UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
Área de Bromatologia

Flavonóides e ácidos cinâmicos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.- Poaceae) e seus produtos. Identificação e atividade antioxidante e antiproliferativa.

Joaquim Mauricio Duarte Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Franco Maria Lajolo

São Paulo
2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011864

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Joaquim Mauricio Duarte
A447f Flavonóides e ácidos cinâmicos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. - Poaceae) e seus produtos. Identificação e atividade antioxidante e antiproliferativa / Joaquim Mauricio Duarte Almeida. -- São Paulo, 2006.
129p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Química de alimentos 2. Flavonóide : Bioquímica vegetal 3. Antioxidante : Ciência dos alimentos I. T. I I. Lajolo, Franco Maria, orientador.

641.1 CDD

Joaquim Mauricio Duarte Almeida

Flavonóides e ácidos cinâmicos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.- Poaceae) e seus produtos. Identificação e atividade antioxidante e antiproliferativa.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Franco Maria Lajolo
orientador/presidente

Prof. Dr. Antonio Salatino
1°. examinador

Prof. Dr. Wagner Vilegas
2°. examinador

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
3°. examinador

Prof. Dr. Alexis de Jesus Vidal Novoa
4°. examinador

São Paulo, 27 de junho de 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Franco Maria Lajolo, pela sugestão do tema e liberdade para concluir este trabalho.
Ao Prof. Dr Antônio Salatino, por toda colaboração e sugestões no decorrer deste novo percurso.
À Profª Drª Beatriz Rosana Cordenunsi, por toda sabedoria transmitida e por estar sempre a disposição.
À Profª Drª Maria Inés Genovese, pela assistência e participação nos trabalhos.
Ao Prof Dr Eduardo Purgatto, pelas inúmeras assistências nas vicissitudes com os aparelhos.
À Profª Drª Giuseppina Negri (Gina), por toda colaboração na interpretação dos espectros de massas e de ressonância.
À profª Drª Bernadete Franco, pela assistência nas burocracias e desmandos dessa nossa USP.
Ao Ms Ricardo José dos Santos, além da amizade, por toda ajuda prestada e sempre com muita disposição nos esclarecimentos da difícil arte de extrair, purificar e quantificar os flavonóides.
Ao Dr Adair Vieira Jr, por toda ajuda no enigmático mundo da informática, além das informações técnicas e assuntos aleatórios.
Ao Eng. Renato Astorino, pela companhia e auxílio técnico durante nossas pernoites no laboratório.
Ao Ms Alexandre Lobo, por todas as dicas compartilhadas durante esse período.
Aos Engºs José de Paula Neto e Vanessa (Usinas Santa Albertina e Cosan, respectivamente) pelo material fornecido.
À Kátia e ao Charles, laboratório de Química Farmacêutica, pelos espectros de infravermelho.
Ao prof. Dr Hélio e a Inês Gonçalves, laboratório de Heterocíclicos, pelos espectros de rmn.
À Simone, Biofar, pelos espectros de massas tandem.
Aos Ms Daniel e Hélio (Applied Biosystems e IPEM) pelos espectros de massas tandem.
À Dra Claudia Furlan, IB, por todas as dicas sobre o programa Fitopac-Shell.
À Ms Selma, pela ajuda no uso do programa Statistica e todos os comentários pertinentes.
Dra Eliana Giuntini, pelas informações sobre a tabela de composição de alimentos.
Ao pessoal técnico, Tia Márcia, Lúcia e Tânia, pelos inúmeros auxílios durante este período.
Ao grande amigo Alberto Bernal, por toda colaboração, almoços e trocas de experiências botânicas e pelo grande exemplo de humildade e sinceridade.
Aderuza, Amanda, Ana Cris, Ana Paula, Claudinéia, Claudinha, Milana, Gisele, Gracieli, Grazieli, Fernanda, Janaina, Lucile, Marcelo, Malu, Neuza, Paola, Rose, Roberta por tornarem o laboratório mais alegre e menos estafante.
Aos colegas do B14 e do Instituto de Biociências pelo agradável convívio.
À Adriana, Cinthia, João Paulo e Luis Marcelo pelos memoráveis almoços no "butequinho" e "bandejão".
Á seção de pós-graduação, Jorge e minha japonesa preferida, Elaine.
A secretaria do departamento de Alimentos, Mônica, Tânia e Edílson.
Aos meus irmãos, Marcelo, Mércia e Márcio, aos meus pais, Ely e Arlete, por contribuírem com minha formação.
Ao Bugu *in memoriam*, por me levar para passear e a Drica e Milu, pelo alívio de meus estresses.
Ao André, pela ajuda na impressão dos trabalhos, sites de busca e etc. Ao Daniel, por estar sempre por perto quando eu me sentia um pouco distante de tudo.
Ao CNPq pelo auxílio financeiro.
À Eliana, por todos comentários, revisões de textos, resumos, dicas e auxílio financeiro durante este trabalho. Agradeço por ter feito tudo acima com toda paciência e amor, e também por estar sempre do meu lado, incondicionalmente. Sem dúvida, você foi imprescindível!
A Deus, por me dar saúde, ter amigos e assim poder cumprir mais esse objetivo.

No Nordeste do Brasil, dizem que Jesus Cristo caminhava por uma longa estrada, em dia de sol a pino. Estava com fome e sede, quando avistou um canavial. Debaixo de suas sombras, sentou e pôs-se a chupar os gomos. Pródigo, abençoou as plantas e prometeu que delas o homem haveria de tirar um alimento bom e doce. No dia seguinte e na mesma hora, o diabo, com os chifres e o rabo queimados, saiu do fogo do inferno e galopou até o mesmo canavial. Lá as canas soltavam um caldo que lhe queimou a garganta. Furioso, amaldiçoou as plantas e prometeu que delas o homem tiraria uma bebida tão ardente como as caldeiras do inferno. Por isso que da cana se tira o açúcar, bênção de Nosso Senhor, e a cachaça, maldição do diabo.

SUMÁRIO

Resumo 01
Abstract 03
I. INTRODUÇÃO GERAL
I.1. Cana-de-açúcar 05
I.2. Produção de melaço e rapadura 06
I.3. Produção de açúcar 08
I.4. Compostos bioativos 13
I.5. Referências 19
II. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)
II.1. INTRODUÇÃO 22
II.2. MATERIAL E MÉTODOS 22
II.2.1. Material 23
II 2.2. Métodos 23
II.2.3. Identificação 27
II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 31
Identificação de luteolina 8-C-glucosídeo (orientina) 34
Identificação de 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo 37
Identificação de tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo 40
II.4. CONCLUSÕES 55
II.5. REFERÊNCIAS 56
III. PERDAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DO AÇÚCAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CALDO MISTO E SEUS PRODUTOS
III.1. INTRODUÇÃO 59
III.1. MATERIAL E MÉTODOS 60
III.2.1. Material 60
Amostras de cana 60
Amostras dos produtos da cana 61
III.2.2 MÉTODOS 61
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
Teor de sólidos totais das amostras in natura e dos produtos da cana-de-açúcar 66
Teores de sólidos solúveis (°Brix) dos produtos da cana-de-açúcar 67
Perfil dos compostos fenólicos das amostras *in natura* e dos produtos da cana-de-açúcar 68
Redução de radicais livres (DPPH) 76
Sistema β-caroteno/ácido linoléico 78
Análise multivariada 81
III.4. CONCLUSÕES 85
III.5. REFERÊNCIAS 86
IV. CALDO DE CANA E RAPADURA: TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA 89
IV.1. INTRODUÇÃO 89
IV.2. MATERIAL E MÉTODOS 91
IV.2.1. Material 91
IV.2.2. MÉTODOS 92
IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 97
Teor de sólidos totais das amostras de caldo de cana e rapadura 97
Perfil dos compostos fenólicos das amostras de caldo de cana e rapadura 99
Redução de radicais livres (DPPH) 106
Sistema β-caroteno/ácido linoléico 107
Atividade antiproliferativa dos compostos fenólicos do caldo de cana, rapadura e tricina 110
Análise multivariada 117
IV.4. CONCLUSÕES 120
IV.5. REFERÊNCIAS 121
Considerações finais 124
ANEXOS 126

LISTA DE ABREVIATURAS

ACG	ácido clorogênico
AcOH	ácido acético
ACQ	ácido 5-*O*-cafeoilquinico
β-CAL	sistema β-caroteno/ácido linoléico
BHA	Hidroxidoanisol de butila
BHT	Hidroxidotolueno de butila
CC	Caldo de cana
CC-M	Extrato de compostos fenólicos do caldo de cana obtido por eluição de coluna de poliamida com metanol
CC-N	Extrato de compostos fenólicos do caldo de cana obtido por eluição de coluna de poliamida com metanol/hidróxido de amônio
CID	Dissociação induzida por colisão
CG-EI-MS	Cromatografia gasosa-impacto de elétrons-detector de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência- detector arranjo diodo
CP	Cromatografia em papel
CM	Caldo misto
DAD	Detector com arranjo de diodos
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EFS	Extração em fase sólida
Glu	Glicose
H	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
m/z	Relação massa/carga
m-	Meta
MeOH	Metanol
mM	Milimolar
MEL	Melaço
MSMS	Espectrômetro de massas seqüencial
Nm	Nanômetro
ORAC	capacidade de absorção de radicais de oxigênio
o-	Orto
p-	Para
PFO	Polifenoloxidase
RAP-M	Extrato de compostos fenólicos de rapadura obtido por eluição de coluna de poliamida com metanol
RAP-N	Extrato de compostos fenólicos de rapadura obtido por eluição de coluna de poliamida com metanol/hidróxido de amônio
RRL	Redução de radicais DPPH
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografia em camada delgada
TPI	Índice de polifenólicos totais
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
V1	Variedade SP801842
V2	Variedade SP813250
V3	Variedade RB835480
VHP	Very high polarization
XPE	Xarope

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema I.1:	Fluxograma básico da produção de açúcar	09
Esquema II.1:	Fragmentação por dissociação induzida por colisão proposta para tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo, baseada no espectro de massas (MS/MS) no modo negativo.	46
Esquema II.2:	Fragmentação por dissociação induzida por colisão proposta para tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo, baseada no espectro de massas (MS/MS) no modo positivo.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1.	Dados sobre espectro do analito EL3 no infravermelho com transformada de Fourier.	50
Tabela II.2.	Dados sobre os desvios químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) de RMN de ^{1}H e ^{13}C de tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosideo em DMSO-*d6* (δ em ppm, J em Hz).	54
Tabela III.1.	Teores de sólidos totais e solúveis (°Brix) das variedades de cana-de-açúcar e seus produtos.	67
Tabela III.2.	Determinação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH dos produtos da cana-de-açúcar obtidos durante o processamento do açúcar.	77
Tabela III.3:	Determinação da atividade antioxidante pelo sistema *β*-caroteno/ácido linoléico de produtos da cana-de-açúcar obtidos durante o processamento do açúcar.	79
Tabela III.4.	Correlação entre os valores de flavonóides totais, ácidos cinâmicos, índice de fenólicos totais, atividade de redução do radical DPPH e atividade antioxidante pelo sistema *β*-caroteno/ácido linoléico de produtos obtidos por processamento do caldo de cana.	82
Tabela IV.1.	Teores de sólidos totais e fenólicos totais de caldo de cana e rapadura	97
Tabela IV.2	Determinação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.	107
Tabela IV.3.	Determinação da atividade antioxidante pelo sistema *β*-caroteno/ácido linoléico de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.	108
Tabela IV.4.	Correlação entre o Índice de Polifenólicos Totais, atividade de redução do radical DPPH e atividade antioxidante pelo sistema *β*-caroteno/ácido linoléico de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.	118
Tabela IV.5.		

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1:	Estruturas dos ácidos cinâmicos	14
Figura I.2:	Estrutura básica de um flavonóide	16
Figura II.1.	Diagrama de extração do caldo de cana. EFS: extração em fase sólida.	23
Figura II.2.	Diagrama de isolamento e de hidrólise de glicosídeos do eluato 2: EFS: extração em fase sólida.	26

Figura II.3.	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos da extração em fase sólida do caldo de cana.	33
Figura II.4.	Estrutura e via de fragmentação de orientina 8-*C*-glucosídeo.	36
Figura II.5.	Espectro de massas (tandem) de orientina 8-*C*-glucosídeo.	36
Figura II.6.	Espectro de massas no modo positivo de 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo	39
Figura II.7.	Estrutura molecular sugerida para o analito CCP (tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo).	41
Figura II.8.	Espectros de luz UV/visível do analito 2.2.	43
Figura II.9	Espectro de massas de do analito 2.2. nos modos positivo e negativo obtidos por dissociação induzida por colisão (CID) em espectrômetro de massas com triploquadrupolo.	45
Figura II.10	Cromatograma do monossacarídeo obtido a partir da hidrólise do analito 2.2, espectro de massas do açúcar do glucosídeo e espectro de massas de glucose da biblioteca NIST98.	48
Figura II.11	Espectros de IV-TF do analito 2.2.	51
Figura II.12	Clivagem do *O*-glicosídeo referente ao analito 2.2 na posição C-7 através de hidrólise ácida com HCl 2N	52
Figura III.1.	Teores de fenólicos totais de variedades de cana-de-açúcar, caldo de cana e seus produtos.	70
Figura III.2.	Teores dos compostos fenólicos de variedades de cana-de-açúcar em base úmida obtidos em CLAE-DAD.	72
Figura III.3.	Gráfico dos escores da componente principal 1 versus componente principal 2 dos produtos obtidos no processamento da cana-de-açúcar	84
Figura IV.1.	Cromatogramas CLAE-DAD de extratos de caldo de cana e rapadura	99
Figura IV.2.	Teores dos compostos fenólicos de caldo de cana em base úmida determinados por CLAE-DAD.	101
Figura IV.3.	Teores dos compostos fenólicos de rapadura em base úmida obtidos por CLAE-DAD.	103
Figura IV.4.	Cromatogramas dos extratos de rapadura e rapadura obtidos por CLAE-DAD.	104
Figura IV.5.	Cromatogramas dos extratos de caldo de cana e rapadura obtidos por CLAE-DAD por meio de resina XAD2.	105
Figura IV.6.	Curva concentração-resposta da Doxorrubicina sobre as linhagens celulares	111
Figura IV.7.	Curva concentração-resposta de caldo de cana sobre as linhagens celulares	112
Figura IV.8.	Curva concentração-resposta de rapadura sobre as linhagens celulares	113
Figura IV.9.	Curva concentração-resposta de tricina sobre as linhagens celulares	114
Figura IV.10.	Gráfico dos escores da componente principal 1 versus componente principal 2 dos extratos de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.	115

RESUMO

Os produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar possuem, além de altas concentrações de sacarose, flavonóides que podem atuar como quimiopreventivos e antioxidantes. Neste estudo foram elucidadas as estruturas dos flavonóides e dos ácidos cinâmicos mais abundantes no caldo de cana, sendo apresentadas duas novas substâncias, uma flavona, tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosideo e uma lignana, 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo. Entre as flavonas analisadas, o derivado de tricina apresentou maior abundância.

Foi também confirmada neste estudo a perda de compostos fenólicos durante o processamento industrial do açúcar. Nos colmos de cana-de-açúcar evidenciamos altas concentrações de ácidos clorogênico e cumárico, e baixos teores de flavonóides. No decorrer do processamento verificaram-se perdas significativas de ácidos cinâmicos e aumento nos teores de flavonóides. Os maiores teores foram verificados no xarope e os menores no açúcar VHP. Entretanto, a proporção dos compostos fenólicos teve pouca alteração durante o processamento. As flavonas encontradas na cana *in natura* se mantiveram durante todo o processamento, enquanto que não se detectou ácido ferúlico nas variedades e ácido caféico nos produtos. A atividade antioxidante dos produtos obtidos durante as etapas do processamento do açúcar foram avaliadas. As maiores atividades foram encontradas no xarope e melaço, enquanto que as menores, no caldo misto e açúcar VHP.

Uma avaliação sobre o perfil dos compostos fenólicos de amostras de rapadura e caldo de cana obtidos no comércio local mostrou que a rapadura apresenta altos teores

de luteolina, enquanto no caldo, prevalece tricina. Nas amostras de rapadura destacam-se altos teores de ácido clorogênico, composto que se mostrou ausente nas amostras obtidas durante as etapas do processamento industrial do açúcar. As atividades antioxidantes dos extratos de rapadura mostraram que mesmo em baixas concentrações a atividade é moderada. O caldo apresentou atividade semelhante, mas em concentrações mais elevadas. Quanto à atividade antiproliferativa, o extrato de rapadura apresentou atividades citostáticas para todas as linhagens e citocida para as linhagens de células cólon (HT-29), de mama (MCF-7), de mama resistente (NCI-ADR), de pulmão (NCI-460), de ovário (OVCAR), de rim (786-0) e de melanoma (UACC-62). O derivado de tricina, isolado a partir do caldo de cana, apresentou atividade antioxidante moderada. Suas atividades antiproliferativas foram mais pronunciadas para as linhagens de células de mama resistente (NCI-ADR) e de cólon (HT-29), com atividade citostática e citocida para as linhagens de pulmão (NCI-460), de mama (MCF-7), de ovário (OVCAR), de rim (786-0) e de melanoma (UACC-62).

ABSTRACT

Sugar cane products have high sucrose concentration and flavonoids that can function with chemopreventive and antioxidant. In this study have been elucidated flavonoids and cinnamic acids structures most abundant in sugar cane juice and were presented two new substances, one flavone, tricin-7-*O*-β-(6"-methoxycinnamic)-glucoside and one lignan, 3-hydroxy-1-[4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl]-2-[4-(3-hydroxy-1-(E)-propenyl)-2,6-dimethoxyphenoxy]-propyl-β-D-glucopyranoside. Among the flavones analyzed, tricin presents high concentration.

In this study was corroborated the loss of phenolic compounds during the processing industrial of sugar. In culm of sugar have been evidenced high concentrations of the chlorogenic and coumaric acids, and low flavonoid contents. During the processing has been proved significant loss of cinnamic acids and increase of flavonoids. The highest contents have been proved in the syrup and the smallest in the sugar VHP. However, the profile of the phenolic compounds had little alteration during the processing. The flavones finded in sugar cane *in natura* were remaining during all the processing and, are not find ferulic acid in the varieties and caffeic acid in the products. The antioxidant activities in products obtained during processing stage of sugar cane were evaluated. The highest activities were finded in the syrup and molasses and the smallest in sugar cane juice and sugar VHP.

Assessment about the profile of the phenolic compounds in rapadura and sugar cane juice acquired in local commerce showed that the rapadura presents high contents of the luteolina, while in sugar cane juice, predominate tricin. In the sample of rapadura stand out high chlorogenic acid contents, compound that showed absent in sample from during the processing industrial stages of sugar. The antioxidants activities of rapadura extracts showed the in spite of in low concentration the activity

is moderate. The sugar cane juice presented similar activity but, in high concentration. As for the antiproliferative activity, the rapadura extract presented cytostatic effect for all lines and cytocidal for the colon cell lines (HT-29), of breast (MCF-7), of multi-drug resistant breast cells (NCI-ADR), of lung (NCI-460), of ovary (OVCAR), of kidney (786-0), and of melanoma (UACC-62). Tricin, isolated from sugar cane juice, presented moderate antioxidant activity. The antiproliferative effects of tricin were more pronunciated for multi-drug resistant breast cells (NCI-ADR) and of colon (HT-29), with cytostatic effect and cytocidal for lung lines (NCI-460), of breast (MCF-7), ovary (OVCAR), of kidney (786-0), and of melanoma (UACC-62).

I INTRODUÇÃO

A vida animal depende das plantas, não apenas pela sua capacidade de converter dióxido de carbono, água e nitrogênio em metabólitos primários essenciais ao trabalho e reprodução das células, mas também devido à biossíntese de numerosos tipos de outros compostos orgânicos (Vickery & Vickery, 1981).

Raros são os estudos químicos envolvendo flavonóides e ácidos cinâmicos em cana-de-açúcar além das suas propriedades biológicas. Segundo a literatura, apenas flavonas, apigenina, luteolina e tricina foram detectadas no suco da cana (Paton & Duong, 1992), inexistindo ainda dados sobre os derivados do suco, tais como melado e rapadura.

Entre os grandes desafios da humanidade no século 21 estão a ampliação da produção de alimentos, a obtenção de um meio ambiente mais limpo e saudável e o desenvolvimento de novas fontes renováveis de energia e produtos químicos.

I.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae (Gramineae) e sua origem geográfica é atribuída ao Sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e também à Índia, onde é cultivada desde épocas remotas. Seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *S. officinarum, S. sinense, S. barberi*, *S. edule*, *S. spontaneum* e *S. robustum* (Daniels & Roach, 1987).

A exploração canavieira assentou-se, no início, sobre a espécie *S. officinarum* L. O surgimento de várias doenças e de uma tecnologia mais avançada implicaram na criação de novas variedades, as quais foram obtidas pelo cruzamento de *S. officinarum* com as outras quatro espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, através de retrocruzamentos com as espécies parentais. Os

trabalhos de melhoramento persistem até os dias atuais e conferem a todas as variedades em cultivo uma mistura das cinco espécies originais e a existência de cultivares ou variedades híbridas (Coopersucar, 2005).

O colmo da cana-de-açúcar é constituído de fibra e caldo absoluto. A fibra, definida como o conjunto de substâncias insolúveis em água, é formada principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, os teores variando de 10 a 16%. O caldo absoluto representa, portanto, de 84 a 90% do colmo, sendo constituído por uma solução impura e diluída de sacarose, contendo água (75 a 82%) e sólidos solúveis (18 a 25%). Os sólidos solúveis (Brix) são agrupados em açúcares (18%) e não-açúcares orgânicos (1%) e inorgânicos (1%). Os açúcares são representados principalmente pela sacarose (17%), e glicose e frutose (1,0%) (Martins, 2004).

A cana-de-açúcar é cultivada em áreas de clima tropical e subtropical. Para o Brasil tem especial significado econômico, visto que lidera a lista dos 80 países produtores, garantindo 25% da produção mundial, utilizado principalmente, na produção de açúcar e como fonte de energia (etanol e eletricidade). As indústrias sucroalcooleiras movimentam o equivalente a 15,7 bilhões de reais por ano, contribuindo com 2,5% do Produto Interno Bruto do país (BRASIL, 2004). Na safra 2006/2007 o Brasil deverá atingir aproximadamente 410 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com rendimento médio de 70 toneladas por hectare, destacando-se como o maior produtor e maior exportador mundial de açúcar com 22,05 milhões de toneladas (FNP Consultoria e Agroinformativos, 2006).

I.2 PRODUÇÃO DE MELAÇO E RAPADURA

A legislação brasileira, do Ministério da Saúde, define *rapadura* como produto sólido obtido pela concentração do caldo de cana; *melaço*, como líquido que se

obtém como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto; e *melado*, como líquido xaroposo obtido pela evaporação do caldo de cana ou a partir da rapadura, por processos tecnológicos adequados. Esses produtos devem ser preparados com matérias primas não fermentadas, isentas de matéria terrosa, de parasitas e detritos de animais ou vegetais. É vedada a adição de essências, corantes naturais ou artificiais, conservadores e edulcorantes. (Brasil, 2005).

Segundo o SEBRAE/MG (2005), uma tonelada de cana produz entre 80 a 100 quilos de rapadura. Para fabricar rapadura e melaço, o produtor precisa adotar os procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidos pela Vigilância Sanitária, que incluem medidas rigorosas de higiene dos trabalhadores, limpeza diária dos engenhos, das moendas, dos reservatórios e dos tachos; além de matéria-prima de boa qualidade e armazenagem adequada.

A prática de adicionar aditivos ao caldo, para dar à rapadura cor mais clara, não é recomendável. Há, no entanto, certas substâncias que, ao serem adicionadas ao caldo, provocam a floculação de determinados compostos que vêm à superfície sob forma de espuma. Essas substâncias são conhecidas como purificantes. Dentre as existentes, citam-se a mucilagem do quiabo e do mutambo, a clara de ovo, a caseína do leite e outras, geralmente utilizadas no meio rural. Essa espuma, proveniente da limpeza do caldo, devido ao seu bom valor nutritivo e energético, pode ser aproveitada na alimentação de suínos (Pinto, 1990).

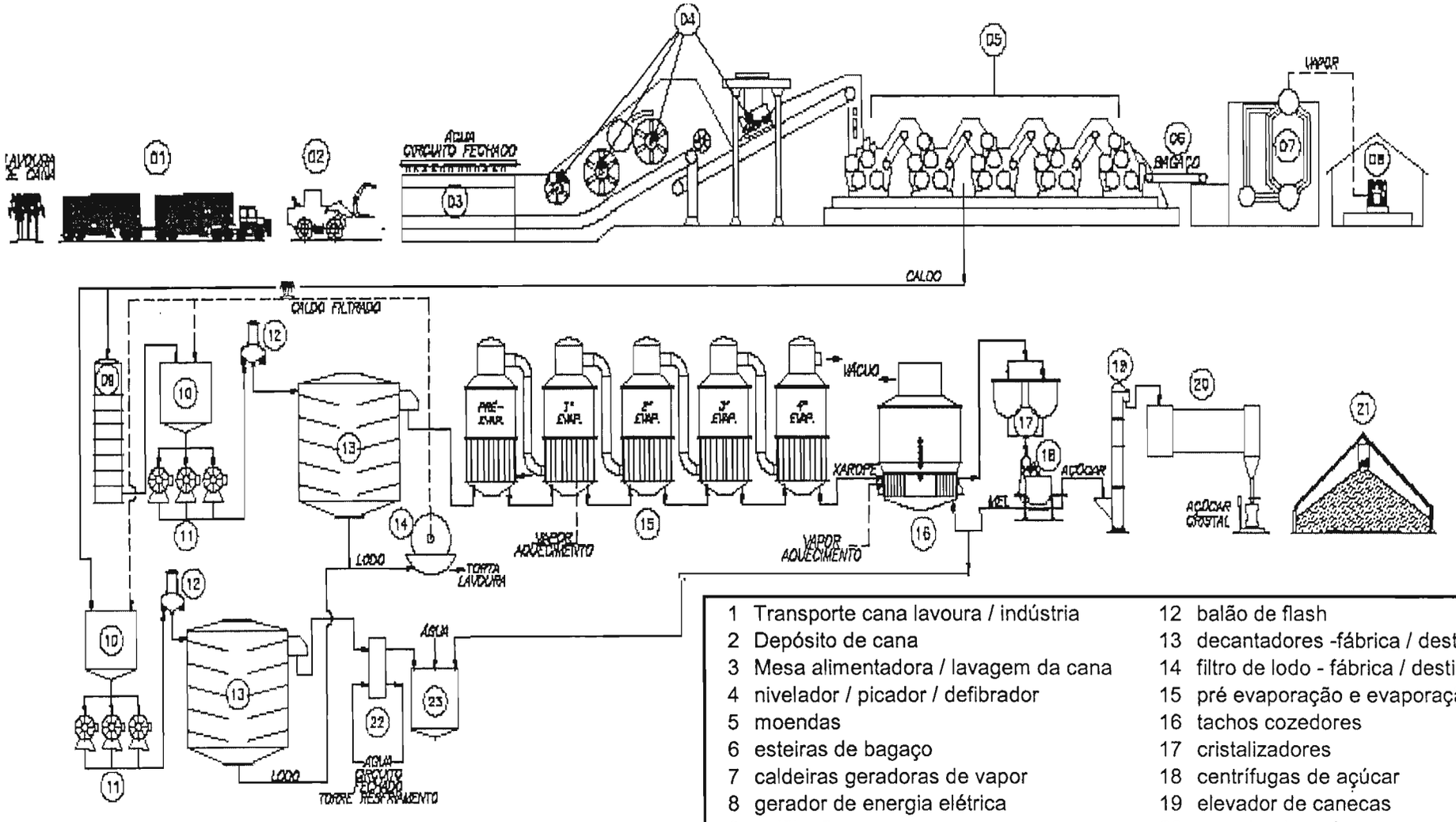
O valor nutritivo da rapadura vem sendo reconhecido e tem motivado algumas providências governamentais. Em 1997 e 1998, o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco - LAFEPE – produziu pastilhas de rapadura, de 1 e 4 miligramas, e as distribuiu na rede oficial de ensino do Estado. As pastilhas foram adicionadas aos

pratos da merenda escolar e serviram de complemento alimentar (Lima & Cavalcanti, 2001).

Carvalho *et al.* (2001) avaliaram a freqüência de consumo alimentar por adolescentes de 10 a 19 anos no Piauí e observaram que a rapadura é consumida de 3 a 4 vezes/semana. Dessa forma esse alimento é uma importante fonte de energia em algumas regiões do Brasil, fazendo parte do hábito alimentar. Um estudo sobre o consumo alimentar em 17 creches municipais no estado de Piauí mostrou que crianças de 2 a 3 anos de idade consomem em média 17,50 g de rapadura e crianças de 4 a 5 anos 15,01 g; em relação ao valor energético, as primeiras ingerem em média 867 kcal/dia e as demais 1030 kcal/dia (Cruz, 2001). Utilizando a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA-USP, 1998) observou-se que a rapadura pode responder por 5,3 a 7,3% do valor energético da dieta. Este percentual é representativo, pois o arroz, alimento tradicionalmente consumido como fonte de energia, é responsável pela oferta de 13 a 14% do valor energético para as crianças desta faixa etária.

I.3 PRODUÇÃO DO AÇÚCAR

A extração da sacarose a partir da cana-de-açúcar utiliza processos padronizados e com alta tecnologia consistindo em várias etapas (esquema 1), de acordo com as normas do departamento de engenharia da usina e serão descritas a seguir (Cosan 2002; Usina Albertina, 2005).



1	Transporte cana lavoura / indústria	12	balão de flash
2	Depósito de cana	13	decantadores -fábrica / destilaria
3	Mesa alimentadora / lavagem da cana	14	filtro de lodo - fábrica / destilaria
4	nivelador / picador / defibrador	15	pré evaporação e evaporação
5	moendas	16	tachos cozedores
6	esteiras de bagaço	17	cristalizadores
7	caldeiras geradoras de vapor	18	centrífugas de açúcar
8	gerador de energia elétrica	19	elevador de canecas
9	sulfitação	20	secador de açúcar
10	calagem	21	armazém de açúcar
11	aquecedores - fábrica / destilaria	22	trocador de calor
		23	tanque pulmão / diluidor

Esquema 1. Fluxograma básico da produção de açúcar (adpatado de Cosan, 2004).

Extração do caldo de cana

A cana destinada à produção de açúcar tem origem conhecida, ou seja, sabe-se a variedade, tipo de correção de solo, idade e forma de colheita. Antes da moagem, a cana coletada manualmente é lavada nas mesas alimentadoras para retirar a terra proveniente da lavoura. A cana colhida mecanicamente não é lavada pois, devido a sua forma de toletes, o arraste de sacarose pela água seria muito grande. Após a lavagem, a cana passa por picadores que trituram os colmos, preparando para a moagem. Após o preparo, a cana desfibrada é enviada à moenda para ser moída e extrair o caldo. As moendas separam água e sólidos da fibra que formará o bagaço. A sacarose está dissolvida no caldo, portanto o objetivo da moagem é extrair a maior quantidade possível de sólidos da cana. No intuito de dissolver os sólidos no bagaço para aumentar a extração, adiciona-se água ao bagaço antes de passar pelos últimos rolos, constituindo o processo denominado *embebição*. A *embebição* aumenta a eficiência da extração, conseguindo assim, extrair cerca de 96% do açúcar contido na cana, que será utilizado para produzir açúcar ou álcool. O caldo extraído vai para o processo de tratamento do caldo e o bagaço para as caldeiras.

O caldo extraído na moenda, chamado *caldo misto*, é peneirado, para remoção de impurezas mais grosseiras. No entanto, impurezas menores (solúveis, insolúveis ou coloidais) não são removidas apenas com a utilização de peneiras. No caso desse tipo de impurezas, uma seqüência de procedimentos é adotada, no intuito de coagulá-las, de maneira que a decantação possa separá-las. Após essa seqüência de tratamento, descrita a seguir, o caldo é enviado à produção de açúcar.

Tratamento do caldo

Sulfitação: Processo no qual o caldo absorve SO_2, inibindo reações que causam a formação de cor, coagulando matérias coloidais, auxiliando na formação de precipitados que farão o arraste de impurezas durante a sedimentação, reduzindo o pH, diminuindo a viscosidade do caldo e desinfetando o meio.

Calagem: Adição de leite de cal ($Ca(OH)_2$) que também coagula material coloidal, auxilia na precipitação e arraste de impurezas solúveis e insolúveis e eleva o pH para valores neutros.

Flasheamento: No balão de flash, uma diminuição brusca de pressão provoca uma ebulição espontânea do caldo eliminando assim o ar nele dissolvido que, quando presente, dificulta a decantação das impurezas mais leves.

Decantação: É a etapa de purificação do caldo pela remoção das impurezas floculadas nos tratamentos anteriores, também chamada de clarificação. O caldo, livre das impurezas, é chamado caldo decantado e segue para a etapa de evaporação. As impurezas constituem o que é chamado de lodo. O lodo é enviado à etapa de filtragem, descrita a seguir.

Filtragem: Recuperação do açúcar contido no lodo, dessa forma separa-se o caldo filtrado do que é retido no filtro: a torta, formada basicamente pelos resíduos retirados na decantação. O caldo retorna ao processo e a torta é utilizada como adubo na lavoura.

