

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

**Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições
de extração e aplicação em sistema lipídico**

Richtier Gonçalves da Cruz

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

**Piracicaba
2014**

Richtier Gonçalves da Cruz
Bacharel em Ciências de Alimentos

**Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração
e aplicação em sistema lipídico**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

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

Piracicaba
2014

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

Cruz, Richtier Gonçalves da

Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico / Richtier Gonçalves da Cruz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

97 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Antioxidantes sintéticos e naturais 2. Acerola 3. Borra de café 4. Casca de lichia
5. Superfície de resposta 6. Oxidação lipídica I. Título

CDD 664.06
C957

Dedico minha dissertação e todo meu trabalho a ciência, clara, evidente e sistêmica. A qual se tornou minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Ilda e Rafael e minha irmã Richtylle pela base sólida e pelos princípios de ética e moral aos quais fui educado. A minha vó por contribuir na formação da minha personalidade e aos demais familiares pela união.

A minha querida orientadora professora Thais, pela confiança concedida e por ser um exemplo pessoal e profissional o qual admiro e sigo.

A professora Marisa pelos ensinamentos e postura. Aos demais professores e funcionários do LAN sempre prestativos e dispostos a ensinar. E os professores Diego e Simone pela gentil disposição em ajudar e instruir.

Aos meus amigos do laboratório de óleos e gorduras, Thalita Augusto, Mariana, Larissa, Adriana, Samuel, Adriano, Gabriela, Grasiela, Guilherme e Daphinie, pelo companheirismo, descontração, apoio, e pelos desentendimentos que no fim só firmou o quanto nos amamos. E as minhas queridas estagiárias brasileiras, Marianna e Camila, e francesas, Léonor e Johanna, pela ajuda no laboratório, paciência e amizade.

Aos meus amigos Taciana, Tânia, Nãna, Alan, Francini, Lu, Mariana Finotti, Bruna, Ana Paula, Gizele, Danilo, Gustavo, Marjory, Mariana Scudeller, Amanda, Celise, Henrique e demais amigos da pós e da graduação. Vocês fazem parte da minha conquista.

As minhas amadas amigas francesas Julie, Anais e Alice e meus amigos Timothée, Romain e Patrick. Pela parceria e pelos vínculos de amizade entre Brasil, França e Estados Unidos. *Merci beaucoup*.

Minhas eternas professoras da UFV Emiliane, Martha e Milene. Por fazerem parte da minha base e acima de tudo pela amizade infundável.

Por fim agradeço aos cientistas e artistas que me inspiram desde a infância. Por fazerem parte de quem eu sou e quero ser.

**"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."**

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS E RELAÇÃO COM A SAÚDE	19
Resumo.....	19
Abstract.....	19
2.1 Antioxidantes.....	19
2.1.1 Butil hidroxianisol (BHA).....	22
2.1.2 Butil hidroxitolueno (BHT).....	24
2.1.3 Terc butil hidroxiquinona (TBHQ).....	26
2.1.4 Propilgalato (PG).....	28
2.2 Antioxidantes naturais	30
2.3 Considerações Finais.....	32
Referências	32
3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BORRA DE CAFÉ SOLÚVEL	39
Resumo.....	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução	40
3.2. Material e Métodos.....	41
3.2.1 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante	41
3.2.2 Delineamento experimental e análise estatística	42
3.3 Resultados e Discussão.....	44
3.3.1 Otimização do processo de extração de compostos fenólicos da borra de café	44
3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> da borra de café.....	55
3.4 Conclusão	57
Referências	57

4 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE RESPOSTA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ACEROLA	59
Resumo	59
Abstract.....	59
4.1 Introdução.....	60
4.2 Material e Métodos	61
4.2.1 Obtenção e preparo das amostras.....	61
4.2.2 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante	61
4.2.3 Delineamento experimental para estudo da extração e análise estatística dos dados.....	62
4.3 Resultados e Discussão	63
4.3.1 Estudo da extração de compostos fenólicos.....	63
4.3.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> da acerola.....	68
4.4 Conclusão.....	70
Referências.....	70
5 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE RESPOSTA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CASCA DE LICHIA.....	73
Resumo	73
Abstract.....	73
5.1 Introdução.....	74
5.2 Material e Métodos	75
5.2.1 Obtenção e preparo das amostras.....	75
5.2.2 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante	75
5.2.3 Delineamento experimental e análise estatística	76
5.3 Resultados e Discussão	77
5.3.1 Estudo da extração de compostos fenólicos.....	77
5.3.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> da casca de lichia.....	82
5.4 Conclusão.....	83
Referências.....	84

6 ESTUDO DO CONTROLE DA OXIDAÇÃO DE EMULSÕES COM EXTRATOS DE ACEROLA, BORRA DE CAFÉ E CASCA DE LICHIA E EM COMPARAÇÃO AO TBHQ	87
Resumo	87
Abstract	87
6.1 Introdução	88
6.2 Material e Métodos	89
6.2.1 Preparo e análise dos extratos	89
6.2.2 Preparo e análise das emulsões	89
6.3 Resultados e Discussões	90
6.4 Conclusão	94
Referências	94
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

RESUMO

Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico

A oxidação lipídica é uma das principais reações de deterioração em alimentos, provocando perdas em qualidade e valor nutricional. Para evitar este problema a indústria utiliza antioxidantes, substâncias capazes de retardar essas reações. Os compostos fenólicos constituem-se na principal substância antioxidante utilizada e encontrada em alimentos, sendo que estes podem estar presentes em várias matérias primas vegetais e em resíduos agroindustriais, desprezados pela indústria. O objetivo do presente trabalho foi estudar as condições de extração de compostos fenólicos de frutos de acerola (*Malpighia emarginata*), borra de café (*Coffea arabica*) e casca de lichia (*Litchi chinensis*), bem como avaliar sua atividade antioxidante *in vitro* e sua aplicação em emulsões. Para extração dos compostos fenólicos foi aplicada a metodologia de superfícies resposta, visando a definição da melhor combinação de variáveis (concentração de etanol, temperatura e tempo) para a máxima recuperação de compostos fenólicos. A avaliação da atividade antioxidante se deu pela estabilização do radical DPPH e estudo da cinética da reação em comparação ao antioxidante sintético TBHQ. Além disso, foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos adicionados a emulsões em diferentes concentrações (50 a 200 mg.kg⁻¹), submetidas a teste acelerado de oxidação. O estudo das condições de extração evidenciou que os compostos fenólicos de cada matriz devem ser extraídos em condições distintas. Extratos de frutos de acerola apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais quando foi utilizada apenas água como solvente (175,87 mg GAE.g⁻¹), seguido pelos extratos de borra de café e de casca de lichia extraídos com soluções etanólicas (26,37 e 25,87 mg GAE.g⁻¹ respectivamente). O estudo da cinética de estabilização do radical DPPH demonstrou que o extrato de acerola foi o mais eficiente, seguido pelos extratos de casca de lichia e de borra de café (650,53; 43,09 e 38,74 de TEAC, respectivamente). O estudo de aplicação dos extratos em sistema modelo, com acompanhamento da oxidação por meio da determinação de hidroperóxidos formados (mmol.kg⁻¹), indicou que somente o extrato de acerola, em todas as concentrações utilizadas, apresentou efeito comparável ao TBHQ. Os extratos de casca de lichia e de borra de café, em qualquer concentração utilizada, não apresentaram a mesma proteção à oxidação lipídica. Com os resultados obtidos pode-se concluir que cada matriz se comporta de uma forma na extração de compostos fenólicos, e daí vem a necessidade de se realizar estudo das condições de preparo dos extratos para cada amostra. O extrato de acerola se mostrou o mais eficiente, tanto na cinética de estabilização do radical DPPH quanto na inibição da oxidação no sistema lipídico estudado. No entanto mais trabalhos são necessários para avaliar diferentes sistemas de oxidação, bem como estudos toxicológicos para garantir níveis seguros de consumo.

