferem benefícios a saúde (PAGANI et al., 2014).

Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de alimentos, bebidas e amostras biológicas. Os métodos para medir a capacidade antioxidante mais comumente utilizados são: o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil radical (DPPH), o radical ABTS [2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e a capacidade de absorção de radicais do oxigênio (ORAC) (BÜYÜKTUNCEL; PORGALI;

ÇOLAK, 2014). Estes métodos diferem uns dos outros em termos de princípios do ensaio e condições de reação. Dessa forma apenas com um ensaio não é possível se avaliar com precisão todos os antioxidantes. Portanto recomenda-se uma combinação de ensaios para proporcionar um perfil mais completo da capacidade antioxidante (PERÉZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Frente a necessidade de estudos que propiciem o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de desativação dos radicais livres sintéticos (DPPH e ABTS) e espécies reativas de oxigênio (radicais peroxila, superóxido e ácido hipocloroso) de extratos de película de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos por diferentes sistemas de solventes.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta das amostras

As amostras de película de amendoim das cultivares Runner IAC886 e IAC505 foram produzidas por meio do processo de blanchamento, e fornecidas pela CAP Agroindustrial, situada em Dumont-SP. O resíduo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) da variedade Cingapura, foram fornecidas pela Empresa Agrorosa Ltda, localizada na cidade de São Mateus-ES.

4.2.2 Preparo das amostras

No laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, os resíduos foram limpos, congelados e submetidos ao processo de liofilização, sendo na sequência armazenados a -18 °C.

A extração convencional foi preparada conforme descrito por Bloor (2001), com algumas modificações. Inicialmente pesou-se 0,5 g de cada resíduo liofilizado e moído e, então se adicionou 5 mL de um dos solventes: água destilada, propilenoglicol:água destilada (80:20 v/v) ou etanol:água destilada (80:20 v/v). As extrações foram conduzidas em banho-maria nos tempos de 20 ou 50 minutos (conforme detalhado no item 3.3.1, Capítulo 3) e em seguida permaneceram por mais 15 minutos em banho de ultrassom (180 W), a temperatura ambiente. Após estes processos, os extratos foram filtrados em papel *whatman* nº 3 e os

sobrenadantes recolhidos e armazenados em frasco âmbar para as análises subsequentes. Os extratos dos resíduos foram preparados em triplicata.

4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos nas condições selecionadas

4.2.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu

A análise de atividade antioxidante de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Al-Duais et al. (2009). O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Uma alíquota de 20 µL dos extratos dos resíduos agroindustriais foram introduzidos em microplaca e adicionados 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu a 10%. Na sequência, e após a homogeneização, foram acrescentados 75 µL de uma solução de carbonato de potássio 7,5%. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente, e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitora de microplacas a $\lambda = 740\text{nm}$. Os resultados do conteúdo total de compostos fenólicos foram expressos em equivalente de ácido gálico, calculado por meio do ajuste de uma curva de calibração de ácido gálico (20 a 120 µg/mL). As análises foram conduzidas em triplicatas.

4.2.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

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

4.2.3.3 Capacidade sequestrante do radical peroxila

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

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

Onde AUC é a área abaixo da curva, f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0 e f_i , a fluorescência relativa ao tempo i. A AUC net foi calculada pela subtração da AUC do controle (AUC_{ct}) do valor da AUC da amostra ou padrão (AUC_{am} ou AUC_{pd}), de acordo com a Equação 2:

$$AUC_{net} = AUC_{am \text{ ou } pd} - AUC_{ct} \quad (\text{Equação 2})$$

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

4.2.3.4 Capacidade sequestrante do radical ânion superóxido

O ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita por Melo et al. (2015). O radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) foi gerado por via não enzimática por meio do sistema NADH/PMS (dinucleótido de β -nicotinamida e adenina/fenazina metassulfato). O meio reacional continha os seguintes reagentes, no volume final de 300 µL: 50 µL do extrato dos resíduos agroindustriais em cinco diferentes concentrações diluídos em tampão fosfato de potássio (19

mM e pH 7,4), 100 µL NADH (498 µM), 100 µL NBT (129 µM) e 50 µL de PMS (16,2 µM). Os controles foram conduzidos nas mesmas condições, sendo o volume do extrato substituído por tampão fosfato de potássio (19 mM e pH 7,4).

A capacidade de desativação do radical peroxila foi determinada pelo monitoramento dos extratos dos resíduos agroindustriais em reduzir o NBT para diformazan. Dessa forma foram realizadas leituras a cada um minuto, em uma leitora de microplacas, durante um intervalo de 10 minutos (estabilização do sistema) a $\lambda=560$ nm e em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em termos de EC_{50} , ou seja, a concentração mínima necessária para inibir em 50 % a redução do sal tetrazólio (NBT) em relação ao controle (equação 3). Este valor foi obtido por uma regressão linear entre as concentrações utilizadas do extrato e a porcentagem de inibição da redução do NBT de cada extrato.

$$\left(\frac{\text{Absorbância controle } final + \text{Absorbância do extrato } final}{\text{Absorbância controle } final} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 3})$$

4.2.3.5 Capacidade sequestrante do ácido hipocloroso

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos dos resíduos agroindustriais na oxidação induzida por HOCl da DHR (dihidrorhodamina 123) para rodamina 123, conforme descrito por Melo et al. (2015). O ácido hipocloroso foi preparado por ajuste do pH a 6,2 de uma solução 1% de NaOCl, com adição da solução 10% de H_2SO_4 . A concentração de ácido hipocloroso foi determinado espectrofotometricamente a $\lambda=235$ nm, utilizando o coeficiente de absorção molar de 100 M/cm em solução de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. O meio reacional foi formado pelos seguintes reagentes, para um volume final de 300 µL: tampão fosfato 100 mM, pH 7,4; extratos dos resíduos agroindustriais, DHR (5 µM), e HOCl (5 µM). O ensaio foi realizado a 37 °C em uma leitora de microplacas e a fluorescência foi medida imediatamente com o comprimento de onda de emissão de $\lambda=528 \pm 20$ nm e excitação de $\lambda=485 \pm 20$ nm. Os resultados foram expressos como EC_{50} (mg/mL) de cada extrato.

4.2.3.6 Análise estatística

O delineamento experimental para os ensaios de atividade antioxidante foi inteiramente casualizado com três repetições. A análise de variância foi realizada com auxílio

procedimento GLM do programa SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para análise multivariada foi utilizado o procedimento FACTOR, transformando as análises de compostos fenólicos, DPPH, ABTS e ORAC em dois fatores. Posteriormente com o procedimento CLUSTER, os resíduos foram agrupados por similaridade.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu

Os resultados da capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu dos extratos dos resíduos agroindustriais da película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, expressos em mg/g (equivalentes em ácido gálico), estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Capacidade redutora dos extratos resíduos agroindustriais – método Folin-Ciocalteu

Resíduos agroindustriais			Equivalentes mg ácido gálico.g ⁻¹		
			Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
Película	de	amendoim	101,50±0,096Ab	32,96±0,056Ba	25,11±0,056Ca
(IAC886)					
Película	de	amendoim	103,76±0,032Aa	31,23±0,084Bb	23,81±0,092Ca
(IAC505)					
Pimenta-rosa			38,42±0,060Ac	11,58±0,096Bc	8,35±0,076Cb
Pimenta-do-reino			8,49±0,032Ad	5,62±0,030Bd	7,33±0,020ABb

Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada). Letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

De acordo com os resultados obtidos, o solvente que apresentou o melhor desempenho nesta análise foi o etanol 80%. Entre os resíduos, as películas de amendoim IAC886 e IAC505 foram as que apresentaram as maiores capacidades de redução do reagente de Folin-Ciocalteu.

As películas de amendoim IAC886 e IAC505 apresentaram resultados superiores no solvente etanol 80% (101,50 e 103,76 mg/g), quando comparado aos solventes água (32,96 e 31,23 mg/g) e propilenoglicol 80% (25,11 e 23,81 mg/g), respectivamente.