Obtenção do açúcar

Evaporação: Constitui o primeiro estágio de concentração do caldo proveniente da etapa de tratamento. O caldo clarificado contém cerca de 85% (15°Brix) de água. A evaporação tem como objetivo reduzir essa porcentagem para aproximadamente 40% (65°Brix) tomando consistência de *xarope*. Essa evaporação

é realizada em evaporadores de múltiplo efeito concorrente, isto é, o vapor gerado pela evaporação da água do caldo (vapor vegetal) presente na caixa de evaporação anterior é utilizado como fonte de aquecimento para a posterior.

Cozimento: Saindo da etapa de evaporação, o *xarope* é enviado ao cozimento que é uma nova etapa de concentração tornando o meio supersaturado dando condições necessárias à cristalização da sacarose. O produto obtido nesse cozimento é uma mistura de cristais de açúcar e *mel* (solução açucarada) com cerca de 95°Brix e temperatura entre 58 a 65 °C, e é denominado de massa cozida.

Cristalização: Essa massa cozida é, posteriormente, enviada aos cristalizadores nos quais, por um processo denominado *nucleação* produz-se pequenos cristais, de modo controlado e padronizado. Esse processo é fundamental na qualidade do produto final, no qual todos os cristais são induzidos a uma formação conjunta e uniforme, chamada de semeamento total. A massa obtida é uma mistura de cristais de açúcar e o seu correspondente mel (*melaço*), o qual foram obtidos os cristais.

Centrifugação: Essa segunda massa contém cristais de açúcar (*magma*) e melaço que na centrifugação são separados, o *melaço* retornando aos cozedores para um maior esgotamento e o *magma* sendo utilizado como núcleo para o cozimento, que por sua vez será submetido a uma nova centrifugação, através da qual se obtém o açúcar propriamente dito. O açúcar descarregado das centrífugas apresenta alto teor de umidade (0,5 a 2%) e temperatura elevada (65 a 95 °C)

Secagem: Por meio de um elevador de canecas, os cristais de açúcar seguem para a secagem em tambores rotativos usando ar quente. Esse açúcar pode ser comercializado como açúcar cristal. Ou então, utilizado para a fabricação de outros produtos como o açúcar invertido, o açúcar refinado ou o açúcar líquido.

Algumas etapas podem variar de acordo com a usina e com o tipo de produto desejado. Os produtos obtidos passam por um controle de qualidade que analisam o grau de umidade, resíduo de material utilizado na purificação, etc. A cor do açúcar é padronizada, entretanto ocorrem variações peculiares de acordo com as variedades de cana-de-açúcar utilizadas no processamento. Fenilpropanóides e flavonóides contribuem para a coloração do suco da cana-de-açúcar, provavelmente através de seus produtos oxidados ou desidratados (Palla, 1983; Bucheli & Robinson, 1994; Yusof *et al.* 2000). Esses metabólitos, em geral, embora inconvenientes para a indústria de açúcar, têm se destacado como compostos bioativos, atuando como quimiopreventivos e antioxidantes.

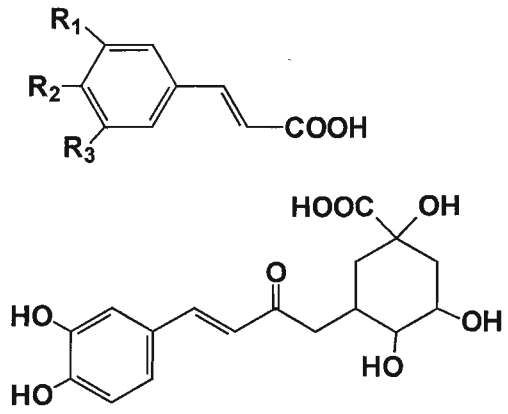
I.4 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos fenólicos constituem importante categoria de metabólitos secundários e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Destacam-se entre eles os ácidos cinâmicos e os flavonóides, pela atenção recebida na prevenção de doenças crônico-degenerativas e ubiqüidade entre os vegetais (Hollman, 2001).

I.4.1 Ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos são definidos como uma série de ácidos *trans*-3-fenilpropanóicos diferindo na substituição do anel. Esses compostos estão largamente distribuídos como conjugados nos materiais vegetais incluindo alimentos e bebidas (Clifford, 2000). Embora exista uma grande variedade desses compostos, grande parte tem origem biossintética comum: o amino ácido fenilalanina (Hollman, 2001). Os mais comuns são os ácidos caféico (3,4-dihidroxicinâmico), ferúlico (3-

metoxi- 4-hidroxicinâmico), sinápico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) e *p*-cumárico (4-hidroxicinâmico) (Figura 1). Os ácidos cinâmicos raramente são encontrados como ácidos livres em material vegetal não processado, mas eles podem ser analisados após a desconjunção e descritos como ácidos livres (Vickery & Vickery, 1981; Clifford, 2000).



ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-ACQ)

	R_1	R_2	R_3
cinâmico	H	H	H
p-cumárico	H	OH	H
caféico	OH	OH	H
ferúlico	OCH_3	OH	H
sinápico	OCH_3	OH	OCH_3

Figura I.1. Estruturas de ácidos cinâmicos e de um ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

De acordo com Clifford (2000), os ácidos cinâmicos conjugados podem ser divididos em duas classes principais: ácidos clorogênicos (ACG) e outros conjugados cinâmicos. Classicamente, os ACGs são uma família de ésteres formados entre ácidos *trans*-cinâmicos e ácido quínico (1L-1 (OH),3,4/5-tetrahidroxiciclohexano ácido carboxílico) que possui hidroxilas axiais nos carbonos 1 e 3, e hidroxilas equatoriais nos carbonos 4 e 5 (Figura 1). O ACG mais comum é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-ACQ). Os ACG podem ser subdivididos de acordo com sua identidade, número e posição da acilação, como por exemplo, monoéster de

ácido caféico. Os ácidos cinâmicos também podem estar conjugados a muitas outras moléculas além do ácido quínico e seus compostos relacionados, entretanto algumas vezes como componente minoritário de distribuição limitada, como por exemplo, ésteres de mono ou polissacarídeos. É sugerido que a formação do éster é um processo de detoxificação para o estoque de compostos fenólicos pela planta (Vickery & Vickery, 1981; Clifford, 2000).

Diversos trabalhos ressaltam as atividades biológicas atribuídas aos ácidos cinâmicos. No vegetal, os ácidos cumárico e ferúlico atuam como alelopáticos, prevenindo o crescimento de outras plantas (Vickery & Vickery, 1981). Para os animais, há evidências sobre atuações como quimiopreventivo, antimicrobiano e inibidor da tirosinase e α-glucosidase (Roller & Seedhar, 2002; Adisakwattana *et al.* 2004; Mishima *et al.*, 2005; Shi *et al.* 2005). Há também indícios da atuação do ácido cumárico sobre a inibição de danos oxidativos ao DNA ocasionados por radiações UV-B e inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Vieira *et al.*, 1998; Zang *et al.*, 2000; Abdel-Wahab *et al.*, 2003; Lodovici *et al.*, 2003).

I.4.2 Flavonóides

É estimado que cerca de 2% de todo carbono fotossintetizado pelas plantas é convertido em flavonóides ou compostos correlacionados, e atualmente já são conhecidas mais de 6400 estruturas de flavonóides (Markham, 1982; Harborne & Williams, 2000). Os flavonóides ocorrem sob diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes da classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de 3 átomos de carbono (C_6-C_3-C_6), que pode ou não formar um terceiro anel. Nos compostos tricíclicos, os anéis são chamados A, B e C, e os átomos de carbono

recebem numeração com números ordinários nos núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') no núcleo B (Figura 2). As chalconas não possuem anel C e seus átomos de carbono são numerados segundo um critério distinto (Vickery & Vickery, 1981; Markham, 1982; Harborne & Williams, 2000).

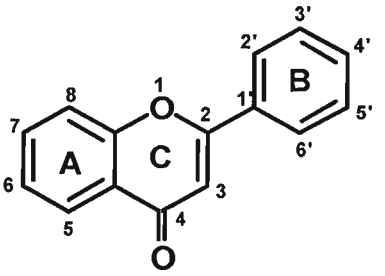


Figura I.2. Estrutura básica de um flavonóide.

As classes de flavonóides podem ser diferenciadas com base na oxidação do anel pirano central, e também pela posição de ligação do anel B (Hahlbrock, 1981). Entre essas classes podemos destacar flavonas, flavonóis, antocianinas, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, isoflavonóides, biflavonóides, entre outras.

França *et al.* (2001) identificaram e caracterizaram genes em cana-de-açúcar que codificam enzimas chaves para a síntese de flavonóides, como a chalcona sintase, envolvida na formação do precursor da maioria dos flavonóides, a isoflavona sintase, envolvida na biossíntese de isoflavonóides que desempenham importante papel na defesa de plantas e nodulação de raízes, e a isoflavona redutase, enzima chave para a síntese de fenilpropanóides fitoalexínicos. Esse estudo também sugere que a ativação da síntese de flavonóides ocorre em resposta a situações de estresse. Entretanto, até o presente momento, os flavonóides encontrados na cana são predominantemente derivados de flavonas, entre esses estão os derivados de apigenina, luteolina e tricina (Paton, 1992; Colombo *et al.* 2005).

Flavonóides podem ser comumente encontrados em plantas utilizadas na dieta humana (Arabbi *et al.* 2004). Flavanonas ocorrem predominantemente em

frutos cítricos, flavonas em hortaliças, isoflavonas em leguminosas, antocianinas e flavanóis em frutos e hortaliças. A preparação e o processamento de frutos e hortaliças frescas podem diminuir o conteúdo flavonoídico em 50% em virtude de perda na água de cozimento ou remoção de porções da planta ricas nas substâncias. Grãos e sementes oleaginosas contêm flavonóides, mas o processamento os remove ou reduz a sua quantidade. Outros grupos de alimentos vegetais contêm diferentes montantes de constituintes flavonoídicos. Mel, chocolate e doces que contêm constituintes vegetais têm flavonóides. Alimentos de origem animal não apresentam esses compostos (Peterson & Dwyer, 1998). Aproximadamente 90% dos flavonóides nas plantas ocorrem na forma glicosilada e é sugerido que eles são absorvidos na forma de agliconas no intestino humano (Hollman, 2001).

Diversas atividades biológicas são atribuídas aos flavonóides, entre elas antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral, antiviral, inibidora enzimática e estrogênica. Os flavonóides têm-se revelado eficientes redutores de várias espécies oxidantes, como o ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), radicais hidroxila e peroxila (Satue-Garcia *et al.*, 1997; Harborne & Williams, 2000)

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, pode ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (Molyneux, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Assim como o ácido ascórbico, a vitamina E e o β-caroteno, também os fenilpropanóides e flavonóides são potentes antioxidantes (Rice Evans, 1996). Eles

podem também agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (Satue-Garcia *et al.* 1997; Hopia & Heinonen, 1999). Flavonóides antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, verduras, chás e vinhos (Bors, 1990; Duthie & Crozier, 2000; Harborne & Williams, 2000; Arabbi *et al.* 2004). A combinação de antioxidantes fenólicos no vinho, entre eles derivados de epicatequina e quercetina, pode proteger contra a aterosclerose através do seu consumo regular por um longo período (Frankel *et al.*, 1993; Flesch *et al.* 1998; Briviba *et al.* 2002).

Nas últimas décadas, vários estudos relacionam fatores dietéticos à prevenção de doenças, entre elas as cardiovasculares e o câncer. Mas a crença na capacidade dos alimentos em curar ou prevenir doenças é antiga (Manach *et al.*, 2004). Em virtude do crescimento de pesquisas em produtos naturais com potencial antioxidante, torna-se necessário conhecer os compostos presentes em alimentos tão amplamente consumidos, assim como seu virtual valor biológico.

I.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, M.H.; EL-MAHDY, M.A.; ABD-ELLAH, M.F.; HELAL, G.K.; KHALIFA, HAMADA, F.M.A. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's Herat. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 461-465. 2003.

ADISAKWATTANA, S.; SOOKKONGWAREE, K.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; NGAMROJNAVANICH, N.; CHAVASIRI, W.; DEESAMER; S.; YIBCHOK-ANUN S.; Structure–activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on α-glucosidase inhibition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14 p. 2893–2896. 2004.

ARABBI, P.R. GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 52, p. 1124-1131. 2004.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico para Rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embaladas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 26 dez. 2003. p. 28 – 32

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Comercialização. **Estatísticas: agronegócio brasileiro**. <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 10 de fevereiro de 2004.

BRIVIBA, K.; PAN, L.; RECHKEMMER, G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. **Journal of Nutrition**. v. 132, p. 2814-2818. 2002.

CARVALHO, C.M.R.G; NOGUEIRA, A.M.T.; TELES, J.B.M.; PAZ, S.M.R.; SOUZA, R.M.L. Consumo alimentar de adolescentes matriculados em um colégio particular de Terezina, Piauí, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 85-93. 2001.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 80, p. 1033-1043. 2000.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; HDJOKO, K.; HOSTETTMANN. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV- detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**, v. 1082, p. 51-59. 2005.

COOPERSUCAR disponível em <http://www.copersucar.com.br/ institucional/por/ academia/cana_acucar.asp> acessado em 22 de agosto de 2005.

COSAN. **Produção de açúcar e álcool**. São Paulo: Cosan, 2002. 9p.

CRUZ, G.F.; SANTOS, R.S.; CARVALHO, C.M.R.G.; MOITA, G.C. Avaliação dietética em creches municipais de Terezina, Piauí, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 21-32. 2001.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. New York: Elsevier, 1987. 84p.

DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. **Current opinion in lipidology**. v. 11, p. 43-47. 2000.

FLESCH, M.; SCHWARZ, A.; BOHM, M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory physiologogy**, v. 275, p. H1183-H1190. 1998

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2006**. São Paulo, 2006. p.227-228: Cana-de-açúcar.

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

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

HAHLBROCK, K. Flavonoids. *In*: CONN, E.E. (Ed.). **The biochemistry of plants. Secondary plant products.** New York, Academic Press, 1981. 798p. v.7.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504. 2000.

HOLLMANN, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 81, p. 842-852. 2001.

HOPIA, A; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glicosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 139-144. 1999.

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

LIMA, J.P.R.; CAVALCANTI, C.M.L. Do engenho para o mundo. A produção de rapadura no nordeste: características, perspectivas e indicação de políticas. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 32, n. 4, p. 950-974. 2001

LODOVICI, M.; RAIMONDI, L.; GUGLIELMI, F.; GEMIGNANI, S.; DOLARA, P. Protection against ultraviolet □-induced oxidative DNA da,mage in rabbit corneal-derived cells (SIRC) by 4-coumaric acid. **Toxicology**, v. 184, p. 141-147. 2003.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79. p. 727-747. 2004.

MARKHAM, K.R. 1982. **Techniques of flavonoids identification**. London, Academic press. 113p.

MARTINS, N.G.S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; Universidade de São Paulo, 2004. 87p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

MISHIMA, S.;ONO Y.;ARAKI Y.;AKAO Y.; NOZAWA, Y.; Two related cinnamic acid derivatives from brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma s-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1025-1030. 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Sciences Technology**. v. 26, p. 211-219. 2004.

PALLA, G. Characterization of the main secondary components of the liquid sugars from cane molasses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 545-548. 1983.

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part I. **International Sugar Journal**. v. 94, p. 99-108. 1992.

PATON, N.H.; DUONG, M.; Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part III. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 170-176. 1992.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research,** v. 18, p. 1995-2018. 1998.

PINTO, G. L. **Fabricação de rapadura e açúcar batido**. Viçosa, UFV. 1990. 9p.

RICE-EVANS, C. Structure-Antioxidant activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, **Free radical Biology Medicine**, v. 20, p. 933-956. 1996.

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 45, p. 3362-3367. 1997.

SEBRAE-MG. **Estudo Técnico das Alternativas de Aproveitamento da Cana-de-açúcar**. disponível em <http://www.sebraemg.com.br>. acessado em 20 de julho de 2005.

SHI, Y.; CHEN, Q.X.; WANG, Q.; SONG, K.K.; QIU, L.; Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (Agaricus bisporus) tyrosinase. **Food Chemistry**, v. 92, p. 707-712, 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP.** Versão 4.1. 1998. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: agosto de 2005.

USINA ALBERTINA. Disponível em <http://www.albertina.com.br/processo.htm> acessado em 23 de agosto de 2005.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism.** London, The MacMillan Press, 1981. 335p.

VIEIRA, O.; LARANJINHA, J.; MADEIRA, V.; ALMEIDA, L. Cholesteryl éster hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 333-340. 1998.

ZANG, L.Y.; COSMA, G.; GARDNER, H.; SHI, X.L.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 279, p. 954-960. 2000.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

II.1 INTRODUÇÃO

O caldo de cana fresco e gelado é uma bebida muito apreciada pela população devido ao seu sabor, odor, aspecto agradável e, principalmente, pelo baixo preço. É utilizado como base para a produção de vários outros alimentos, xarope, rapadura e açúcar, por exemplo.

Estudos prévios mostraram que sua composição, além de sais minerais e da alta concentração de sacarose, apresenta compostos fenólicos entre as substâncias que lhe conferem cor, podendo atuar como um alimento funcional. Entre os compostos fenólicos, destacam-se os derivados de flavonas, apigenina, luteolina e tricina, além de ácidos cinâmicos, principalmente o ácido clorogênico (Paton 1978; Curtin & Paton, 1980; Mabry *et al.*, 1984; Paton & Duong, 1992; McGhie, 1993; Takara *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2005; 2006).

Devido à dificuldade em se isolar analitos que se encontram em matriz com alta concentração de sacarose, raros são os trabalhos que apresentam compostos fenólicos identificados nos produtos da cana-de-açúcar. Este trabalho tem como objetivo identificar as estruturas dos principais compostos fenólicos no caldo de cana-de-açúcar, através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

II.2 MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1 Material

II.2.1.1 Amostra

O caldo de cana analisado neste estudo foi obtido no comércio local (zona oeste, São Paulo, SP) em agosto de 2004. A moenda foi previamente lavada com água e foram recolhidos 3.000 mL obtidos por expressão de cana-de-açúcar, variedade SP813250. As amostras foram imediatamente transportadas até o

laboratório sob refrigeração, onde foram prontamente filtradas em *cheesecloth* e armazenadas em freezer (-18°C) para posterior utilização, quando foram diluídas 1:2 (v/v) com água deionizada acidificada ao pH 2,0 com HCl 2M.

II.2.1.2 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ou grau HPLC quando necessário. Metoxiamina, N-metil-n-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), os padrões de glucose, luteolina, apigenina e ácido 5-cafeoilquínico foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Dimetilsulfóxido deuterado foi adquirido de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, EUA).

II.2.2 Métodos

II.2.2.1 Extração e purificação do caldo de cana

Os processos de extração e purificação do caldo de cana estão descritos na Figura II.1.

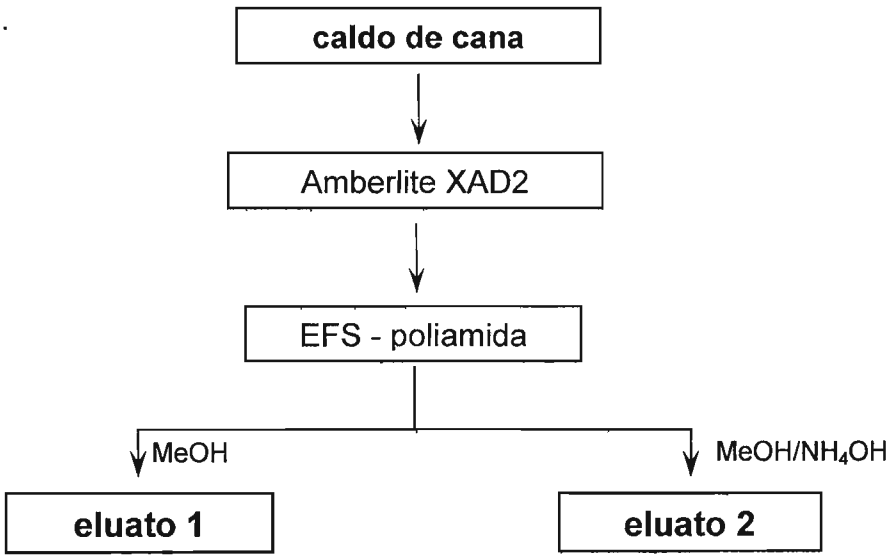


Figura II.1. Diagrama de extração do caldo de cana. EFS: extração em fase sólida.

II.2.2.1.1 Extração em Amberlite XAD2

Os compostos fenólicos presentes em 1000 mL da solução acidificada de caldo de cana foram adsorvidos por meio de 400 g de resina Amberlite® XAD2 (Supelco, Bellefonte, PA, E.U.A.), previamente condicionada com metanol e água deionizada, adicionada à amostra em copo graduado (D'arcy, 2005). A mistura ficou sob agitação por 20 minutos em temperatura ambiente (25°C), sendo filtrada em *cheesecloth*. O efluente foi descartado e a resina reconduzida ao copo graduado, onde foi submetida outras quatro vezes ao processo descrito anteriormente, utilizando água deionizada para remoção da sacarose. Os compostos fenólicos foram recuperados a partir da resina por meio de três extrações com 500 mL de solução metanol:hidróxido de amônio (99,5:0,5), pelo mesmo processo descrito anteriormente. Os eluatos foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida em Rotavapor (RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em banho a 40°C, até remoção do metanol. A resina foi submetida a recuperação por meio de condicionamento com solventes apolares e reutilizada para as demais extrações dos compostos fenólicos. Foram realizadas as extrações dos volumes restantes da solução acidificada do caldo de cana e o extrato aquoso obtido foi submetido a extração em fase sólida.

II.2.2.1.2 Extração em fase sólida

A cada volume remanescente de extrato aquoso obtido no intem anterior, isento de metanol, foi adicionada água deionizada suficiente para completar 100 mL e a mistura foi submetida à extração em fase sólida (EFS). Desse modo, o extrato aquoso foi distribuído igualmente em três colunas contendo cada uma 3,5 g de poliamida, preparadas em seringa própria de 20 mL. As colunas foram pré-

condicionadas com 50 mL de metanol e 100 mL de água deionizada. Após passagem do extrato aquoso, as colunas foram lavadas com 50 mL de água, sendo esse volume descartado. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada com 150 mL de metanol (eluato 1) e posteriormente de 150 mL de metanol:hidróxido de amônio (99,5:0,5 – v/v) (eluato 2). O fluxo dos solventes através da coluna foi monitorado utilizando-se manifold Visiprep 24 DL da Supelco (Bellefonte, E.U.A.). Os eluatos foram reunidos e concentrados por rotaevaporação sob pressão reduzida. Os eluatos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para quantificação, verificação da sua pureza e tempo de retenção.

II.2.2.2 Isolamento e hidrólise dos glicosídeos

Os processos de isolamento e de hidrólise de glicosídeos do eluato 2, obtido no item anterior estão descritos na Figura II.2.

II.2.2.2.1 Cromatografia preparativa em papel

O eluato 2 foi submetido à cromatografia preparativa em seis folhas de papel Whatman 3MM (Whatman, Maldstone, Inglaterra) utilizando como fase móvel ácido acético 15%. A visualização dos cromatogramas foi efetuada sob luz UV de ondas longas. As bandas obtidas foram recortadas e eluídas três vezes com metanol/hidróxido de amônio (99,5:0,5 – v/v), sendo os analitos concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida e ressuspendidos em metanol. Os analitos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para verificação de sua pureza e tempo de retenção.

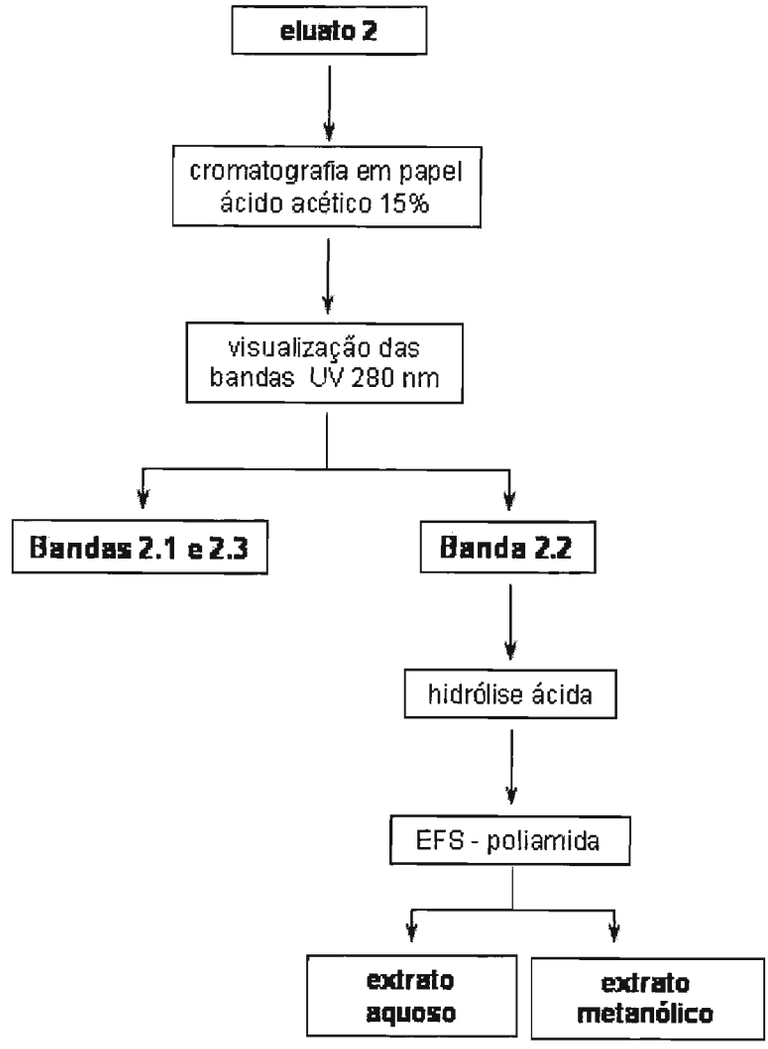


Figura II.2. Diagrama de isolamento e de hidrólise de glicosídeos do eluato 2: EFS: extracão em fase sólida.

II.2.2.2.2 Hidrólise dos glicosídeos

Os analitos obtidos foram submetida à hidrólise, segundo Markham (1982). Cerca de 0,5 mg do analito foi tratado com 1 mL de HCl 2N durante 1 hora a 80ºC em sistema fechado. Após hidrólise, a aglicona e o carboidrato foram separados em coluna contendo 1,0 g de poliamida pré-condicionada com metanol e água deionizada, segundo item 2.2.1. A água de lavagem, 50 mL, aqui denominada como eluato aquoso, foi recolhida para análise do carboidrato e à aglicona foi eluída com

50 mL metanol:hidróxido de amônio (Figura II.2). Os eluatos obtidos, referentes ao carboidrato e a aglicona, foram concentrados por rotaevaporação sob pressão reduzida e posteriormente submetidos a secagem completa para análise por cromatografia a gás com detecção por espectrômetro de massas e CLAE-DAD, respectivamente.

II.2.3 Identificação

II.2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação dos flavonóides nas amostras foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi um Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD), monitorado pelo software ChemStation.

A separação dos compostos foi realizada em coluna Prodigy 5 μm ODS 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltda, Reino Unido). As fases móveis utilizadas foram, A: água/tetrahidrofurano/ácido trifluoroacético (98:2:0,1) e B: acetonitrila, na proporção de 17% de B durante dois min, aumentando para 25% de B após cinco min, 35% de B após mais oito min e 50% de B após mais cinco min, e para a limpeza da coluna a fase B foi aumentada para 90 % (Arabbi *et al.* 2004). As amostras foram injetadas em triplicata, variando-se entre 5 e 20 μL, de acordo com a concentração da amostra. Foram também co-injetados padrões para a quantificação. A determinação e quantificação foram realizadas comparando-se os tempos de retenção e os espectros obtidos com os dos padrões que foram previamente usados na calibração. Considerou-se uma determinação positiva quando a semelhança entre os espectros foi igual ou superior a 90 %. A calibração foi realizada através da injeção dos

padrões em triplicata em cinco concentrações diferentes, de 0,5 a 10 μg. Os resultados foram expressos em mg de aglicona/100 g de amostra, em base úmida (b.u.).

II.2.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os analitos foram submetidos à cromatografia em camada delgada em celulose (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando como fase móvel ácido acético 15%, BAW (álcool butílico:ácido acético:água - 4:1:5) e CAW (clorofórmio: ácido acético:água – 30:15:2). Foram determinados os valores de Rf dos analitos e observadas as colorações das manchas antes e após exposição a vapores de amônia (Mabry *et al.*1970).

II.2.3.3 Espectrofotometria de UV/visível

Alíquotas dos analitos foram analisadas através de espectrofotometria UV/visível (HP 8453 - Hewlett Packard, Palo Alto, E.U.A.) em solução metanólica e solução metanólica com o acréscimo de reagentes complexantes ($AlCl_3$, $AlCl_3$ + HCl, NaOAc + H_3BO_3) e ionizantes (KOH e NaOAc), através dos quais foram obtidas indicações sobre o padrão de hidroxilação e substituição do núcleo flavonóide. A preparação dos reagentes utilizados foi executada segundo Markham (1982).

II.2.3.4 Espectrometria de massas

Espectrometria de massas tandem (MSMS)

Os espectros de massas foram obtidos por ionização por *electrospray* (ESI) em temperatura ambiente em espectrômetro triploquadrupolo API 4000 (Applied Biosystems/MSD Sciex, Toronto, Canadá). Foram utilizados ar ultrapuro (20 psi) e

nitrogênio (12 psi) como gás nebulizante e de solvatação, respectivamente. A voltagem do capilar ESI foi de 5,5kV e –4,5kV no modo positivo e negativo, respectivamente. Nos experimentos com dissociação induzida por colisão (CID), a célula de colisão (Q2) foi preenchida com nitrogênio (6,0 u.a.) e a energia de colisão variou de 5 a 130 eV. As amostras, previamente diluídas em 50% com CH_3OH/H_2O (v/v) com 5,0 mmol/L de CH_3COONH_4, foram injetadas no aparelho usando um sistema de injeção automático Harvard A.S.I.P. 22 (Harvard, South Natick, MA, E.U.A.) com fluxo contínuo de 10 μL/min.

Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Bruker Daltonics Micro-TOF (Billerica, MA). Fluxo do gás de secagem 4,0 L/min, temperatura 200 °C, pressão do gás nebulizante 0,40 bar, voltagem do capilar 4500 V, fluxo 180 μL/h (fluxo infusão direta).

II.2.3.5 Cromatografia a gás com detecção por espectrômetro de massas através do impacto de elétrons (CG-IE-EM).

Para a identificação do monossacarídeo utilizou-se a metodologia adaptada de Frenzel e colaboradores (2002). A uma alíquota extrato aquoso obtido no item 2.2.3.2 isento de água, adicionou-se 100 μL de uma solução de metoxiamina 20 μg/mL em piridina mantendo-se em incubação por 180 minutos a 25 °C. Posteriormente, adicionaram-se 100 μL de MSTFA, e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Para análise, foi injetado 1 μL das amostras derivatizadas automaticamente em modo split (35:1), com injetor automático HP ALS-1100 (Hewlett Packard, Palo

Alto, E.U.A.). O mesmo procedimento acima foi realizado com a amostra padrão correspondente.

A separação e análise dos componentes foram realizadas por cromatografia em fase gasosa, em equipamento HP 5890 ser. II Plus, acoplado a espectrômetro de massas HP 5973 MSD monitorado pelo software ChemStation, utilizando o processo de impacto de elétrons a 70 eV. Como gás de arraste foi utilizado hélio, com fluxo constante de 1 cm^3/min, razão de divisão 1:20. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida SPB-50 (Supelco Park, Bellefonte, PA, EUA - 30 m x 0,25 mm x 0,25μm). As temperaturas utilizadas foram de 250 °C para o injetor e de 230 °C para a interface entre o cromatógrafo e o detector. A temperatura inicial da coluna foi de 70°C durante 5 min, elevando-se 5°C/min até 310°C.

II.2.3.6 Espectroscopia de luz infravermelha com transformada de Fourier (IV-TF).

Os espectros de IV-TF foram obtidos a partir de amostras trituradas em brometo de potássio (KBr) analisadas pelo modo de transmissão, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1} em espectrômetro Bomem Michelson MB100 (Bomem, Quebec, Canadá).

II.2.3.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d6*) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DPX 300 (Bruker, Karlsruhe, Alemanha), operando em 300,13 MHz para ^1H e 75,48 MHz para ^{13}C, com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os desvios químicos foram descritos em partes por milhão (δ) em relação ao TMS.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O caldo de cana é possuidor de altas concentrações de sacarose e umidade. A resina Amberlite XAD2 favoreceu a remoção da sacarose, obtendo-se eluatos em maior concentração. Alguns autores que oportunamente tenham analisados compostos fenólicos em produtos obtidos a partir do caldo de cana, o fizeram através de extração com solventes imiscíveis com água (Nakasone *et al.*, 1996; Takara *et al.*, 2002; Payet *et al.* 2005). Esse tipo de metodologia favorece a extração de compostos sem o incoveniente da interferência da sacarose e da umidade, mas ao mesmo tempo impede a extração completa de compostos hidrossolúveis e/ou glicosilados.