Palavras-chave: Antioxidantes sintéticos e naturais; Acerola; Borra de café; Casca de lichia; Superfície de resposta; Oxidação lipídica

ABSTRACT

Antioxidant activity of vegetable extracts: study of extraction conditions and evaluation in lipid system

The oxidation is one of major deterioration in food lipids, causing losses in quality and nutritional value. To avoid this, antioxidants are used and the phenolic compounds are the main component of antioxidant applied and presented in foods, and also may be present in agroindustrial residues, usually discarded by the industry. The objective of this study was to identify ideal conditions to extract phenolic compounds from acerola fruits (*Malpighia emarginata*), coffee grounds (*Coffea arabica*) and lychee skins (*Litchi chinensis*) by means of surface response methodology (RSM), evaluation of antioxidant activity of extracts in *in vitro* essays, application of selected extracts in emulsions systems during accelerated test. The response surface methodology was applied to each material in order to identify the effects of temperature, ethanol concentration and time in extraction processes. Antioxidant activity by DPPH stabilization and its kinetic evaluation were performed and compared to TBHQ. Furthermore, selected extracts (50 to 200 mg.kg⁻¹) were added in emulsion system and subject to accelerated oxidation test. RSM have shown that phenolic compounds of each material are extractable in different conditions. Acerola fruits aqueous extracts present maximum phenolic content (175.87 mg GAE.g⁻¹) and the higher DPPH antioxidant activity, followed by coffee grounds and lychee skins extracts (26.37 and 25.87 mg GAE.g⁻¹). Acerola extracts also presented the best stabilization of DPPH in kinetic study, with results comparable to the TBHQ effect (650.53 TEAC). Acerola extract added to the emulsion showed a good antioxidant effect in all concentrations during accelerated test, resulting in final oxidation levels (mmol hydroperoxides kg⁻¹) comparable to TBHQ in the same concentration. Coffee grounds and lychee skins extracts were not efficient in avoid hydroperoxides increasing. Results showed the importance of studying extractions conditions for each material. Acerola extract showed the most efficient antioxidant activity both in DPPH kinetics DPPH stabilization and inhibition of lipid oxidation in the system studied. However, further work is needed to evaluate different oxidation systems, as well as toxicological studies to ensure safe levels of consumption.

Keywords: Synthetic and natural antioxidants; Acerola fruits; Coffee grounds; Lychee skins; Response surface methodology; Oxidation

1 INTRODUÇÃO

A rancificação de lipídios é uma das principais reações de deterioração dos alimentos, levando ao surgimento de sabores e odores que muitas vezes descaracterizam o produto. Essa reação de deterioração causa perda de qualidade e redução no valor nutritivo do alimento. Devido a isso a indústria utiliza-se de antioxidantes, substâncias capazes de impedir e/ou retardar as reações de oxidação. Uma série de antioxidantes está disponível no mercado, classificados em sintéticos ou naturais. Os sintéticos são muito utilizados há anos pelas indústrias do setor, e em geral mostram-se eficientes no controle das reações de oxidação. No entanto nos últimos anos têm-se questionado a inocuidade destes à saúde do consumidor, o que leva a uma tendência em substituí-los por antioxidantes naturais, mesmo não havendo trabalhos suficientes que também atestem concentrações seguras de consumo destes.

A indústria de alimentos gera resíduos com potencial de uso como antioxidante, por apresentarem compostos fenólicos em sua composição, tais como cascas, tortas, bagaço entre outros. A reutilização destes produtos para recuperação dessas substâncias desperta o interesse da comunidade científica a fim de dar fins alternativos a estes resíduos, que muitas vezes são descartados e que poderiam ser fontes alternativas de antioxidantes naturais, que possam vir a ser utilizados pelas indústrias.

A borra de café e a casca de lichia são matrizes oriundas de indústrias alimentícias e são tratadas como resíduos, sendo que podem apresentar quantidades apreciáveis de compostos fenólicos. A acerola é uma matéria prima que se destaca pelo seu alto teor de compostos bioativos, como o ácido ascórbico e compostos fenólicos. No entanto são escassos na literatura trabalhos que visem estudos da extração de compostos fenólicos e avaliem a atividade antioxidante destes comparado a antioxidantes sintéticos e em emulsões lipídicas.

Neste contexto, o presente trabalho foi conduzido visando avaliar o efeito de alguns parâmetros na extração de compostos fenólicos em de frutos de acerola e de resíduos agroindustriais (borra de café e casca de lichia), por meio da metodologia de superfície resposta, bem como avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos nas condições selecionadas frente a radicais estáveis e em sistema de emulsão submetido à oxidação, comparando a eficiência com o TBHQ. Dentre os

vários solventes utilizados para extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais, o etanol e água apresentam a vantagem de segurança, sob o ponto de vista toxicológico e ambiental, quando comparado à acetona, metanol e outros solventes orgânicos. Por isso foram selecionados para os estudos desenvolvidos nesse trabalho.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre antioxidantes naturais e sintéticos.

Nos Capítulos 3, 4 e 5 são discutidos os resultados do estudo da extração de compostos fenólicos de dois resíduos agroindustriais (borra de café e casca de lichia) e de frutos de acerola, e é apresentado estudo sobre atividade antioxidante dos extratos obtidos em ensaios *in vitro*.

E por fim, o Capítulo 6 apresenta os resultados da aplicação dos extratos produzidos em condições otimizadas em um sistema modelo de base lipídica.

2 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS E RELAÇÃO COM A SAÚDE

Resumo

Os antioxidantes sintéticos são substâncias extremamente importantes na indústria, uma vez que estão diretamente relacionados com o aumento da vida útil de muitos produtos. No entanto, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de substituí-los por antioxidantes naturais, uma vez que os sintéticos podem prejudicar a saúde dos consumidores. Este trabalho apresenta uma revisão das pesquisas realizadas com antioxidantes sintéticos e naturais, que avaliaram o efeito de ambos, não só na oxidação de lipídios, mas também nos organismos. Resultados conflitantes foram encontrados, o que leva à conclusão de que é necessário um maior número de estudos, tanto para determinar a atividade antioxidante quanto para definir a ação toxicológica dos sintéticos e naturais.

Palavras-chave: Antioxidante; Fenólicos; Toxicologia

Abstract

Synthetic antioxidants are extremely important substances in the industry since they are directly related to the increase of shelf life of food products. However several studies are being conducted with the aim to replace synthetic antioxidants by natural ones, since the synthetic apparently can damage the health of consumers. This paper presents a review of researches conducted on synthetic and natural antioxidants that evaluated the effects not only in the lipid oxidation but also in organisms. Conflicting results were found, leading to the conclusion that antioxidant mechanism and toxicological studies on both synthetic and natural antioxidants, are needed.