O resíduo de pimenta-rosa apresentou os maiores potenciais ($P < 0,05$) no solvente etanol 80% (38,42 mg/g), sendo três vezes maior quando comparado aos solventes água (11,58 mg/g) e propilenoglicol 80% (8,35 mg/g).

No resíduo de pimenta-do-reino, o solvente água proporcionou o menor potencial de redução (5,62 mg/g), diferindo do etanol 80% (8,49 mg/g), mas não do propilenoglicol 80% (7,33 mg/g).

A quantidade de compostos fenólicos é influenciada diretamente pelas condições de estresses bióticos e abióticos que as plantas passam durante seu ciclo de vida. Esses compostos tendem a ser sintetizados para a proteção contra estresses, justificando a maior concentração destes compostos nas partes externas dos frutos e vegetais, que estão mais susceptíveis e expostas a danos (SIMÕES et al., 2004). Em relação ao amendoim, o teor de compostos fenólicos totais aumenta com o grau de maturação (GOW et al., 1994).

O amendoim é muito utilizado na indústria de alimentos, mas quase sempre passa por processos para retirada de sua pele ou película. A utilização dessa película para fins alimentares ainda é muito limitada, apesar do alto conteúdo de nutrientes, em particular de compostos fenólicos, o que corresponde a cerca de 125 mg/g (JIANMEI et al., 2005; OLDONI et al., 2016). Entretanto, o conteúdo de compostos fenólicos totais na película de amendoim pode variar de 90 a 149 mg/g (equivalentes ao ácido gálico) (NEPOTE; GROSSO; GUZMAN, 2005), faixa esta similar a encontrada neste estudo. Os teores de compostos fenólicos podem assim variar de acordo com o método de extração e o solvente utilizado na análise (YU et al., 2006).

Os resultados para o resíduo da pimenta-rosa foram de 38,42, 11,58 e 8,35 mg/g (equivalentes ao ácido gálico), para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, respectivamente (Tabela 11). Na avaliação de frutos da pimenta rosa Biazotto (2014), encontrou resultados de compostos fenólicos de 49,51 mg/g, em extrato metanólico. Poucos dados são relatados na literatura para extratos de resíduos, pois boa parte dos estudos sobre a pimenta-rosa se limitam a avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de óleos essenciais (EL-MASSRY et al., 2009; BENDAOU et al., 2010) e extratos de folhas (CERUKS et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; COSTA et al., 2015).

Entretanto, os teores de compostos fenólicos encontrados para o resíduo de pimenta-rosa (Tabela 12) corroboram com os encontrados por Costa et al. (2015) para folhas, cascas e

frutos, utilizando dois métodos de extração: soxhlet e maceração, com o solvente etanol 100%, onde foram encontradas concentrações que variaram de 5,44 a 309,03 e 73,90 a 228,51 mg/g equivalente ao ácido gálico, respectivamente. Outros autores trabalhando com óleos essenciais (EL-MASSRY et al., 2009) e folhas (BULLA et al., 2015) encontraram valores similares de compostos fenólicos, ou seja, teores de 35,00 e 384,64 mg/g (equivalente ao ácido gálico), respectivamente. De acordo com os resultados encontrados, estes resíduos agroindustriais podem ser considerados fontes potenciais de compostos fenólicos.

O resíduo de pimenta-do-reino, quando comparado aos demais resíduos agroindustriais, apresentou valores inferiores de compostos fenólicos ($P < 0,05$), com concentrações de 8,49, 5,62 e 7,33 mg/g equivalente ao ácido gálico para os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, respectivamente. Os baixos valores de compostos fenólicos observados no resíduo de pimenta-do-reino podem estar relacionados com o processo de colheita do fruto. O engace é o principal constituinte do resíduo de pimenta-do-reino. Após a colheita o engace é separado do fruto, o qual é amontoado no campo podendo ocorrer processo de fermentação e possível degradação de compostos fenólicos. Segundo Ibanez et al. (1999) a temperatura utilizada durante a secagem afeta a estabilidade dos compostos devido à degradação química, térmica e enzimática, o que ocasiona redução do conteúdo fenólico.

De acordo com Gulçin (2005), a quantidade de fenólicos totais no fruto de pimenta-do-reino é de 42,80 mg/g (equivalentes ao ácido gálico). Entretanto valores de 16,98 e 18,42 mg/g foram observados por Biazotto (2014) e Saha e Verma (2015), respectivamente, indicando assim variações nos teores de compostos fenólicos deste fruto.

4.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

No método de avaliação da atividade antioxidante pelo radical DPPH, o composto antioxidante age como doador de átomos de hidrogênio e quando este é adicionado à solução alcoólica de radical livre DPPH, a coloração da solução é modificada de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

A atividade antioxidante pelo método sequestro do radical livre DPPH para os extratos dos resíduos de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80%, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Atividade antioxidante de extratos de resíduos agroindustriais pelo método de sequestro do radical livre DPPH

Resíduos agroindustriais	Equivalentes $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$		
	Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
Película de amendoim (IAC886)	778,16 $\pm$ 0,288Aa	497,09 $\pm$ 1,631Ba	499,54 $\pm$ 0,397Ba
Película de amendoim (IAC505)	776,46 $\pm$ 0,278Aa	505,38 $\pm$ 0,079Ba	503,50 $\pm$ 0,039Ba
Pimenta-rosa	535,74 $\pm$ 0,318Ab	99,85 $\pm$ 1,949Bb	94,81 $\pm$ 0,318Bb
Pimenta-do-reino	36,55 $\pm$ 1,890Bc	13,54 $\pm$ 0,039Cc	47,76 $\pm$ 0,119Ac

Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada). Letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

O etanol 80% foi o solvente que apresentou as melhores condições de extração de compostos ativos, sendo seguido pelo propilenoglicol 80% e a água.

Nos resíduos avaliados, os maiores valores de atividade antioxidante foram para os resíduos de película de amendoim IAC886 e IAC505, extraídos com etanol 80% (778,16 e 776,46 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente).

O resíduo de pimenta-rosa apresentou atividade de 535,74 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para o solvente etanol 80%, o que foi maior que quando comparado a obtida com a água (99,85 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) e propilenoglicol 80% (94,81 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) ($P<0,05$). O resíduo de pimenta-do-reino mostrou resultados superiores para o solvente propilenoglicol 80% (47,76 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), seguido do solvente etanol 80% (36,55 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) e por último a extração com água (13,54 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) ($P<0,05$). Os valores de atividade antioxidante encontrados por Biazotto (2014) em frutos de pimenta-rosa e pimenta-do-reino, utilizando como solvente o metanol, foi de 695,73 e 37,92 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente, resultados estes que também vão de encontro com os teores encontrados para os seus respectivos resíduos.

Estudos demonstram que frutas, vegetais e cereais são ricos em nutrientes e compostos antioxidantes, e que a concentração de compostos se situam principalmente nas partes externas (MELO et al., 2008). Elevados potenciais de redução do radical DPPH foram observados por outros autores em cascas e sementes de diversos frutos como casca do umbu (MELO; ANDRADE, 2010), resíduo de polpa de acerola (CAETANO et al., 2009), resíduo de polpa de goiaba (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009), casca de citrus (AL-JUHAIMI,

2014; BABBAR et al., 2011), casca de maçã (VIEIRA et al., 2011), casca e sementes de lichia, sementes de uva (BABBAR et al., 2011), casca e sementes de manga (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013), casca e semente de abacate (DAIUTO et al., 2014) e engaces e bagaço de uvas (MELO et al., 2015).

4.3.3 Capacidade de Absorção de Radicais do Oxigênio

Os resultados da capacidade de desativação do radical peroxila pelos extratos dos resíduos de película de amendoim (cultivares IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos com os solventes etanol 80%, água e propilenoglicol 80% se encontram na Tabela 14.