Pelo menos nove derivados de flavonas foram detectados no caldo de cana, conforme comparação dos espectros de UV/visível obtidos da amostra com os da biblioteca do CLAE-DAD (Figura II.3). A maioria das substâncias é derivada de apigenina e luteolina, a distinção entre os derivados da mesma aglicona devendo-se provavelmente à posição de conjugação no núcleo flavônico e natureza dos açúcares. Os ácidos fenólicos encontrados são derivados de ácidos cinâmicos.

II.3.1 Eluato 1

O eluato 1 apresentou a maioria dos compostos fenólicos acima mencionados. Entretanto, não foi possível isolar analitos em quantidades suficientes para identificação completa. Pelo fato desse eluato possuir vários derivados de uma mesma flavona e esses diferirem pelo padrão de substituição no anel benzênico, ou por tipo de carboidratos, ou por conjugação com outras moléculas, a afinidade entre esses compostos torna a separação muito complexa. Foram utilizadas diversas técnicas de separação, cromatografia de partição, em papel, em camada delgada e

líquida de alta eficiência preparativa. As mais promissoras foram cromatografia em camada delgada e papel, pelo número de solventes possíveis de ser utilizados. Entretanto, o rendimento foi insuficiente para uma elucidação completa dos analitos isolados. As metodologias usuais para ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier e espectrometria de luz UV/visível com adição de reagentes ionizantes e complexantes necessitam de maiores concentrações de analitos. Por este motivo, os compostos fenólicos presentes no eluato 1 foram analisados por meio de cromatografia líquida com detecção por arrajo de diodos (CLAE-DAD) e por infusão direta em espectrômetro de massas tandem. Essas técnicas requerem menores quantidades de amostras e produzem resultados satisfatórios que serão descritos a seguir.

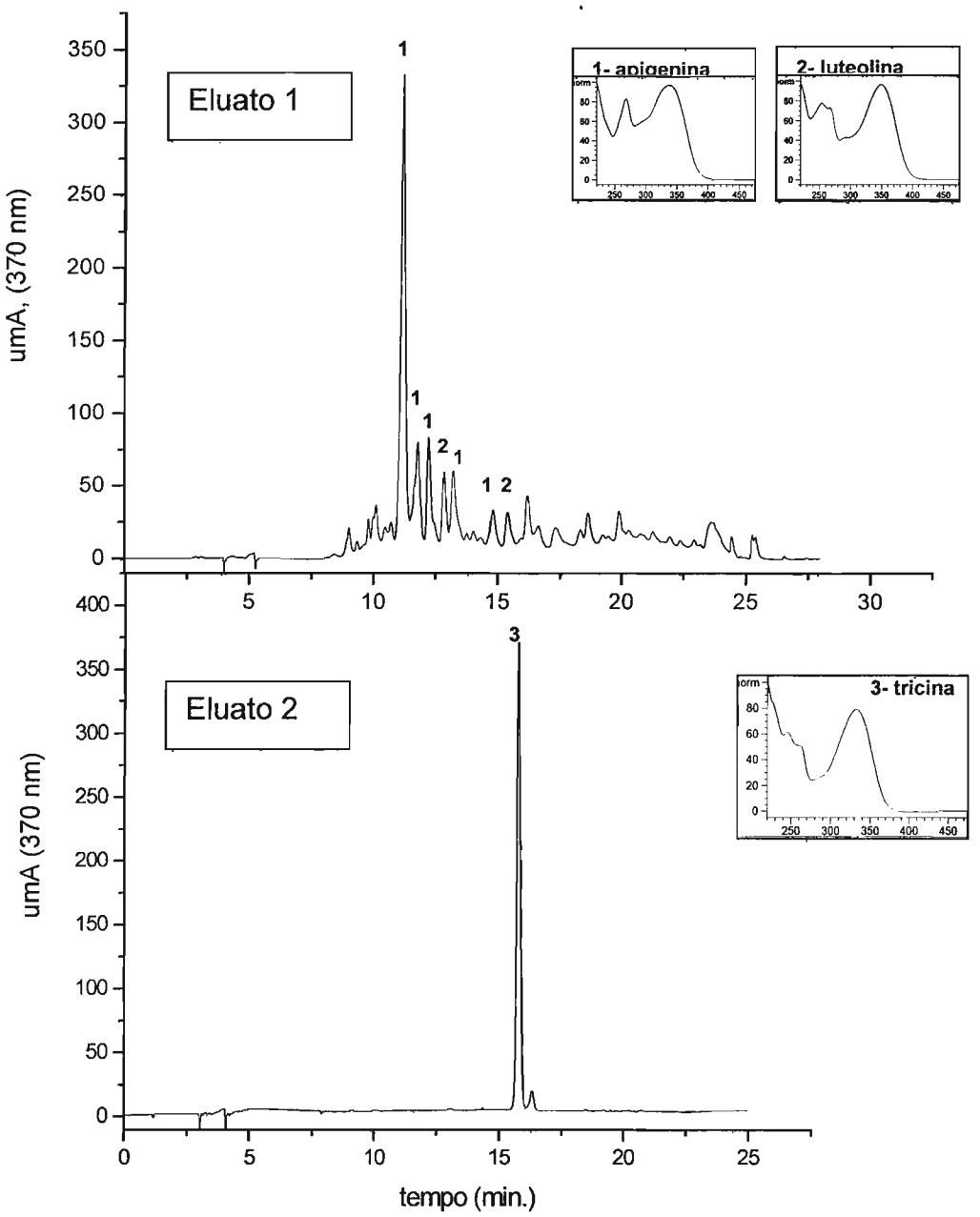


Figura II.3. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos da extração em fase sólida do caldo de cana. Eluato 1: eluato obtido com metanol; Eluato 2: eluato obtido com metanol/hidróxido de amônio. 1: derivados de apigenina; 2: derivados de luteolina; 3: derivados de tricina.

II.3.1.1 Identificação de luteolina 8-*C*-glucosídeo (orientina).

Foi detectado no eluato 1 um flavonóide com íon precursor m/z 448 obtido pelo modo MS. Os experimentos com dissociação induzida por colisão (CID), utilizando os produtos da varredura de íons, indicam que a substância corresponde à orientina, levando-se em conta sua fragmentação que é igual aos dados obtidos por Sanchez-Rabaneda e colaboradores (2003) e Pereira e colaboradores (2005).

De Campos e colaboradores (2005), analisando os compostos fenólicos de *Piper solmsianum*, observaram que a orientina possui atividade antimicótica contra fungos dermatófitos. Desse modo, abre-se caminho para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas para auxiliar no tratamento de persistentes infecções superficiais ocasionadas por fungos. Além disso, a orientina em baixas dosagens tem mostrado eficiente proteção contra danos à medula óssea, ocasionados por altas doses de radiações, sugerindo uma potencial proteção aos tecidos durante radioterapia (Nayak & Devi, 2005).

A orientina é uma flavona *C*-glucosilada na posição 8. Esse composto tem um isômero, isoorientina que possui a substituição *C*-glicosídica na posição 6. Em algumas plantas de grande importância comercial, como o maracujá, é comum encontrar as duas formas. A quantificação e identificação por HPLC-MS destes compostos são recursos úteis para o controle de qualidade desses frutos (Pereira *et al.* 2004). Através dos fragmentos é possível diferenciar esses isômeros, especialmente pelo fragmento m/z 299 (Figura II.4) que tem maior abundância em isoorientina do que em orientina (Sanchez-Rabaneda *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2005). Diferentemente de flavonóides *O*-glicosilados que possuem formação de íons gerados a partir de reações de retro Diels-Alder (RDA), os *C*-glicosilados possuem

via de fragmentação característica (Figura II.4), a partir de clivagens no resíduo de glucose e perdas de moléculas de água (Domon; Costello, 1988; Ma *et al.*, 1997; Cuyckens & Claeys, 2004). O íon m/z 448 (Figura II.5) apresenta perdas de parte do açúcar características para orientina, condizente com a literatura (Sanchez-Rabaneda *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2005). Com essas evidências sugerimos que na fração metanólica (eluato 1) do extrato do caldo de cana existe, entre outros derivados de flavonas, luteolina-8-*C*-glucosídeo com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$.

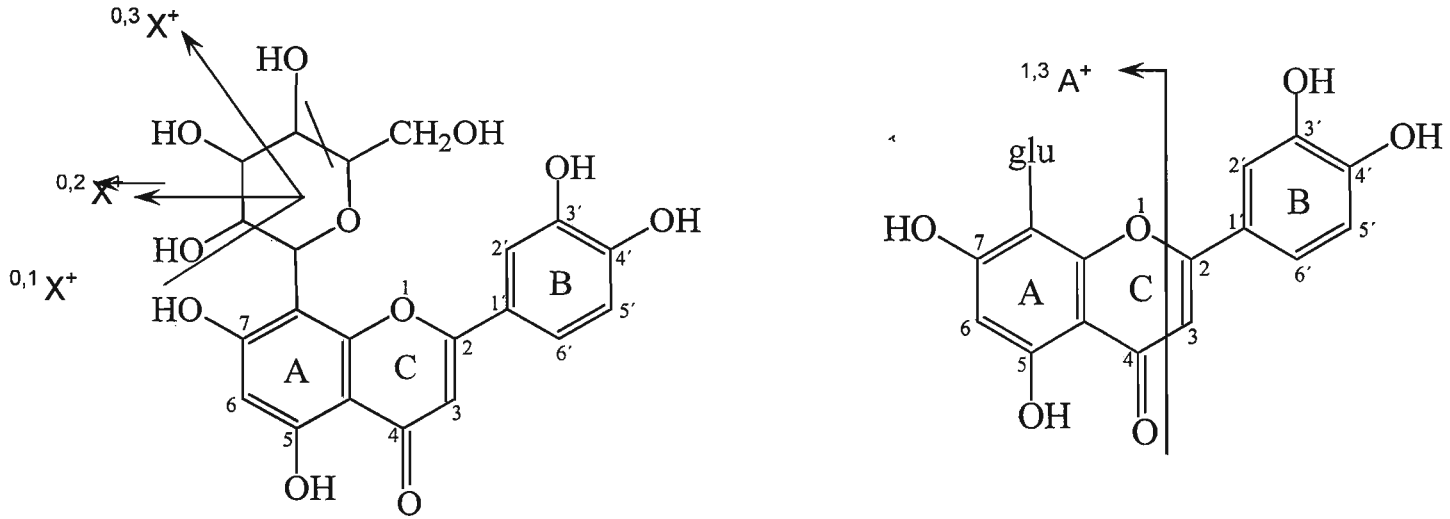


Figura II.4. Estrutura e via de fragmentação de orientina 8-*C*-glucosídeo de acordo com a nomenclatura adotada por Domon e Costello (1988) e Ma *et al.* (1997). Os subscritos indicam onde ocorre a clivagem da ligação.

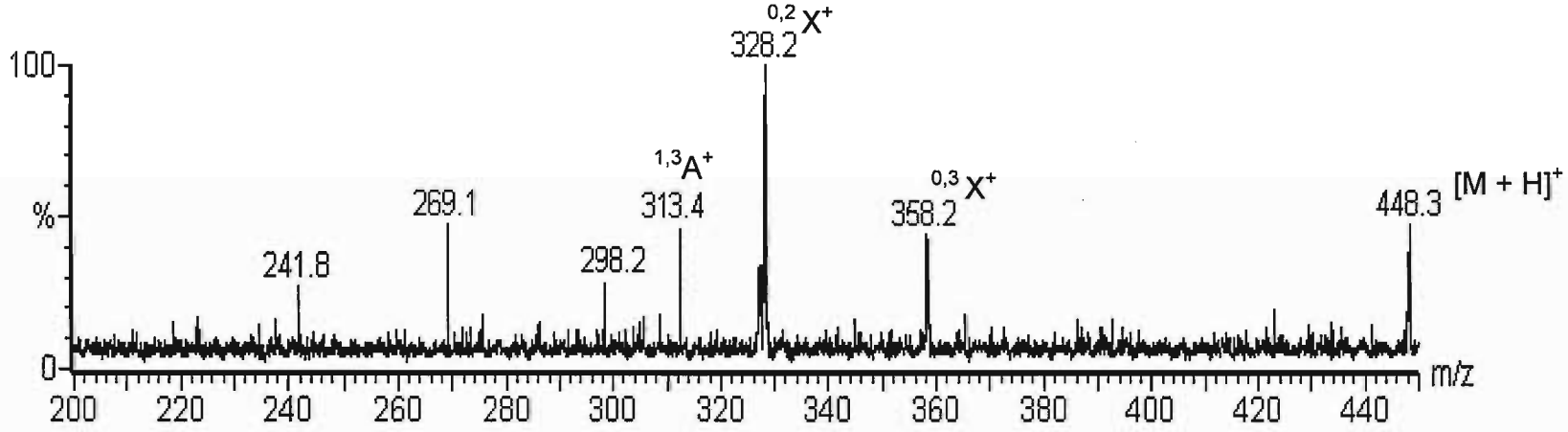


Figura II.5. Espectro de massas (tandem) de orientina 8-*C*-glucosídeo obtido por experimentos com dissociação induzida por colisão (CID).

II.3.1.2 Identificação de 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo.

Foi detectado no eluato 1 uma lignana glicosilada com íon precursor m/z 585 obtido pelo modo MS (Figura II.6 A). Os experimentos com dissociação induzida por colisão (CID), utilizando os produtos da varredura de íons (Figura II.6 B), indicam que a substância possui fórmula molecular $C_{27}H_{37}O_{14}$, levando-se em conta sua fragmentação semelhante aos dados obtidos por Nakasone e colaboradores (1996) e Takara e colaboradores (2002).

O termo lignana está relacionado à compostos cujo esqueleto resulta de ligações entre duas unidades derivadas de 1-fenilpropano (Bruneton, 1995). A lignana isolada é derivada da ligação entre os álcoois sinapílico e 5-hidróxido-coniferílico com substituição na posição 7 por glucose (Figura II.6 C).

Em kokuto, um produto similar à rapadura muito comum no japão, produzido a partir do suco de cana-de-açúcar, foram isolados fenilpropanóides e lignanas com propriedades antioxidantes (Nakasone *et al.*, 1996; Takara *et al.*, 2002). Lignanas, detectadas e identificadas em líquidos corpóreos humanos, são de origem vegetal e possuem peso molecular e estruturas similares aos esteróides, implicando que elas poderiam ser importantes moduladores dietéticos no sistema hormonal humano (Bannwart *et al.*, 1984; Setchel *et al.,* 1984; Adlercreutz, 1988; Adlercreutz *et al.*, 1990). Muitas lignanas possuem propriedades citotóxicas e antimitóticas, entretanto algumas são utilizadas com finalidades terapêuticas, por suas funções protetoras dos distúrbios coronarianos (Vanharanta *et al.,* 1999; 2002). A podofilotoxina, extraída de *Podophyllum*

peltatum L., inibe o crescimento de tumores com mecanismo em ação em nível dos microtúbulos durante a divisão celular (Bruneton, 1995)

A lignana detectada no eluato 1 é similar a encontrado em Kokuto, a distinção entre elas devendo-se ao padrão de oxidação do grupo fenil. O composto identificado em kokuto possue um grupo hidroxi a menos do que o composto encontrado no caldo de cana. Takara e colaboradores (2002) indagam a procedência das lignanas isoladas de kokuto, cuja produção requer aquecimento e variação do valor de pH. Em nosso trabalho, podemos afirmar que essa nova lignana, semelhante a encontrada no produto processado, não é um artefato decorrente de processamento, pelo fato do caldo de cana ser obtido apenas por expressão da cana-de-açúcar.

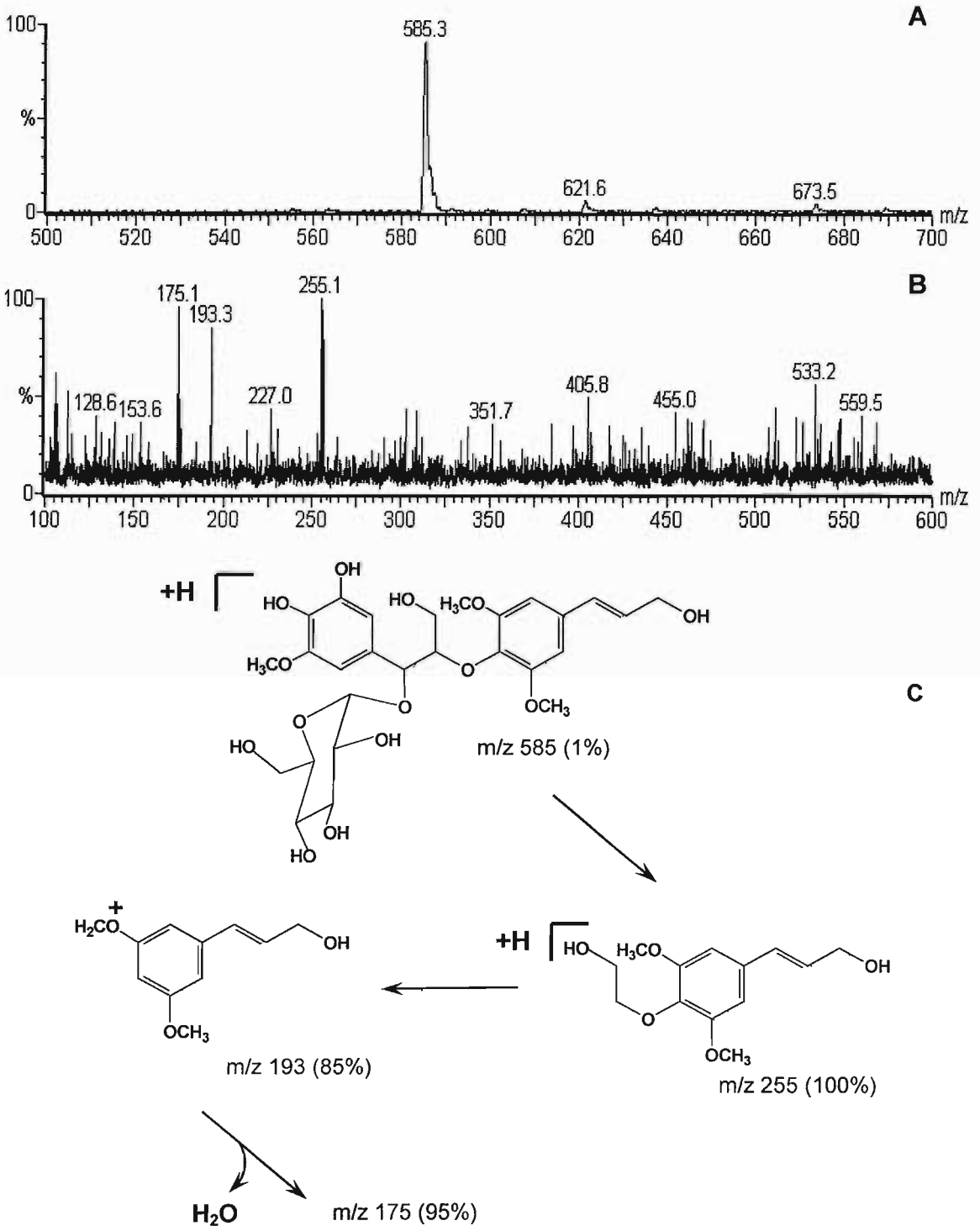


Figura II.6: **A**: Espectro de massas no modo positivo de 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo. **B:** Espectro de massas no modo positivo obtido por dissociação induzida por colisão (CID) em espectrômetro de massas com triploquadrupolo. **C**: Fragmentação sugerida para a substância, baseada no espectro de massas obtido por CID.

II.3.2 Eluato 2

O eluato 2, previamente isolado por extração em fase sólida (EFS) após cromatografia preparativa, apresentou três bandas. Duas bandas (2.1 e 2.3) de menor intensidade de cor azul, e uma banda intermediária (2.2) de cor púrpura com maior intensidade, com a qual foi possível obter quantidades suficientes para as etapas necessárias à identificação completa de sua estrutura.

II.3.2.1 Identificação do analito 2.2 (tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo).

Com a confirmação do grau de pureza por CLAE (Figura II.3), foram obtidas informações iniciais a estrutura da molécula através de dados cromatográficos. O analito apresentou Rf 0,27 em ácido acético 15% (AcOH), 0,06 em BAW e 0,75 em CAW. Flavonas glicosiladas, como a isolada no presente trabalho, quando cromatografadas em ácido acético apresentam valores de Rf crescentes com o aumento do número de açúcares (Markham, 1982). Williams e colaboradores (1973), trabalhando com tricina mono e di-glucosiladas observaram maior Rf em diglicosídeos por cromatografia em AcOH. O valor de Rf do analito em ácido acético é condizente com um monoglicosídeo (Williams *et al.* 1973). Entretanto, quando utilizado o sistema BAW, o valor do Rf do analito ficou muito abaixo dos valores relatados por Williams e colaboradores (1973). A acilação no glucosídeo provavelmente é responsável pelas diferenças observadas. Os altos valores de Rf do analito quando cromatografado em CAW são coerentes com padrões acilados e agliconas metoxiladas (Markham, 1982).

A mancha obtida no cromatograma apresentou tonalidade púrpura sob luz UV e, quando exposta a vapores de amônia, alterou-se para o amarelo. Essas características são próprias para flavonas com padrão 5, 4'- di-OH (Markham, 1982).

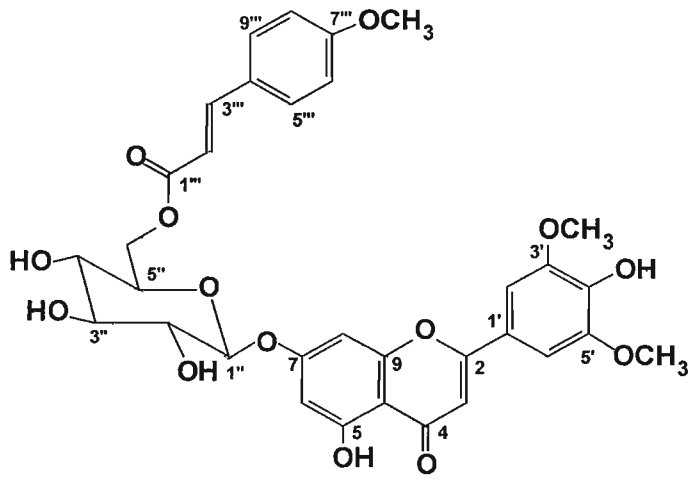


Figura II.7. Estrutura molecular sugerida para o analito 2.2 (tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo).

II.3.2.1.1 Espectrofotometria de UV/visível

O analito 2.2 foi ressuspendido em metanol e submetido à análise espectrofotométrica de UV/visível. Duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm foram obtidas (Figura II.8) Essas bandas são geralmente referidas a banda I (345 nm) e banda II (272 nm). A banda I está mais associada ao anel B (derivados biossinteticamente de chiquimato), e a banda II com o anel A (derivados biossinteticamente de acetato). A banda I fornece informações sobre o tipo de flavonóide, assim como o seu padrão de oxidação. O valor da banda I (345 nm) corresponde a uma flavona e como a mancha em cromatograma em papel é púrpura à luz UV, conclui-se que há um grupo 5-OH.

A adição de reagentes ionizantes e complexantes nas amostras analisadas auxiliou na elucidação da estrutura e localização da substituição. Hidróxido de potássio é uma base forte e ioniza os grupos hidroxílicos no núcleo do flavonóide (Mabry *et al.*, 1970), sendo utilizado portanto, para a detecção de grupos 4'-OH e 7-OH livres. A adição de KOH à solução metanólica produziu um desvio batocrômico de 56 nm com aumento de intensidade na banda I, indicando a presença de um grupo 4'-OH livre. Há uma substituição na posição 7 do anel A (Figura II.8). Essa substituição na posição 7 do anel A foi confirmada pela ausência de um desvio entre a banda II da solução metanólica e a banda II da solução metanólica com adição de acetato de sódio (Colombo *et al.*, 2005).

O padrão de oxidação do anel B foi estabelecido com adição de complexantes ($AlCl_3$). Esse reagente forma complexo ácido-lábil com hidroxilas vicinais, e como no anel B há metoxilas em 3' e 5' não há formação de complexo

com $AlCl_3$, o que é consistente com o padrão proposto para a estrutura (Figuras II.7 e II.8).

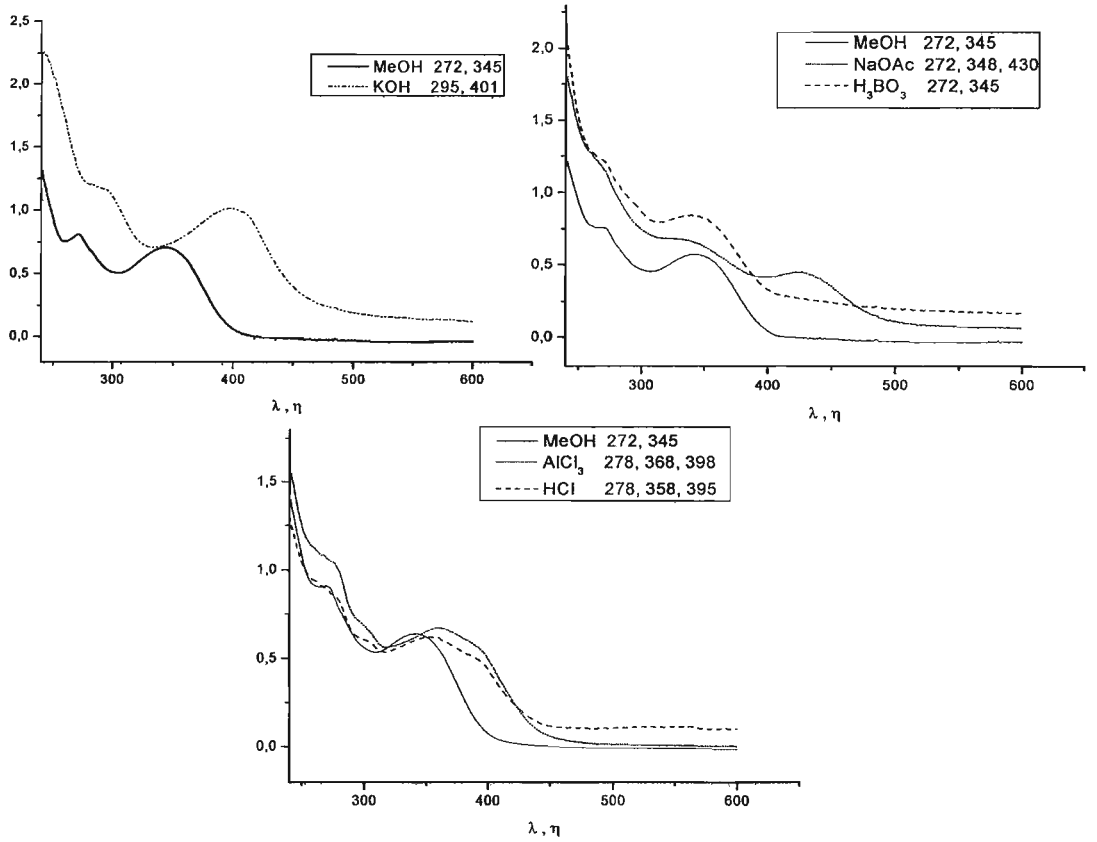


Figura II.8. Espectros de luz UV/visível do analito 2.2. Glicosídeo em metanol (MeOH) e metanol com o acréscimo de reagentes complexantes ($AlCl_3$, $AlCl_3$ + HCl, NaOAc + H_3BO_3) e ionizantes (KOH e NaOAc) e seus respectivos valores de absorbância.

II.3.2.1.2 Espectrometria de massas tandem (ESIMSMS)

O íon precursor m/z 651 ou 653 do analito 2.2 foi obtido através do modo MS, com o primeiro quadrupolo (Q1) gerando íons nos modos negativo ou positivo, respectivamente (Figura II.9).

Os experimentos com dissociação induzida por colisão (CID), utilizando os produtos da varredura de íons, indicam a presença de tricina, ao levar-se em conta os padrões de fragmentação, no modo positivo e negativo que resultam em picos correspondentes à tricina em m/z 329 e 331, respectivamente (Esquemas II.2 e II.3, Figura II.9).

Alguns dos íons obtidos a partir de reações de retro Diels-Alder (RDA) são úteis para determinação estrutural das substituições dos anéis A e B, e é possível distinguir isômeros de flavonas com massa molecular idênticas (WU *et al.* 2004). No caso da fragmentação do analito 2.2 (Esquema II.2 e II.3) obtida por CID, evidencia-se a perda de grupos metilas (CH_3) após a desglicosilação, um fato coerente com a estrutura da tricina, que é portadora de dois grupos metoxila no anel B (Figuras II.7 e II.8). Esse resultado é corroborado tanto pelos dados de UV/visível quanto pelos verificados em CCD.

Com essas evidências sugerimos que o analito isolado a partir do caldo de cana apresenta fórmula molecular $C_{33}H_{14}O_{32}$.