Keywords: Antioxidant; Phenolics; Toxicology

2.1 Antioxidantes

Antioxidantes podem ser definidos como compostos capazes de retardar ou inibir a oxidação ocorrida em lipídios ou em outras moléculas, evitando o início ou bloqueando a propagação das reações de oxidação em cadeia de diferentes modos, como ilustrado na Figura 1. Os compostos fenólicos, em geral, apresentam elevada atividade antioxidante devido às suas propriedades de oxido-redução, quelando o oxigênio triplete e singlete e/ou decompondo peróxidos através da doação de prótons, comportando-se como ácido de Lewis (MUKAI et al., 1993; BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001; RAMALHO; GORGE, 2006).

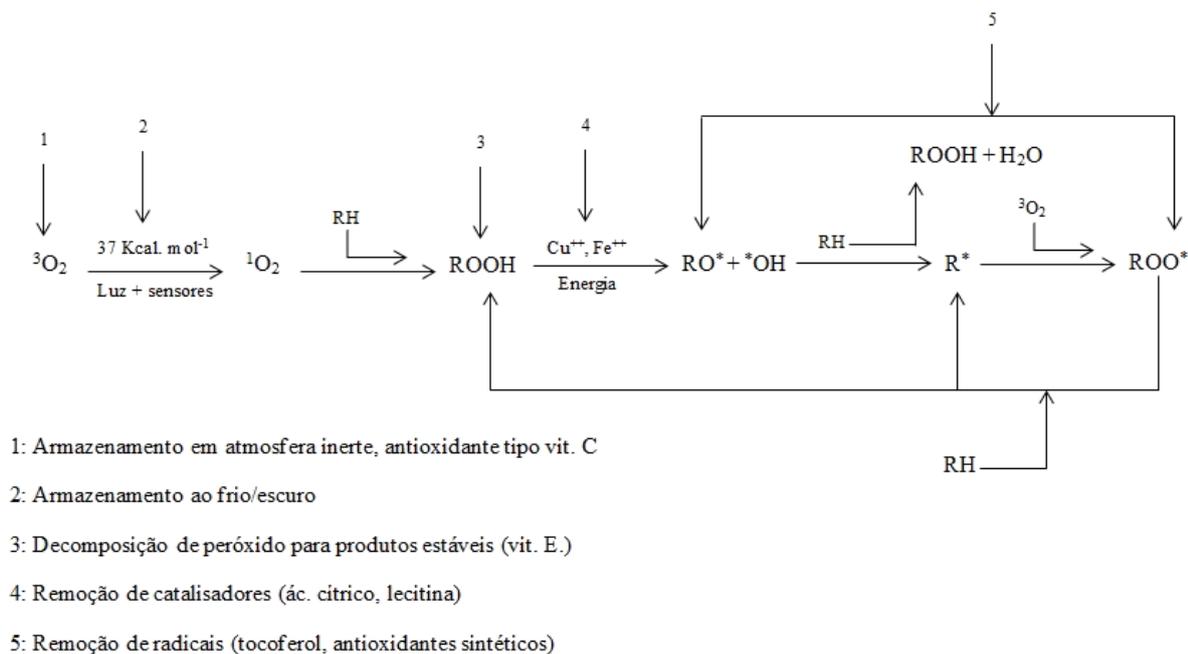


Figura 1 - Formação de radicais livres e possibilidades de controle com antioxidantes

Fonte: Araújo (2008)

Duas classificações básicas são conferidas aos antioxidantes: sintéticos ou naturais. De modo geral os sintéticos são compostos fenólicos contendo vários graus de substitutos de alquila, enquanto que os naturais podem ser compostos fenólicos, quinona, lactona entre outros. Os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria de alimentos devido a sua alta capacidade antioxidante e notável atuação no retardo das reações de oxidação, devido a isso eles são alvos de estudos relacionados com sua eficiência e toxicologia (MUKAI et al., 1993; ZHENG; WANG, 2001; ARAÚJO, 2008).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os polifenóis, sendo os principais o butil hidroxianisol (BHA) (IUPAC: 2-terc-butil-4-metoxifenol), butil hidroxitolueno (BHT) (IUPAC: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), terc butil hidroquinona (TBHQ) a (IUPAC: 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol) e propil galato (PG) (IUPAC: propil 3,4,5-trihidroxibenzoato). A estrutura destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre gerado no processo de oxidação, interrompendo assim o mecanismo pelo qual a reação ocorre e a geração de compostos indesejáveis às características sensoriais e nutricionais dos alimentos. Desse modo, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres que possuem baixa reatividade graças à estabilização que a ressonância do anel aromático

proporciona, não propagando ou promovendo as reações de oxidação (OMURA, 1995).

Os antioxidantes naturais compreendem uma vasta classe de compostos químicos, que atuam de diferentes meios na oxidação de lipídios, doando prótons (antioxidante primário), como os compostos fenólicos, e/ou quelando com catalisadores da reação de oxidação (sinérgicos), como os ácidos cítrico e ascórbico. Dentre os antioxidantes naturais mais utilizados destacam-se os ácidos fenólicos, tocoferóis e extratos de plantas, como sálvia e alecrim (RAMALHO; JORGE, 2006).

Para que um antioxidante seja considerado inócuo, a dose letal mediana (LD_{50}) não pode ser menor que 1.000 mg kg^{-1} de peso vivo, além de não apresentar efeitos significativos adversos em animais experimentais em testes a longo prazo, em níveis de 100 vezes o proposto para o consumo humano (ARAÚJO, 2008).

Mesmo com a alta eficiência dos antioxidantes sintéticos cientificamente comprovada, a partir do início da década de 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para a utilização na indústria de alimentos, aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir os sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (DÉGASPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Diversos trabalhos avaliaram os antioxidantes sintéticos a fim de determinar os efeitos adversos que estes podem causar em animais experimentais. Alguns destes trabalhos relacionam-nos o potencial de carcinogênese, além de aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (SIMIÃO, 1985; YILDIRIM et al., 2001; MELO; GUERRA, 2002). No entanto, são escassos os trabalhos que avaliam o efeito que esses antioxidantes causam diretamente a humanos, ou que avaliem também possíveis efeitos que os antioxidantes naturais isolados apresentam no organismo.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica para pontuar os reais efeitos que os principais antioxidantes sintéticos apresentam no organismo, e também levantar alguns estudos já feitos com os antioxidantes naturais, para elucidar sua inocuidade.