Tabela 14 – Desativação do radical peroxila pelo método da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Resíduos agroindustriais			Equivalentes $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$		
			Etanol 80%	Água	Propilenoglicol 80%
Película	de	amendoim	108,08 $\pm$ 0,941Ac	29,29 $\pm$ 0,357Cc	77,86 $\pm$ 0,865Ba
(IAC886)					
Película	de	amendoim	152,15 $\pm$ 0,559Ab	44,81 $\pm$ 0,138Cb	62,01 $\pm$ 0,557Bb
(IAC505)					
Pimenta-rosa			158,24 $\pm$ 0,917Aa	65,55 $\pm$ 0,543Ba	45,40 $\pm$ 0,929Cc
Pimenta-do-reino			51,83 $\pm$ 0,988Ad	42,94 $\pm$ 0,263Bb	26,52 $\pm$ 0,785Cd

Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada). Letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

De acordo com os resultados obtidos, o solvente que apresentou a melhor extração de compostos capazes de desativar o radical peroxila foi o etanol 80%. Entre os extratos obtidos com o solvente etanol 80%, a pimenta-rosa e a película de amendoim (IAC505) foram superiores ($P < 0,05$) na desativação do radical peroxila (158,24 e 152,15 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente), que quando comparados à película de amendoim IAC886 e pimenta-do-reino (108,08 e 51,83 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente).

Os extratos obtidos com os solventes água e propilenoglicol 80% mostraram ser menos eficientes na extração de antioxidantes que sequestram os radicais peroxila. De acordo com Yu, Ahmedna e Goktepe (2005) e Yilmaz e Toledo (2006), esses solventes são menos

eficientes para a extração de compostos fenólicos de plantas, principalmente a água. De fato, a película de amendoim (IAC886 e IAC505) quando extraída com água mostraram valores muito baixos quando comparado ao etanol 80% (29,29 e 44,87 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 14).

Ballard et al. (2010), estudando resíduo de película de amendoim encontraram resultados muito superiores para os solventes etanol e água (2.049,7 e 612,00 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente). Esses mesmos autores relatam que os antioxidantes podem se comportar de formas diferentes, dependendo do tipo de sistema de solvente e do substrato lipídico envolvido, tornando assim difícil comparar resultados.

O resíduo da pimenta-do-reino foi o que apresentou os menores de atividades por esta metodologia. O solvente propilenoglicol 80% apresentou uma atividade de 26,52 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, diferindo do etanol 80% e do solvente água (51,83 e 42,94 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente).

De acordo com a literatura, pode-se verificar uma grande variação nos resultados de atividade antioxidante pelo método ORAC. Yilmaz e Toledo (2006) avaliando dois tipos diferentes de sementes de uvas Chardonnay e Merlot observaram uma grande variação nos resultados (638 e 345 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente). Wang et al. (2011) avaliando quarenta cultivares de mirtilo encontraram resultados que variaram de 196 a 528 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$.

Vários estudos demonstraram que os compostos fenólicos podem ser utilizados como uma fonte natural de substâncias bioativas, os quais possuem capacidades distintas de sequestrar os radicais livres (LACHMAN et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

4.3.4 Capacidade desativação do ânion superóxido e ácido hipocloroso

Os resultados do sequestro do radical ânion superóxido e ácido hipocloroso dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (cultivares Runner IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, extraídos com o solvente etanol 80%, estão mostrados na Tabela 15. Os resultados estão expressos em de EC_{50} (mg/mL). Assim, quanto menor o valor do EC_{50} , maior será a capacidade desativadora destas espécies reativas de oxigênio.

Tabela 15 – Capacidade desativação do ânion superóxido e ácido hipocloroso dos extratos de resíduos agroindustriais obtidos com etanol 80%

Resíduos agroindustriais	Radical superóxido	Radical hipocloroso
	EC ₅₀ (mg/mL)	
Película de amendoim (IAC886)	0,230±0,080B	0,0342±0,056B
Película de amendoim (IAC505)	0,270±0,065B	0,0404±0,590C
Pimenta-rosa	1,240±0,089C	0,0609±0,087D
Pimenta-do-reino	0,091±0,076A	0,0045±0,075A

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Os resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505) não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) na análise de sequestro do radical superóxido (0,23 e 0,27 mg/mL, respectivamente). Entretanto, já para a análise do radical hipocloroso, houve diferença significativa entre esses resíduos (0,0342 e 0,0404 mg/mL, respectivamente), mostrando que a película IAC505 atuou melhor na desativação dessa espécie reativa em questão. Gow e Pin (1994) estudando película de amendoim, também verificaram que esse resíduo tem boa atividade antioxidante contra a produção das espécies reativas peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila.

Os resultados para o resíduo de pimenta-rosa foi menos significativo nas análises de superóxido e ácido hipocloroso (1,24 e 0,0609 mg/mL, respectivamente), mostrando menor capacidade de desativação dessas espécies reativas.

O resíduo de pimenta-do-reino apresentou atividades muito superiores quando comparado aos resíduos de película de amendoim e pimenta-rosa, com valores de EC₅₀ de 0,091 e 0,0045 mg/mL, para o sequestro dos radicais superóxido e ácido hipocloroso, respectivamente. Em estudo *in vitro* feito por Gulçin (2005), com o extrato do fruto de pimenta-do-reino, foi verificado que este possui compostos com forte habilidade em doar hidrogênio, sendo capazes de inibir e/ou quelar metais, radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Em estudos *in vivo* com o extrato de pimenta-do-reino, foi verificado que o mesmo reduziu a peroxidação lipídica e auxiliou as enzimas antioxidantes do organismo (VIJAYAKUMAR; NALINI, 2006; SRINIVASAN, 2007; MAHDY et al., 2012).

4.3.5 Análise de agrupamento (“cluster”)

Os dados obtidos por meio das atividades antioxidantes dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino foram analisadas por meio de análise multivariada de fatores e agrupamento. Na Figura 13 pode ser observado o gráfico de agrupamento por similaridades.

Figura 13 – Dendrograma de agrupamento hierárquico por similaridade obtido através das análises de compostos fenólicos, DPPH, ABTS e ORAC dos resíduos de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa (P. Rosa) e pimenta-do-reino (P. Reino) nos solvente água (A), etanol 80% (E) e propilenoglicol 80% (P)

Os resíduos de película de amendoim (IAC886 e IAC505) e pimenta-rosa quando extraídos com o solvente etanol 80% apresentaram uma similaridade nas análises de atividade antioxidante de 41,7%, com exceção do resíduo de pimenta-do-reino quando extraído com o etanol (Figura 13).

Os outros resíduos quando extraídos com água e propilenoglicol, com exceção da pimenta-do-reino com etanol, apresentaram similaridade de 78,2% nas análises de antioxidantes. Os resíduos de pimenta-do-reino (etanol 80%, água e propilenoglicol 80%), pimenta-rosa (água) e película de amendoim (IAC886 e IAC505) (propilenoglicol 80%), apresentaram atividade antioxidante com similaridade de 86,1%. Assim, a polaridade do solvente pode ter sido determinante na distinção dos resíduos agroindustriais na análise multivariada.

4.4 Conclusões

Os resultados obtidos no estudo de avaliação da atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais da película de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino demonstram alta capacidade de desativação de espécies reativas sintéticas e de oxigênio. De forma geral, o etanol 80% foi o solvente que proporcionou a maior extração de compostos antioxidantes. A película de amendoim foi o resíduo que apresentou as maiores atividades antiradical frente a todos os métodos avaliados, com exceção da desativação do radical superóxido e ácido hipocloroso. No sequestro do ânion superóxido e ácido hipocloroso, o extrato da pimenta-do-reino foi 2,5 e 7,6 vezes mais ativa, respectivamente, que o extrato da película de amendoim. Assim, pode concluir que cada resíduo possui uma particularidade de resposta e, portanto a realização de diferentes análises torna-se importante para o conhecimento do comportamento de cada material.

Referências

- AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Oxford, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- AL-JUHAIMI, F.Y. Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 46, n. 4, p. 1459-1462, 2014.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V. ;AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ARBOS, K.A.; STEVANI, P.C.; CASTANHA, R.F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.
- BABBAR, N.; OBEROI, H.S.; UPPAL, D.S.; PALIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 1, p. 391–396, 2011.
- BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 8, p. 3064–3072, 2009.