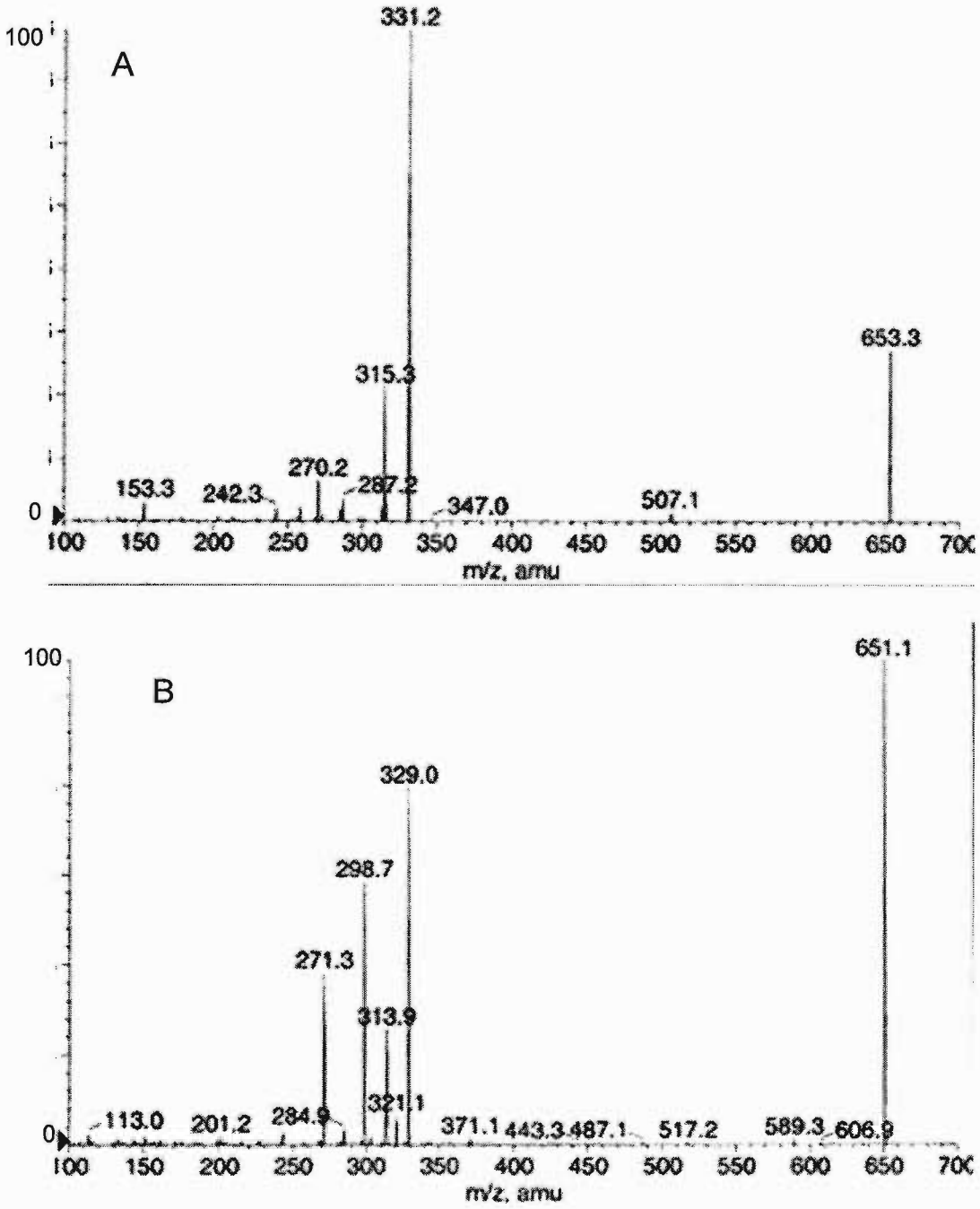
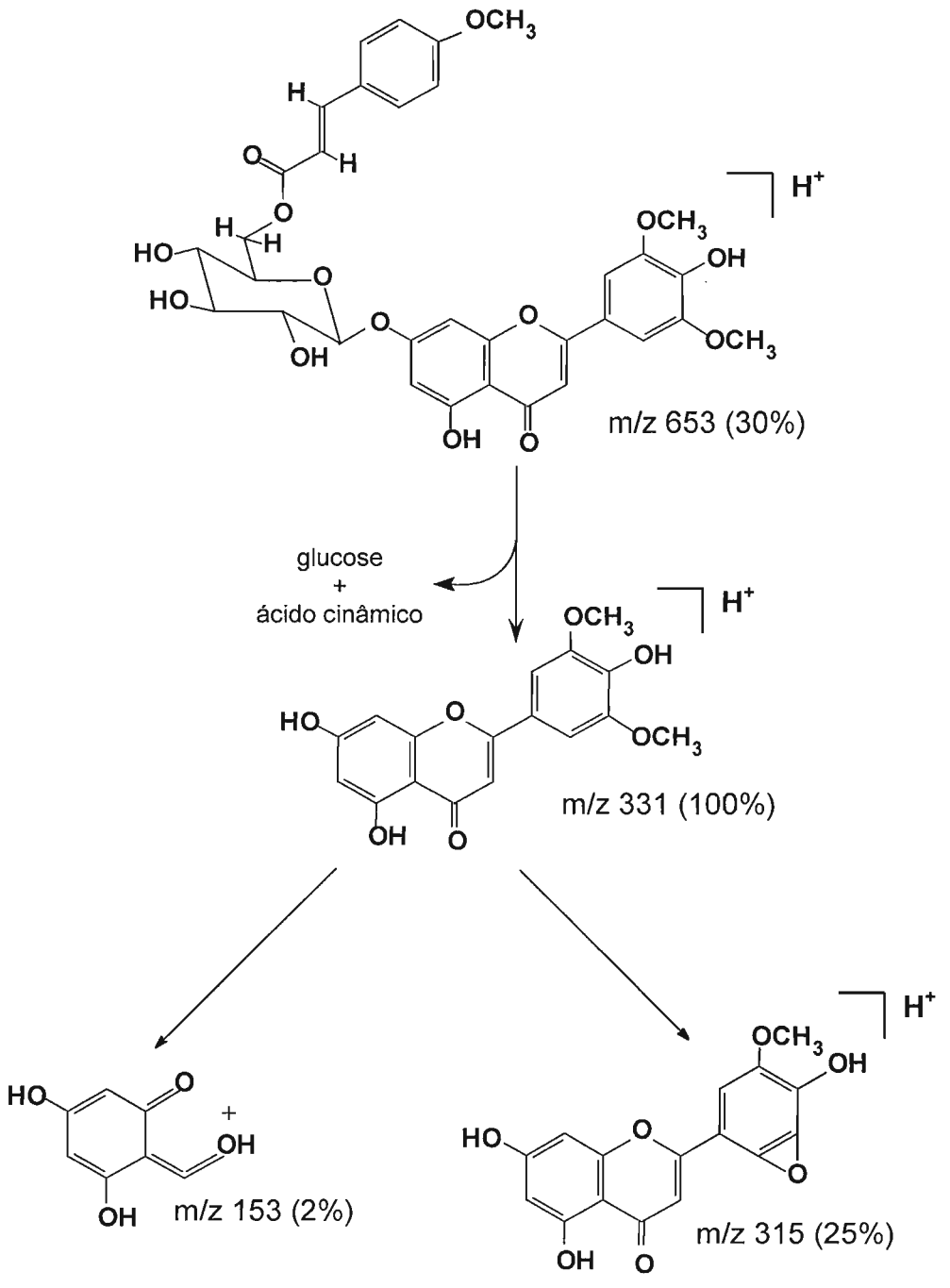
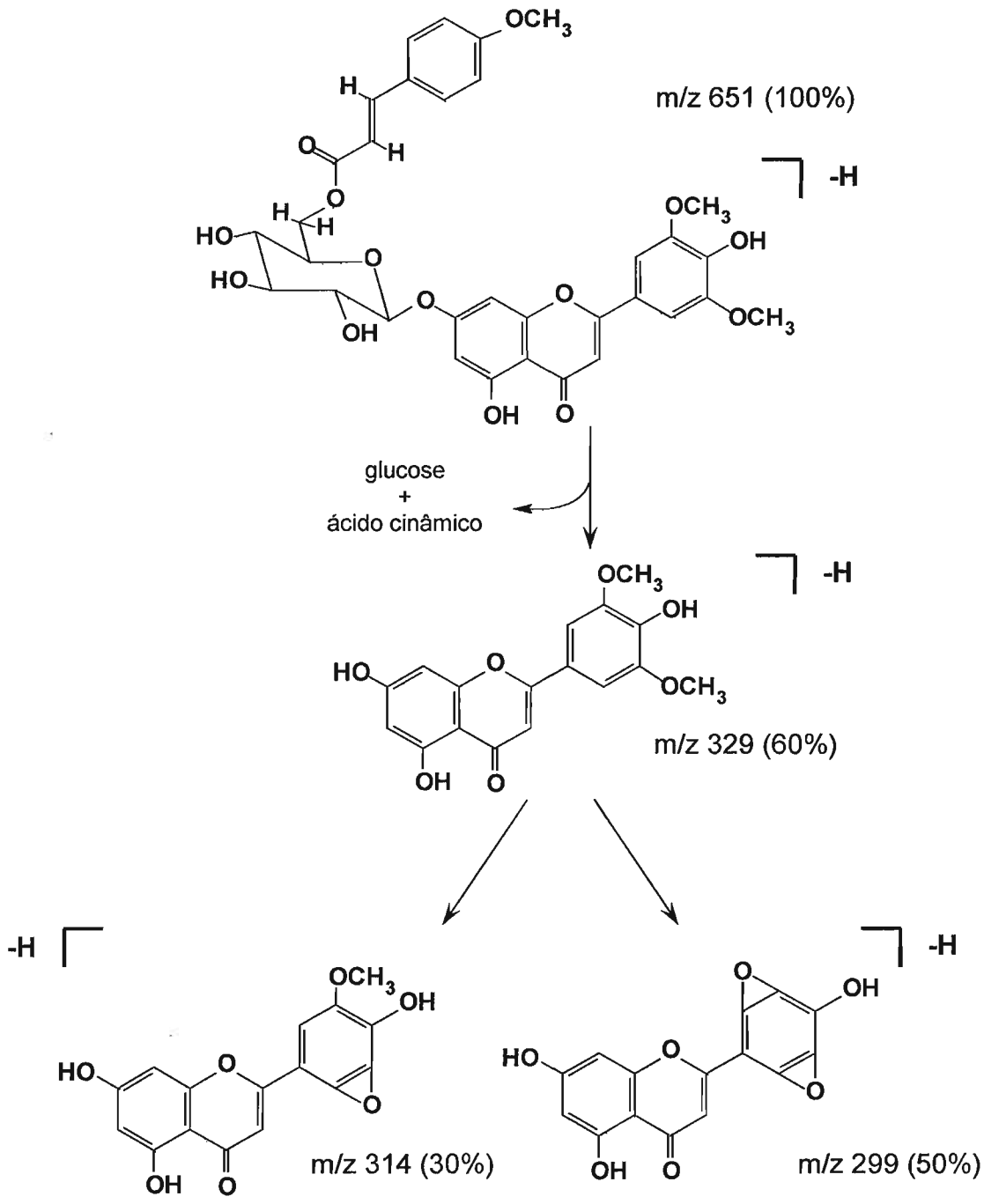


Figura II.9: Espectro de massas do analito 2.2 nos modos positivo (A) e negativo (B) obtidos por dissociação induzida por colisão (CID) em espectrômetro de massas com triploquadrupolo.



Esquema II.1. Fragmentação por dissociação induzida por colisão proposta para o analito 2.2, baseada no espectro de massas (MS/MS) no modo positivo.



Esquema II.2. Fragmentação por dissociação induzida por colisão proposta para tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo, baseada no espectro de massas (MS/MS) no modo negativo.

II.3.2.1.3 Cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG-IE-EM).

A Figura II.10 mostra o cromatograma conjuntamente com os dois espectros de massas obtidos por CG-IE-EM referentes ao carboidrato obtido após a hidrólise do analito 2.2. A fragmentação e o tempo de retenção foram comparados com amostra padrão de glucose e com dados da biblioteca NIST 98. O tempo de retenção de 40,16 minutos e os fragmentos m/z 73, 217, 361 e 437 são característicos de glucose.

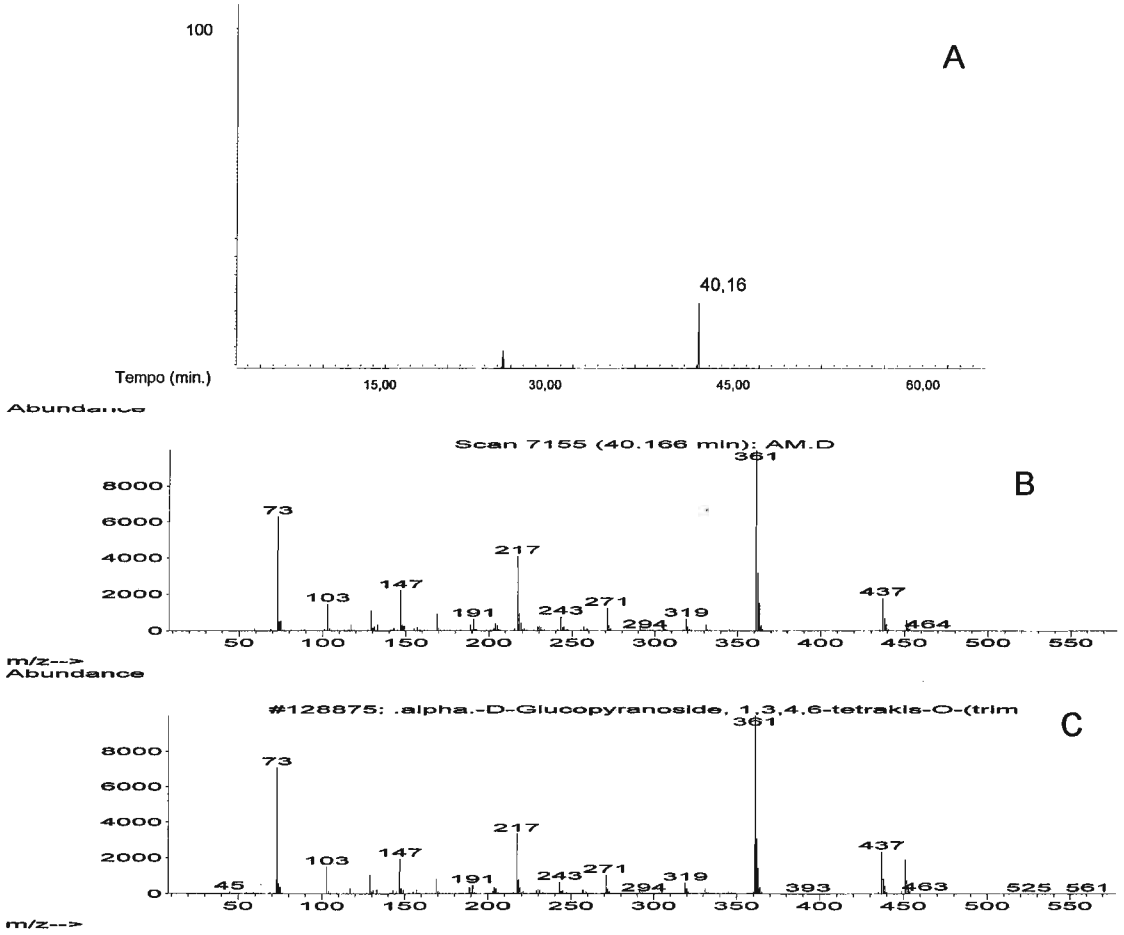


Figura II.10. A: Cromatograma do carboidrato isolado a partir da hidrólise do analito 2.2, B: espectro de massas do carboidrato do glucosídeo e C: espectro de massas de glucose da biblioteca NIST98.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

II.3.2.1.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF).

A Figura II.11 mostra três espectros de IV-TF referentes ao glicosídeo, à aglicona e ao açúcar com o ácido metoxicinâmico acilado do analito 2.2. Há duas bandas correspondentes a carbonila (C=O) no espectro do glicosídeo. A hidrólise do glicosídeo, realizada conforme o item II.2.2.2.2, cliva o glicosídeo na posição C-7, liberando-se o açúcar conjugado a aglicona (Figura II.12).

A banda de C=O no espectro do glicosídeo em 1.619 cm^{-1} refere-se à carbonila em C-4 da tricina, a qual estabelece ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo hidroxila C-5 (Figura II.12). A banda em 1.639 cm^{-1} corresponde à carbonila do resíduo de metoxicinâmico esterificado à glucose (Figura II.12C). A posição dessa banda é coerente com a conjunção da carbonila com as ligações olefínicas do ácido metoxicinâmico. O espectro da aglicona que apresenta apenas uma banda, em 1.621 cm^{-1}, refere-se à carbonila associada ao grupo hidroxila C-5 (Figura 8 e 9B). O espectro do açúcar esterificado pelo ácido metoxicinâmico também apresenta apenas uma banda de carbonila em 1639 cm^{-1}, referente ao ácido metoxicinâmico (Figura 11 e 12C). Wang e colaboradores (2004), trabalhando com *Pleioblastus amarus* (Gramineae) observaram que a associação da carbonila C-4 com o grupo hidroxila C-5 do éter 7-metílico da tricina 4'-*O*-glucopiranosídeo resulta em absorção em 1623 cm^{-1}. Dordevic e colaboradores (2000) trabalhando com *Salvia officinalis* L. (Labiateae) também relataram a ocorrência da banda em 1.616 cm^{-1}, correspondente à carbonila da luteolina. No entanto, Wang e colaboradores (2004) observaram que

no éter 7-metílico da tricina-5-O-glucopiranosídeo a banda correspondente à carbonila ocorre em 1.643 cm^{-1}. A diferença para maior comprimento de onda da referida banda é devida à ausência de ligação de hidrogênio da carbonila com a hidroxila em C-5, já que a glicosilação ocorre na hidroxila da posição C-5. Sendo assim, com esses dados sugerimos que há duas carbonilas no glicosídeo, uma referente à carbonila em C-4 e a outra no resíduo do ácido metoxicinâmico esterificado à glucose, e ainda que há uma hidroxila em C-5 (Figura II.7).

O espectro de IV-TF do glucosídeo também indica a presença de hidroxilas (banda em 3.415 cm^{-1}), anel aromático (1.515, 1.499 e 1.458 cm^{-1}), estiramento vibracional (1.217 e 1.114 cm^{-1}) e deformação (1.428 cm^{-1}) do álcool simétrico (Figura II.11 e Tabela II.1).

Tabela II.1. Dados sobre espectro do analito 2.2 no infravermelho com transformada de Fourier.

λ cm^{-1}	Glicosídeo
3.415	OH – fenólicas e alcoólicas
1.639	C=O - conjugada com C=C
1.619	C=O - do núcleo flavonóide
1515, 1.499 e 1.458	C=C - aromáticos
1.217 e 1.114	C-O - estiramento vibracional do álcool simétrico
1.428	OH – deformação do álcool simétrico

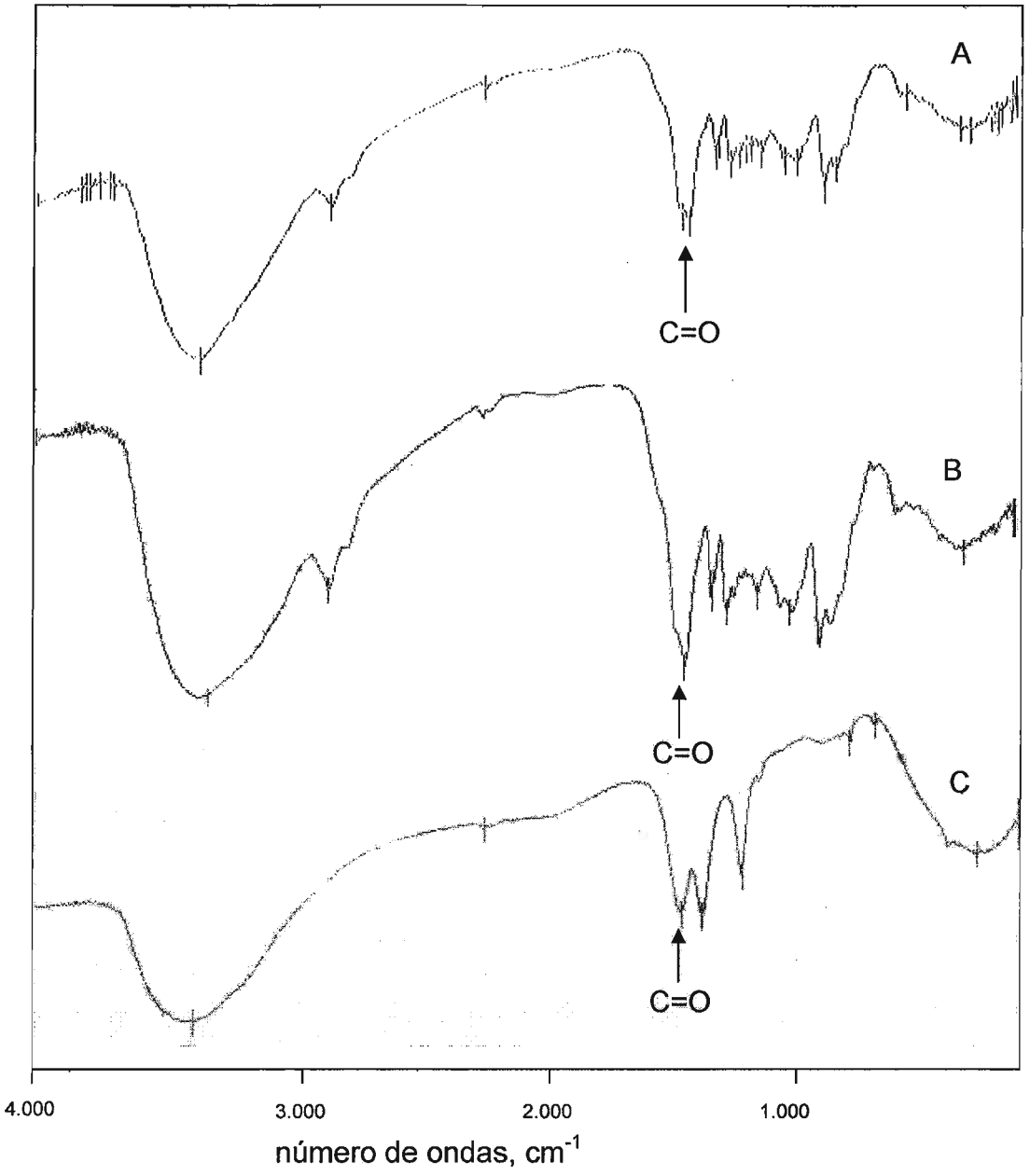


Figura II.11. Espectros de IV-TF do analito 2.2. A: glucosídeo, B: aglicona e C: açúcar com o ácido metoxicinâmico acilado. C=O: carbonila.

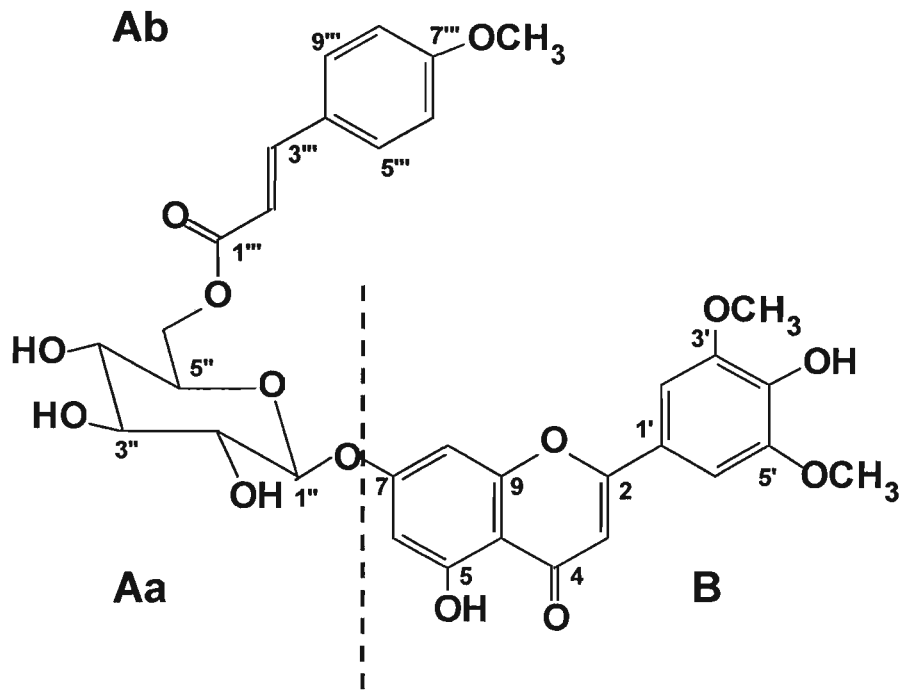


Figura II.12. Clivagem do *O*-glicosídeo referente ao analito 2.2 na posição C-7 através de hidrólise ácida com HCl 2N. **Aa**: resíduo de glucose, **Ab**:resíduo de ácido metoxicinâmico, e **B**: resíduo de tricina.

II.3.2.1.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C.

Os dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do analito 2.2 em solução de DMSO-*d6* são apresentados na Tabela II.2 e indicam a presença de resíduos de tricina, hexose e ácido metoxicinâmico. O sinal de um próton anomérico é observado em δ 5,27 (d, J = 7,4 Hz, H-1") correspondente ao próton do H ligado ao C-1"da glucose que está ligado à hidroxila da posição 7 da tricina. Os sinais do anel B são de dois picos singletos (H-2', H-6') em δ - 7,37 ppm, indicando oxigenação em C-3', C-4' e C-5', corroborando os dados obtidos com o espectro de UV/Visível. As duas metilas nas posições 3' e 5' do anel B apresentam deslocamentos em δ 149,1 ppm no espectro RMN ^{13}C (Agrawal *et al.*, 1989). Esses valores são semelhantes

aos encontrados por Wang e colaboradores (2004) em pleiosídeo B, uma tricina glicosilada isolada das folhas de *Pleioblastus amarus*.

Os sinais dos espetros de RMN de ^{1}H e ^{13}C correspondentes ao açúcar são coerentes com os valores conhecidos de glucose. Sua configuração β foi deduzida pela constante de acoplamento do próton do carbono C-1" da glucose com a tricina (Agrawal *et al.*, 1989).

A acilação ocorre na hidroxila 6' do açúcar. O espectro de ^{1}H, indica a presença de um par de dubletos orto-acoplados com J=8,4 Hz, correspondente a dois pares de prótons degenerados, H-6''' e H-8''' em 6,72 ppm e H-7''' e H-9''' em 7,4 ppm, apresentando um padrão AA'BB' com constante de acoplamento (J=8,4 Hz) indicam que o grupo metoxila está na posição *para* no ácido metoxicinâmico. Um pronunciado desvio para campo mais baixo dos prótons 6-metilênicos do glucosídeo em δ 5,12 e 4,13 ppm sugere que a acilação com o ácido metoxicinâmico ocorreu na região terminal da glucose.

Tabela II.2. Dados sobre os desvios químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) de RMN de ^{1}H e ^{13}C de tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosideo em DMSO-*d6* (δ em ppm, J em Hz).

posição	^{1}H	^{13}C
2		165,01
3	7,07 – (s)	101,50
4		182,86
5		161,88
6	6,39 – (d, J = 1,1)	100,24
7		163,35
8	6,87 – (d, J = 1,1)	95,32
9		157,65
10		105,25
1'		120,99
2'	7,37 – (s)	104,73
3'		149,01
4'		140,90
5'		149,01
6'	7,37 – (s)	104,73
3', 5' – OCH_3	3,72 – (s)	57,19
1"	5,27 – (dd, J = 12,0; 4,8)	98,21
2"	3,39 – (t, J=8,8)	72,63
3"	3,57 – (t, J=8,8)	77,79
4"	3,31 – (t, J=8,8)	71,29
5"	3,89 – (m)	77,89
6"	4,13 – (dd, J = 12,0; 6,6)	68,02
	5,12 – (d, J = 7,4)	
1"'		182,86
2"'	6,30 - (d, J = 15,6)	129,49
3"'	7,69 - H – 3"' (d, J = 15,6)	132,45
4"'		120,99
5"'	7,34 - (d, J = 8,4)	129,49
6"'	6,72 - (d, J = 8,4)	104,73
7"'		157,65
8"'	6,72 - (d, J = 8,4)	104,73
9"'	7,34 - (d, J = 8,4)	129,49
7"' - OCH_3	3,72 – (s)	57,19

II.4 CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos identificados na cana de açúcar apresentaram-se glicosilados, com substituição por glucose. Foram identificadas três substâncias, sendo duas ainda desconhecidas: Orientina, uma flavona *C*-glicosilada; tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo; 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo, uma lignana glicosilada. Tanto o derivado de tricina, quanto a lignana glicosilada apresentaram-se com metoxilação em sua estrutura.

Os procedimentos utilizados neste trabalho para a extração, purificação e identificação de compostos fenólicos possibilitaram a ampliação do perfil de um alimento muito popular em nosso país.

II.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H. Lignans and phytoestrogens. Possible preventive role in cancer. **Frontiers of Gastrointestinal Research**, v. 14, p. 165-176. 1988.

ADLERCREUTZ, H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum,** v. 50, p. 201 3-23, 1990.

AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S.; BANSAL, M.C. **Flavonoids**. *in*. AGRAWAL, P.K. (ed.). Carbon-13 NMR of flavonoids. New York. Elsevier Science Publishers B.V. p. 95-182. 1989.

ARABBI, P.R. GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131. 2004.

BANNWART, C.; ADLERCREUTZ, H.; FOTSIS, T.; WÄHÄLÄ, K.; HASE, T.; BRUNOW, G. Identification of *O*-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein, and of matairesinol, one likely plant precursor of the animal lignan enterolactone, in human urine. Finn. Chem. Lett. v. 4, p. 120-125, 1984.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Andover: Intercept/ Paris: Lavoisier, 1995. 915p.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; HDJOKO, K.; HOSTETTMANN. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV- detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**, v. 1082, p. 51-59. 2005.

COLOMBO, R.; LANÇAS, F.M.; YARIWAKE, J.H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of chromatography**, v. 1103, p. 118-124. 2006.

CUYCKENS, F.; CLAYES, M. Mass spectometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15. 2004.

CURTIN, J.H.; PATON, N.H. The quantitative analysis of phenolic acids from sugar liquors by High Performance Liquid Chromatography. In: International Society of Sugar Cane Technologist, Manila, 1979, **Proceedings**. Manila: Sugar Processing Research Institute, 1980, p. 1-9.

D'ARCY, B.R. **Antioxidants in Australian floral honeys**. Barton, Rural industries Research and Development Corporation. 2005. 84p.

DE CAMPOS, M.P.; CECHINEL, V.; DA SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CRUZ, R.C.; CRUZ, A.B. Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1527—1530. 2005.

DOMON, B.; COSTELLO, C.E. A systematic nomenclaturefor carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glyconjugates. **Glycoconjutes Journal**, v. 5, p. 397-409. 1988.

DORDEVIĆ, S.; CAKIĆ, M.; AMR, S. The extraction of apigenin and luteolin from the sage *Salvia officinalis* L. from Jordan. **Facta Universitatis**, v. 1, p. 87-93. 2000.

FRENZEL, TH.; MILLER, A. ENGEL, K.-H. Metabolic profiling – Fractionation Method for Analysis of Major and Minor Compounds in Rice Grains. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 215-221, 2002.

MA, Y.L.; LI, Q.M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAYES, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 1357-1364. 1997.

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

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79. p. 727-747. 2004.

MARKHAM, K.R. 1982. **Techniques of flavonoids identification**. London, Academic press. 113p.

McGHIE, T.K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 107-112. 1993.

NAKASONE, Y.; TAKARA, K.; WADA, K.; TANAKA, J.; YOGI, S. Antioxidante compounds isolated from kokuto, non-centrifugal cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 1714-1716. 1996.

NAYAK, V.; DEVI, P.U. Protection of mouse bone marrow against radiation-induced chromosome damage and stem cell death by the ocimum flavonoids orientin and vicenin. **Radiation Research**, v. 163. p. 165-171, 2005.

PATON, N.H. A method for the separation and identification of phenolic acids in sugar products. In: International Society of Sugar Cane Technologist, São Paulo, 1977, **Proceedings**. São Paulo: Sugar Processing Research Institute, 1978, p. 2635-2643.

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part I. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 99-108. 1992.

PAYET, B.; SING, A.S.C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 53, p. 10074-10079. 2005.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M., WAUTERS, J-N, TITS, M, ANGENOT, L. Comparison of HPTLC densitometric and HPLC-UV determination of flavonoids from *Passiflora*. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 241-248. 2004.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the *C*-glycosylflavone isomer pair orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 295-301. 2005.

SETCHELL, K.D.R.; BORRIELLO, S.P.; HULME, P.; AXELSON, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 569-578. 1984.

TAKARA, K.; KINJYO, A.; MATSUI, D.; WADA, K.; NAKASONE, Y. YOGI, S. New antioxidative phenolic glycosides isolated from kokuto, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 29-35. 2002.

VANHARANTA, M.; VOUTILAINEN, S.; LAKKA, T.A.; VAN DER LEE, M.; ADLERCREUTZ, H.; SALONEN, J.T. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. **Lancet**, v. 354, p. 2112-2115. 1999.

VANHARANTA, M.; MURSU, J.; NURMI, T.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T.H.; SALONEN, R.; ADLERCREUTZ, H.; SALONEN, J.T. Phloem fortification in rye bread elevates serum enterolactone level. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 952-957. 2002.

WANG, H.B.; YAO, H.; BAO, G.H.; ZHANG, H.P.; QIN, G.W. Flavone glucosides with immunomodulatory activity from the leaves of *Pleioblastus amarus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 969-974. 2004.

WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; CLIFFORD, H.T. Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the Palmae. **Phytochemistry**. v. 12, p. 2417-2430. 1973.

WU, W.; LIU, Z.; SONG, F.; LIU, S. Structural analysis of selected characteristic flavones by eletrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 1103-1005. 2004.

CAPÍTULO III

PERDAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DO AÇÚCAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CALDO MISTO E SEUS PRODUTOS.

III.1 INTRODUÇÃO

A importância da cana-de-açúcar advém de sua múltipla utilização, podendo ser empregada *in natura*, para alimentação animal ou como matéria-prima para a fabricação de melado, rapadura aguardente, açúcar e álcool.

O mercado de açúcar compreende vários tipos de produtos, dentre os quais podem-se destacar o açúcar, açúcar invertido e o subproduto melaço, que servem como bens intermediários na produção de ingredientes específicos (Alves, 2004). O açúcar VHP (Very High Polarization) é utilizado como insumo no processo de refinação. Seu processamento pode originar tanto o açúcar cristal como o refinado amorfo ou refinado granulado sobre o qual recai a preferência da maioria dos importadores do açúcar brasileiro (Cosan, 2002).

O setor sucroalcooleiro, nos últimos anos, tem se destacado pelas inovações tecnológicas. O setor vem deixando a atividade extrativista e investindo cada vez mais na formação de uma agroindústria integrada que explora as diversas possibilidades energéticas e alimentícias da cana-de-açúcar (Martins, 2004). Os métodos convencionais, utilizados pelas usinas, consistem de tratamento térmico e químico do caldo e xarope (Kumar *et al.*, 1992). Essas etapas têm como objetivos a concentração da sacarose, e a obtenção de um açúcar mais claro, através da remoção de pigmentos. Os pigmentos e precursores que vêm com o caldo são colóides, proteínas, pectinas, compostos inorgânicos e orgânicos. Além disso, dependendo das condições de corte, do carregamento, do transporte, do tipo de estocagem e do tratamento dado na usina, os compostos fenólicos podem se oxidar e se ligar aos polissacarídeos (Cosan, 2002).

Os compostos fenólicos na cana-de-açúcar atuam como antioxidantes. Nakasone e colaboradores (1996) isolaram cinco compostos antioxidantes a partir

do extrato de "kokuto", um produto similar à rapadura utilizado no Japão como adoçante natural. Takara e colaboradores (2002) elevaram para treze o número de compostos fenólicos presentes em "kokuto" com atividades antioxidantes, algumas das substâncias apresentando atividade superior à do α-tocoferol. A atividade antioxidante também foi observada por Payet e colaboradores (2005) em sete amostras de açúcar.

Este trabalho tem como objetivos avaliar as perdas de compostos fenólicos durante o processamento industrial do açúcar e a atividade antioxidante do caldo misto e seus produtos obtidos pelo processo industrial.

III.2 MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1 Material

III.2.1.1 Amostras de cana *in natura*

O material utilizado para as análises foi coletado na safra de maio de 2003, na Usina Cosan, município de Piracicaba – São Paulo.

As variedades SP801842 (V1), SP813250 (V2) e RB835480 (V3) utilizadas na produção de açúcar foram coletadas e catalogadas assim que foram descarregadas dos caminhões que chegavam à usina. As amostras foram separadas individualmente em topo, médio e base e mantidas sob refrigeração. No laboratório, o material foi lavado, descascado individualmente (para utilização apenas da medula), sendo em seguida fragmentado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer a – 80 °C até o momento das análises, quando foram trituradas e homogeneizadas em gral com pistilo sob nitrogênio líquido.