2.1.1 Butil hidroxianisol (BHA)

O BHA comercial é uma mistura de dois isômeros, 2-BHA e 3-BHA (Figura 2), antioxidante sintético que apresenta maior eficiência em gordura animal do que óleo vegetal, é insolúvel em água e geralmente é utilizado em sinergia com BHT e PG pela indústria de alimentos. Segundo alguns autores, possui estabilidade térmica quando submetido a altas temperaturas e seu limite de uso máximo permitido é de 100 mg kg^{-1} (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

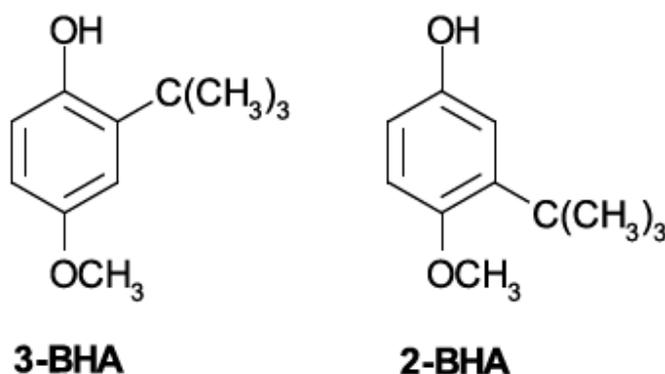


Figura 2 - Estrutura fenólica dos isômeros de BHA

Diversos trabalhos comparam a eficiência da atividade antioxidante do BHA com extratos de vegetais, principalmente de frutas e especiarias, como o alecrim, sendo que na maioria, os autores encontram uma atividade antioxidante igual ou superior ao BHA atribuída principalmente aos fenólicos (ácido clorogênico, quercetina e ácido cafeico), o que leva à indicação de uso de extratos como fontes alternativas ao BHA, devido aos seus possíveis efeitos tóxicos (ANTONIASSI, 2001; MURICIA et al., 2001; DÉGASPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; BANDYOPADHYAY et al., 2007).

Seal et al. (1969) avaliaram a aplicação de três isômeros do BHA (2-BHA, 3-BHA e 4-BHA) em cobaias e seus efeitos em alterações morfológicas causadas na pele dos animais. Os autores evidenciaram uma invasão de células basais na derme das cobaias que receberam o 4-BHA, sugerindo um possível efeito carcinogênico. Os tecidos dos animais que receberam 3-BHA também apresentaram este efeito, no entanto com uma ação menor, já o 2-BHA não apresentou efeitos. No trabalho

realizado por Gaunt et al. (1965), os autores avaliaram a resposta do fígado de ratos que ingeriram BHA. Foi relatado um aumento no peso no fígado e na excreção urinária de vitamina C dos animais que receberam o antioxidante sintético, no entanto tais alterações não foram evidente após 4 semanas, sendo que os ratos receberam uma dose de 500 mg.Kg^{-1} , 6 vezes ao dia. Não houve evidências histopatológicas de dano no fígado.

Em geral, o BHA não apresenta efeitos significativos na reprodução de animais experimentais, e, além disso, foi relatado como produtor de pouco ou nenhum efeito sobre a atividade de enzimas microssomais (BRANEN, 1974). No entanto, Sporn e Dina (1968) elucidaram que os fígados de ratos alimentados com 0,01-0,1% BHA apresentou consumo de oxigênio reduzido com succinato como substrato, enquanto os fígados de ratos alimentados com 0,1-1,0% BHA tinha o consumo de oxigênio aumentado e a fosforilação oxidativa alterada.

Woods e Smith (1961) aplicaram uma emulsão contendo BHA na bochecha de *hamsters* dourados, e avaliaram alterações ocorridas em diferentes tecidos. Foi evidenciado um eritema inicial progressivamente aumentado e com 40 dias, hiperplasia epitelial e hiperqueratose foram evidentes, acompanhada pela formação de pequenas bolhas. Além disso, a junção epitélio-tecido conjuntivo foi histologicamente perturbada e células basais formaram pseudopodia que se estendia através da lâmina densa. Degeneração muscular também foi observada.

Outros trabalhos também fazem uma associação do consumo de BHA e o surgimento de câncer. No trabalho de Masui et al. (1986) os autores administraram doses de até 2% de BHA para ratos e *hamsters* por até 104 semanas. Papilomas e carcinomas foram encontrados em ambos os animais, em diferentes tempos do experimento.

No entanto, desde que o BHA foi listado no *Sixth Annual Report on Carcinogens*, apenas um estudo em animais experimentais foi realizado. Administração dietética de BHA para peixes (hermafrodita *Rivulus marmoratus*) em concentrações de 0,01 a 0,8% por 12 dias levou ao desenvolvimento de tumores de fígado em todas as concentrações testadas, classificando assim, o BHA como hepatocarcinogênico (PARK et al., 1990).

Os dados disponíveis de estudos epidemiológicos para avaliar a relação entre o câncer humano devido a exposição ao BHA são insuficientes, sendo que apenas um trabalho foi encontrado. Botterweck et al. (2000), avaliaram 2035

indivíduos, constituídos por homens e mulheres de 55 a 69 anos na Holanda, durante 6,3 anos, procurando estabelecer uma relação entre o consumo de BHA e o câncer de estômago. No entanto não foi encontrada uma associação significativa ($p > 0,05$) entre o consumo do antioxidante e a doença, levantando a hipótese de que o baixo consumo de BHA não é cancerígeno a humanos.

Williams et al. (1999) concluíram que o BHA não é reativo com o DNA e em doses altas ele pode ser carcinogênico para roedores, mas que no entanto é irrelevante para seres humanos uma vez que estão expostos a baixas doses do BHA e possuem mais resistência ao desenvolvimento do câncer de estômago que os animais estudados. Alguns trabalhos que administraram concentrações de 3000 mg.kg^{-1} a animais experimentais mostraram atividade anticancerígena, considerando assim, o BHA como um aditivo que não representa risco ao desenvolvimento de câncer aos humanos.

2.1.2 Butil hidroxitolueno (BHT)

O BHT (Figura 3) é um antioxidante sintético muito utilizado pela indústria de alimentos, possui propriedades similares a do BHA, entretanto é menos efetivo devido à presença de dois grupos butil, que atribuem maior impedimento estérico que o BHA. Além disso, o BHT é facilmente vaporizado a altas temperaturas como as utilizadas na de fritura. É insolúvel em água, pode ser utilizado em sinergia com o BHA, possui maior eficiência em gordura animal que óleos vegetais e seu limite máximo de uso permitido é de 100 mg.kg^{-1} (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

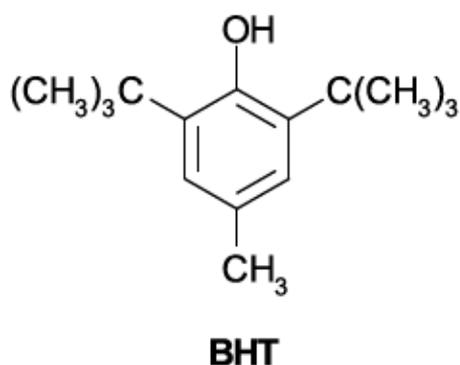


Figura 3 - Estrutura fenólica do BHT

Muitos trabalhos também comparam a eficiência de antioxidantes naturais de diversas fontes como chás, óleos essenciais, frutas tropicais como mamão, acerola e caju e até mesmo com película de amendoim ao BHT. Os resultados, em geral, evidenciam uma atividade antioxidante menor do BHT frente aos antioxidantes naturais como quercetina, ácido cafeico, catequina, epicatequina entre outros. Na maioria dos trabalhos os autores indicam o uso dos naturais em substituição ao BHT devido a sua possível toxigenicidade (VON-GADOW et al., 1997; MORAIS et al., 2006; GALVÃO et al., 2008; MELO et al., 2008; CAMARGO et al., 2012).