BANSODE, R.R.; RANDOLPH, P.; AHMEDNA, M.; HURLEY, S.; HANNER, T.; BAXTER, S. A. S.; JOHNSTON, T. A.; SU, M.; HOLMES, B. M.; YU, J.; WILLIAMS, L. L. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function, **Food Chemistry**, Barking, v. 148, n. 1, p. 24–29, 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.

BIAZOTTO, F.O. **Atividade antioxidante, anticolinesterásica e perfil metabolômico de diferentes tipos de pimentas**: implicações na doença de Alzheimer. 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 335, p. 3-14, 2001.

BONG, C.F.J.P. A potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper Nigrum*. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 4, p. 2398-2404, 2010.

BULLA, M.K.; HERNANDES, L.; BAESSO, M.L.; NOGUEIRA, A.C.; BENTO, A.C.; BORTOLUZZI, B.B.; SERRA, L.Z.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 91, p. 558–566, 2015.

BÜYÜKTUNCEL, E.; PORGALI, E.; ÇOLAK, C. Comparison of total phenolic content and total antioxidant activity in local red wines determined by spectrophotometric methods. **Food and Nutrition Sciences**, Malden, v. 5, n. 17, p. 1660-1667, 2014.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; ARAUJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H. Polar phenolic constituents from *Schinus terebinthifolius* raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 597–599, 2007.

COSTA, S.C.o.; RIBEIRO, P.R.; LOUREIRO, M.B.; SIMÕES, R.C.; DE CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L.G. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosia**, Munbai, v. 11, n. 43, p. 607-614, 2015.

DAIUTO, E.R.; TREMOCOLDI, M.A.; ALENCAR, S.M.; VIEITES, R.L.; MINARELLI, P.H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate “Hass”. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.H.; SHAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 12, p. 5265–5270, 2009.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant of Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2006.

GOW, C.Y.; PIN, D.D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 3, p. 629-632, 1994.

GULÇIN, I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 56, n. 7, p. 491-499, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IBANEZ, E.; OCA, A.; MURGA, G. de; LOPEZ-SEBASTIAN, S.; TABERA, J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1400-1404, 1999.

JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. (Ed). **Food antioxidants**. New York: Dekker, 1996. p. 5-63.

JIANMEI, Y.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1/2, p. 199–206, 2005.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, New York, v. 41, n. 2, p. 41-60, 2009.

LACHMAN, J.; ORSÁK, M.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; KOVÁŘOVÁ, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **Food Science and Technology**, Dublin, v. 43, n. 1, p. 52–58, 2010.

MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN, A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer’s disease induced in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 16, n. 3, p. 31-42, 2012.

MELO, E.A.; ANDRADE, R.A.M.S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.A.G.L.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

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

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 1, p. 33-38, 2005.

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

OSAWA, T. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In: URITANI, I.; GARCIA, V.V.; MENDOZA, E.M. **Postwar vest biochemistry of plant food-materials in the tropics**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1994. p. 241-251.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DIAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Toronto, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **The Natural Products Journal**, Saiph Zone, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plants Foods for Human Nutrition**, New York, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

SAHA, S.; VERMA, R.J. *In vitro* and in silico study of *Piper Nigrum* on cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and antioxidant enzymes. **Journal of Herbal Medicine**, Amsterdam, v. 5, p. 86-98, 2015.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects; a review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 18, p. 820-897, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENHEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 1104 p.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

STEFFEN, L.M.; JACOBS, D.R.; STEVENS, J.; SHAHAR, E.; CARITHERS, T.; FOLSOM, A.R. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. 383-390, 2003.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.H. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VIJAYAKUMAR, R.S.; NALINI, N. Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apolipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, London, v. 17, n. 2, p. 71-86, 2006.

WANG, J.; YUAN, X.; JIN, Z.; TIAN, Y.; SONG, H. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 1, p. 242-250, 2007.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 1, p. 940-949, 2007.

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

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1/2, p. 199-206, 2005.

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

ZHANG, Z.; ZHANGA, Q.; WANGA, J.; SONGA, H.; ZHANGA, H.; NIUA, X. Chemical modification and influence of function groups on the *in vitro* antioxidant activities of porphyrin from *Porphyra haitanensis*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 290-295, 2010.

5 COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS RESÍDUOS DE AMENDOIM, PIMENTA-ROSA E PIMENTA-DO-REINO

Resumo

As plantas medicinais contêm várias substâncias que podem apresentar um efeito sinérgico, tanto farmacodinâmico quanto farmacocinético e sendo assim existem algumas hipóteses de mecanismos de ação que justificam a ação terapêutica de seus extratos. Os produtos naturais, especialmente os derivados das plantas medicinais vem sendo utilizados há muitos anos com intuito de promover o tratamento de enfermidades. Atualmente, as pesquisas que envolvem os antioxidantes naturais tem dado atenção aos resíduos gerados nas agroindústrias de alimentos, passando estes a ocupar um papel importante na procura por compostos bioativos. Dentre os compostos bioativos, os compostos fenólicos têm recebido grande atenção nos últimos anos devido a sua capacidade de ação como antioxidantes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliara composição fenólica por meio de técnicas cromatográficas e a atividade anti-inflamatória de extratos etanólicos (80%) dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino. Nas análises por HPLC-RP e CG-MS foi possível identificar os compostos fenólicos procianidina B1, ácido sirínico, procianidina B2, epicatequina e ácido *p*-cumárico na película de amendoim IAC886. Para a de película de amendoim IAC505, somente não foi possível identificar o ácido sirínico. Para o resíduo de pimenta-rosa foi encontrado os seguintes compostos: catequina, ácido *p*-cumárico, mirecetina e epicatequina e na pimenta-do-reino o ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Em relação a atividade anti-inflamatória, o resíduo de pimenta-do-reino apresentou resultados muito promissores, pois conseguiu suprimir ($P<0,01$) as concentrações da citocina TNF- α e nitritos no sobrenadante das células RAW 264.7.

Palavras-chaves: Resíduos agroindustriais; Espécies reativas de oxigênio; HPLC-RP e atividade anti-inflamatória

Abstract

Medicinal plants contain several substances that may have a synergistic effect in both pharmacokinetic and pharmacodynamic as well and there are some chances of action mechanisms that justify the therapeutic action of its extracts. Natural products, especially those derived from medicinal plants have been used for many years, aiming to promote the treatment of diseases. Currently, research involving natural antioxidants has given attention to the waste generated in the agricultural industries of food, passing these to occupy an important role in studies for bioactive compounds. Among the bioactive compounds, phenolic compounds have received great attention in recent years due to its ability to act as antioxidants. This study aimed it assessed phenolic composition using chromatographic techniques and anti-inflammatory activity of ethanol extracts (80%) of organic residues of peanut skin (IAC886 and IAC505), pink pepper and black pepper. In the analysis by HPLC-RP and CG-MS was possible to identify the phenolic compounds procyanidin B1, syringic acid, procyanidin B2, epicatechin and *p*-coumaric acid in IAC886 peanut skin. For the IAC505 peanut skin was not possible to identify the syringic acid. For pink pepper residue was possible to identify the following compounds: catechin, *p*-coumaric acid, epicatechin and mirecetina and black pepper in the united syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and sinapic acid. For anti-inflammatory activity of the extracts of waste agroindustrial IAC886

and IAC505 peanut skin can observe an increase in TNF- α concentrations and nitrites, which was not found in pepper pink residue ($P < 0,01$). The black pepper residue showed very promising results, as regards anti-inflammatory activity, it could suppress ($P < 0,01$) TNF- α and nitrite concentrations in the supernatant of the RAW 264.7 cell.

Keywords: Agro-industrial by-products; Reactive oxygen species; HPLC-RP and anti-inflammatory activity

5.1 Introdução

As plantas são importantes fontes de produtos naturais, pois possuem vários compostos biologicamente ativos que podem se transformar em potenciais fontes de novas moléculas para o tratamento de enfermidades. As plantas medicinais contêm substâncias que podem apresentar efeito sinérgico, tanto farmacodinâmico quanto farmacocinético e, por isso, normalmente, há várias hipóteses de mecanismos de ação que justificam a ação terapêutica de seus extratos (SPINELLA, 2002; RODRIGUES et al., 2015).