III.2.1.2 Amostras dos produtos da cana

Na usina foram coletadas amostras do caldo de cana diretamente da moenda, denominado caldo misto (CM). Nas etapas de concentração do caldo foram coletados melaço (MEL), xarope (XPE) e açúcar VHP (VHP). Todo o material foi mantido em freezer a –18 °C.

III.2.1.3 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ou grau HPLC quando necessário. Luteolina, apigenina, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), β-caroteno, monopalmitato de polioxietilenosorbitana (Tween 40) e os ácidos caféico, cumárico, ferúlico e linoléico foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), o ácido clorogênico, da Apin Chemicals (Abingdon, Reino Unido), e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) da Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EUA).

III.2.2 MÉTODOS

III.2.2.1 Determinação de sólidos totais

A determinação de sólidos totais foi realizada pesando-se cerca de 2 g de amostra em cadinhos de alumínio com tampa, e colocados em estufa a vácuo a 70°C até peso constante, sob pressão $\leq$ 100 mm Hg (AOAC, 1995). As determinações foram realizadas em triplicata.

III.2.2.2 Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)

A determinação do teor de sólidos solúveis nas amostras líquidas foi realizada utilizando-se um refratômetro de alto contraste (Shibuya optical Co. LTD., Tokyo,

Japão), após filtração das amostras em papel de filtro Whatman nº 6. As determinações foram realizadas em triplicata.

III.2.2.3 Determinação e quantificação de flavonóides e ácidos cinâmicos

a. Extração

A extração em duplicata foi realizada homogeneizando-se cerca de 25 g de amostra em 100 mL de metanol/água na proporção de 70:30 (incluindo a água das amostras), utilizando-se Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern, Suiça), por 1 minuto em velocidade média, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes com 50 mL da mesma solução. Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em Rotavapor (RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em banho a 40°C, até remoção do metanol.

b. Extração em fase sólida

O volume restante do extrato, livre de metanol, obtido acima foi ajustado com água deionizada para 50 mL em balão volumétrico e uma alíquota de 25 mL foi passada em coluna de 1 g de poliamida CC6 (Macherey-Nagel Gmbh & Co., Düren, Alemanha), preparada em seringa de 6 mL (HPLC Technology, Hertforshire, Reino Unido). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água deionizada. Após a passagem do extrato aquoso, a coluna foi lavada com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi realizada com 50 mL de metanol e posteriormente com 50 mL de metanol:hidróxido de amônio (99,5:0,5). O fluxo dos solventes através da coluna foi monitorado utilizando-se manifold Visiprep 24 DL da Supelco (Bellefonte, PA, E.U.A.).

Após secagem completa dos eluatos através de rotaevaporação sob pressão reduzida, os resíduos foram ressuspendidos em 1 mL de metanol HPLC e filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA, E.U.A.) de 0,25 ηm de poro.

c. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação dos flavonóides e ácidos cinâmicos nas amostras foram realizadas conforme o item II.2.3.1. A calibração foi realizada através da injeção dos padrões em triplicata em cinco concentrações diferentes, de 0,5 a 10 μg. Os picos obtidos nos cromatogramas com espectro similar a um dos padrões utilizados foram quantificados com comprimento de onda e curva de calibração específica. Os resultados foram expressos em mg de aglicona/100 g de amostra, em base úmida (b.u.).

III.2.2.4 Atividade antioxidante

Os produtos da cana-de-açúcar obtidos pelo processo industrial foram utilizados para analisar a atividade antioxidante através de dois métodos:

a. Sistema β-caroteno/ácido linoléico

A determinação foi feita de acordo com Marco (1968) com algumas modificações (Duarte-Almeida *et al.* 2006). Para o preparo de mistura reativa, foram adicionados 20 μL de ácido linoléico, 200 μL de Tween 40, 25 μL de uma solução de β-caroteno (2 mg/mL clorofórmio) e 500 μL de clorofórmio em *erlenmeyer*. Após a secagem completa do clorofórmio sob nitrogênio, foram adicionados aproximadamente 25 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30

minutos e agitou-se vigorosamente a solução. A mistura reativa assim preparada ficou límpida e apresentou absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 ηm.

A análise foi realizada utilizando-se uma microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA, E.U.A.) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 ηm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 μL dessa mistura reativa, 10 μL de metanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções-padrão em metanol e os extratos obtidos no item III.2.2.3. Esses extratos foram ajustados para a concentração de 100 μM com metanol, quando necessário. As leituras das absorbâncias foram realizadas no início e com intervalos de 15 minutos durante 180 minutos a 45°C, em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.).

A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada através do decaimento da absorbância a 470 ηm do controle (A_c), que deve ficar abaixo de 0,2 para ser considerado 100% da oxidação, após 180 minutos de reação. A queda da absorbância das amostras (A_{am}) foi correlacionada com a queda do controle, e assim estabeleceu-se a porcentagem da inibição (% I) da oxidação através das seguintes fórmulas:

$$Ac = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$Aam = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$\% I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

Como padrão de referência foi utilizada uma solução metanólica de Trolox na concentração de 5 μM.

b. Redução de radicais livres

A atividade antioxidante foi determinada através de redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrihidrazila) pela ação dos antioxidantes presentes na amostra (Brand-Williams, 1995). Uma solução metanólica de DPPH• (~20 mg/mL) foi preparada de forma a apresentar absorbância entre 0,6 e 0,7 em 517 ηm.

As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA, E.U.A.) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 ηm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 μL da solução de DPPH•, 40 μL de metanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções-padrão em metanol ou os extratos obtidos no item III.2.2.3, adequadamente diluídos. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.). Como padrão de referência foi utilizada uma solução metanólica de Trolox na concentração de 80 μM. O decaimento da absorbância das amostras (Aam), correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac), resulta na porcentagem de redução de radicais livres (% RRL), que pode ser expressa através da seguinte fórmula:

$$\%\,RRL = \frac{Ac - Aam}{Ac} x\,100$$

III.2.2.5 Análise dos resultados

Os resultados obtidos neste estudo são paramétricos, sendo expressos como média e desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, OK, E.U.A.). Os testes escolhidos foram Análise de Variância de uma via (One-Way ANOVA) e quando detectadas

diferenças na ANOVA, foi aplicado o teste post hoc Newman-Keuls, para precisar as diferenças estatísticas. O nível de significância adotado foi de * $p<0,05$ e ** $p<0,01$. Quando necessário, foram determinadas as correlações paramétricas dos dados. O nível de significância foi estabelecido como: 0 a 0,6 - correlação nula ou inexistente, 0,61 a 0,8 - moderada e 0,81 a 1 - forte. A Análise de Componente Principal (PCA) foi realizada utilizando-se o programa Fitopac versão 1.5.

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabendo-se que em determinadas regiões de material vegetal há diferenças na concentração de compostos fenólicos (Salatino *et al.*, 1988), e também por causa da utilização integral do material pela usina, não havendo separação de material durante as etapas de fragmentação ou moagem, a homogeneização das amostras foi realizada após a pulverização. Os produtos da cana-de-açúcar foram coletados durante as etapas do processamento do açúcar, para se averiguar a composição dos compostos fenólicos e avaliar suas atividades antioxidantes.

III.3.1 Teor de sólidos totais das amostras *in natura* e dos produtos da cana-de-açúcar

A Tabela III. 1 mostra praticamente o mesmo teor de sólidos totais, para as diferentes variedades de cana-de-açúcar. Os resultados, próximos a 28%, são condizentes com os de Martins (2004). Todavia, há uma grande variação dos teores de sólidos totais entre os produtos obtidos por moagem da cana-de-açúcar. O caldo misto apresenta uma redução de 52% de sólidos totais em relação às canas *in natura*, isso provavelmente decorrente da remoção das fibras e da diluição do caldo pelo processo de embebição (COSAN, 2002). O xarope, após ser submetido à

concentração por meio de evaporação de água, tem seus teores de sólidos totais aumentado em cerca de 4 vezes. O melaço e o xarope apresentam teores de sólidos totais pouco inferior ao descrito no procedimento da indústria. O açúcar VHP tem o maior teor de sólidos totais dentre as amostras analisadas.

Tabela III.1. Teores de sólidos totais e solúveis (ºBrix) das variedades de cana-de-açúcar e seus produtos.

Amostras	% Sólidos totais*	ºBrix
V1	27,0 ± 0,3	n.a.
V2	27,3 ± 0,1	n.a.
V3	27,1 ± 0,2	n.a.
CM	14,0 ± 0,1	15 ± 1
XPE	56,7 ± 0,0	57 ± 0
MEL	76,3 ± 0,4	80 ± 1
VHP	99,9 ± 0,0	n.a.

Obs.: V1: SP801842; V2: SP813250; V3: RB835486; CM: caldo misto; XPE: xarope; MEL: melaço e VHP: açúcar VHP.; n.a: não analisado; *média e desvio padrão de três replicatas.

III.3.2 Teores de sólidos solúveis (ºBrix) dos produtos da cana-de-açúcar.

Os teores de sólidos solúveis no caldo misto, xarope e melaço expressos em ºBrix são apresentados na Tabela III.1. O caldo misto, em média com 15 ºBrix, após tratamento químico para remoção de impurezas é submetido à evaporação de água, elevando o teor para 30 ºBrix (Cosan, 2002). A evaporação da água eleva a

concentração da sacarose e assim obtém-se o melaço com cerca de 70 °Brix. Esse melaço é transferido para tachos, onde será submetido à alta temperatura sob pressão, com o que o teor alcançará valores entre 90 e 95 °Brix (Cosan, 2002). Esses resultados são no geral coerentes com o teor de sólidos totais, que é proporcional ao teor de sólidos solúveis (Tabela III.1).

III.3.3 Perfil dos compostos fenólicos das amostras *in natura* e dos produtos da cana-de-açúcar.

Os derivados de flavonóides foram designados segundo a respectiva aglicona. Assim, os derivados de apigenina, luteolina e tricina foram referidos como apigenina, luteolina e tricina, respectivamente. Os ácidos clorogênicos foram referidos como isômeros do ácido clorogênico. Os derivados de ácidos caféico e ferúlico, conjugados ou não, foram designados derivados de ácido caféico e ferúlico, respectivamente. Os ácidos *o*-, *m*-, *p*- e metóxi cumárico, conjugados ou não, foram designados ácido cumárico.

Durante a extração em fase sólida com metanol, observou-se que a maioria dos ácidos cinâmicos e flavonas foi extraída com esse solvente. Entretanto, como mencionado no capítulo anterior (item II.3), os derivados de tricina foram extraídos quase que totalmente com o sistema de solventes metanol/hidróxido de amônio (Anexos 1, 2 e 3). Para efeito de avaliação quantitativa e qualitativa do perfil das amostras, os valores obtidos foram computados integralmente.

De acordo com a Figura III.1, o perfil de compostos fenólicos das variedades de cana-de-açúcar é composto predominantemente por ácidos fenólicos (derivados dos ácidos caféico, clorogênico, cumárico) e, em menor concentração, flavonóides.

As agliconas dos flavonóides detectados (apigenina, luteolina e tricina) pertencem à classe das flavonas.

Por meio de análise por eletroforese de alta voltagem, Faber e Carpenter (1972) sugerem a presença de flavonóis entre os compostos fenólicos que compõem os corantes da cana-de-açúcar. Os flavonóis detectados por esses autores foram quercetina, rutina e campferol. Esse resultado não foi corroborado por outros autores que analisaram tanto o material vegetal quanto os respectivos produtos (Paton 1978; Curtin & Paton 1980; Mabry *et al.* 1984; Paton 1992; McGhie 1993; Takara *et al.* 2002; Colombo *et al.* 2005).

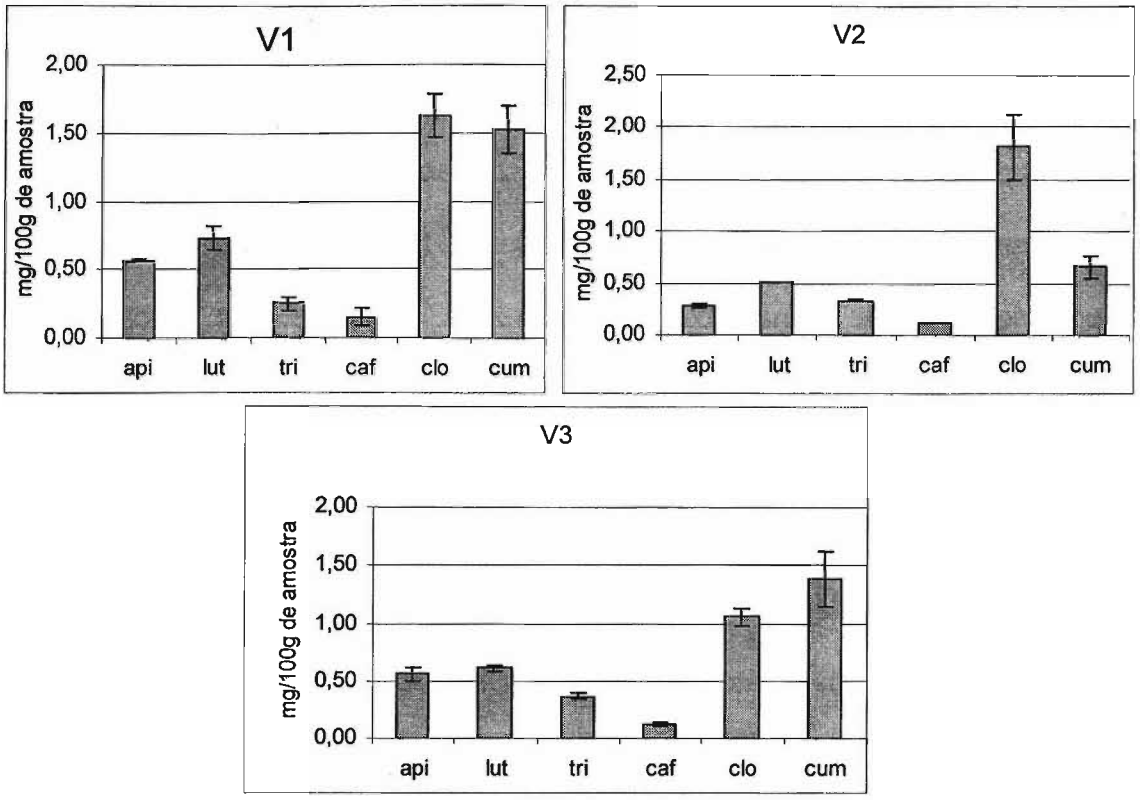


Figura III.1. Teores de compostos fenólicos de variedades de cana-de-açúcar em base úmida obtidos por CLAE-DAD. V1: SP801842; V2: SP813250; V3: RB855486. api: derivados de apigenina; lut: derivados de luteolina; tri: derivados de tricina; caf: derivados do ácido caféico; clo: isômeros do ácido clorogênico; cum: derivados do ácido cumárico; fer: derivados de ácido ferúlico. Médias e desvios padrões de seis replicatas.

Nas Liliopsida (monocotiledôneas), as flavonas são flavonóides predominantes na maioria das espécies. Nas Poaceae (Gramineae) não se têm detectado antocianinas (Vickery & Vickery, 1981; Harborne & Williams, 2000). Alguns autores (Smith & Hall, 1972) destacam a presença de antocianinas em variedades de cana altamente coloridas na casca do colmo, e nos ápices da planta. As antocianinas estão relacionadas às cores de flores e frutos, determinando colorações que variam do vermelho ao azul, dependendo do pH. Entretanto, tanto a polinização das flores quanto a dispersão dos frutos das Poaceae são realizadas pelo vento, não ocorrendo produção dessas substâncias para a atração de polinizadores ou dispersores (Vickery & Vickery, 1981).

Os derivados de luteolina são os flavonóides com maior expressão nas variedades analisadas, representando cerca de 44% do total dos flavonóides detectados. As variedades V1 e V3 mostram teores semelhantes de flavonóides, com cerca de 30% a mais do que a variedade V2. Paton & Duong (1992), analisando vinte variedades de cana observaram que a expressão da coloração estava relacionada ao decréscimo da concentração do ácido clorogênico, de alguns compostos fenólicos neutros e de flavonóides luteolínicos, isto é, flavonas com um grupo *orto*-di-hidroxila. Isto indica que todos esses compostos participam da reação de escurecimento e que a reação pode envolver mais do que uma enzima e mecanismos oxidativos (Paton & Duong, 1992). O ácido clorogênico pode atuar como substrato na reação de escurecimento enzimático devido à presença do grupo *orto*-difenil em sua estrutura (Bucheli & Robinson, 1994). Paton (1992), trabalhando com cana-de-açúcar destinada à produção de açúcar, detectou 1,0 mg/100 g de ácido clorogênico em uma variedade de cana australiana. Esse resultado é bem inferior ao apresentado pelas variedades utilizadas no Brasil (Figura III.1). Entretanto, a indústria do açúcar busca cada vez mais variedades resistentes às pragas da lavoura, com grande quantidade de sacarose e também variedades que produzam caldo mais claro, ou seja com baixo teor de ácido clorogênico.

As variedades de cana-de-açúcar *in natura* possuem perfis que se distinguem dos de seus produtos, quanto à concentração de flavonóides e dos ácidos cinâmicos (Figuras III.1 e III.2). Nos produtos, os flavonóides representam em média 60% do total de compostos fenólicos detectados, ao contrário das variedades, em que estes não ultrapassam 29%. Entretanto, os ácidos cinâmicos são mais expressivos nos colmos, principalmente pela concentração dos derivados dos ácidos clorogênico e cumárico (Figura III.1). Nota-se também a ausência dos derivados do ácido caféico

nos produtos e a presença dos derivados do ácido ferúlico, não detectados nas variedades (Figuras III.1 e III.2).

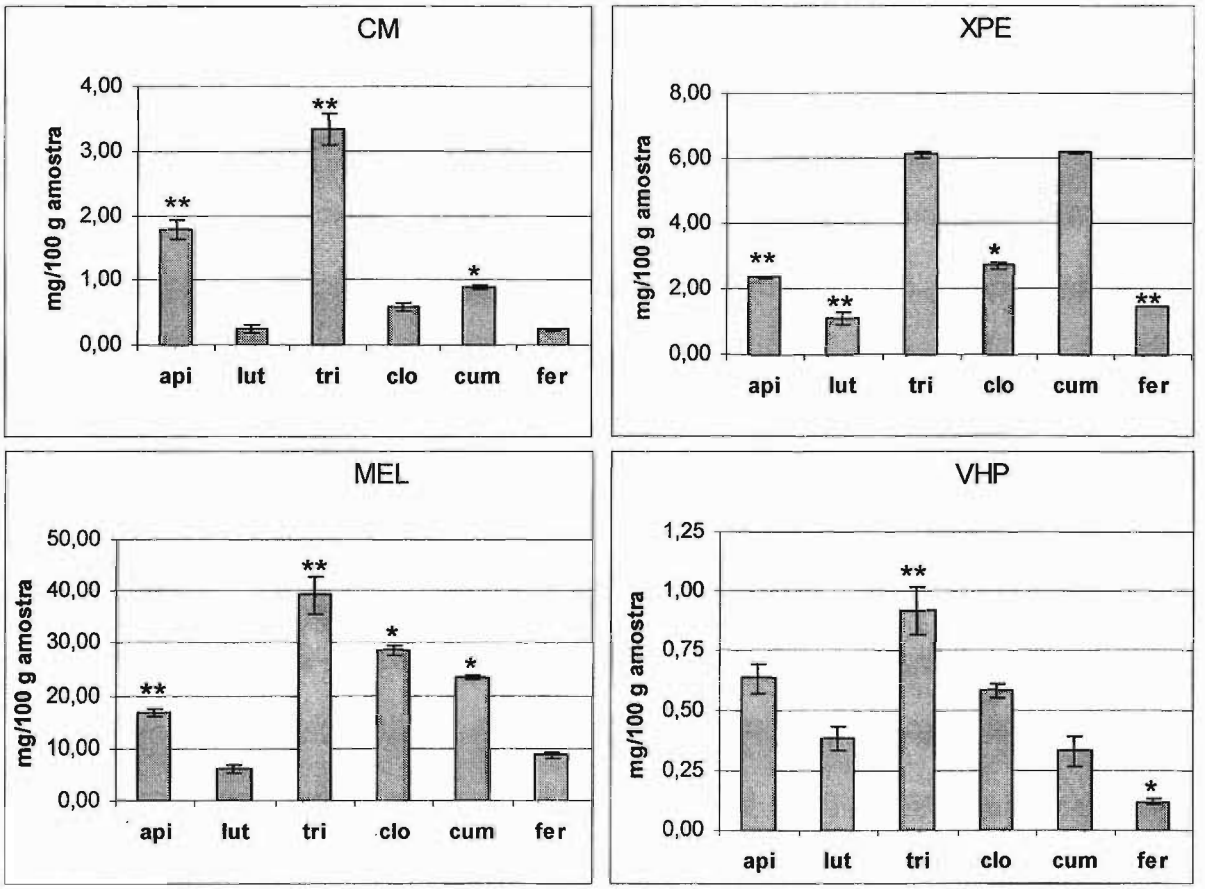


Figura III.2. Teores de compostos fenólicos de produtos obtidos por processamento do caldo de cana em base úmida obtidos por CLAE-DAD. CM: caldo misto; XPE: xarope; MEL: melaço; VHP: açúcar VHP. api: derivados de apigenina; lut: derivados de luteolina; tri; derivados de tricina; caf: derivados do ácido caféico; clo: isômeros do ácido clorogênico; cum: derivados do ácido cumárico; fer: derivados do ácido ferúlico. Médias e desvios padrões de seis replicatas. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

Os ácidos cinâmicos são pouco abundantes no caldo misto (CM), destacando-se entre os de maior abundância os derivados de ácido cumárico. O ácido clorogênico, abundante nas amostras de cana *in natura*, tem o seu teor abruptamente reduzido nos produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar. Coombs e colaboradores (1974) isolaram da folha de cana de açúcar uma polifenol oxidase

(PFO) com alta especificidade para o ácido clorogênico. A PFO é uma enzima que catalisa a orto-hidroxilação dos monofenóis e a oxidação dos *o*-difenóis para *o*-quinona (Mayer & Harel, 1979). Assim, é possível que durante a extração ocorra a atuação da referida enzima, reduzindo o teor de ácido clorogênico.

As diferenças nas amostras e no modo de extração dos compostos fenólicos podem interferir nos valores obtidos. O caldo misto (CM) é obtido pela expressão do material vegetal, de modo que as fibras e outras partes do material não entram em contato com o solvente durante a extração. No modo experimental, há um contato maior do solvente com todo conteúdo do material vegetal, que sob agitação mecânica favorece uma extração mais abrangente desses compostos. Além disso, o metanol utilizado como solvente inativa a ação enzimática (Paton & Duong, 1992).

Os flavonóides, que se apresentam em menor concentração na cana *in natura*, destacam-se nos produtos obtidos a partir da moagem. O perfil dos flavonóides no caldo misto (CM) é quantitativamente distinto ao apresentado pela cana *in natura* ($p<0,01$). Nos colmos, a luteolina é mais abundante, enquanto que no CM a proporção desta flavona é menor (Figuras III.1 e III.2). Tricina, flavonóide pouco abundante nas variedades, mostra-se no início do processamento com altos teores que se mantêm até os últimos estágios da produção do açúcar (Figuras III.1 e III.2). No caldo misto, a tricina é o composto fenólico de maior concentração, sendo este dado significante ($p=0,0024$), apresentando quase o dobro da quantidade de apigenina e mais de dez vezes a concentração de luteolina. Derivados de tricina despertam especial interesse em química de produtos naturais, porque ela é relativamente rara na natureza (Harborne & Hall, 1963; Hudson *et. al.,* 2000; Cai *et al.*, 2005). A tricina foi detectada em espécies resistentes à mangra e à podridão de

raiz, estando provavelmente relacionada à resistência a doenças de plantas (Harborne & Hall, 1964; McGhie, 1993).

O xarope (XPE) possui aproximadamente o triplo dos teores de compostos fenólicos em comparação ao caldo misto (CM), com predominância dos derivados do ácido cumárico e de tricina (Figura III.2). O aumento é significativo (p=0,0017), embora a proporção relativa dos dois produtos da cana-de-açúcar mostre pouca alteração (Figura III.2). O súbito aumento de concentração dos derivados do ácido cumárico pode ser devido à sua liberação após o aumento de temperatura ocasionado no estágio de concentração para obtenção do mel (MEL). Pan e colaboradores (1998) relatam a presença de ácido cumárico em paredes celulares de gramíneas, associado à lignina e polissacarídeos por meio de ligação éster.

O aumento da concentração de compostos fenólicos no mel (MEL) é notável, sendo superior a dez vezes aos encontrados no caldo misto (CM). Nessa fase, observa-se também uma alteração no perfil entre os produtos, no qual pela primeira vez os teores dos ácidos cinâmicos são superiores aos dos flavonóides. Há um aumento substancial dos isômeros do ácido clorogênico e uma redução dos teores de derivados do ácido cumárico (Figura III.2).

O açúcar VHP apresenta um perfil semelhante ao encontrado no mel, embora a proporção seja bem menor. Nota-se também que o percentual dos derivados de flavonas aumenta, principalmente os de apigenina e luteolina, 68% e 41% respectivamente, em relação à tricina. Mesmo assim, a tricina é o composto fenólico com maior expressão entre todas as substâncias.

Payet e colaboradores (2005) analisaram sete amostras de açúcar mascavo (*sugar brown*). O resultado mais significativo foi apresentado por uma das amostras, na qual foram detectados trinta compostos fenólicos, dentre os quais citam-se os

ácidos cumárico e ferúlico. Entretanto, os autores não detectaram as flavonas e tão pouco isômeros do ácido clorogênico, devendo-se isso ao tipo de metodologia de extração empregada.

Paton & Duong (1992), analisando cana-de-açúcar e seu respectivo suco, apresentam em seu trabalho o primeiro perfil da composição dessas amostras. Trata-se de um perfil qualitativo onde se faz uma distinção entre flavonas e ácidos fenólicos.

Em nosso trabalho, foi possível observar que o perfil é alterado ao longo do processamento do açúcar, ocorrendo alterações qualitativas e quantitativas. Apresentamos também uma metodologia prática para a extração e determinação das duas classes de compostos fenólicos presentes na cana-de-açúcar e nos seus produtos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

III.3.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos, redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL). O método do DPPH• determina a capacidade do antioxidante em reduzir radicais livres (BRAND-WILLIAMS, 1995). O sistema β-CAL avalia a capacidade do antioxidante em inibir o descoramento do β-caroteno causado pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoléico (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995).

Como visto anteriormente (item III.3.3), há uma concentração maior de compostos fenólicos em alguns produtos em comparação aos outros. Como o intuito deste trabalho foi o de avaliar as atividades antioxidantes individuais e compará-las entre si, procedeu-se à uniformização das amostras ajustando-as a uma mesma concentração. Outra informação seria a atuação separada dos compostos fenólicos por meio dos extratos obtidos pela extração em fase sólida, os extratos obtidos com metanol (M) e com metanol/hidróxido de amônio (N).

III.3.4.1 Redução de radicais livres (DPPH•)

A Tabela III.2 mostra a atuação de produtos da cana-de-açúcar em reduzir radicais DPPH•. Os produtos, na concentração de 100 μM, apresentaram, em sua maioria, atividades superiores às desempenhadas pelo padrão. A maior atividade redutora de radicais livres foi apresentada pelo XPE-N, sendo 42% superior ao padrão de referência. Outros produtos também se destacaram como possuidores de grande atividade antioxidante, como por exemplo, MEL-N - 45,20% e CM-N - 38,35% de redução de radicais DPPH•, sendo estatisticamente significante em relação ao controle ($p<0,01$). A maioria das amostras apresentou atividade próxima à descrita

para o padrão, sendo que os extratos de XPE-M, VHP-M e VHP-N proporcionaram valores estatisticamente similares.

Tabela III.2. Determinação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH•[1] dos produtos da cana-de-açúcar, na concentração de 100 μM, obtidos durante o processamento do açúcar.

produtos	% Redução do DPPH [2]
CM M	28,25 ± 0,43
CM N	38,35 ± 0,41
XPE M	32,03 ± 0,57
XPE N	57,80 ± 1,21
MEL M	23,86 ± 0,57
MEL N	45,20 ± 2,55
VHP M	32,55 ± 1,32
VHP N	32,36 ± 1,88
trolox 80 μM	33,16 ± 2,83

1: DPPH• – difenilpicrilhidrazila; 2: Resultados expressos como média ± desvio padrão da média de três replicatas.

Grande parte dos produtos obtidos pela extração em fase sólida com solvente metanol/hidróxido de amônio apresentou atividades superiores de redução de radicais DPPH•, em comparação aos que foram extraídos com metanol. Os produtos XPE-N e MEL-N proporcionaram atividades antioxidantes muito significantes quando comparados a seus pares, XPE-M e MEL-M ($p<0,01$). A maior diferença de atividade é encontrada entre os extratos MEL-M e MEL-N, e a menor entre os extratos de açúcar VHP. Payet e colaboradores (2005), ao avaliarem atividades antioxidantes de

compostos fenólicos em açúcar mascavo, detectaram que em soluções aquosas essas amostras apresentam fraca atividade em reduzir radicais livres DPPH•.

Embora o extrato MEL-N tenha apresentado uma das maiores atividades dentre os demais extratos, MEL-M forneceu o menor índice. Essa diferença entre esses extratos é de 47%, similar à encontrada entre o XPE-M e XPE-N, 44%. É possível que a composição dos extratos contendo derivados de tricina tenham atividades superiores aos demais compostos fenólicos contidos no extrato metanólico. A correlação entre o conteúdo polifenólico e atividade antioxidante é no geral aceitável mas depende da natureza da amostra e de outros compostos na atividade antioxidante (Moure *et al.* 2001).

A redução de atividade antioxidante nos produtos da cadeia produtiva do açúcar é observada a partir dos extratos de MEL. Apesar de nessa etapa do processamento o referido produto obter uma das maiores concentrações de compostos fenólicos, sua atuação como antioxidante é mediana frente a uma mesma concentração com amostras de xarope. Essa redução pode estar relacionada à degradação de compostos com atividades antioxidantes por efeitos das altas temperaturas e pressão para a concentração da sacarose. Agostini e colaboradores (2004) relatam a queda da atividade antioxidante de frutas e verduras tratadas termicamente. Murakami e colaboradores (2004) comentam que produtos submetidos a altas temperaturas podem continuar a ter atividade antioxidante, mas em menor proporção, em virtude da degradação dos metabólitos.

III.3.4.2 Sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL)

A Tabela 6 mostra a atividade antioxidante determinada pelo sistema β-CAL. De acordo com essa tabela, a atividade antioxidante da maioria dos produtos

analisados variou entre 70 e 85% de inibição da oxidação do β-caroteno, incluindo o controle. No sistema β-CAL, os produtos da cana-de-açúcar forneceram resultados praticamente opostos aos obtidos pelo método de redução do radical DPPH•. Os resultados mostram uma atividade maior, exercida pelos extratos obtidos com metanol, frente aos extratos obtidos com metanol/hidróxido de amônio. A maior atividade de inibição foi detectada nos extratos VHP com cerca de 85% de inibição e a menor, no CM-N, com 56 %.

Tabela III.3. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico de produtos da cana-de-açúcar, na concentração de 100 μM, obtidos durante o processamento do açúcar.

Produtos	% inibição[1]
CM M	77,33 ± 2,81
CM N	55,67 ± 2,42
XPE M	76,32 ± 1,37
XPE N	72,36 ± 5,99
MEL M	73,21 ± 3,85
MEL N	72,36 ± 0,49
VHP M	85,79 ± 0,62
VHP N	83,23 ± 1,63
Trolox 10 μM	72,05 ± 3,20

[1]Resultados expressos como média ± desvio padrão da média de três replicatas

Todos os extratos apresentaram atividades superiores à do padrão, com exceção da amostra CM-N, sendo este dado muito significante (p=0,0113). A amostra CM-N é constituída quase que exclusivamente por derivados de tricina e no método anterior apresentava atividades superiores às encontradas nas amostras com derivados de apigenina, de luteolina e de ácidos cinâmicos. Tsao e

colaboradores (2005), utilizando dois métodos de avaliação antioxidante, afirmam que determinadas substâncias podem atuar diferentemente em determinados métodos de análise e que, de maneira geral, o sistema β-CAL apresenta dificuldades para a determinação da atividade antioxidante.

No caldo misto (CM) há menor concentração de luteolina em relação aos demais compostos fenólicos (Figura III.2). No entanto, nas amostras de açúcar VHP (VHP) a concentração é aumentada, acontecendo o mesmo com o ácido clorogênico. Luteolina e ácido clorogênico possuem duas hidroxilas vicinais em um mesmo anel fenólico. De acordo com a literatura, essas duas hidroxilas conferem a esses compostos fenólicos propriedades antioxidantes superiores a outros compostos que apresentam apenas uma hidroxila no anel fenólico. A grande reatividade do sistema orto-dihidroxilico é possível devido à pequena energia de dissociação da ligação O-H e a ressonância do anel B, aliado à grande estabilidade do radical envolvido (Foti *et al.*, 1996; Hopia & Heinonem, 1999; Manach *et al.*, 2004; Cuyckens; Cleys, 2004).