Clapp et al. (1974) administraram o BHT para camundongos durante 16 meses e avaliaram a presença de carcinomas. Os autores evidenciaram que na concentração de 7.500 mg kg^{-1} ocorreu um aumento no número de tumores pulmonares nos camundongos que receberam o BHT com relação ao controle. No entanto os mesmos autores, mais tarde realizaram um experimento com um número maior de animais induzindo o câncer com dietilnitrosamina e fizeram novamente a administração de BHT. Além de não encontrarem os mesmos resultados, foi observado que os animais que ingeriram BHT juntamente com a dietilnitrosamina apresentaram maior tempo de vida e redução na incidência de carcinoma em células escamosas, sugerindo o BHT como um anticancerígeno (CLAPP et al., 1978).

Em outro estudo, foi constatada a presença de carcinomas nos alvéolos e nos brônquios em ratos que receberam uma concentração de 3000 mg.kg^{-1} de BHT, porém os mesmos tumores não foram encontrados nos animais que receberam uma dose de 6000 mg kg^{-1} de BHT, levando a conclusão de que o BHT não foi carcinogênico nas condições estudadas (NCI, 1979). Shirai et al. (1982), também não evidenciaram o BHT como carcinogênico em concentrações de até 5000 mg kg^{-1} administradas a camundongos machos e fêmeas por 96 semanas.

Outros trabalhos realizados com animais experimentais também não observaram a indução de carcinomas com doses de até 10000 mg.kg^{-1} , sendo que alguns classificaram o BHT como substância anticancerígena, uma vez que inibiu ou retardou o surgimento de tumores nos animais estudados (DEICHMANN et al., 1955; ULAND, 1973; HIROSE, 1981).

No trabalho realizado por Olsen et al. (1986) os autores observaram aumentos relacionados com a dose de BHT no número de adenomas e carcinomas hepatocelulares em ratos machos e um aumento da adenomas para ratos fêmeas sendo que todos os tumores hepatocelulares foram detectados quando os ratos

apresentavam mais de 2 anos de idade. No entanto os autores observaram que o tempo de vida dos ratos de ambos os sexos que receberam o BHT foi significativamente maior quando comparado ao controle, levando os autores a concluir que estudos adicionais sobre o papel do BHT no desenvolvimento de tumores devem ser realizados.

Ao analisarem amostras oriundas de sedimentos litorâneas Kinae et al. (1981) identificaram 28 substâncias, entre elas o BHT, e ao avaliarem o efeito causado no DNA de *Bacillus subtilis* os autores não observaram danos, o que sugere ser uma substância não genotóxica nas condições estudadas. Outros autores também não encontraram associação entre o BHT e mutação em *Salmonella typhimurium* (BEM-HUR et al., 1981; BRUSICK, 1993).

No estudo realizado por Botterweck et al. (2000) na Holanda, também não foi encontrada correlação entre o consumo do BHT e a indução do câncer de estômago entre pessoas de 55 a 69 anos. Williams et al. (1999) evidenciaram que assim como o BHA, o BHT não apresenta riscos ao desenvolvimento de câncer em humanos em doses controladas, sendo que em concentrações de 100 mg.kg^{-1} este pode atuar como anticancerígeno.

2.1.3 Terc butil hidroquinona (TBHQ)

O TBHQ (Figura 4) é um antioxidante muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras, principalmente em óleos vegetais polinsaturados. As hidroxilas posicionadas na posição para são responsáveis pela estabilização do radical oriundo das reações de oxidação. É estável quando submetido a altas temperaturas, sendo considerado o melhor antioxidante de óleos para fritura e para produtos fritos. É ligeiramente solúvel em água, e sua combinação com ácido cítrico aumenta sua eficiência em óleos vegetais. Seu limite máximo permitido em alimentos é de 100 mg.kg^{-1} (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

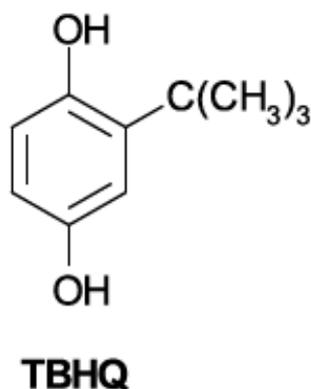


Figura 4 - Estrutura fenólica do TBHQ

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos visando a substituição do TBHQ por antioxidantes naturais provenientes de frutas, hortaliças e especiarias como mamão, cogumelo, alho, chás entre outros, sendo que a maior justificativa a sua substituição é sua possível ação toxicológica. No entanto todos os trabalhos encontrados evidenciaram uma atividade antioxidante menor para os extratos naturais do que para o TBHQ, confirmando o fato da sua alta estabilidade quando submetido a altas temperaturas, e grande eficiência no controle das reações de oxidação (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998; LIANG et al., 2006; JORGE; MALARIDA, 2008; COIMBRA; RÉ, 2009; SILVA et al., 2009; CAMARGO et al., 2012).

Os estudos sobre genotoxicidade do TBHQ são contraditórios, uma vez que alguns deles não observaram mutação gênica induzida por TBHQ em microrganismos como *Salmonella* e *Saccharomyces cerevisiae* ou em fígado de ratos, indicando-o como substância não carcinogênica (ABE; SASAKI, 1977; ROGERS et al., 1992; ZEIGER et al., 1992). No entanto outros trabalhos sugerem que o TBHQ pode ocasionar aberrações cromossômicas e em diferentes tecidos de animais experimentais como *hamsters* e ratos, considerando-o como agente mutagênico (PHILLIPS et al., 1989; MATSUOKA et al., 1990; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM - NTP, 1995). Outros trabalhos sugerem o TBHQ como substância anticancerígena, como o estudo de Hirose et al. (1993a), em que os autores avaliaram o efeito da ingestão deste antioxidante sintético na concentração de 1% por ratos que foram tratados com a substância carcinogênica 1,2 dimetil hidrazina, foi observado que a ingestão do TBHQ dietético diminuiu

significativamente a multiplicidade de adenocarcinomas do cólon com relação ao grupo que ingeriu somente a 1,2 dimetil hidrazina.

Fukushima et al. (1991) avaliaram o desenvolvimento de carcinoma em ratos utilizando substâncias cancerígenas e a inibição com a administração de antioxidantes. Foi observado que os ratos que receberam uma mistura de antioxidantes que continha o TBHQ administrado juntamente com os agentes cancerígenos e/ou compostos nitrosos apresentaram uma menor incidência de hiperplasia no fígado além da redução de nódulos e carcinoma hepatocelular, sugerindo-o como substância anticancerígena.

No estudo de Imhoff e Hanser (2010), os autores concluíram que o TBHQ parece gerar espécies reativas de oxigênio mitocondrial, que desempenham um papel fundamental na via de sinalização Nrf2 e que está diretamente relacionada com a proteção das células contra agentes carcinogênicos.