Os produtos naturais, especialmente os derivados das plantas medicinais, vêm sendo utilizados há muitos anos pela humanidade com intuito de promover o tratamento de enfermidades (PHILLIPSON, 2001). No decorrer dos anos, pesquisas foram desenvolvidas sobre estes produtos, o que tem contribuído para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, sendo muitos destes derivados de plantas superiores (CALIXTO et al., 2005). As pesquisas com plantas começaram a partir do século 19, quando foram registradas as primeiras investigações científicas, o que resultou no isolamento de várias substâncias ativas (MOTANARI; BOLZANI, 2001).

Atualmente, as pesquisas que envolvem os antioxidantes naturais tem dado atenção aos resíduos gerados nas agroindústrias de alimentos, passando estes a ocupar um papel importante nos estudos de prospecção por compostos bioativos. Essa busca vem sendo também incentivada pela indústria farmacêutica, a qual nos últimos anos realizou descobertas promissoras, como por exemplo, a vincristina, a vimblastina, podofilotoxina que atuam como agentes quimioterápicos (MOTANARI; BOLZANI, 2001).

Dentre os compostos bioativos, os polifenóis têm recebido grande atenção nos últimos anos devido a sua capacidade de ação como antioxidantes. Estes compostos são encontrados em tecidos de plantas e são importantes para o crescimento, desenvolvimento e protegem as plantas contra infecções e lesões (KARAKAYA et al., 2001). Os polifenóis estão presentes em frutas, vegetais e bebidas, como chás e vinhos.

Em 2003, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou uma alegação de saúde, que sugere consumir nozes e amêndoas na quantidade de 42 gramas, no caso do amendoim, incluindo a película, 0,5 a 1,0 g e para a farinha de amendoim de 15 a 20 gramas. Isto faz parte de uma dieta que se constitui de baixo teor de gordura saturada e colesterol, o que pode auxiliar a reduzir o risco de doenças cardiovasculares (PENG; BITSKO; BISWAS, 2015).

O resíduo de película de amendoim é um resíduo das indústrias de alimentos que utilizam o amendoim como matéria prima principal. A película possui em sua composição compostos fenólicos como o antioxidante resveratrol e as procianidinas B1 e B2, que apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro* (OLDONI et al. 2016). O resveratrol também pode ser encontrado em uvas, e traz ao organismo benefícios principalmente na redução de doenças cardiovasculares (YU et al., 2005; OZCAN, 2010; JONES et al., 2013), atividade antialérgica (TOMOCHIKA et al., 2011, WHITE et al., 2013), clareamento da pele e atividade anti-inflamatória (TATSUNO et al., 2012). Além disso, o resveratrol, uma vez que atinge o intestino grosso pode exercer benefícios por atuar como um prebiótico promovendo o crescimento da microbiota benéfica ao organismo, especialmente os *Lactobacillus* sp. (CALATAYUD et al., 2013). Outros compostos já relatados para o extrato da película de amendoim foram o ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico e ácido ferúlico, epigallocatequina, epicatequina, catequina galato e epicatequina galato (YU et al., 2006).

A pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é nativa do Nordeste, Sudeste, Centro-oeste e das regiões Sul do Brasil. Os frutos são muito utilizados na culinária mundial, sendo que todas as partes dessa planta são aproveitadas, inclusive para o tratamento de infecções respiratórias, doenças cutâneas, reumatismos e problemas gastrointestinais (SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015).

A pimenta-do-reino tem uma grande diversidade de metabólitos, abrangendo em torno de 667 compostos diferentes, caracterizados por meio de investigações fitoquímicas de 112 espécies estudadas, as quais correspondem aproximadamente 10% do total de espécies conhecidas (DYER et al., 2004). A espécie *P. Nigrum* é um condimento muito utilizado na culinária mundial e possui grande importância econômica e comercial, além de possuir efeitos terapêuticos contra a bronquite asmática, infecções da boca e dos olhos (SRINIVASAN, 2007; AHMAD et al., 2012). Existem também relatos de atuação como antidepressivo (LI et al., 2007), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2007), anti-hipertensivo (TAQVI; SHAH; GILANI et al., 2008) e hepatoprotetor (IBRAHIM; NANE; ANJUM, 2008).

Os compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais são importantes fontes de compostos bioativos que atuam no organismo contra os radicais livres produzidos em excesso,

principalmente quando se trata do processo inflamatório. Este processo consiste na resposta contra uma lesão tissular ou infecção, envolvendo efeitos fisiológicos que levam a uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão, gerando uma série de eventos que tem como produto final a formação de radicais livres (RODRIGUES et al., 2015).

Atualmente existem muitas pesquisas que envolvem extratos vegetais e seu potencial bioativo, porém poucos estudos ainda foram realizados quando se trata de resíduos agroindustriais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição fenólica e atividade anti-inflamatória *in vitro* dos resíduos agroindustriais de película de amendoim, pimenta-rosa e pimenta-do-reino.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Coleta das amostras

As amostras de película de amendoim (cultivares IAC886 e IAC505), produzidas por meio do processo de blanchamento, foram fornecidas pela CAP Agroindustrial, situada na cidade de Dumont-SP. O resíduo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), da variedade Cingapura, foram fornecidas pela Empresa Agrorosa Ltda, localizada na cidade de São Mateus-ES.

5.2.2 Preparo das amostras

A extração foi realizada conforme descrito por Bloor (2001), com algumas modificações. Inicialmente pesou-se 30 g de cada resíduo liofilizado e moído e, então se adicionou 30 mL do solvente etanol:água destilada (80:20v/v). As extrações da película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino foram conduzidas em banho termostático a (60 °C, por 20 minutos), (90 °C, por 20 minutos) e (85 °C, por 50 minutos), respectivamente, e em seguida por mais 15 minutos em banho de no ultrassom. Após esses processos, cada extrato foi filtrado em papel *whatman* nº 3 e concentrados em rotaevaporador a 40 °C, até a evaporação completa do etanol. Na sequência, as amostras foram liofilizadas para remoção da água e os concentrados foram utilizados nas análises subsequentes. Os extratos dos resíduos agroindustriais foram feitos em triplicatas.

5.2.3 Análises cromatográficas

5.2.3.1 Derivatização - formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

Para realização das análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS), as amostras passaram pela etapa chamada derivatização. A cromatografia gasosa analisa gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando a amostra é constituída principalmente por compostos de alta massa molar e/ou grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivatização, reação que transforma as substâncias de interesse em derivados com características adequadas à análise (BONATO, 2006). Dessa forma, a derivatização química é usualmente utilizada para reduzir a polaridade de grupos funcionais e facilitar sua separação no cromatógrafo gasoso. Foram adicionados às subfrações da casca e da semente, obtidas pela coluna de LH-20 e pela cromatografia em camada delgada em fase normal, respectivamente, 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70 °C durante 10 minutos para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) rediluído em hexano (800 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* para injeção no GC-MS.

5.2.3.2 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises por GC-MS foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80°C (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20 °C/minuto alcançou 250°C (1 minuto), passou a 300 °C (5 minutos) a taxa de 6 °C/minuto, a 310 °C (5 minutos) a taxa de 15 °C/minuto, a 320 °C (10 minutos) a taxa de 20 °C/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. O volume de injeção foi de 0,6 µL no modo “*splitless*”. O detector operou no modo “*scanning*” (m/z 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GC-MS. Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do GC-MS (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley® 8.

5.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (HPLC-RP)

As análises por HPLC em fase reversa dos extratos dos resíduos de película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino foram feitas de acordo com o método descrito por Melo et al (2015). Vinte microlitros de cada extrato foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 254 nm e uma coluna de fase reversa Simadzu ODS (250 x 4,6mm) instalada em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co.) composto por duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-2A, injetor automático SIL-10AF, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10Avp, forno de colunas CTO-10ASvp mantido a 30 °C e coletor automático de frações FRC-10A. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de dois solventes água/ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A) e acetonitrila/ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente B), com vazão constante de 1mL/min. O gradiente iniciou-se com 5% do solvente B até 7% de B em 7 minutos, 20% de B em 50 minutos, 45% de B em 70 minutos, 100% de B em 85 minutos, permanecendo até 95 minutos, 5% de B em 100 minutos. A coluna foi mantida a 28 °C. Neste trabalho foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides (Sigma-Aldrich e Extrasynthese): ácido ferúlico, ácido gálico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido trans-cinâmico, (-)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina galato, miricetina, quercetina, quercetina-3- β -D-glucosídeo, rutina, crisina, luteolina, vitexina, resveratrol, polidatina, procianidina B1 e procianidina B2 e as antocianinas: mirtilina, kuromanina, oenina, petunidina e peonidina.