Takara e colaboradores (2002), ao analisarem a atividade antioxidante dos compostos isolados de "kokuto", relacionaram a eficiência dos compostos em reduzir radicais com o grupo hidroxila fenólico. Observaram também que, um composto glicosilado detectado no referido produto era menos eficiente do que sua aglicona. Sendo assim conclui-se que o número de hidroxilas em um composto não o torna mais eficiente, é necessário que estas hidroxilas estejam no mesmo anel aromático (Foti *et al.,* 1996; Hsu et al. 2005; Cuyckens & Cleys, 2004).

Conclusões baseadas em apenas um método podem levar à subestimação de amostras. Devido à complexidade de compostos apresentados pela cana-de-açúcar, não é possível se basear em apenas um composto para se avaliar a atividade.

Alguns estudos mostram que o ácido clorogênico apresenta baixa atividade no ensaio FRAP (capacidade de redução do ferro no plasma) e no sistema β-CAL, mas alta no método de PCL (fotoquimioluminescência); por outro lado a quercetina-3-galactosídeo apresenta alta atividade no sistema β-CAL e moderada no método de PCL. Essa inconsistência reafirma a necessidade de se utilizar dois métodos com diferentes modos de ação (Verhagen et al. 2003; Tsao *et al.*, 2005).

III.3.5 Análise multivariada

A Tabela III.4 mostra as correlações estabelecidas entre os flavonóides totais, ácidos cinâmicos totais e polifenólicos totais dos produtos obtidos durante o processamento do açúcar, assim como a correlação desses com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante realizada no sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL) e no método de redução do radical DPPH. No caldo misto observamos uma forte correlação positiva (r=0,9836) entre os flavonóides e os teores de fenólicos totais detectados. Uma correlação similar (r=0,9893) foi também detectada na amostra de melaço. Ambas as amostras apresentam altos teores de derivados de tricina e apigenina. As amostras de xarope e açúcar VHP apresentaram forte correlação positiva entre ácidos cinâmicos e fenólicos totais, r=0,9668 e 0,9669 respectivamente. Correlações negativas foram presenciadas nas amostras de melaço, principalmente entre flavonóides e ácidos cinâmicos (r= −0,8242) e ácidos cinâmicos e fenólicos totais (r= −0,7325), sugerindo que o aumento de flavonóides ou ácidos cinâmicos resultaria em redução de ácidos cinâmicos e fenólicos totais respectivamente.

Tabela III.4: Correlação entre os valores de flavonóides totais, ácidos cinâmicos, índice de fenólicos totais, atividade de redução do radical DPPH e atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL) de produtos obtidos por processamento do caldo de cana.

Variáveis	caldo misto	xarope	melaço	açúcar VHP
flavonóides x ácidos cinâmicos	0,6072	0,3238	−0,8242	0,4248
flavonóides x fenólicos totais	0,9836	0,5550	0,9893	0,6416
ácidos cinâmicos x fenólicos totais	0,7405	0,9668	−0,7325	0,9669
flavonóides x DPPH	−0,7765	−0,0662	0,0802	0,9899
ácidos cinâmicos x DPPH	−0,9189	−0,0231	−0,5810	−0,8722
fenólicos totais x DPPH	−0,8657	−0,5227	−0,7115	0,9739
flavonóides x β-CAL	−0,7197	−0,9945	−0,1704	−0,9494
ácidos cinâmicos x β-CAL	0,2799	0,9811	0,6524	0,5622
fenólicos totais x β-CAL	−0,6020	0,9794	0,7723	−0,9729

A correlação entre os métodos de avaliação antioxidante foi, em sua maioria, negativa, principalmente no método de redução do radical DPPH. Entretanto, fortes correlações foram encontradas no açúcar VHP, entre o método de redução do radical DPPH e os teores de flavonóides e de fenólicos totais. Em contrapartida, no sistema β-CAL essas mesmas variáveis apresentaram correlações negativas. Fortes correlações positivas foram encontradas no xarope entre ácidos cinâmicos e também pelos fenólicos totais com o sistema β-CAL, r=0,9811 e 0,9794 respectivamente. No xarope também foram encontradas fortes correlações negativas entre o sistema β-CAL e os teores de flavonóides.

O método de análise por componentes principais (PCA) proporciona um estudo multivariado dos dados experimentais obtidos facilitando a visualização da correlação entre as amostras e variáveis. O peso dos componentes entre si foi definido pelas correlações lineares existentes entre as variáveis e foi expresso pelo autovalor de cada componente principal. A análise de componente principal foi

realizada sobre a matriz de dados composta de oito variáveis e oito extratos de produtos obtidos no processamento industrial da cana-de-açúcar. As concentrações dos derivados das três flavonas (apigenina, luteolina e tricina), dos derivados dos três ácidos cinâmicos (ácidos clorogênicos, cumárico e ferúlico) e os resultados dos dois estudos das atividades antioxidantes (redução do radical DPPH e sistema β-CAL) representaram as variáveis.

A Figura III.3 mostra o gráfico de escores da componente principal 1 *versus* os da componente principal 2. Estas duas componentes principais descrevem 85,09% da variância total dos dados. Dentre as componentes principais, a primeira explica 66,69% da variância total dos dados enquanto que a segunda componente principal, 18,41%. A primeira componente principal tem alta contribuição da concentração dos compostos polifenólicos, sendo responsável pela discriminação do extrato de mel. É interessante notar que a segunda componente principal separa a maioria das amostras em dois grupos, extratos eluídos com metanol e eluídos com metanol/hidróxido de amônio (extrato N). Os grupos também foram divididos conforme sua atividade antioxidante, mostrando a proximidade dos extratos N, com maiores teores de tricina e ácido clorogênico, com a avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de redução do radical DPPH.

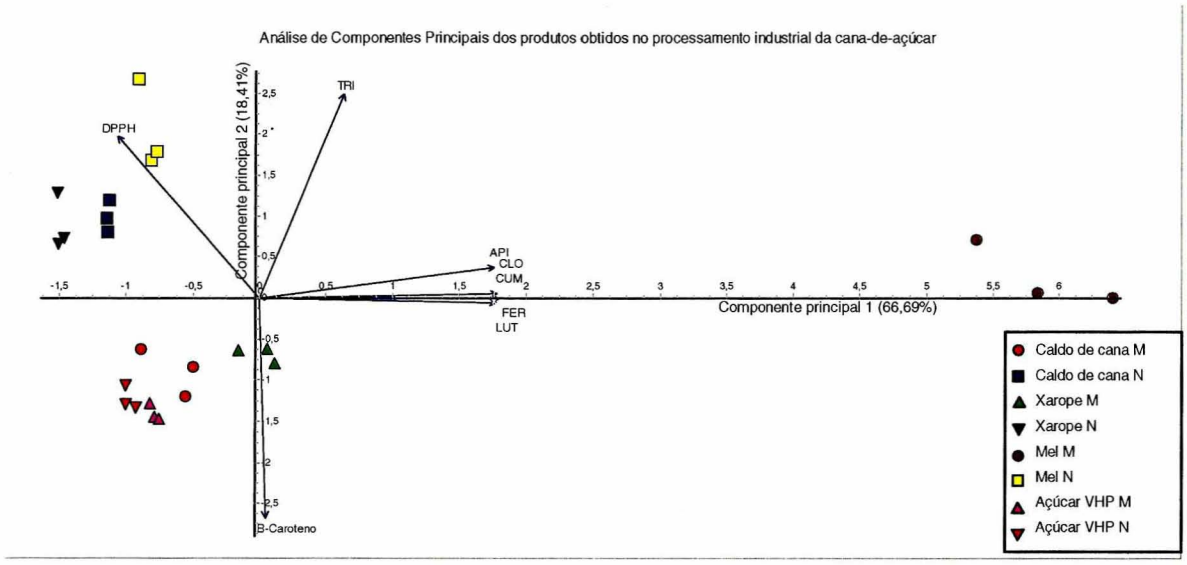


Figura III.3. Gráfico dos escores da componente principal 1 versus componente principal 2 dos produtos obtidos no processamento da cana-de-açúcar. API: apigenina; CLO: ácido clorogênico; CUM: ácido cúmárico; FER: ácido ferúlico; LUT: luteolina; TRI: tricina; DPPH: difenilpicrilhidrazila; B-caroteno: sistema β-caroteno/ácido linoléico.

III.4 CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos das variedades de cana-de-açúcar são constituídos basicamente por derivados de flavonas, luteolina, apigenina e tricina e por derivados dos ácidos cinâmicos, clorogênico, cinâmico e caféico. Os ácidos cinâmicos constituem o maior grupo dentre os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos dos produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar contêm derivados de flavonas, luteolina, apigenina e tricina e ácidos cinâmicos, clorogênicos, cinâmicos, ferúlico. As flavonas estão em maior concentração, destacando-se entre elas os derivados de tricina.

Ao longo do processamento para a concentração da sacarose, aumenta a concentração dos compostos fenólicos, mas na formação do açúcar VHP as perdas de compostos fenólicos são substanciais.

As atividades antioxidantes dos produtos diferem significativamente entre as amostras analisadas. Substâncias com estrutura semelhante podem diferir em sua atividade antioxidante, dependendo do método utilizado.

III.4.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, L.R; MORON JIMENEZ, M.J; RAMON, A.N.; AYALA GOMEZ, A. Determination of the antioxidant capacity of flavonoids in fruits and fresh and thermicaly treated vegetables. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 54, p. 89-92. 2004.

ALVES, M.R.P. Derivados de açúcar: internacionalização na cadeia produtiva do açúcar na segunda metade da década de 1990. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 1, p. 52-66, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. v. 28, p. 25-30, 1995.

BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Contribution of enzimic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, p. 257-261. 1994.

CAI, H.; STEWARD, W.P.; GESCHER, A.J. Determination of the putative cancer chemopreventive flavone tricin in plasma and tissues of mice by HPLC with UV-visible detection. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 518-522. 2005.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; HDJOKO, K.; HOSTETTMANN. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV- detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**. v.1082, p.51-59. 2005.

COSAN. **Produção de açúcar e álcool**. São Paulo: Cosan, 2002. 9p.

CUYCKENS, F.; CLAYES, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**. v.39, p.1-15. 2004.

CURTIN, J.H.; PATON, N.H. The quantitative analysis of phenolic acids from sugar liquors by High Performance Liquid Chromatography. In: International Society of Sugar Cane Technologist, Manila, 1979, **Proceedings**. Manila: Sugar Processing Research Institute, 1980, p. 1-9.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•.Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006. No prelo.

FABER, L.; CARPENTER, F.G. Plant pigments as colorants in cane sugar. In: Technical Session Cane Sugar Refining Research, Louisiana, 1971, **Proceedings**. Louisiana: Sugar Processing Research Institute, 1972, p. 21-31.

FOTI, M.; PIATELLI, M. BARATTA, M.T.; RUBERTO, G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.497-501. 1996.

HARBORNE, J.B.; HALL, E. Plant polyphenols – XII. The occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses. Phytochemistry, v. 3, p.421-428. 1964.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504. 2000.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A.; WILSON, K.L. Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian Cyperaceae. **Phytochemistry,** v.24, p.751-766. 1985.

HOPIA, A; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 139-144. 1999.

HSU, L.Y.; LIN, C.F.; HSU, W.C. HSU, W.L.; CHANG, T.C. Evaluation of polyphenolic acid esters as potential antioxidants. **Biological & pharmaceutical bulletin**. v. 28, n. 7, p.1211-1215. 2005.

HUDSON, E.A.; ANH DINH, P.; KOKUBUN, T.; SIMMONDS, M.S.J.; GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology Prevention**, v. 9, p. 1163-1170. 2000.

KUMAR, R.; NATEH, S.; JAGADISH, K.; SANYAL, P. Various techniques of syrup clarification in sugar industry. **Taiwan Sugar**, v. 39, 24-30. 1992.

MABRY, T.J.; LIU, Y.L.; PEARCE, J. New flavonoids from sugarcane (Saccharum). **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 127-130. 1984.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747. 2004.

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

MARTINS, N.G.S. Os fosfatos na cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; Universidade de São Paulo, 2004. 87p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**. v. 18, p. 193-215. 1979.

McGHIE, T.K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 107-112. 1993.

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

MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. **Journal of Food Science**, v. 69, p. C7-C10. 2004.

NAKASONE, Y.; TAKARA, K.; WADA, K.; TANAKA, J.; YOGI, S. Antioxidante compounds isolated from kokuto, non-centrifugal cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 1714-1716. 1996.

PAN, G.X.; BOLTON, J.L.; LEARY, G.J. Determination of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 5283-5288. 1998.

PATON, N.H. A method for the separation and identification of phenolic acids in sugar products. In: International Society of Sugar Cane Technologist, São Paulo, 1977, **Proceedings**. São Paulo: Sugar Processing Research Institute, 1978, p. 2635-2643.

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part I. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 99-108. 1992.

PATON, N.H.; DUONG, M.; Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part III. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 170-176. 1992.

PAYET, B.; SING, A.S.C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 53, p. 10074-10079. 2005.

SMITH, P; HALL, P. Sugar cane anthocyanins as colour precursors and phytoalexins. In: International Society of Sugar Cane Technologist, Louisiana, 1971, **Proceedings**. Loisiana: Sugar Processing Research Institute, 1972, p. 1139-1146.

TAKARA, K.; KINJYO, A.; MATSUI, D.; WADA, K.; NAKASONE, Y. YOGI, S. New antioxidative phenolic glycosides isolated from kokuto, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 29-35. 2002.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p.4989-4995, 2005.

VERHAGEN, H.; ARUOMA, O. I.; VAN DELFT, J. H. M.; DRAGSTED, L. O.; FERGUSON, L. R.; KNASMÜLLER, S.; POOL-ZOBEL, B. L.; POULSEN, H. E.; WILLIAMSON, G.; YANNAI, S. The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant, antimutagenic or anticarcinogenic potential of test substances in *in vitro* experiments and animal studies *in vivo*. **Food Chemical of Toxicology**, v. 41, p. 603-610. 2003.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London, The MacMillan Press, 1981. 335p.

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, p. 377-382, 1995.

Capítulo IV

CALDO DE CANA E RAPADURA: TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA

IV.1.INTRODUÇÃO

Entre os produtos da cana-de-açúcar minimamente processados, o caldo de cana e a rapadura são os mais consumidos pela população de países como Brasil, Colômbia, Cuba, Índia, Malásia, Austrália, Japão, entre outros (Nakasone *et al.*, 1996; Paton, 1992; Yusof *et al.* 2000).

Há uma grande demanda no mercado interno e externo por produtos naturais. Nutricionalmente, a rapadura é uma excelente fonte de energia, consistindo em uma boa fonte de minerais com relativo valor protéico e vitamínico. Pela sua composição, pode substituir com vantagens o açúcar cristal e refinado na alimentação dietética da família, como também ser usado na merenda escolar. O formato de mini-rapadura tem boa aceitação na alimentação escolar e por atletas. Economicamente, é considerado alimento de custo acessível tanto para a população rural como para a urbana (SEBRAE-MG, 2005). Embora a produção de rapadura no Brasil, em grande parte, ainda seja artesanal, há uma tendência em sua modernização, procurando padronizar a produção e o tipo da cana utilizada para esse fim. Algumas empresas possuem registro no Ministério da Saúde e até exportam seus produtos (Lima; Cavalcanti, 2001). Quanto ao caldo de cana, existem algumas iniciativas em prol de sua comercialização *in natura* através de liofilização e de pasteurização. Alguns dos principais problemas do processamento são relativos à cor, devido à reação de Maillard e/ou oxidação de compostos fenólicos (Palla, 1983; Bucheli & Robinson, 1994; Yusof *et al.* 2000).

O interesse por polifenóis, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos devido principalmente a suas propriedades biológicas, como antioxidantes e quimiopreventivos (Schaefer *et. al.* 2006;

Yang *et al.* 2006). A atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos é similar ou superior ao mais reconhecido antioxidante alimentar, vitamina E (Rice-Evans *et al.*, 1996; Hollman, 2001). Através da prevenção de danos oxidativos a estruturas celulares, os compostos fenólicos podem atuar como agentes quimiopreventivos (Kuo, 1997; Yao *et al.*, 2004). O aumento dos índices de cura de alguns tumores, em especial das neoplasias hematológicas, as quais não eram controladas pelo emprego da cirurgia ou radioterapia se deu em virtude da introdução da quimioterapia (Mans *et al.*, 2000). A avaliação das atividades citotóxicas de novas substâncias aumentou substancialmente com o aprimoramento da metodologia de cultura de células, no final dos anos 80. Essa metodologia permitiu o desenvolvimento de diversas linhagens celulares procedentes de tumores humanos, possibilitando uma técnica para triagem *in vitro* (Boyd, 1989).

Os objetivos deste trabalho foram de quantificar os teores de flavonóides e de ácidos cinâmicos do caldo de cana e da rapadura e de avaliar suas atividades antioxidantes e antiproliferativa *in vitro*.

IV.2 MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1. AMOSTRAS

As amostras de caldo de cana foram obtidas por meio de moenda elétrica, com prévia limpeza do sistema para obtenção apenas de representantes da extração mecânica do colmo da cana-de-açúcar. É comum encontrar o caldo de cana associado com abacaxi e limão, por esse motivo foram tomadas as devidas precauções. Quanto à rapadura, procurou-se obter amostras com rotulagem e registro no Ministério da Saúde.

IV.2.1.1 Amostras de caldo de cana

O caldo de cana foi obtido no comércio local (caldo de cana A - zona oeste e caldo de cana B – zona sul, São Paulo, SP) em agosto de 2004. A moenda foi previamente lavada com água e apenas o segundo litro obtido pela expressão do colmo da cana-de-açúcar, variedade SP 813250, foi coletado para este estudo. As amostras foram filtradas em *cheesecloth* e imediatamente transportadas até o laboratório sob refrigeração, onde foram imediatamente armazenadas em freezer a – 18 °C até o momento das análises.

IV.2.1.2 Amostras de rapadura

Foram adquiridas no comércio varejista amostras de rapadura fabricadas no segundo semestre de 2004. Duas provenientes do estado de Minas Gerais (A e B) e uma do estado da Paraíba (C). As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, sendo trituradas, em moinho de facas e homogeneizadas antes das análises.

IV.2.2 MÉTODOS

IV.2.2.1 Determinação de sólidos totais

A determinação de sólidos totais nas amostras foi realizada conforme o item III.2.2.1.

IV.2.2.2 Determinação e quantificação de flavonóides e ácidos cinâmicos

A extração por fase sólida com poliamida dos compostos fenólicos do caldo de cana e rapadura foi realizada de acordo com o item III.2.2.3. Extratos de caldo de cana e rapadura também foram obtidos por meio de extração com resina XAD-2 segundo item II.2.2.1. Esses extratos foram analisados por HPLC-DAD segundo item II.2.3.1 para efetuar sua quantificação. O índice de polifenólicos totais (IPT) foi obtido conforme os procedimentos descritos por Tsao e colaboradores (2003), utilizando como padrão ácido 5-cafeoilquínico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).

IV.2.2.3. Atividade antioxidante

Os extratos obtidos no item anterior, juntamente com tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo obtida no item II.2.2.2.1, foram analisadas quanto seu potencial antioxidante frente a dois métodos, sistema *β*-caroteno/ácido linoléico e redução do radical estável DPPH•, descritos no item III.2.2.4.

IV.2.2.4 Atividade antiproliferativa

Os extratos de caldo de cana e rapadura obtidos por meio de extração com resina XAD-2, segundo o item VI.2.2.2, foram concentrados sob pressão reduzida em rotavapor (RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em banho a 40°C, até remoção completa do solvente. Juntamente com tricina-7-O-β-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo, obtida no item II.2.2.2.1, foram submetidos à triagem *in vitro* com linhagens de células tumorais humanas de leucemia linfóide (K-562), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), mama (MCF-7), mama expressando fenótipo a múltiplas drogas (NCI-ADR), cólon (HT-29), ovário (OVCAR-3), rim (786-0) e próstata (PC-3), segundo a metodologia descrita na literatura. Essas linhagens foram cultivadas em RPMI com 5% de soro fetal bovino inativado, em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C e ambiente úmido. Como substância de referência, foi utilizada doxorrubicina nas concentrações de 25 x 10^{-2}, 25 x 10^{-1}, 25 e 250 µg/mL.

IV.2.2.4.1 Diluição e Aplicação das Amostras

Soluções estoques foram preparadas dissolvendo-se as amostras em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Para adição nas placas, as amostras foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina.

Para o teste de atividade, foram adicionados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Essas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido, para readaptação ao ambiente. Depois desse período, uma placa controle (T_0) foi fixada através da adição de 50 µL ácido tricloroacético a 50% (TCA) para determinação da quantidade de células no momento da adição dos

extratos. Nas demais placas, foram adicionados os extratos nas concentrações de 25 x 10^{-2}, 25 x 10^{-1}, 25, 250 µg/mL e incubadas por 48 horas. Após esse período, as placas de 96 compartimentos foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão (leucemia) e incubadas por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Essas placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

A seguir, as placas foram coradas pela adição de 50 µL do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por quatro vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (ELISA – Molecular Devices Versa Max Microplate Reader).

IV.2.2.4.2 Cálculos

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias, descontadas de seus respectivos brancos. Para avaliar o efeito dos extratos sobre o crescimento das células, três medidas foram obtidas no tempo zero (T_0) para todas as células no início da incubação e no final da incubação, controle (C) e teste (T) sem e com adição dos extratos, respectivamente.

Para valores de $T \geq T_0$ (atividade citostática) utilizou-se a fórmula $100 \times \left[\frac{T - T_0}{C - T_0}\right]$.

Para valores de $T < T_0$ (atividade citocida) utilizou-se a fórmula $100 \times \left[\frac{T - T_0}{T_0}\right]$.

Os valores de IC_{50} (concentração do extrato necessária para inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por analise de regressão não linear. As porcentagens de inibição de crescimento foram estimadas indiretamente por meio do número de células coradas pelo SRB (Skehan *et al.*, 1990; Fátima *et al.* 2006).

IV.3.2. Análise de resultados

Os resultados obtidos neste estudo são paramétricos, sendo expressos como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, OK, E.U.A.). Os testes escolhidos foram Análise de Variância de uma via (One-Way ANOVA) e constatando-se diferenças, foi aplicado o teste post hoc Newman-Keuls, para precisar as diferenças estatísticas. O nível de significância adotado foi de: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$. Quando necessário, foram

determinadas as correlações paramétricas dos dados. O nível de significância foi estabelecido como: 0 a 0,6 - correlação nula ou inexistente, 0,61 a 0,8 - moderada e 0,81 a 1 - forte. A Análise de Componente Principal (PCA) foi realizada utilizando-se o programa Fitopac versão 1.5.

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1. Teor de sólidos totais das amostras de caldo de cana e rapadura

De acordo com a Tabela IV.1, as amostras de caldo de cana apresentaram os mesmos teores de sólidos totais. Esse teor é superior ao encontrado no caldo misto, uma vez que na usina utiliza-se o processo de embebição para se extrair ao máximo a sacarose (Tabela III.1). O caldo de cana utilizado no processamento industrial do açúcar é proveniente de uma mistura de variedades de cana-de-açúcar. Para as indústrias sucroalcooeiras, as variedades são selecionadas pelo teor de sacarose e resistência a doenças, entre outros critérios. Já as variedades utilizadas para fins de extração do suco para o consumo direto, além de se buscar exemplares com grandes teores de sacarose, são requisitos também, colmos mais uniformes e macios (MATSUOKA *et al.* 1999).

Tabela IV.1. Teores de sólidos totais, grau Brix e fenólicos totais de caldo de cana e rapadura.

Produtos	% de sólidos totais[1]	°Brix[1]
caldo de cana A	23,5 ± 0,1	19,5 ± 0,7
caldo de cana B	23,5 ± 0,4	21,2 ± 0,4
rapadura A	97,7 ± 0,2	n.a.
rapadura B	97,5 ± 0,2	n.a.
rapadura C	96,9 ± 0,6	n.a.

[1]Resultados expressos como média ± desvio padrão da média de três replicatas. n.a.: não analisado.

As amostras de rapadura apresentaram teores de sólidos totais muito próximos. Como produto obtido através da concentração do caldo de cana-de-açúcar, a rapadura

apresenta teor de sólidos totais 75% maior que o caldo (Tabela IV.1). Para a produção de rapaduras, deve-se utilizar cana recém cortada e em fase madura, com no mínimo 18° Brix. O ponto de maturação da cana, culminante em relação ao conteúdo de sacarose na cana, está entre 22° e 23° Brix. A idade da cana influi diretamente no rendimento e qualidade da rapadura. Colmos jovens apresentam altos teores de umidade e de açúcares redutores. Açúcares redutores, em quantidades acima do normal, dificultam a solidificação da rapadura, reduzem o rendimento e causam escurecimento. Colmos envelhecidos entram em processo vegetativo, reduzindo o teor de sacarose que se transformam em açúcares redutores, utilizados para novo desenvolvimento vegetativo. Nessa etapa, também ocorre a formação de fibras, que reduzem o rendimento e dificultam a moagem (SEBRAE-MG, 2005). Assim, as amostras coletadas para este estudo estavam no seu estágio maduro e com teor satisfatório para o consumo ou como matéria prima para a rapadura.

IV.3.4. Perfil dos compostos fenólicos das amostras de caldo de cana e rapadura

Os extratos obtidos pela extração em fase sólida com poliamida foram denominados **M**, quando obtidos por eluição com metanol e **N**, quando obtidos com metanol:hidróxido de amônio. Na análise por CLAE-DAD, esses extratos mostraram cromatogramas distintos. Tanto o caldo de cana quanto a rapadura apresentaram a maioria dos picos no extrato **M**, enquanto que no extrato **N**, poucos picos foram apresentados, os mais intensos referentes a tricina (Figura IV.1).

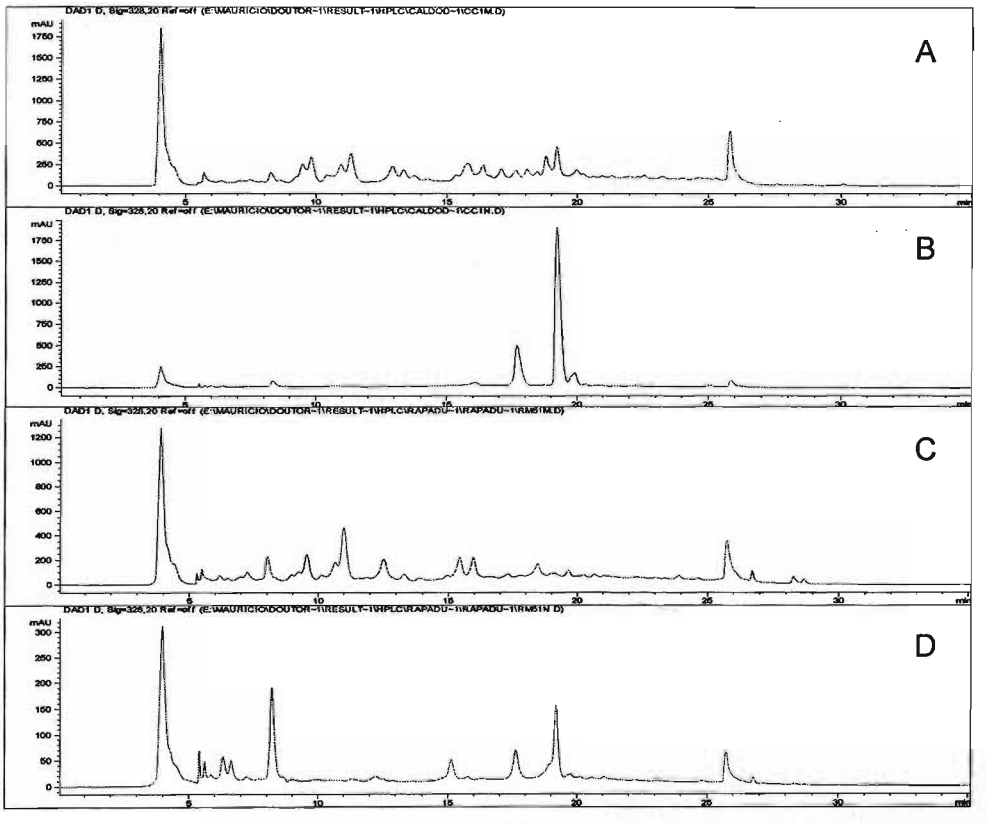


Figura IV.1: Cromatogramas CLAE-DAD de extratos de caldo de cana (A e B) e rapadura (C e D). Extratos metanólicos: A e C; extratos em metanol:hidróxido de amônio B e D.

O perfil de compostos fenólicos do caldo de cana é formado basicamente por flavonas (derivados de apigenina, luteolina e tricina) e isômeros do ácido clorogênico (Figura IV.2). Embora as amostras tenham sido obtidas em diferentes estabelecimentos

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

comerciais, ambas as amostras são resultados da expressão de colmos da variedade SP813250 resultando em um mesmo perfil de compostos fenólicos. Entretanto, as amostras de caldo de cana diferem das amostras de caldo misto (CM) obtidas pelo processamento industrial do açúcar, qualitativa e quantitativamente (Figura III.2). O caldo misto do presente estudo é resultado da expressão de colmos de três variedades diferentes, entre elas a SP813250. No caldo misto há presença de derivados de ácido cumárico e ferúlico entre os ácidos cinâmicos, inexistentes no caldo de cana vendido no varejo. Além disso, o caldo misto apresenta teor de derivados de apigenina 74% superior ao encontrado nas amostras de caldo de cana. Os derivados de luteolina são 81% mais abundantes no caldo de cana do que no caldo misto. Os teores de derivados de tricina e isômeros do ácido clorogênico são similares para ambas as amostras. É presumível que o processamento industrial com o objetivo de extrair exaustivamente a sacarose existente no colmo da cana-de-açúcar favorece, concomitantemente, a extração de compostos fenólicos. Outros compostos fenólicos já foram relatados para cana-de-açúcar. No capítulo II, mencionamos duas substâncias metoxiladas, tricina-7-*O*-*β*-(6"-*p*-metoxicinamato)-glucosídeo e 3-hidroxi-1-[4,5-dihidroxi-3-metoxifenil]-2-[4-(3-hidroxi-1-(E)-propenil)-2,6-dimetoxifenoxi]-propil-β-D-glucopiranosídeo e uma flavona *C*-glicosilada, a orientina. Paton & Duong (1992), mencionam que os principais flavonóides do caldo de cana-de-açúcar australiano são derivados de apigenina e tricina, que não possuem grupos *O*-dihidroxílicos, ou são éteres metílicos de luteolina. Essas autoras comentam que, esses compostos não participam como substrato no escurecimento enzimático. Colombo e colaboradores (2005) destacam a presença de flavonas metoxiladas em folhas e bagaço de cana-de-açúcar, como tricina e diosmetina.

Nas amostras de caldo de cana, o único ácido cinâmico detectado foi o clorogênico. Esse ácido tem pouca expressão no caldo, com teores próximos ou menores que os derivados de apigenina, representando entre 6 e 9% do total de compostos detectados. Na rapadura, os teores desse ácido são mais expressivos, sendo superiores aos encontrados nos derivados de tricina e demais ácidos cinâmicos, cuja proporção ultrapassa os 19% do total de compostos fenólicos (Figura IV.2). A atuação da enzima PFO no caldo de cana deve ter sido reduzida pelo fato de se preservar a amostra com refrigeração até o momento de análise. Na produção da rapadura, o caldo de cana é diretamente colocado nos tachos para concentração. A temperatura elevada, provavelmente promove a inativação da enzima e a conseqüente concentração promove o aumento no teor do referido ácido (Buchelli & Robinson, 1994).

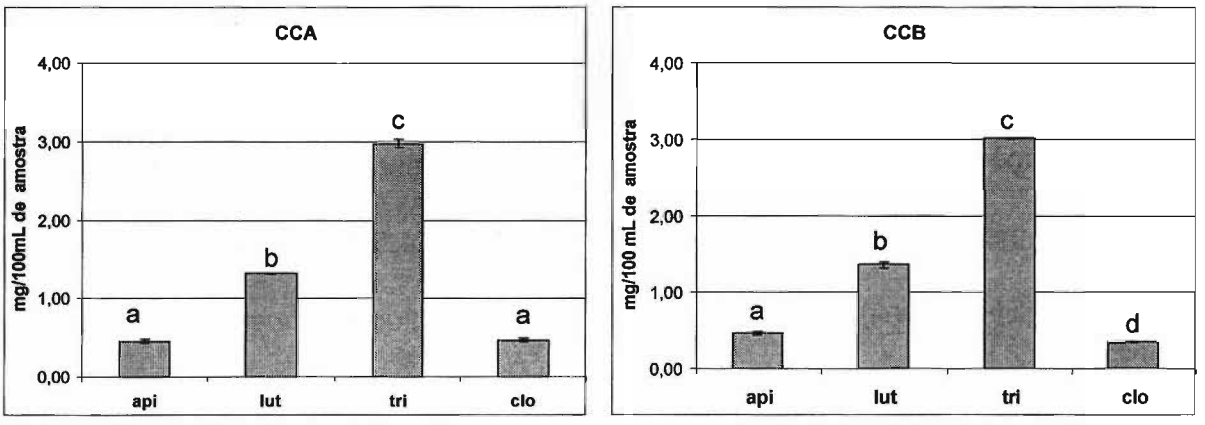


Figura IV.2. Teores dos compostos fenólicos de caldo de cana em base úmida determinados por CLAE-DAD. api: derivados de apigenina; lut: derivados de luteolina; tri: derivados de tricina; clo: isômeros do ácido clorogênico. Médias e desvios padrões de seis replicatas. Letras iguais não diferem significativamente ($p<0,05$).