Não foram encontrados trabalhos realizados com humanos, para avaliar o real efeito toxigênico do TBHQ. Apesar de alguns trabalhos evidenciarem os efeitos quimioprotetores do TBHQ, outros estudos sugerem que altas doses podem levar a indução de câncer. Entre todos os estudos com animais considerando resultados positivos e negativos, apenas um ensaio de micronúcleos na medula óssea de ratos, com a avaliação negativa foi considerado conclusivo pelo *Expert Committee on Food Additives* (JECFA). O que levou o JECFA a considerar que é improvável que o TBHQ seja genotóxico *in vivo* em condições de uso como um antioxidante. No entanto, devido aos resultados negativos quanto ao consumo de TBHQ, mais trabalhos toxicológicos *in vivo* e/ou *in vitro* são necessários para elucidar tal afirmação (GHAVARI et al., 2010).

2.1.4 Propil galato (PG)

O PG (Figura 5) é um antioxidante extremamente efetivo na estabilização de óleos e gorduras e atua sinergisticamente com TBHQ e BHA. É menos solúvel em óleo que o BHA e BHT e apresenta uma considerável solubilidade em água, não é muito resistente ao aquecimento e, além disso, forma complexos de coloração violeta com o íon ferro resultando na descoloração do produto, devido a isso sempre

é utilizado com agentes complexantes como ácido cítrico. Seu limite máximo permitido é de 100 mg.kg^{-1} (FENNEMA, 1996; ARAÚJO, 2008).

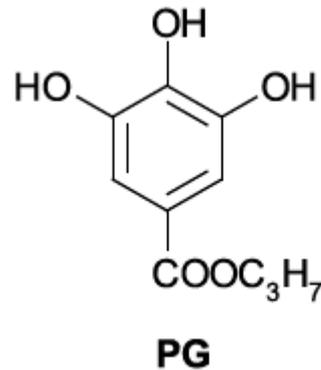


Figura 5 - Estrutura fenólica do PG

Alguns estudos comparam a atividade antioxidante do PG com extratos provenientes de frutas, chás, com outros antioxidantes sintéticos como BHA, BHT e outros ésteres de ácido gálico, ou mesmo com antioxidantes naturais purificados como ácido ascórbico, resveratrol e tocoferóis. No entanto os resultados variam entre os trabalhos, sendo que em normalmente o PG apresenta uma atividade antioxidante intermediária quando comparado com os antioxidantes naturais ou mesmo com os sintéticos (ARUOMA et al., 1993; HUANG; FRANKEL, 1997; JAYAPRAKASHA et al., 1997; MURCIA et al., 2001; SOARES et al., 2003).

Dacre (1974) analisou o efeito toxicológico da ingestão do PG em longo prazo em ratos. Doses de 0 a 1% foram administradas a animais machos e fêmeas e diversos tecidos, como do fígado e rins, foram analisados. Não foi encontrado nenhum efeito significativo em todas as concentrações testadas com relação ao controle, o que levou o autor a concluir que na dieta dos animais 1% de PG, o que equivale a uma ingestão de $1,5\text{g/Kg.dia}^{-1}$ para humanos, foi uma concentração sem efeito e segura. No entanto outros trabalhos relatam um possível efeito citotóxico do PG, como constataram Nakagawa et al. (1995) e Nakagawa e Tayama (1995), sendo que os autores evidenciaram uma diminuição do ATP intracelular acompanhado com o aumento da concentração de PG, o que ocasionou a morte celular. Os mesmos autores, em trabalho posterior, relataram que em concentrações menores ou iguais de 0,5 mM de PG não houve morte celular, e que mesmo provocando fragmentação do DNA nessas concentrações o PG não foi uma substância citotóxica (NAKAGAWA et al., 1997).

Também é relatado que o PG possui um efeito significativo sobre agentes carcinogênicos como nitrosaminas, além de reduzir o efeito mutagênico de aflatoxina B1, mas que, no entanto em concentrações equimolares do PG com estas substâncias, o efeito toxigênico pode ser aumentado (ROSIN; STICH, 1980)

Hirose et al. (1993b) estudaram o efeito anticancerígeno de diferentes antioxidantes sintéticos em ratos machos que ingeriram nitrosaminas. Os autores observaram que o PG foi eficiente apenas na redução da multiplicidade dos túbulos renais atípicos, levando os autores a concluir que este composto não demonstrou exercer influência positiva ou negativa no desenvolvimento de câncer.

Nenhum estudo para elucidar os efeitos tóxicos do PG em humanos foi encontrado, sendo que trabalhos realizados com animais experimentais a longo prazo também são escassos. Van-Der-Heijden et al. (1986) concluíram que estudos mais detalhados e a longo prazo para analisar os efeitos crônicos dos galatos são necessários, e que com as provas toxicológicas disponíveis até o momento do trabalho os PG poderia ser usado com segurança como antioxidante em alimentos.

2.2 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de diferentes matrizes alimentares ou orgânicas, sendo muito comum a utilização de vegetais e plantas. Estes abrangem uma série de substâncias químicas com diferentes funções orgânicas e mecanismos de atuação. Uma grande quantidade de frutas, ervas e especiarias são fontes de compostos fenólicos. Estas substâncias frequentemente têm demonstrado uma alta atividade antioxidante em sistemas *in vitro*, o que sugere sua utilização como conservante natural em alimentos propensos à oxidação lipídica (RICE-EVANS et al., 1996; ZHENG; WANG, 2001).

Os compostos fenólicos, além da atividade antioxidante, podem exibir de propriedades fisiológicas desejáveis como atividade antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora, mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos, com potencial de controle das reações de oxidação (BALASUNDRAM et al., 2006).

Devido a isso, uma série de trabalhos visaram estudar o potencial de extratos de diversas fontes naturais a fim de substituir os antioxidantes sintéticos, que são largamente utilizados para aumentar a vida útil de alimentos lipídicos (DURÁN; PADILLA, 1983). Além disso, o crescente aumento da medicina alternativa e a atração pelo apelo de natural faz com que a população consuma cada vez mais produtos e/ou preparados contendo altas doses de antioxidantes naturais, sendo alegadas a eles propriedades terapêuticas. No entanto eles ainda necessitam passar por ensaios clínicos controlados para comprovar sua eficácia, e também seu potencial de toxicidade em condições específicas uma vez que esse é um campo pouco estudado na pesquisa (GALATI; O'BRIEN, 2004).

Embora algumas evidências epidemiológicas mostrem uma correlação positiva entre o consumo de antioxidantes naturais e a saúde dos consumidores, estudos observacionais e de caso-controle, comumente apresentam resultados conflitantes, como o aumento de risco de doenças cardiovasculares, e aumento do risco de câncer em concentrações subótimas. Algumas explicações para estes resultados são a falta de conhecimento dose/resposta em seres humanos, conhecimento limitado da biodisponibilidade de antioxidantes na dieta, isoladamente e em conjunto, resposta fisiológica individuais, pesquisas realizadas com antioxidantes isolados desconsiderando-se o sinergismo entre eles, entre outras (COSTA; ROSA, 2010)

Em uma pesquisa recente realizada por Mubarak et al. (2013) os autores evidenciaram que o ácido clorogênico, que é um antioxidante natural e no trabalho em questão foi proveniente do café, foi responsável por aumentar a resistência a insulina em camundongos, além de aumentar a deposição de gordura no fígado, o que pode estar relacionado com doenças crônicas como diabetes e obesidade. Contradizendo o que outros trabalhos mais antigos indicam a respeito do mesmo.