5.2.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.4.1 Crescimento celular

Mácrofagos de camundongos (Raw 264.7), provenientes da ATCC; Rockville, MD foram mantidos em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO®, United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO®) e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). As células foram cultivadas em placas de petri para cultura de tecido de 61 cm² (TPP®) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Aproximadamente 4 x 10⁴ células/mL foram adicionadas a placas de cultura de tecidos com 24 e 96 poços, onde foram mantidas até atingirem a semi-confluência para a utilização nos experimentos (GREEN et al., 1982).

5.2.4.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). As células (RAW 264.7) foram aderidas em placas de 96 poços por 24 horas (37 °C, 5% de CO₂). Após esse período foram adicionadas as amostras diluídas em meio de cultura, seguindo-se incubação por 24 ou 48 horas (37 °C, 5% de CO₂). Após a incubação, o meio foi substituído por 1 mL de RPMI 1640 + SFB 5% + 1 mg de MTT. As células foram então incubadas por mais 3 horas (37 °C, 5% de CO₂) e em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 µg de DMSO/poço. A leitura da absorbância em $\lambda = 550\text{nm}$ foi realizada em leitor de Elisa utilizando-se o DMSO como branco das amostras. A porcentagem da atividade foi determinada como $(A1/A0)/100\%$, onde A0 e A1 foram as absorbâncias na ausência e presença das amostras, respectivamente (GREEN et al., 1982).

5.2.4.3 Determinação da produção de TNF- α

Após 30 minutos de exposição da cultura celular aos tratamentos 10 µg/mL das amostras, as células foram estimuladas com LPS de *E.coli* (Sigma Aldrich Corp.) na concentração 1 µg/mL e incubadas por 4 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, a quantificação de TNF- α foi realizada por Elisa no sobrenadante da cultura celular da linhagem das células RAW. As leituras de densidades ópticas foram realizadas em leitora de microplaca (ASYS, UVM340, Biochrom, UK) a um comprimento de onda de $\lambda = 450\text{nm}$ e os resultados foram expressos em pg/mL (GREEN et al., 1982).

5.2.4.4 Determinação da produção de óxido nítrico

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^5 células/mL dispostas em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C com ou sem tratamento e estimuladas com LPS (1 µg/mL). O total de nitritos foi determinado usando um kit comercial “Griess Reagent System” (Promega). O sobrenadante das células tratadas e não tratadas foram coletados e transferidos para placas de 96 poços. Foram adicionados de 50 µL de solução de Sulfanilamida, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e adicionados 50µL de solução NED. Os níveis de NO₂- foram determinados por espectrofotometria em absorbância de $\lambda = 520$ a 550 nm. Uma curva padrão de nitrito foi

realizada para cada ensaio para a quantificação precisa de NO_2^- (GREEN et al., 1982). Estas análises foram realizadas no Departamento de Ciências Fisiológicas, FOP/UNICAMP.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC-MS)

Os resíduos agroindustriais de película de amendoim IAC886 e IAC505 foram avaliados pela técnica de GC-MS, o que possibilitou a identificação de vários compostos (Tabela 21). A espectrometria de massas constitui uma técnica analítica muito utilizada na obtenção de informações sobre o peso molecular e características estruturais da amostra e tem sido empregada através de diferentes métodos para a caracterização e quantificação de compostos fenólicos em frutas, vegetais e outros produtos naturais.

A análise de CG-MS possibilitou a identificação dos seguintes compostos nas películas de amendoim: ácido 1,2-benzeno carboxílico, dietil ester; ácido *p*-cumárico; ácido galacturônico hexa-trimetilsilil ester; ácido linoléico (trimetilsilil); ácido oleico trimetilsilil ester; ácido esteárico, trimetilsilil ester; ácido eicosanóico, trimetilsilil ester; (-)-epicatequina (silanizada). Dentre esses compostos, o que se apresentou em maior abundância foi ácido oléico trimetilsilil ester na película de amendoim IAC505 e IAC886, com porcentagens de 17,46 e 10,61%, respectivamente.

Nos resíduos de pimenta-rosa e pimenta-do-reino, a quantidade de compostos identificados foi menor quando comparado a película de amendoim, sendo mesmo possível identificação de cinco compostos: ácido gálico; ácido D-glucônico, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil), trimetilsilil éster; ácido propanóico 2 (trimetilsilil)oxi, trimetilsilil Ester; ácido propanóico 2(trimetilsilil)oxi, trimetilsilil éster; ácido butanodióico, bis(trimetilsilil) éster; ácido 1,2 benzeno carboxílico. Na pimenta-rosa o ácido gálico representou 2,83% e na pimenta-do-reino o ácido propanóico 2(trimetilsilil)oxi, trimetilsilil éster mostrou uma concentração de 6,63%, sendo as maiores porcentagens encontradas neste resíduo.

Apesar dos resíduos agroindustriais terem apresentado bons resultados nas análises de atividade antioxidante, poucos compostos fenólicos foram identificados pela técnica de CG-MS. Este fato evidencia a possibilidade de os compostos fenólicos estarem unidos a grupos e/ou compostos, e, que dessa forma impossibilita a sua identificação por esta técnica. Além disso, compostos ainda desconhecidos podem ser responsáveis pela atividade

antioxidante, o que sugere que estudos de fracionamento e isolamento bioguiado são necessários para uma efetiva elucidação estrutural dos compostos bioativos.

Tabela 16 - Tempos de retenção, porcentagem de cada componente e íons do espectro de massa dos compostos fenólicos silanizados identificados nos extratos dos resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e 505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino, obtidos através da técnica de GC-MS

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Intensidade relativa (%)	Ions (m/z)
Película de amendoim (IAC886)			
Ácido 1,2-benzeno carboxílico, dietil éster	19,37	2,90	149(100) 77(25) 150(15) 76(12) 222(1)
Ácido <i>p</i> -cumárico	26,77	0,18	293(100) 308(85) 73(78) 219(75) 309(22)
Ácido galacturônico hexa-trimetilsilil éster	28,65	0,29	73(100) 292(34) 147(31) 319(26) 436(2)
Ácido linoléico (trimetilsilil)	32,12	8,15	75(100) 73(95) 81(70) 337(38) 338(10)
Ácido oléico, trimetilsilil éster	32,22	10,61	117(100) 73(91) 75(86) 129(60) 339(58) 354(6)
Ácido esteárico, trimetilsilil éster	32,64	1,39	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 341(42) 356(7)
Ácido eicosanóico, trimetilsilil éster	35,61	0,51	73(100) 75(90) 55(63) 117(43) 367(28) 382(4)
(-)-Epicatequina (silanizada)	47,07	0,90	368(100) 355(46) 369(34) 650(23) 653(2)
Película de amendoim (IAC505)			
Ácido 1,2-benzeno carboxílico, dietil éster	19,37	8,93	149(100) 77(25) 150(15) 76(12) 222(1)
Ácido <i>p</i> -cumárico	26,77	0,11	293(100) 308(85) 73(78) 219(75) 309(22)
Ácido oléico, trimetilsilil éster	32,20	17,46	117(100) 73(91) 75(86) 129(60) 339(58) 354(6)
Ácido esteárico, trimetilsilil éster	32,63	0,91	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 341(42) 356(7)
Ácido cítrico tributil éster	33,07	0,14	185(100) 129(62) 43(76) 57(48) 259(48)
Ácido eicosanóico, trimetilsilil éster	35,61	0,34	73(100) 75(90) 55(63) 117(43) 367(28) 382(4)
Ácido palmítico bis-O-trimetilsilil glicerol-(2)-monoéster	42,41	0,45	129(100) 73(82) 218(80) 147(54) 459(7)
Ácido oléico (Z)-2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil éster	43,48	1,00	73(100) 129(96) 147(59) 103(44) 397(28) 410(6)
(-)-Epicatequina (Silanizada)	47,07	0,50	368(100) 355(46) 369(34) 650(23) 653(2)
Pimenta-rosa			
Ácido gálico	27,42	2,83	281(100) 458(93) 73(70) 459(39) 461(6)
Ácido D-glucônico, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil), trimetilsilil éster	28,66	1,24	73(100) 333(45) 292(42) 319(30) 614(2)
Pimenta-do-reino			
Ácido propanóico 2(trimetilsilil)oxi, trimetilsilil éster	6,44	6,63	73(100) 117(90) 147(86) 190(21) 219(14)
Ácido butanodióico, bis(trimetilsilil) éster	12,55	0,68	147(100) 73(72) 75(26) 148(16) 247(15)
Ácido 1,2 benzeno carboxílico	16,72	1,39	149(100) 177(25) 150(15) 65(13) 22(2)