Os compostos fenólicos da rapadura são derivados das mesmas flavonas do caldo de cana, mas além dos isômeros de ácido clorogênico foram detectados

derivados de ácidos caféico, cumárico e ferúlico (Figura IV.3). A rapadura **A** apresenta grandes teores de derivados de luteolina. Os teores de derivados de apigenina são superiores aos de tricina, que por sua vez são inferiores aos dos isômeros do ácido clorogênico. Esse perfil difere do apresentado pela rapadura **B**, cujos derivados de apigenina são os de maior intensidade. O baixo teor nos derivados de ácido caféico também é observado na amostra **B**, que em contrapartida mostra um alto teor de isômeros de ácido clorogênico. O ácido caféico é componente do ácido clorogênico. Através de ação enzimática, pode ocorrer a diminuição no teor de um, correlacionado ao aumento do outro (Clifford, 2000). Na amostra **C**, os teores de ácido clorogênico são os mais altos entre as amostras analisadas, correspondendo a 29% do total de compostos fenólicos. Nessa amostra, também é presenciado um pico de um derivado do ácido ferúlico (Figura IV.4), não detectado nas demais amostras. O ácido ferúlico é encontrado em quantidades substanciais e principalmente esterificado a polissacarídeos nas paredes celulares de Poaceae e Chenopodiaceae (Wallace & Fry, 1994). A amostra **B** apresenta o maior teor de fenólicos totais dentre as amostras, sendo cerca de três vezes maior que a amostra **A** e oito frente à amostra **C**. As diferenças entre as amostras podem ser devidas à purificação do produto, uma vez que não existem normas para esse procedimento. Alguns produtores adicionam substâncias para reduzir a cor originada pelo escurecimento enzimático dos polifenóis (Buchelli & Robinson, 1994; SEBRAE-MG, 2005). Esses aditivos podem interferir no perfil de algumas amostras, adicionando outros compostos fenólicos ou ainda aumentando a concentração dos já existentes.

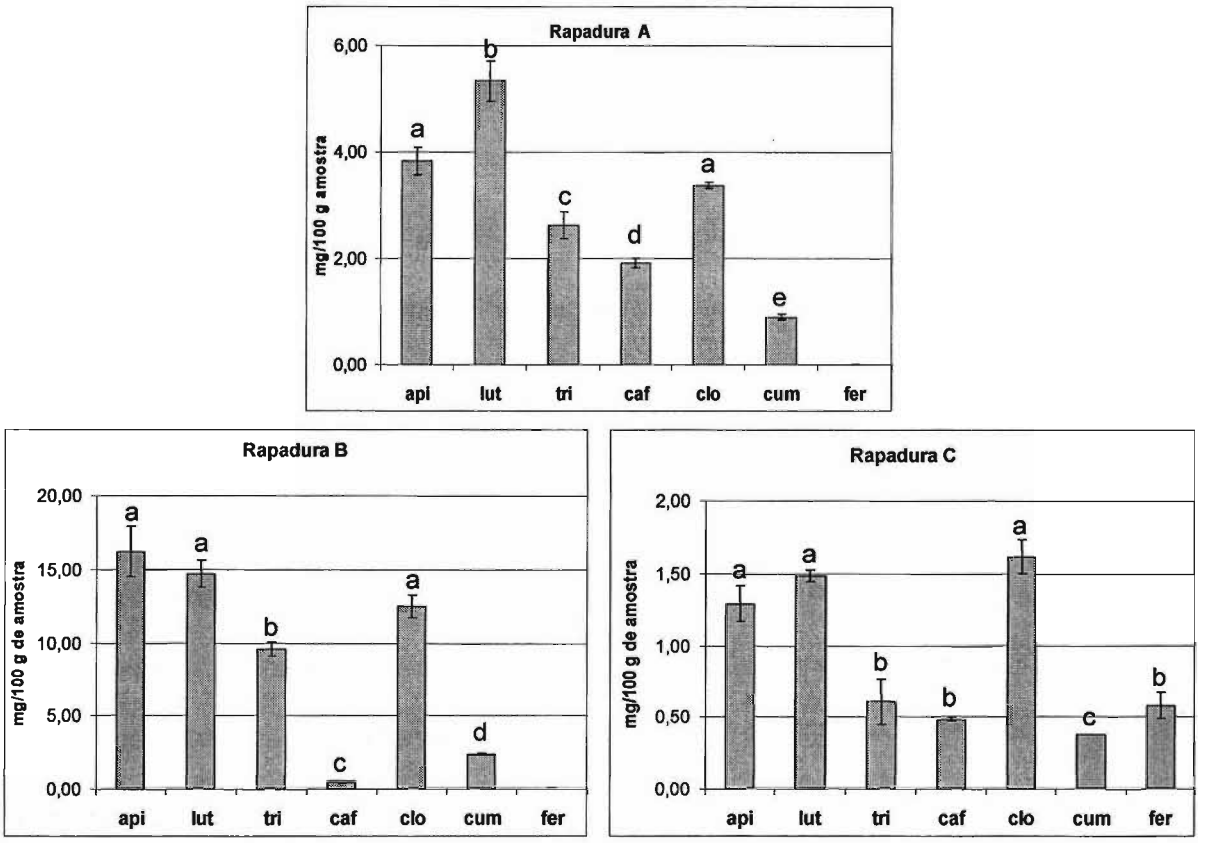


Figura IV.3. Teores dos compostos fenólicos de rapadura em base úmida obtidos por CLAE-DAD. api: derivados de apigenina; lut: derivados de luteolina; tri: derivados de tricina; caf: derivados do ácido caféico; clo: isômeros do ácido clorogênico; cum: derivados do ácido cumárico; fer: derivados do ácido ferúlico. Médias e desvios padrões de seis replicatas. Letras iguais não diferem significativamente ($p<0,05$).

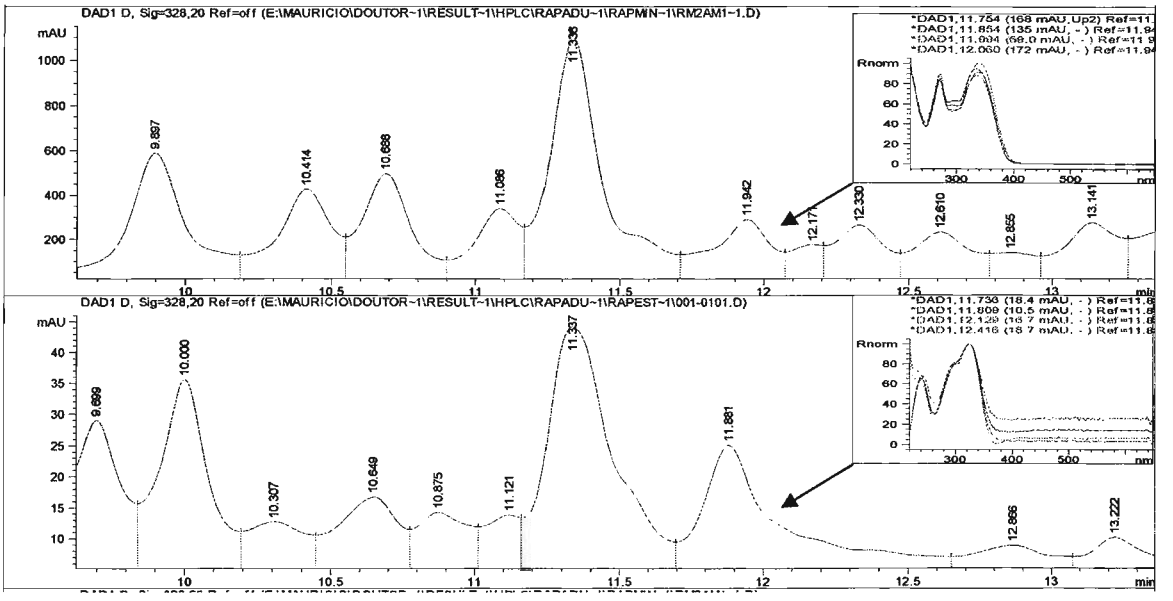


Figura IV.4: Cromatogramas dos extratos de rapadura (A) e rapadura (B) obtidos por CLAE-DAD em 328 nm. Detalhe dos espectros de apigenina e ácido ferúlico para picos com mesmo tempo de retenção.

Os extratos obtidos com a resina XAD2 mostram um perfil que agrega todos os compostos fenólicos, observado através do cromatograma obtido por CLAE-DAD (Figura IV.5). A grande vantagem da resina XAD2 sobre a poliamida foi a extração desses compostos em grandes quantidades, e também a possibilidade de sua reutilização para uma nova extração.

Para avaliação do total de compostos polifenólicos utilizou-se a metodologia proposta por Tsao e Yang (2003), por entender que o método utilizando o reagente Folin-Ciocalteu possui muitos interferentes, como por exemplo, os açúcares redutores comuns aos produtos de cana-de-açúcar. A amostra de caldo de cana **A** apresentou 162 mg equivalentes a concentração do ácido clorogênico (EAC)/L de amostra com pico mais intenso correspondente a um derivado de tricina

(Figura IV.5-A). A rapadura **B** apresentou 31,4 g EAC/Kg de amostra, cujo maior pico corresponde a um derivado de luteolina (Figura IV.5-B).

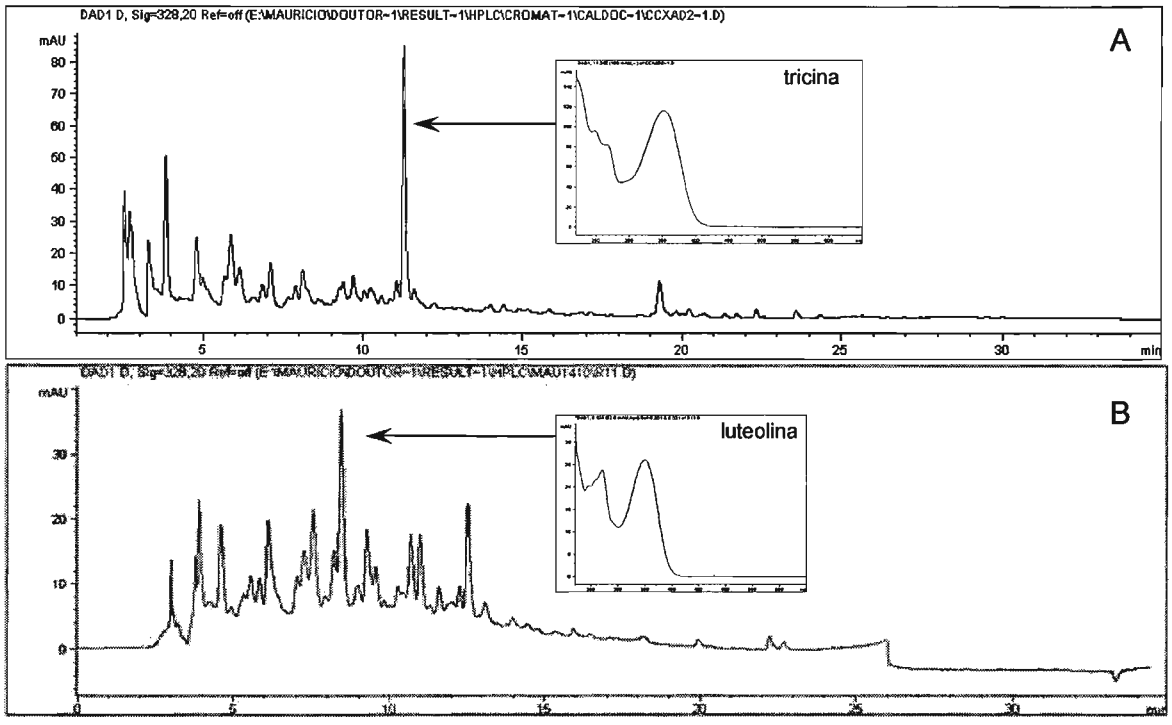


Figura IV.5. Cromatogramas dos extratos de caldo de cana (A) e rapadura (B) obtidos por CLAE-DAD por meio de resina XAD2. Detalhe dos espectros de tricina e luteolina, correspondentes aos picos indicados pelas setas.

IV.3.4. Atividade antioxidante

Os extratos obtidos por meio de extração em fase sólida com poliamida em dois sistemas de solventes e os extratos obtidos com resina XAD2 do caldo de cana e rapadura foram submetidos à avaliação de suas atividades antioxidantes por meio do método de redução de radicais livres. Os extratos obtidos com o uso da poliamida, por meio de extração em fase sólida, apresentaram perfis distintos quando eluídos com solventes diferentes como já discutidos anteriormente. Assim, foram submetidos à análises individuais de sua atividade. Além dos extratos acima mencionados, avaliou-se a atividade da substância isolada a partir do caldo de cana, tricina.

IV.3.3.2. Redução de radicais livres (DPPH•)

De acordo com a Tabela IV.2, os extratos obtidos com metanol/hidróxido de amônio (N) tendem a apresentar atividades superiores aos extratos obtidos com metanol (M). Esses resultados são corroborados com os obtidos pelos produtos da cana-de-açúcar por processamento industrial (capitulo III), evidenciando que os extratos contendo derivados de tricina tem forte atuação como antioxidante. Tricina apresentou atividade 56% superior ao padrão trolox. Somente o extrato de rapadura A-M ficou abaixo do padrão, apesar de sua concentração ser a maior dentre os compostos analisados. As amostras obtidas com a resina XAD2 apresentaram praticamente a mesma atividade redutora, apesar de concentrações distintas. A rapadura **A** apresentou a melhor resposta em função de sua concentração e o menor desempenho ficou com o extrato da rapadura C-M, com 32,73% de redução do radical livre DPPH•.

Tabela IV.2. Determinação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH•[1] de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.

Amostras[2]	% redução do DPPH•[3]
Caldo de cana A (M) (410 μM EAC)	76,64 ± 1,13
Caldo de cana A (N) (330 μM EAC)	77,50 ± 1,91
Rapadura A (M) (580 μM EAC)	68,72 ± 0,26
Rapadura A (N) (45 μM EAC)	71,92 ± 1,86
Rapadura C (M) (48 μM EAC)	32,73 ± 1,79
Rapadura C (N) (45 μM EAC)	42,64 ± 1,08
Caldo de cana XAD2 (150 μM EAC)	42,07 ± 1,86
Rapadura XAD2 (50 μM EAC)	42,02 ± 3,21
tricina (140 μM)	77,50 ± 0,57
trolox (80 μM)	33,72 ± 0,97

1: DPPH• – difenilpicrilhidrazila. 2: Concentração de produtos da cana-de-açúcar expressos em equivalentes a concentração do ácido clorogênico – (EAC). 3: resultados expressos como média ± desvio padrão da média de três replicatas.

IV.3.3.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL)

A Tabela IV.2 mostra a atividade antioxidante dos compostos fenólicos de caldo de cana e rapadura, extraídos em poliamida e XAD2, e de tricina, isolada do caldo de cana. Observou-se que os extratos obtidos com metanol/hidróxido de amônio (N) apresentaram, nesse modelo, atividades próximas aos extratos obtidos com metanol (M). Esse resultado é, no geral, análogo aos obtidos pelos produtos da cana-de-açúcar por processamento industrial (capítulo III), cujas amostras obtidas com metanol/hidróxido de amônio (N) apresentaram maiores atividades. Entretanto, essas

diferenças podem ser atribuídas ao fato de os extratos não se encontrarem em mesma concentração e também ao perfil individual de cada extrato.

Tabela IV.2. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.

Amostras[1]	% inibição[2]
Caldo de cana A (M) (410 μM EAC)	69,78 ± 4,28
Caldo de cana A (N) (330 μM EAC)	51,33 ± 2,69
Rapadura A (M) (580 μM EAC)	55,32 ± 0,66
Rapadura A (N) (45 μM EAC)	56,84 ± 2,87
Rapadura C (M) (48 μM EAC)	56,82 ± 1,32
Rapadura C (N) (45 μM EAC)	38,83 ± 4,16
Caldo de cana XAD2 (150 μM EAC)	49,43 ± 3,71
Rapadura XAD2 (50 μM EAC)	47,91 ± 2,63
tricina (140 μM)	69,77 ± 1,98
trolox (80 μM)	67,87 ± 1,32

1: Concentração de produtos da cana-de-açúcar expressos em equivalentes a concentração do ácido clorogênico – (EAC). 2: resultados expressos como média ± desvio padrão da média de três replicatas.

A maior atividade foi apresentada pelo extrato de caldo de cana (M). Com cerca de 70% de inibição, foi o único extrato que superou a substância de referência, excetuando-se a tricina (Tabela IV.2). O extrato CCA (N) apresentou concentração 20% inferior e inibiu 51% da co-oxidação do β-caroteno pelo ácido linoléico. A menor atividade foi apresentada pela rapadura C (N), ficando 32% abaixo de seu correspondente obtido por eluição em metanol (M). Ambas amostras tiveram

comportamento inferior ao apresentado pelo padrão. As amostras de rapadura A (M e N) e rapadura C (M) mostram mesma atividade, embora em concentrações desiguais.

O caldo de cana e a rapadura, ambos extraídos com a resina XAD2, apresentaram atividades muito próximas, entretanto abaixo do padrão. O caldo de cana XAD2 teve comportamento similar ao extrato de poliamida, ambos em concentrações altas, mas com atividades medianas. O mesmo aconteceu com a rapadura, ambos extratos, XAD2 e poliamida obtiveram resultados medianos em baixas concentrações. Os compostos fenólicos da cana-de-açúcar também podem atuar como antioxidante em modelos *in vivo*. Compostos fenólicos do caldo de cana atuam sobre a intoxicação induzida por cloreto de metil-mercúrio, retardando a mortalidade e reduzindo o ganho de peso de animais intoxicados (Duarte-Almeida *et al.* 2005).

A tricina teve atuação superior ao trolox, embora em maior concentração. Apesar de sua estrutura estar envolta de grupos metoxilas, neste sistema há uma razoável atuação no bloqueio das atividades oxidantes do ácido linoléico. Isso também é observado nas amostras CCA-N, cujo perfil é composto por altas percentagens de tricina. Pelo fato de não apresentar duas hidroxilas vicinais em um mesmo anel fenólico, era de se esperar uma atividade antioxidante inexpressiva. De acordo com a literatura essas duas hidroxilas conferem propriedades antioxidantes superiores a outros compostos que apresentam apenas uma hidroxila no anel fenólico (Foti *et al.*, 1996; Yang *et al.* 2001).

IV.3.4. Atividade antiproliferativa dos compostos fenólicos do caldo de cana, rapadura e tricina

Os extratos obtidos por meio de extração com resina XAD2 do caldo de cana e rapadura foram submetidos à avaliação de suas atividades antiproliferativa *in vitro*. Além dos extratos acima mencionados, avaliou-se a atividade da substância isolada a partir do caldo de cana, o derivado de tricina. Como controle positivo foi utilizada doxorrubicina, uma droga pertencente ao grupo das antraciclinas com eficácia terapêutica comprovada em vários tumores malignos (Schmitt *et al.* 1995).

A Figura IV.6 mostra a curva concentração-resposta da doxorrubicina, utilizada como padrão positivo, sobre as linhagens celulares. O padrão utilizado apresentou, na concentração de 2,5 g/mL, atividade citostática para a maioria das linhagens celulares e citocida para linhagens de ovário (OVCAR), de pulmão (NCI-460) e de melanoma (UACC-62). Na concentração de 25 g/mL foi citocida para as linhagens de próstata (PCO-3) e de rim (786-0). Na concentração máxima foi citocida para as linhagens de mama (MCF-7), de mama resistente (NCI-ADR) e de cólon (HT-29).

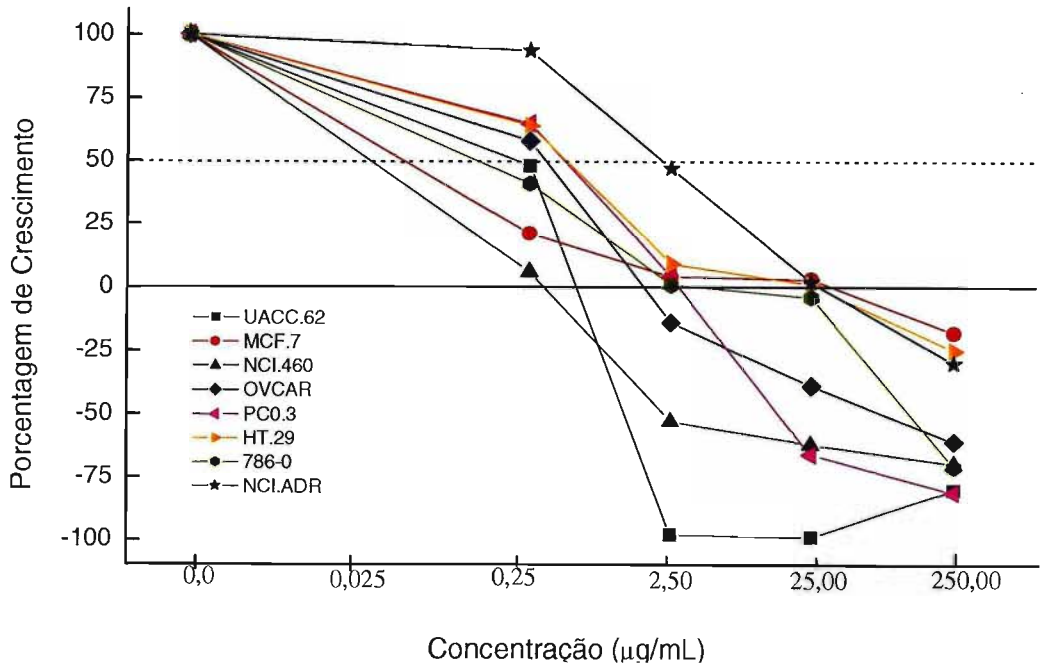


Figura IV.6. Curva concentração-resposta da Doxorrubicina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da droga utilizada.

A atividade antiproliferativa do extrato de caldo de cana sobre as linhagens celulares está representada na curva concentração-resposta da Figura IV.7. A análise da curva demonstrou que esse extrato apresenta atividade citostática, inibição de crescimento (abaixo de 50%), em algumas linhagens celulares como melanoma (UACC-62) e mama (MCF-7), na concentração de 250 μg/mL.

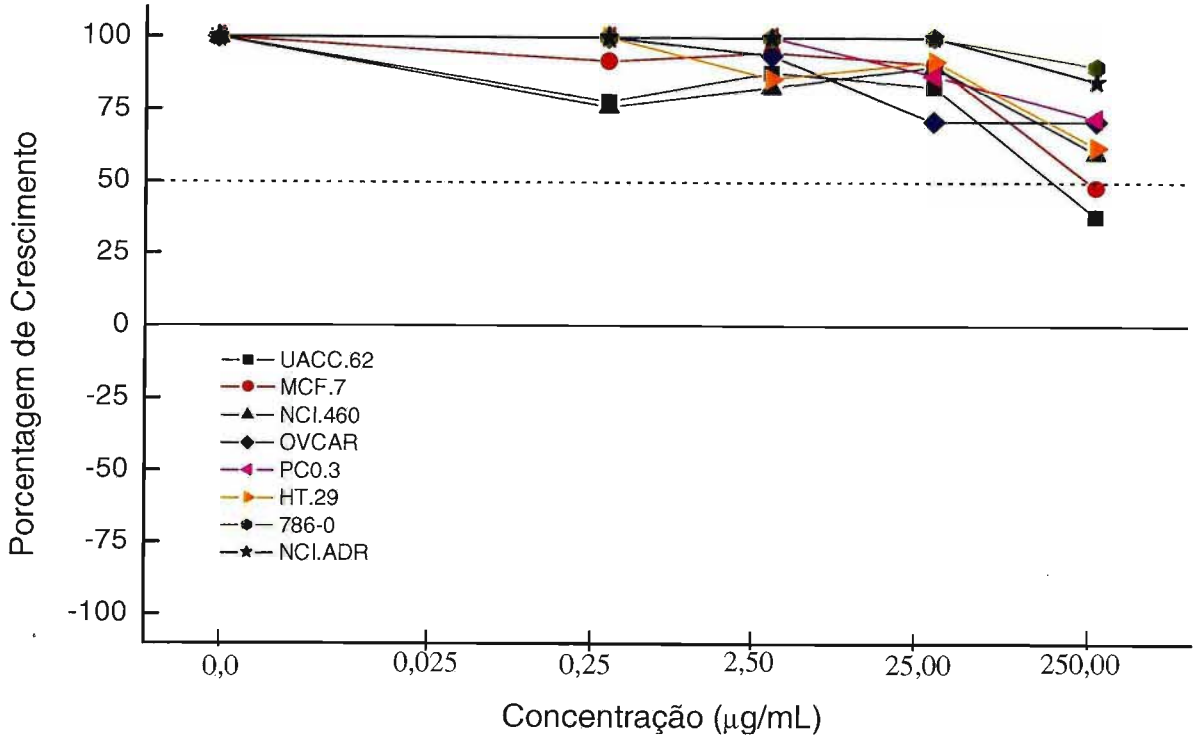


Figura IV.7. Curva concentração-resposta de caldo de cana sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra utilizada.

A Figura IV.8 representa a curva concentração-resposta do extrato de rapadura sobre as linhagens celulares. Esse extrato demonstrou atividade citostática na concentração de 25 μg/mL, para as linhagens de melanoma (UACC-62), de ovário (OVCAR) e de mama resistente (NCI-ADR), e citocida para todas as linhagens celulares com exceção da linhagem de mama resistente (NCI-ADR) que demonstrou atividade citostática na concentração máxima.

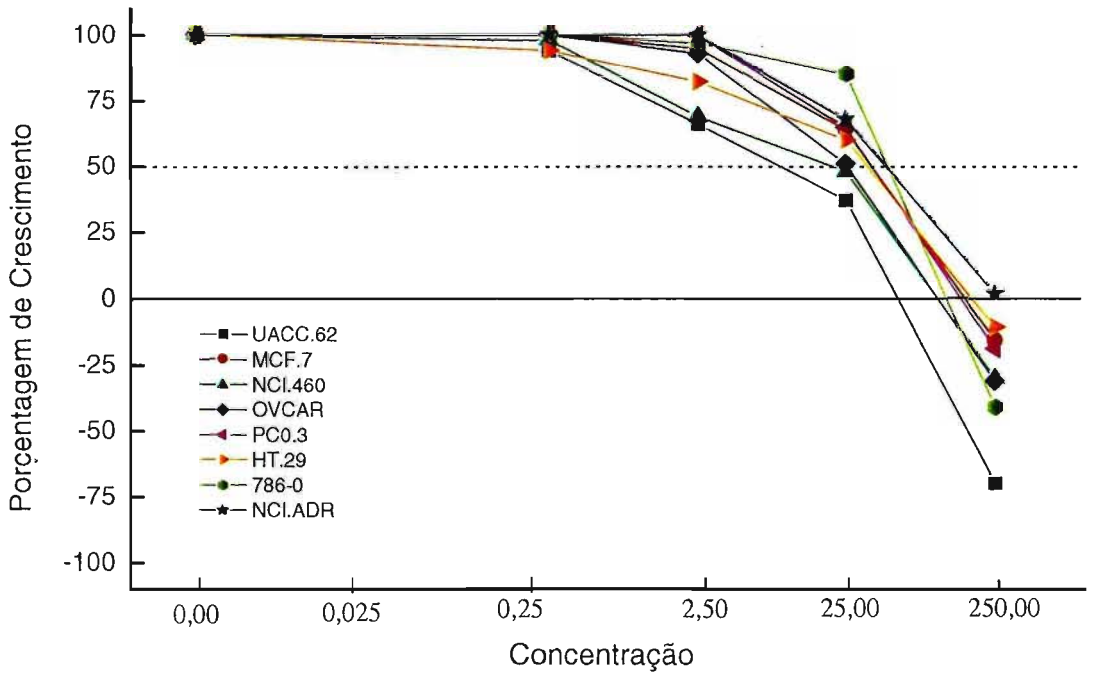


Figura IV.8. Curva concentração-resposta de rapadura sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra utilizada

A Figura IV.9 representa a curva concentração-resposta de tricina sobre as linhagens celulares. Este analito proporcionou atividade citostática, na concentração de 25 μg/mL, para as linhagens de cólon (HT-29) e de mama (MCF-7), e quando na concentração de 250 μg/mL, apresentou atividade citostática para linhagens de mama resistente (NCI-ADR) e de cólon (HT-29), e citocida para as linhagens de pulmão (NCI-460), de mama (MCF-7), de ovário (OVCAR), de rim (786-0) e de melanoma (UACC-62).

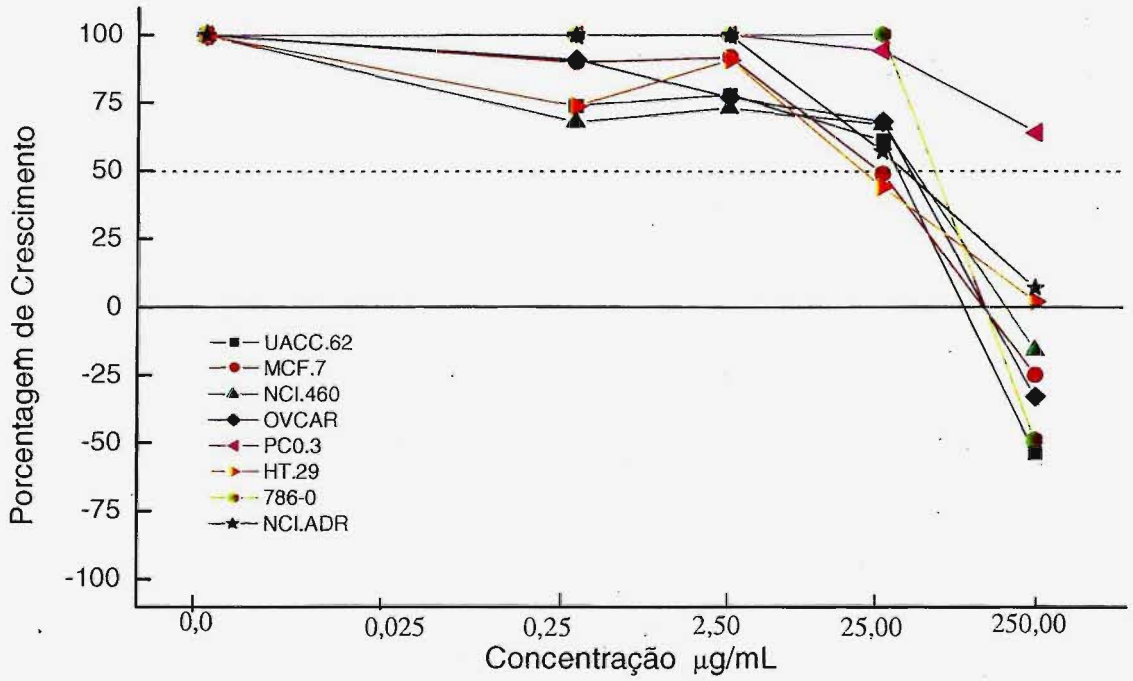


Figura IV.9. Curva concentração-resposta de tricina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra utilizada.

As amostras analisadas apresentaram atividades moderadas, entretanto com resultados promissores. O extrato de caldo de cana exibiu atividades citostáticas (inibição do crescimento) para as linhagens de melanoma (UACC-62) e de mama (MCF-7). Entretanto, a rapadura mostra atividades citostáticas para todas as linhagens e citocidas para a maioria das linhagens em maior concentração.

Tricina, isolada do caldo de cana, também teve boa atuação como antiproliferativo de células neoplásicas. Sua atuação foi semelhante a da rapadura, com atuação citocida para grande parte das linhagens de células. Compostos polifenólicos como os flavonóides, presentes em vegetais, frutas e outras ervas medicinais, parecem prevenir o câncer através de ação antioxidante, atuando também nas fases de iniciação, promoção e progressão do tumor (Yang et al., 2001).

As atividades antiproliferativas dos extratos de caldo de cana e de rapadura foram inferiores aos do padrão doxorrubicina. Esse fármaco é um eficaz agente quimioterápico, sendo utilizado largamente tanto no tratamento de leucemias e linfomas, como também em muitos tumores sólidos. Possui como mecanismo de ação a capacidade de se ligar ao DNA, inibindo tanto a sua síntese quanto a de RNA, mas sua principal ação parece ser mediada por um efeito sobre a topoisomerase II, enzima associada à condensação do DNA. A doxorrobicina intercala-se ao DNA e estabiliza o complexo DNA-Topoisomerase II, fazendo com que o ciclo celular cesse nesse ponto (Epstein, 1998). Certos flavonóides podem inibir as enzimas de manutenção do DNA, topoisomerase IB (topo I) e topoisomerase II (topo II). Webb & Ebeler (2004) destacam que, entre trinta e quatro compostos polifenólicos, a orientina foi o mais deletério à topoisomerase I e um moderado intercalador. O perfil dos compostos fenólicos do caldo

de cana é constituído por ácidos fenólicos e flavonas, dentre as quais destaca-se uma luteolina *C*-glicosilada, orientina (capítulo II). A baixa atuação dos produtos obtidos da cana-de-açúcar, embora contendo compostos que podem atuar significativamente, deve estar relacionada à baixa concentração destes entre os demais compostos fenólicos.