Tal constatação dá suporte à ideia de que mais trabalhos são necessários para avaliar o efeito de antioxidantes naturais *in vivo* e/ou *in vitro* para se determinar sua real atividade e concentrações seguras de consumo.

2.3 Considerações Finais

É notório que novos estudos são necessários para determinar o real efeito no organismo dos antioxidantes sintéticos, uma vez que a maioria dos trabalhos realizados são estudos antigos e que muitas vezes possuem conclusões conflitantes. Além disso, estudos de coorte, e em longo prazo também são necessários para elucidar se estes antioxidantes realmente representam um risco à saúde para humanos na ingestão real em que são consumidos. No mesmo sentido, mais trabalhos também são fundamentais para verificar o efeito dos antioxidantes naturais no organismo e nos alimentos, uma vez que estes podem possuir efeitos indesejáveis quando consumidos em doses que fogem do natural. É importante ressaltar, que tais estudos são de extrema importância, devido à relevância que os antioxidantes apresentam não só em aspectos tecnológicos, mas também fisiológicos, logo determinar concentrações seguras de consumo e evidenciar os efeitos destes tornam-se questões essenciais.

Referências

ABE, S.; SASAKI, M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1635-1641, 1977.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 325-380, 2001.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.

ARUOMA, O.I.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant action of garlic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.41, n. 11, p. 1880-1885, 1993.

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

BANDYOPADHYAY, M.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). **LWT–Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 1, p. 842–851, 2007.

BEN-HUR, E.; GREEN, M.; PRAGER, A.; ROSENHAL, I.; RIKLIS, E. Differential protective effects of antioxidants against cell killing and mutagenesis of *Salmonella tyrnphimuriuni* by γ - radiation. **Journal of Radiation Research**, Tokyo, v. 22, n. 1, p. 250-257, 1981.

BOTTERWECK, A.A.; VERHAGEN, H.; GOLDOHM, R.A.; KLEINJANS, J.; Van-DEN-BRANDT, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, Boston, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BRANEN, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 52, n. 5, p. 59-63, 1974.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BRUSIK, D. Genotoxicity of phenolic antioxidants. **Toxicology and Industrial health**, Princeton, v. 9, n. 23, p. 223-230, 1993.

CAMARGO, A.C.; VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 3, p. 3073-3084, 2012.

CLAPP, N.K.; TYNDALLI, R.I.; CUMMING, R.B.; OTTEN, J.A. Effects of butylated hydroxytoluene alone or with diethylnitrosamine in mice. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 933-940, 1974.

CLAPP, N.K.; TYNDALL, R.I.; SATTERFIELD, L.D.; KLIMA, W.C.; BOWLES N.D. Selective sex-related modification of diethylnitrosamine-induced carcinogenesis in BALB/ c mice by concomitant administration of butylated hydroxytoluene. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 61, n. 1, p. 177-182, 1978.

COIMBRA, M.C.; RÉ, P.V.D.; JORGE, N. Influência do extrato de alho na estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 547-550, 2009.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais**: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. 526 p.

DACRE, J.C. Long-term toxicity study on n-propylgallate in mice. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 125-129, 1974.

DÉGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos, **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEICHMANN, W.B.; CLEMMER, J.J.; RAKOCZY, R.; BIANCHINE J. Toxicity of ditertiarybutylmethyl phenol. **Archives of Industrial Health**, Chicago, v. 11, n. 2, p. 93-101, 1955.

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

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

FENNEMA, O.R. **Food chemistry**, 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 900 p.

FUKUSHIMA, S.; SHIBATA, M.A.; HIROSE, M.; KATO, T.; TATEMATSU, M.; ITO, N. Organ-specific modification of tumor development by low-dose combinations of agents in a rat wide-spectrum carcinogenesis model. **Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 82, n. 7, p. 784-792, 1991.

GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GALVÃO, E.L.; SILVA, S.C.F.; MOREIRA, A.V.B.; SOUSA, E.M.B.D. Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 551-557, 2008.

GAUNT, I.F.; FEUER, G.; FAIRWEATHER, F.A. Liver response tests. IV. Application to short-term feeding studies with butylated hydroxytoluene (bht) and butylated hydroxyanisole (BHA). **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 433-443, 1965.

GHAVARI, N.; HAGGARTY, S.; EL-KADI, A.O.S. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolite. **Current Drug Metabolism**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007.

HIROSE, M.; SHIBATA, M.; HAGIWARA, A.; IMAIDA, K.; ITO, N. Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 147-151, 1981.

HIROSE, M.; YADA, H.; HAKOI, K.; TAKAHASHI, S.; ITO, N. Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. **Journal of Carcinogenesis**, Fort Worth, v.14, n. 8, p. 1549-1553, 1993a.

_____. Modification of carcinogenesis by alpha-tocopherol, t-butylhydroquinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model. **Journal of Carcinogenesis**, Fort Worth, v. 14, n. 11, p. 2359-2364, 1993b.

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 8, p. 3033-3038, 1997.

IMHOFF, B.R.; HANSEN, J.M. Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 541-551, 2010.

JAYASPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M.; SAKARIAH, K. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 15, p. 4344-4348, 1997.

JORGE, N.; MALACRIDA, C.R. Extratos de sementes de mamão (*Carica papaya*) como fonte de antioxidantes naturais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 337-340, 2008.

KINAE, N.; HASHIZUME, T.; MAKITA, T.; TOMITA, I.; KIMURA, I.; KANAMORI, H. Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents. I. Mutagenicity of the sediment samples derived from kraft paper mills. **Water Research**, New York, v. 17, n. 2, p. 17-24, 1981.

LIANG, Y.C.; MAY, C.Y.; FOON, C.S.; NGAN, M.A.; HOCK, C.C.; BASIRON, Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, London, v. 85, n. 5/6, p. 867-870, 2006.

MASUI, T.; HIROSE, M.; IMAIDA, K.; FUKUSHIMA, S.; TAMANO, S. Sequential changes of the for stomach of rats, hamsters and mice treated with BHA. **Journal of the Japanese Cancer Research**, Tokyo, v. 77, n. 1, p. 1083-1090, 1986.

MATSUOKA, A.; MATSUI, M.; MIYATA, N.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. Mutagenicity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and its metabolites in short-term tests *in vitro*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 32-125, 1990.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

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

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécie de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MUBARAK, A.; HODGSON, J.M.; CONSIDINE, M.J.; CROFT, K.D.; MATTHEWS, V.B. Supplementation of a high-fat diet with chlorogenic acid is associated with insulin resistance and hepatic lipid accumulation in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 18, p. 4371-4378, 2013.

MURCIA, M.A.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 3, p. 379-384, 2001.

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

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic study of reaction between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 28, n. 1, p. 753-756, 1993.

NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, K. Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes. **Archives of Toxicology**, New York, v. 69, n. 3, p. 204-208, 1995.

NAKAGAWA, Y.; MOLDÉUS, P.; MOORE, G. Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes. **Archives of Toxicology**, New York, v. 72, n. 1, p. 33-37, 1997.