5.3.2 Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (HPLC-RP)

Os extratos dos resíduos agroindustriais da película de amendoim (IAC886 e IAC505), pimenta-rosa e pimenta-do-reino foram também analisados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação dos compostos foi feita por meio de padrões autênticos, tempo de retenção, co-cromatografia e espectro de absorção na região UV-vis.

Para a película amendoim IAC886 (Figura 14A) foi possível identificar os seguintes compostos: procianidinas B1, ácido siríngico, procianidina B2, epicatequina e ácido *p*-cumárico. Em comparação com a película da cultivar IAC505 (Figura 14B), a diferença foi somente para o ácido siríngico o qual não foi encontrado. De acordo com a literatura, a película de amendoim contém ácidos fenólicos, tais como caféico, ferúlico e cumárico, procianidinas, catequinas e resveratrol (JIANMEI et al., 2005).

Figura 14 – Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de película de amendoim IAC886 (A) e IAC505 (B)

No resíduo de pimenta-rosa foi possível identificar a catequina, ácido *p*-cumárico, mirecetina e epicatequina (Figura 15). Simões et al. (2004) identificaram e quantificaram compostos fenólicos nos frutos de pimenta-rosa e os maiores teores foram encontrados para o ácido *p*-cumárico, ácido vanílico e ácido ferúlico. Estudos também já demonstraram por HPLC a presença de outros compostos antioxidantes na casca, como o ácido gálico (CARVALHO et al., 2009). Nos frutos foi encontrado a apigenina, ácido elágico e naringina (DEGÁSPARI et al., 2005) e nas folhas a catequina (CERUKS et al., 2007), miricetina e ácido gálico (CAVALHER-MACHADO et al., 2008). Os resultados destes trabalhos mostram

lógica e coerência para com os resíduos de pimenta-rosa, haja vista ser constituído de uma mistura de folhas, galhos e frutos.

Figura 15 – Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de pimenta-rosa

No resíduo de pimenta-do-reino os compostos identificados foram o ácido sirínigico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico (Figura 16). Nos frutos de pimenta-do-reino já foram identificados compostos fenólicos, tais como isoquercetina, quercetina, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico (PARMAR et al., 1997; RENJIE et al., 2010). Outros constituintes presentes são os terpenos, esteroides, lignanas, flavonas e os alcaloides como a chavicina, piridina e piperidina (MUSENGA et al., 2007; MURTHY; BHATTACHARYA, 2008), além da piperina (SHAIKH; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

Figura 16 – Cromatograma obtido por HPLC-RP em modo analítico do resíduo de pimenta-do-reino

5.3.3 Atividade citotóxica e quantificação de TNF- α em produção de células RAW 264.7

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de proliferação celular MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que é um ensaio colorimétrico utilizado para quantificar espectrofotometricamente a 517 nm a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, sendo um indicador direto de citotoxicidade. Este ensaio baseia-se na clivagem do sal tetrazólio (coloração amarela) para cristais de formazan (coloração azul), por células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

Os resultados do ensaio biológico *in vitro* para a avaliação do efeito inibitório dos extratos dos resíduos agroindustriais sobre a TNF- α (citocina inflamatória) e de nitritos por estimulação com LPS em células RAW 264.7, estão mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Efeito dos extratos dos resíduos agroindustriais de película de amendoim IAC886 e IAC505, pimenta-rosa e pimenta-do-reino sobre a produção de TNF- α (A) e de nitritos (B) por estimulação com LPS

Controle - células incubadas somente com o veículo. Os dados representam a média dos valores em duplicata de três determinações de experimentos independentes

* $p < 0,01$ foi calculado a partir de comparações com o LPS-estimulação e os valores das amostras

** $p < 0,05$ foi calculado a partir de comparações com o LPS-estimulação e os valores das amostras

$p < 0,01$ foi calculado a partir de comparações com os valores LPS-estimulação e os controles (ANOVA seguido pelo teste de Tukey)

Inicialmente para este ensaio foi realizado um teste preliminar nos extratos dos resíduos agroindustriais quanto à citotoxicidade em concentrações que variaram de 0,1 a 100 μ g/mL em macrófagos. Os extratos dos resíduos agroindustriais não se apresentaram

citotóxicos até a concentração 10 µg/mL, sendo esta concentração utilizada para os ensaios da atividade anti-inflamatória *in vitro*.

Nos extratos de resíduos agroindustriais de película de amendoim (IAC886 e IAC505) pode-se observar um aumento nas concentrações de TNF- α e nitritos (Figura 17 A e B), já que no resíduo de pimenta-rosa e pimenta-do-reino essas concentrações não foram observadas ($P<0,01$). O resíduo de pimenta-do-reino apresentou resultados muito promissores, pois conseguiu reduzir de forma significativa ($P<0,01$) as concentrações de TNF- α e nitritos no sobrenadante das células RAW 264.7 (Figura 17 A e B).

Os resíduos de película de amendoim atuaram como pró-inflamatórios, ou seja, aumentaram consideravelmente os valores de TNF- α e nitritos. No processo de extração, vários compostos são extraídos e com uma enorme diversidade química os quais podem atuar de diversas formas. Em relação à película de amendoim, o(s) composto(s) extraído(s) atuaram potencializando o processo inflamatório.

Estudos farmacológicos conduzidos em animais e a nível celular demonstram que os frutos de pimenta-do-reino contêm compostos fenólicos que podem atuar contra respostas inflamatórias (GUPTA et al., 2000; SELVENDIRAN et al., 2004; SABINA et al., 2011). Essa atuação sobre a atividade anti-inflamatória pode ser devido a atuação desses compostos fenólicos na inibição da enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos (BUTT et al., 2013). Segundo Thambi et al. (2006), existe uma correlação entre a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória, sugerindo que os extratos vegetais podem atuar reduzindo as inflamações, por eliminar os superóxidos, espécies reativas de oxigênio conhecidas por participarem do recrutamento de células polimorfonucleares presentes em tecidos inflamados. De fato, o extrato de pimenta-do-reino, foi o que apresentou as maiores capacidades de desativação dos radicais superóxido e ácido hipocloroso (Tabela 15).

Bernades et al. (2014) estudando o potencial anti-inflamatório *in vitro* da pimenta-rosa na inibição de produção de óxido nítrico por macrófagos observaram que o extrato bruto, em relação a frações, apresentou menor resultado. Existem muitos estudos para a pimenta-rosa que relatam sua capacidade anti-inflamatória (BARRACHINA et al., 1997; YUEQIN et al., 2003; DIAZ et al., 2008; KASIMALA; KASIMALA, 2012; ROSAS et al., 2015). Entretanto neste estudo o resíduo não demonstrou capacidade de redução da citocina TNF- α e nitritos, mediadores do processo inflamatório. Bendaoud et al. (2010) investigando atividade antioxidante e anticancerígenas do óleo essencial dos frutos de pimenta-rosa constataram que este apresentou atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* em carcinoma de mama (humanos). Dessa forma, pode-se concluir que os compostos extraídos no resíduo de

pimenta-rosa não se mostraram capazes de reduzir os efeitos promovidos pela inflamação, apesar de existirem vários trabalhos da literatura que mostram potencial anti-inflamatório para frutos da pimenta-rosa.