O caldo de cana apresenta tricina como o flavonóide de maior abundância, enquanto que na rapadura predominam os derivados de apigenina e luteolina, com alternância entre estes. A tricina é uma flavona com substituições no anel B iguais à do ácido sinápico, e está presente em trigo cultivado e selvagem (Cooper *et al.* 1994), arroz (Hudson *et al.*, 2000), cyperaceae (Harborne *et al.* 1985), Artemisia (Liu; Mabry 1981; 1982), entre outros. Lee e colaboradores (1981) e Hudson e colaboradores (2000) relatam sobre as atividades quimiopreventivas de tricina, além de atividades antileucêmicas. Hudson e colaboradores (2000) sugerem que a baixa proporção de câncer de cólon e de mama na população dos países orientais está relacionada à dieta que tem o arroz como base. Todavia, a concentração de tricina na composição do arroz é muito inferior à encontrada no caldo de cana. Os resultados aqui apresentados mostram atuação considerável do derivado de tricina isolado do caldo de cana. Entretanto, a literatura relata a atuação de tricina como aglicona, enquanto que os resultados aqui apresentados são relativos ao glicosídeo acilado. Apesar da forma glicosilada poder ocasionar impedimento estrutural, o analito obteve resultados similares a sua aglicona, como por exemplo, a atividade sobre linhagens de células tumorais de cólon e de mama, relatados por Hudson e colaboradores (2000) para a tricina.

IV.3.5. Análise multivariada

A Tabela IV.4 mostra as correlações estabelecidas entre os Índices de Polifenólicos Totais (TPI) das amostras de rapadura, caldo de cana e derivado de tricina isolado do caldo de cana com as atividades antioxidantes realizadas no sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL) e no método de redução do radical DPPH, assim como a correlação entre os dois métodos de avaliação de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos extratos de caldo de cana avaliados pela redução do radical DPPH mostrou moderadas correlações negativas com o TPI (r= −0,7584 e −0,7306). Moderadas correlações (r= −0,7406) também foram observadas entre o TPI e o sistema β-CAL para o extrato obtido por eluição com metanol/hidróxido de amônio (extrato N).

O extrato de rapadura A, obtido por eluição com metanol (extrato M), apresentou fortes correlações negativas (r= −0,8606 e −0,8660) entre o TPI e ambos os métodos de avaliação antioxidante. Entretanto, no extrato N, fortes correlações positivas foram detectadas entre TPI e a avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β-CAL (r=0,8660). Com relação à rapadura C, há correlações positivas (r= 0,8794 e 0,3944) para ambos extratos (M e N) entre o TPI e o método de redução do radical DPPH enquanto que, estas correlações são fortes e negativas quando o método de avaliação é o do sistema β-CAL. No sistema β-CAL, os extratos M e N de rapadura C apresentaram correlações negativas com o TPI.

Tabela IV.4: Correlação entre o Índice de Polifenólicos Totais (TPI), atividade de redução do radical DPPH e atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico (β-CAL) de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.

Amostras	TPI x DPPH	TPI x β-CAL	DPPH x β-CAL
caldo de cana M	−0,7584	0,1707	0,5127
caldo de cana N	−0,7306	−0,7406	0,0823
rapadura A M	−0,8606	−0,8660	0,5000
rapadura A N	0,5960	0,8660	0,9177
rapadura C M	0,8794	−0,9813	−0,9547
rapadura C N	0,3944	−0,9948	−0,2993
caldo de cana XAD2	−0,3974	−0,8874	0,4377
rapadura XAD2	0,4308	−0,7559	0,2651
derivado de tricina	0,6590	0,5000	−0,3218

As correlações entre os métodos de avaliação antioxidante foram, em sua maioria, positivas e fracas. Entretanto, foram encontradas fortes correlações (r=0,9177) no extrato de rapadura A com eluição por metanol/hidróxido de amônio e fortes correlações negativas (r= —0,9547) nos extratos de rapadura C obtidos por eluição com metanol.

A análise de componente principal foi realizada sobre a matriz de dados composta de três variáveis e oito extratos de produtos obtidos no processamento industrial da cana-de-açúcar. As variáveis foram representadas pelo Índice de Polifenólicos Totais (TPI) e os resultados obtidos nos dois métodos de avaliação antioxidante, redução do radical DPPH e sistema β-CAL.

A Figura IV.10 mostra o gráfico de escores da componente principal 1 *versus* os da componente principal 2. Estas duas componentes principais descrevem 83,44% da variância total dos dados. Dentre as componentes principais, a primeira explica 60,65%

da variância total dos dados enquanto que a segunda componente principal, 22,79%. A primeira componente principal tem alta contribuição da concentração dos compostos polifenólicos, sendo responsável pela discriminação do extrato de mel. É interessante notar que a segunda componente principal separa a maioria das amostras em dois grupos, extratos M e N. Os grupos também foram divididos conforme o método utilizado para avaliar a atividade antioxidante, mostrando a proximidade entre os extratos N e a avaliação da atividade antioxidante que utiliza o método de redução do radical DPPH. É possível também visualizar a separação pela componente principal 2 dos extratos da rapadura A, e corroborar os resultados das correlações (Tabela IV.4) onde havia uma tendência de linearidade entre o extrato N com TPI e o método de redução do radical DPPH.

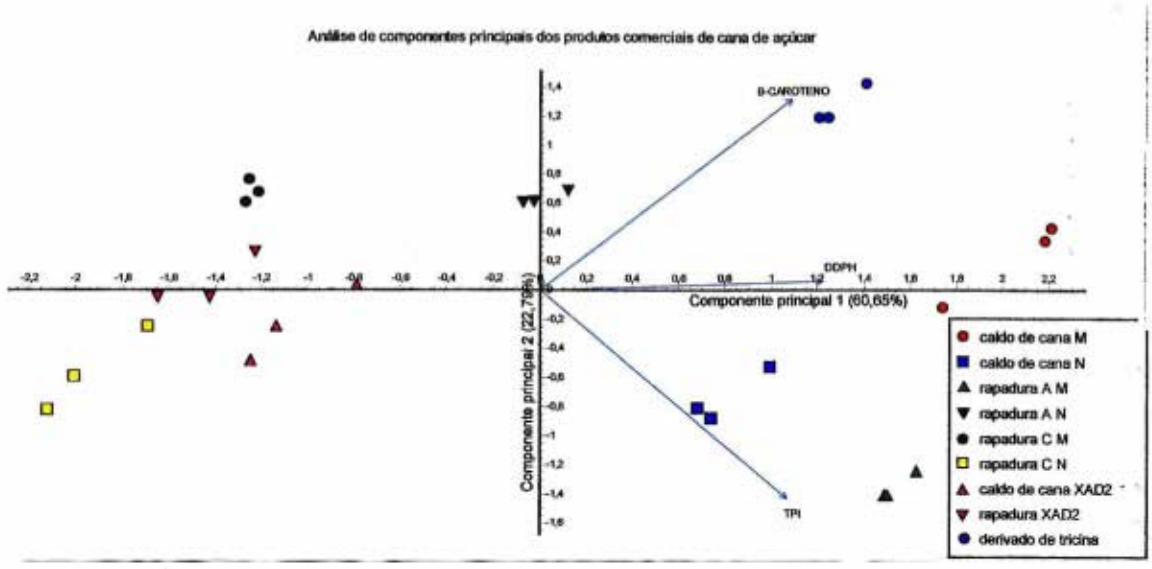


Figura IV.10. Gráfico dos escores da componente principal 1 versus componente principal 2 dos extratos de caldo de cana, rapadura e derivado de tricina.

IV.4 CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos das amostras de caldo de cana e rapadura são constituídos basicamente por derivados de flavonas, luteolina, apigenina e tricina e por derivados dos ácidos cinâmicos, caféico, clorogênico, cumárico e ferúlico. A rapadura apresenta teores mais elevados de luteolina, enquanto que no caldo prevalece tricina.

As atividades antioxidantes dos extratos de rapadura mostraram que, mesmo em baixas concentrações, a atividade é moderada. O caldo apresentou atividade semelhante mas em concentrações mais elevadas.

O extrato de rapadura apresentou atividades citostáticas para todas as linhagens e citocida para células do cólon (HT-29), de mama (MCF-7), de mama resistente (NCI-ADR), de pulmão (NCI-460), de ovário (OVCAR), de rim (786-0) e de melanoma (UACC-62).

O derivado de tricina, isolado a partir do caldo de cana, apresentou atividade antioxidante moderada. Suas atividades antiproliferativas foram mais pronunciadas para as linhagens de células de mama resistente (NCI-ADR) e de cólon (HT-29), com atividade citostática e citocida para as linhagens de pulmão (NCI-460), de mama (MCF-7), de ovário (OVCAR), de rim (786-0) e de melanoma (UACC-62).

IV.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1124-1131. 2004.

BOYD, M.R. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. **Principles and Practice of Oncology Updates**, v. 3. p.1-12. 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico para Rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embaladas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 26 dez. 2003. p. 28 – 32.

BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Contribution of enzimc browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 257-261. 1994.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 80, p. 1033-1043. 2000.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; HDJOKO, K.; HOSTETTMANN. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV- detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**, v. 1082, p. 51-59. 2005.

COOPER, R.; LAVIE, D.; GUTTERMAN, Y.; EVENARI, M. The distribution of rare phenolic type compounds in wild and cultivated wheats. **Journal of Arid Environments**, v. 27, p. 331-336. 1994.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; FALLARERO LINARES, A.; VIDAL NOVOA, A.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Ação das substâncias fenólicas do caldo de cana em relação à toxicidade *in vivo* induzida por metil-mercúrio. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41. p. 47. 2005.

EPSTEIN, R.J. Topoisomerases in human disease. **Lancet**, v. 1, p. 521-524. 1998.

FÁTIMA, A.; KOHN, L.K.; CARVALHO, J.E.; PILLI, R.A. Cytotoxic activity of (*S*)-goniothalamin and analogues against human cancer cells. **Biooganic and Medical Chemistry**, v. 14, p. 622-631. 2006.

FOTI, M.; PIATELLI, M. BARATTA, M.T.; RUBERTO, G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity

relacionship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.497-501. 1996.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A.; WILSON, K.L. Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian Cyperaceae. **Phytochemistry**, v. 24, p. 751-766. 1985.

HUDSON, E.A.; ANH DINH, P.; KOKUBUN, T.; SIMMONDS, M.S.J.; GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology Prevention**. v. 9, p. 1163-1170. 2000.

KUO, S.M. Dietary flavonoids and cancer prevention: Evidence and potential mechanism. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 8, p. 47–69. 1997.

MANS, D.R.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, v. 5, p. 185-98. 2000.

NAKASONE, Y.; TAKARA, K.; WADA, K.; TANAKA, J.; YOGI, S. Antioxidante compounds isolated from kokuto, non-centrifugal cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 1714-1716. 1996.

PALLA, G. Characterization of the main secondary components of the liquid sugars from cane molasses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 545-548. 1983.

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part I. **International of Sugar Journal**, v. 94, p. 99-108. 1992.

PATON, N.H.; DUONG, M.; Sugar cane phenolics and first expressed juice colour – Part III. **International Sugar Journal**,.v. 94, p. 170-176. 1992.

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

SCHAEFER, S.; BAUM, M.; EISENBRAND, G.; DIETRICH, H.; WILL, F.; JANZOWSKI, C. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 24-33. 2006.

SEBRAE-MG. **Estudo Técnico das Alternativas de Aproveitamento da Cana-de-açúcar**. disponível em <http://www.sebraemg.com.br>. acessado em 20 de julho de 2005.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric

cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1118. 1990.

SCHMITT, K.; TULZER, G.; MERL M, ET AL. Early detection of doxorubicin and daunorubicin cardiotoxicity by echocardiography :dyastolic versus systolic parameters. **European Journal of Pediatrics**, v. 154, p. 201-204. 1995.

TAKARA, K.; KINJYO, A.; MATSUI, D.; WADA, K.; NAKASONE, Y. YOGI, S. New antioxidative phenolic glycosides isolated from kokuto, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 29-35. 2002.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4989-4995, 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP**. Versão 4.1. 1998. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: agosto de 2005.

VERHAGEN, H.; ARUOMA, O. I.; VAN DELFT, J. H. M.; DRAGSTED, L. O.; FERGUSON, L. R.; KNASMÜLLER, S.; POOL-ZOBEL, B. L.; POULSEN, H. E.; WILLIAMSON, G.; YANNAI, S. The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant, antimutagenic oranticarcinogenic potential of test substances in *in Vitro* experiments and animal studies *in vivo*. **Food Chemical of Toxicology**, v. 41, p. 603-610. 2003.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London, The MacMillan Press, 1981. 335p.

WALLACE, G.; FRY, S.C. Phenolic components of the plant cell wall. **International Review Cytology**, n. 151, p. 229-267, 1994.

YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids fromtheir oxidation potentials. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 599-604, 2001.

YANG, C.S.; SANG, S.M.; LAMBERT, J.D.; HOU, Z.; JU, J.Y.; LU, G. Possible mechanisms of the cancer-preventive activities of green tea. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 170-175. 2006.

WEBB, M.R.; EBELER, S.E. Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and dna intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. **Biochemical Journal**, v. 384, p. 527-541, 2004.

YUSOF, S.; SHIAN, L.S.; OSMAN, A. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, v. 68, p. 395-401. 2000.

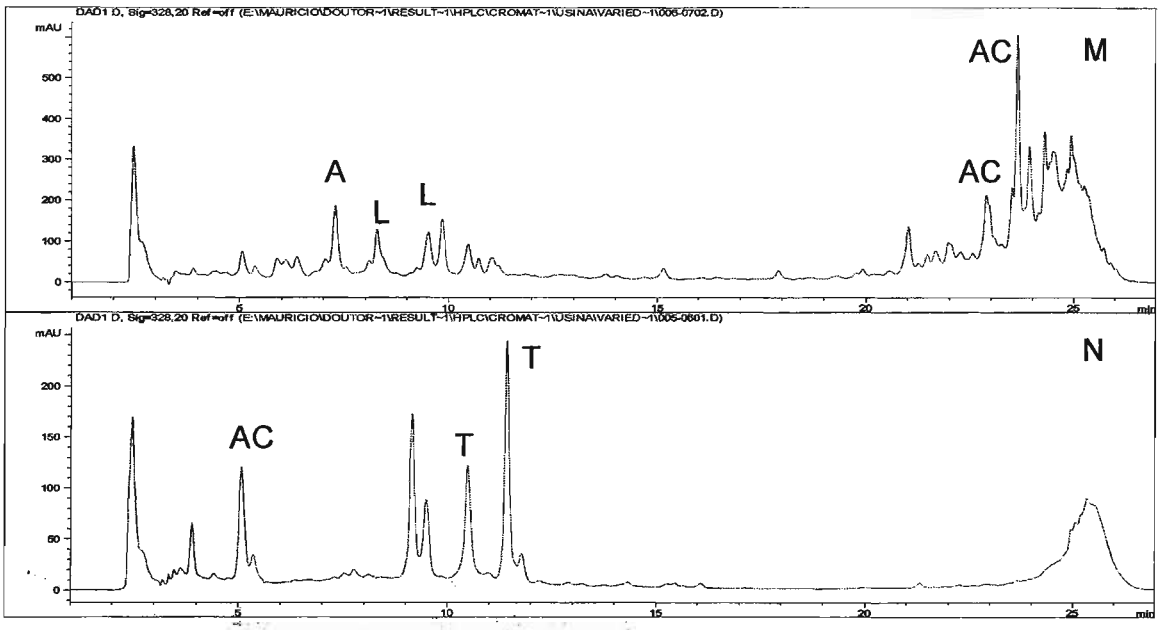
Considerações finais

Os estudos sobre os compostos polifenólicos nos produtos da cana-de-açúcar mostraram que ainda há compostos bioativos a serem descobertos em plantas domesticadas e destinadas ao consumo. Esse trabalho também mostrou que as perdas em compostos polifenólicos foram substanciais na produção industrial do açúcar refinado. Entretanto, o mesmo não ocorreu no processamento da rapadura, cujos teores de compostos polifenólicos foram aumentados significativamente. Porém, na produção da rapadura não há padronização, acarretando diferenças em sua constituição dependendo do fornecedor e região onde são produzidos.

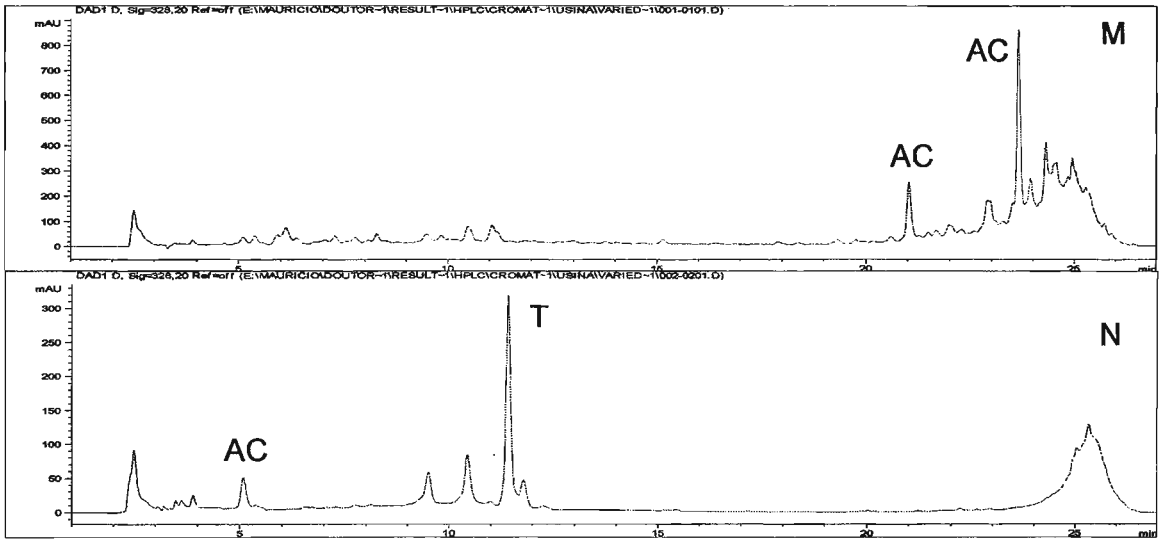
A rapadura apresenta em média 19,24 mg/100 g e o açúcar VHP, 1,93 mg/100g de flavonóides. A ingestão de flavonóides no Brasil em 2004 foi estimada em 74,2 mg/dia, tendo como fontes principais a laranja, a alface e o tomate (Arabbi *et al.*, 2004). Considerando a recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) de que a porção diária de rapadura deve ser de 20 g/dia para uma dieta de 2000 kcal, o consumo desta porção representaria 3,84 mg de flavonóides, cerca de 5% da ingestão habitual. Portanto, ao se tomar uma xícara de café adoçado com 5 g de açúcar VHP a ingestão seria de 0,1 mg de flavonóides, com a substituição por rapadura haveria um aumento em dez vezes de flavonóides ingeridos. Entre as bebidas, o suco de laranja contribui com cerca de 220 mg/L de flavanonas. O caldo de cana contem cerca de 48,5 mg/L de flavonas, lembrando que estes polifenóis apresentam atividades antioxidantes superiores às flavanonas.

Os produtos minimamente processados, caldo de cana e rapadura, são pobremente documentados na literatura e requerem estudos mais aprofundados. A rapadura, em especial, necessita de estudos para padronização de seu processo. A

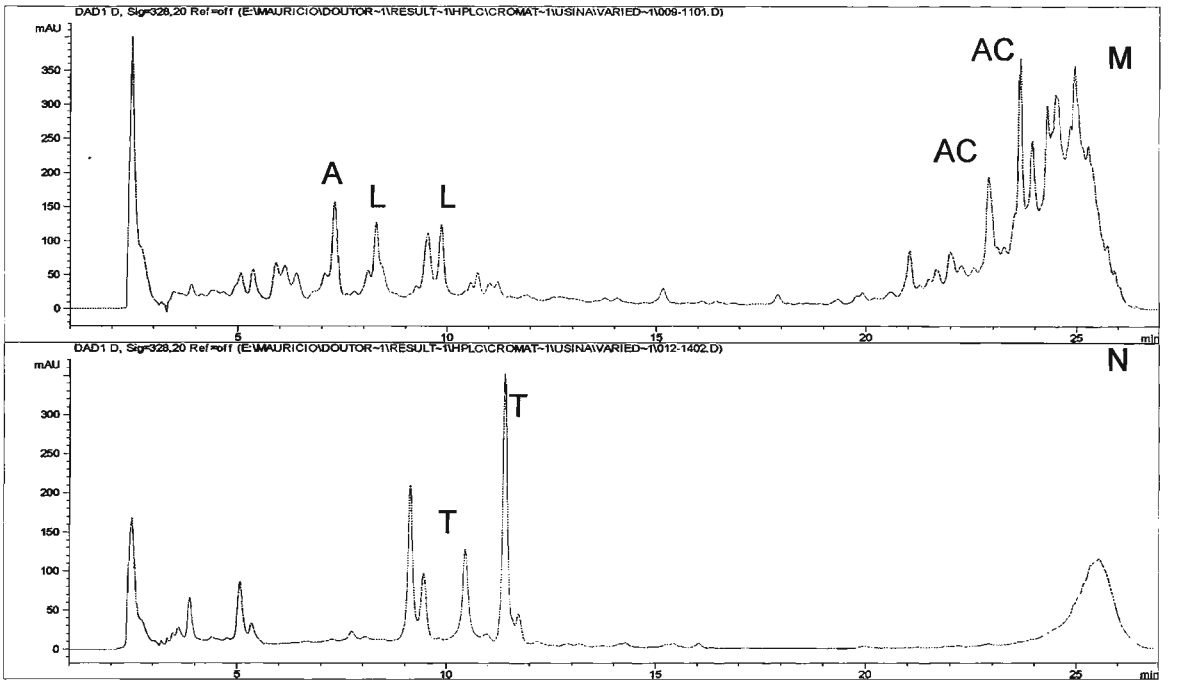
presença de compostos polifenólicos, dotados de relevantes atividades biológicas, apontam para a conveniência do consumo dos produtos da cana-de-açúcar, reforçando recomendações anteriores baseadas na alta concentração de sacarose e presença de ferro, cálcio e magnésio. Sugerem-se medidas com vistas ao incremento de seu consumo pela população em geral, por exemplo, como complemento alimentar em merendas escolares e substituinte do açúcar refinado.



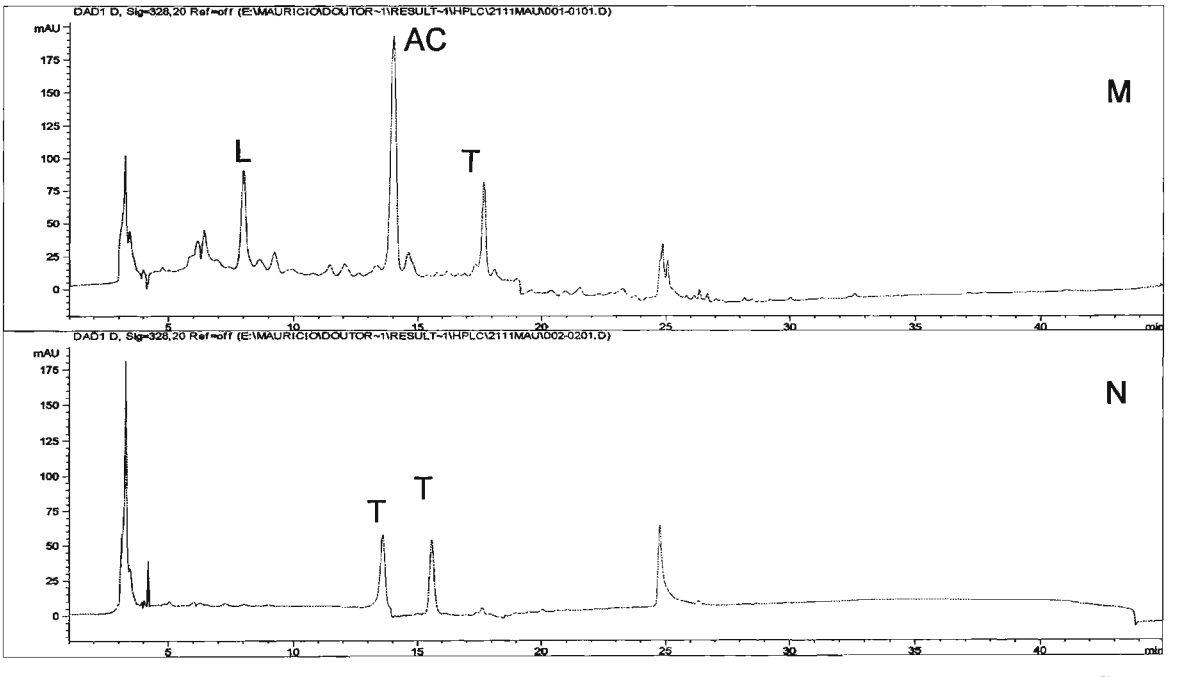
Anexo 1. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) de cana-de-açúcar variedade SP801842 em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



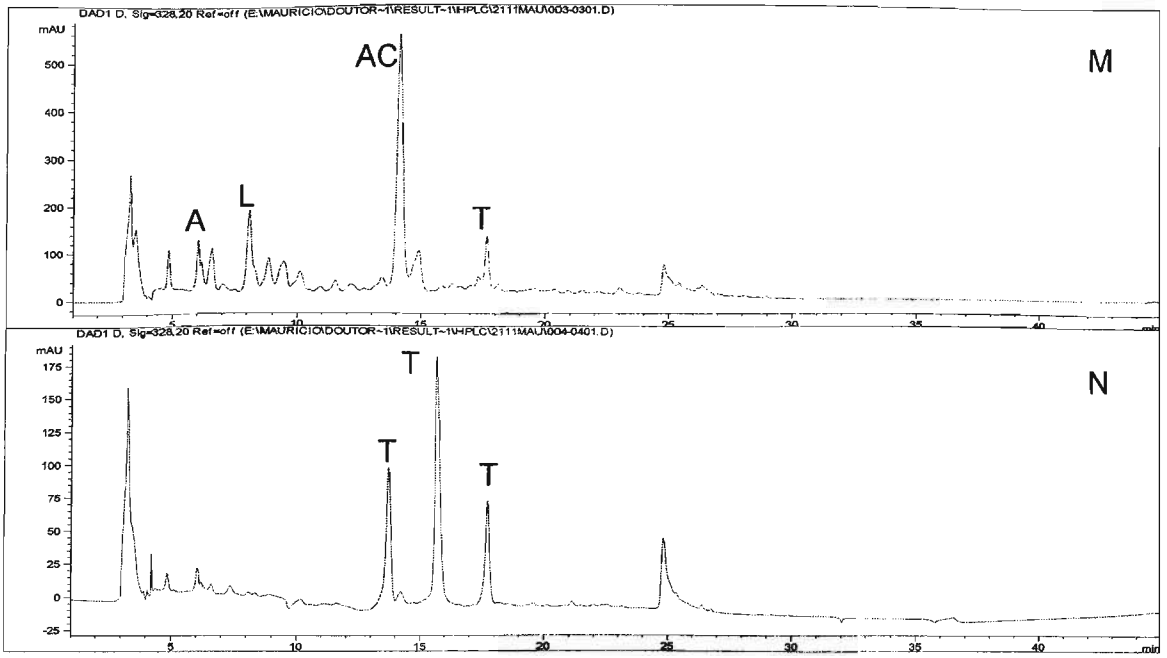
Anexo 2. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) de cana-de-açúcar variedade SP813250 em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



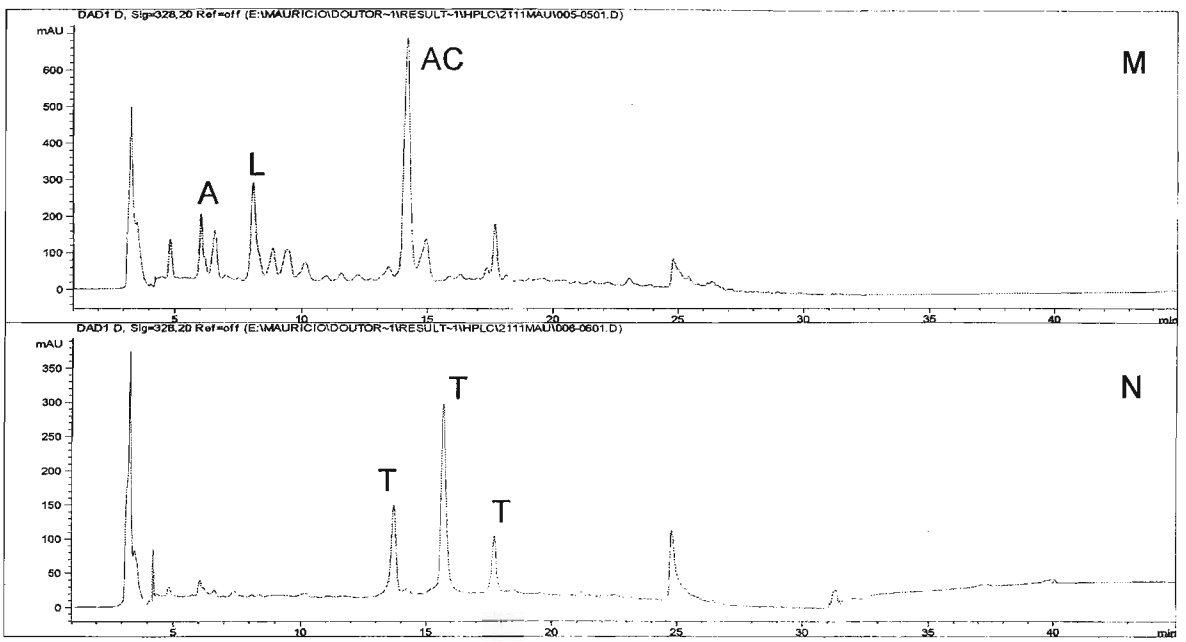
Anexo 3. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) de cana-de-açúcar variedade RB835480 em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



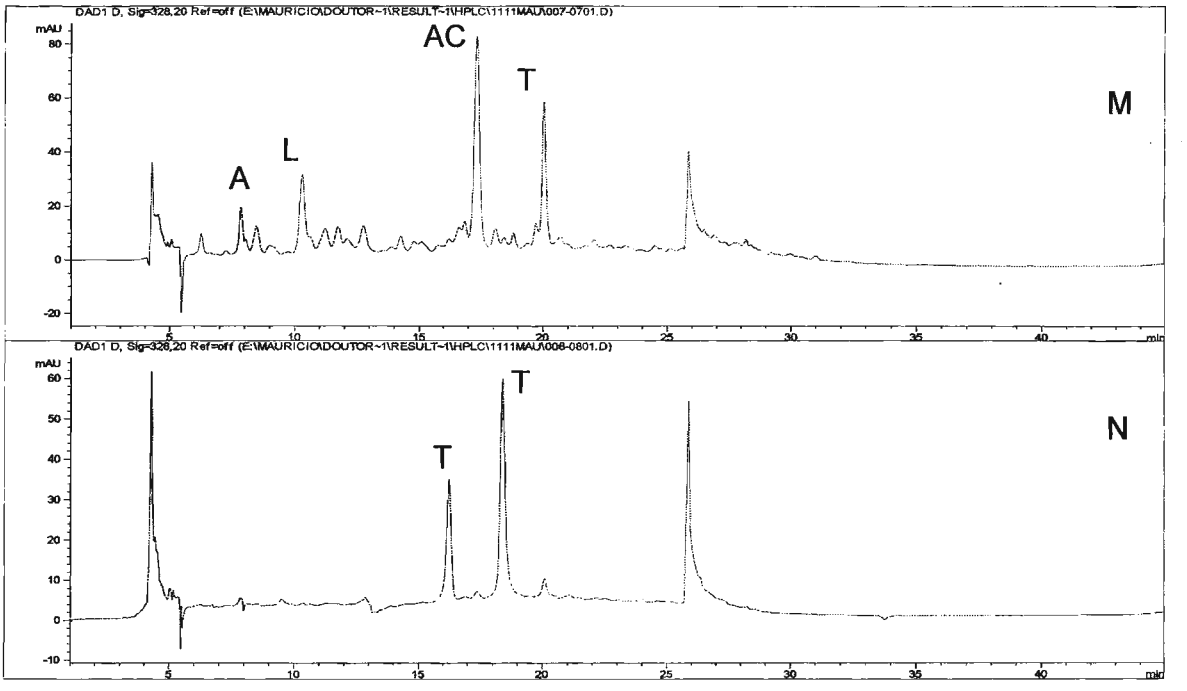
Anexo 4. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) de caldo misto em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



Anexo 5. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) de xarope em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



Anexo 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) melaço em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.



Anexo 7. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos eluatos fração metanol (M) e metanol:amônia (N) açúcar VHP em 328 nm. A: derivado de apigenina; L: derivado de luteolina; T: derivado de tricina; AC: ácidos cinâmicos.