Nos últimos anos estudos sobre os antioxidantes naturais tem sido muito recorrentes, principalmente pela capacidade que estes apresentam em sequestrar diretamente as espécies reativas de oxigênio (SIES; STAHL; SEVANIAN, 2005). As substâncias fenólicas são potentes antioxidantes *in vitro* (GHISELLI et al., 2000) e, como protegem os constituintes lipídicos da oxidação, julga-se que os mesmos tenham um papel importante na prevenção de muitas doenças crônico-degenerativas (KULISIC et al., 2007; SEIFRIED et al., 2007). Esta propriedade também pode ser atribuída à ação anti-inflamatória destas substâncias, por inibir tanto a ciclooxigenase quanto a lipoxigenase (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

5.4 Conclusões

As técnicas de HPLC e CG-MS permitiram a identificação de vários compostos antioxidantes como procianidinas B1 e B2, ácido *p*-cumárico, miricetina, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido sinápico, epicatequina e catequina nos resíduos estudados. O resíduo de pimenta-do-reino apresentou resultados promissores, pois conseguiu reduzir significativamente os níveis de TNF- α e nitritos, reduzindo assim processo inflamatório gerado.

Referências

- AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; FAROOQ, S.; ALI, M.; KHAN, M.A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 3, p. S1945–S1953, 2012.
- BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking, v. 120, n. 4, p. 1185–1192, 2010.
- BARRACHINA, M.D.; BELLO, R.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.A.; PRIMO-YÚFERA, E.; ESPLUNGES, J. Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytotherapy Research**, London, v. 11, n. 4, p. 317-319, 1997.
- BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.

BERNARDES, A.N.; HEGGDORNE-ARAÚJO, M.; BORGES, I.F.J.C.; ALMEIDA, F.M.; AMARAL, E.P.; LASUNSKAIA, E.B.; MUZITANO, M.F.; OLIVEIRA, D.B. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 24, n. 6, p. 644-650, 2014.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 335, p. 3-14, 2001.

BONATTO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATTO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

BUTT, M.S.; PASHA, I.; SULTAN, M.T.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; AHMED W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 53, n. 9, p. 37-41, 2013.

CALATAYUDM, V.D.; LOPEZ-DE-DICASTILLO, C.; LOPEZ-CARBALLO, G.; HERNANDEZ-MUNOZ, P.; GAVARA, R. Active skins based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. **Food Chemistry**, Barking, v. 39, n. 1/4, p. 51-58, 2013.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, London, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005

CARVALHO, M.G.; FREIRE, F.D.; RAFFIN, F.N.; ARAGÃO, C.F.S.; MOURA, T.F.A.L.L. C determination of Gallic acid in preparations derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia Supplement**, London, v. 69, n. 2, p. 249-253, 2009.

CAVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E.C.; BRITO, F.A.; HERINGE, A.P.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, n. 11, p. 1552-1560, 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FAVERO, A.O.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKY, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 617-622, 2005.

DIAZ, C.; QUESADA, S.; BRENES, O.; AGUILAR G.; CICCIO J. F. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumor cell lines. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 22, n. 17, p. 1521-1534, 2008.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUPTA, S.K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R.K.; VELPANDIAN, T. Comparative antinociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v. 41, n. 6, p. 657–662, 2000.

IBRAHIM, M.; NANE, K.M.; ANJUM, A. Hepatoprotective activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 16, p. 2566–2571, 2008.

JIANMEI, Y.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1/2, p. 199–206, 2005.

JONES, J.B.; PROVOST, M.; KEAVER, L.; BREEN, C.; LUDY, M.; MATTES, R.D. A randomized trial on the effects of flavorings on the health benefits of daily peanut consumption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 99, n. 3, p. 490–496, 2013.

KASIMALA, M.B.; KASIMALA, B.B. A review on Brazilian pepper plant: *Schinus molle*. **Journal of Atoms and Molecules**, London, v. 2, n. 2, p. 6–13, 2012.

KULISIĆ, T.; KRISKO, A.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; MILOŠ, M.; PIFAT, G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp hirtum), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, Basingstoke, v. 58, n. 2, p. 87–93, 2007.

KUMAR, S.; SINGHAL, V.; ROSHAN, R.; SHARMA, A.; REMBHOTKAR, G.W.; GHOSH, B. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and IkappaB kinase activation. **European Journal of Pharmacology**, Paris, v. 575, n. 1/3, p. 177–186, 2007.

LI, S.; WANG, C.; LI, W.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; WANG, M. W. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative antiepilepsirine. **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 9, n. 3/5, p. 421–430, 2007.

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

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular grow and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 55, 1983.

MOTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MURTHY, C.T.; BHATTACHARYA, S. Cryogenic grinding of black pepper. **Journal of Food Engineering**, London, v. 85, n. 1, p. 18-28, 2008.

MUSENGA, A.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; RAGGI, M.A. Analysis of aromatic and terpenic constituents of pepper extracts by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 4, p. 612–619, Mar. 2007.

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

OZCAN, M.M. Some nutritional characteristics of kernel and oil of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Oil Science**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 1–5, 2010.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus piper. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal Plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

RENJIE, L.; SHIDI, S.; YONGJUN, M. Analysis of volatile oil composition of the peppers from different production areas. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 19, n. 2, p. 157–165, 2010.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plants Foods for Human Nutrition**, New York, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

RODRIGUES, L.C.C.; MEYER, T.N.; PEREIRA, J.B.B.; SILVA, G.R. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do caroço de abacate sobre a peritonite induzida pela carragenina em ratos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 367-376, 2015.

ROSAS, E.C.; CORREA, L.B.; PÁDUA, T.A.; COSTA, T.E.M.M.; MAZZEI, J.L.; HERINGER, A.P.; BIZARRO, C.A.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 15, p. S0378-8741, 2015.

SABINA, E.P.; NAGAR, S.; RASOOL, M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation-an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, New York, v. 34, n. 3, p. 184–192, 2011.

SCHULZE-KAYSERS, N.; FEUEREISEN, M.M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family: a review. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, v. 5, n. 89, p. 73301-73314, 2015.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SELVENDIRAN, K.; SENTHILNATHAN, P.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Modulatory effect of piperine on mitochondrial antioxidant system in benzo(a)pyrene-induced experimental drug carcinogenesis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 11, n. 1, p. 85-89, 2004.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 1, p. 105–110, 2006.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and post prandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, Cambridge v. 135, n. 5, p. 969-972, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENHEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 1104 p.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 7, n. 2, p. 130-137, 2002.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

TAQVI, S.I.; SHAH, A.J.; GILANI, A.H. Blood pressure lowering and effects of piperine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Naperville, v. 52, n. 5, p. 452-458, 2008.

TATSUNO, T.; JINNO, M.; ARIMA, Y.; KAWABATA, T.; HASEGAWA, T.; YAHAGI, N.; TAKANO, F.; OHTA, T. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n. 6, p. 909-916, 2012.

THAMBI, P.T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M.C.; JOLLY, C.I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (I) R. Br. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Bombay, v. 68, n. 3, p. 352-355, 2006.

TOMOCHIKA, K.; SHIMIZU-IBUKA, A.; TAMURA, T.; MURA, K.; ABE, N.; ONOSE, J.; ARAI, S. Effects of peanut-skin procyanidin A1 on degranulation of RBL-2H3 cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 75, n. 9, p. 1644-1648, 2011.

WHITE, B.L.; GÖKCE, E.; NEPOMUCENO, A.I.; MUDDIMAN, D.C.; SANDERS, T.H.; DAVIS, J.P. Comparative proteomic analysis and IgE binding properties of peanut seed and test (Skin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 16, p. 3957–3968, 2013.

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

YUEQIN, Z.; RECIO, M. C.; MANEZ, S.; GINER, R.M.; CERDA-NICOLAS, M.; RIOS, J. L. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-Inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 10, p. 893-898, 2003.