NAKAGAWA, Y.; NAKAJIMA, K.; TAYAMA, S.; MOLDÉUS, P. Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes: effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 47, n. 5, p. 1021-1027, 1995.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Comprehensive cancer information**. Bethesda, 1979. 128 p. (Technical Report Series, v. 115, n. 1501).

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Toxicology and carcinogenesis studies of t-butylhydroquinone (CAS No.1948-33-0) in F344/N Rats and B6C3F1 mice (feeding studies)**. Research Triangle Park: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1995. 450 p. (Draft Technical Report Series, 459; NIH Publication, 95-3375).

OLSEN, P.; MEYER, O.; BILLE, N.; WURTZEN, G. Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1-12, 1986.

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxy anisole and butylated hydroxyl toluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 72, n. 12, p. 1565-1570, 1995.

PARK, E.H.; CHANG, H.H.; CHA, Y.N. Induction of hepatic tumors with butylated hydroxyanisole in the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. **Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 81, n. 8, p. 738-741, 1990.

PHILLIPS, B.J.; CARROLL, P.A.; TEE, A.C.; ANDERSON, D. Toxicity to Chinese hamster ovary (CHO) cells of the products of reaction of butylated hydroxyanisole with nitrite at low pH. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 117-123, 1994.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

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

ROGERS, C.G.; BOYES, B. G.; MATULA, T.I.; STAPLEY, R. Evaluation of genotoxicity of tert.-butylhydroquinone in an hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells and in strain D7 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 280, n. 1, p. 17-27, 1992.

ROSIN, M.P.; STICH, H.F. Enhancing and inhibiting effects of propyl gallate on carcinogen-induced mutagenesis. **Journal of Environmental Pathology**, Park Forest South, v. 4, n. 1, p. 159-167, 1980.

SEAL, P.; RILEY, P. A.; INMAN, D.R. Basal cell encroachment into the dermis caused by applications of hydroxyanisole. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 264-267, 1969.

SHIRAI, T.; HAGIWARA, A.; KURATA, Y.M.; FUKUSHIMA, S.; ITO, N. Lack of carcinogenicity of butylate hydroxytoluene on long-term administration to B6C3F1. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 861-865, 1982.

SILVA, A.C.; OLIVEIRA, M.C.; RÉ, P.V.D.; JORGE, N. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

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

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 12, n. 4, p. 1077-1080, 2003.

SPORN, A.; DINA, I. Toxicology effects of BHA. **Revue Roumaine de Biochimie**, Bucarest, v. 4, n. 1, p. 301, 1968.

ULLAND, B.M.; WEISBURGER, J.H.; YAMAMOTO R.S.; WEISBURGER, E.K. Antioxidants and carcinogenesis: butylated hydroxytoluene, but not diphenyl-p-phenylenediamine, inhibits cancer induction by N-2-fluorenylacetamide and by N-hydroxy-N-2-fluorenylacetamide. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 199-207, 1973.

VAN-DER-HEIJDEN, C.A.; JANSEEN, P.J.; STRIK, J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 10/11, p. 1067-1070, 1986.

VON-GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 632–638, 1997.

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

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J.; WHYSNER, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9/10, p. 1027-1038, 1999.

WOODS, D.A.; SMITH, C.J. Ultrastructure of the dermal-epidermal junction in experimentally induced tumors and human oral lesions. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 259–263, 1969.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

ZEIGER, E.; ANDERSON, B.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; MORTELMANS, K. Salmonella mutagenicity tests. V. Results from the testing of 311 chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 2, p. 2-141, 1992.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165–5170, 2001.

3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BORRA DE CAFÉ SOLÚVEL

Resumo

O aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos para obtenção de compostos de valor agregado é crescente. A borra de café é produzida em grande escala pela indústria do setor e alguns trabalhos a indicam como fonte de compostos fenólicos, no entanto não há um estudo das condições ótimas dessa extração. Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo da extração de compostos fenólicos, bem como avaliar sua atividade antioxidante. Foi utilizada a metodologia de superfície resposta para otimizar a extração de fenólicos, tendo como variáveis exploratórias a concentração de etanol, temperatura e tempo, e como resposta concentração de fenólicos totais nos extratos. A atividade antioxidante dos extratos obtidos na condição otimizada foi medida em equivalente de trolox e pela cinética de estabilização do radical DPPH, comparada ao TBHQ. Com o primeiro delineamento obtiveram-se regiões ótimas para obtenção de extratos com o máximo teor de compostos fenólicos, no entanto o experimento não foi preditivo e foi realizado um segundo delineamento, com ajuste dos níveis das duas variáveis exploratórias. O modelo matemático ajustado foi preditivo e a ANOVA não indicou falta de ajuste significativa. As melhores condições para obtenção de extrato com máximo teor de compostos fenólicos totais foi com uso de solução etanólica 49,5% (v/v), tempo e temperatura superior a 2 horas e 60°C, respectivamente. A atividade antioxidante se mostrou superior a de algumas frutas consideradas fonte de compostos fenólicos, no entanto a cinética de estabilização comparada com o antioxidante sintético TBHQ não foi eficiente em concentrações iguais, uma vez que o extrato da borra de café demandou maior tempo para estabilizar o radical.

Palavras-chave: Antioxidante; Compostos fenólicos; DPPH

Abstract

The use of waste from the food industry to obtain value-added compounds is increasing. The spend coffee is produced on a large scale by industry, and some studies indicate it as a source of phenolic compounds. However s optimal conditions for such extraction were not determined. In this context, the objective of this work was to study the extraction of phenolic compounds and assess their antioxidant activity. Response surface methodology was used to optimize the extraction of phenolic, with three explanatory variables (ethanol concentration, temperature, and time) and concentration of phenolics as response. Antioxidant activity of obtained extract was measured in equivalent trolox and the kinetic stabilization of the radical DPPH were compared to TBHQ. With the first experimental design optimum extraction regions were identified; however the adjusted model was not predictive. A sequential experimental design, with adjust in explanatory variables levels, was applied and a predictive mathematical model was adjusted, while ANOVA indicates that lack of fit was not significant. The best conditions suggest higher phenolic

concentration in extract can be obtained with 49.5% (v/v) ethanol solution, during over 2 hours at 60°C. The antioxidant activity of coffee extract was superior to some fruits considered a source of phenolic compounds, however the kinetics of DPPH stabilization compared to the synthetic antioxidant TBHQ was not effective at same concentrations, due to spent coffee grounds extracts need more time to stabilize radical.

Keywords: Antioxidant; Phenolic compounds; DPPH

3.1 Introdução

A reutilização de resíduos da indústria de alimentos para obtenção de compostos com valor agregado tem crescido de forma significativa nos últimos anos influenciando também de maneira positiva aspectos de sustentabilidade. Dentre estes compostos, destacam-se os compostos fenólicos que são comumente encontrados em resíduos da indústria de alimentos como cascas, bagaço e tortas e que podem apresentar elevada capacidade antioxidante e serem utilizados para diversos fins em vários segmentos da indústria (LAUFENBERG et al., 2003).

Os compostos fenólicos abrangem desde moléculas simples, até outras com alto grau de polimerização. A atividade antioxidante destas substâncias se deve principalmente a suas características redutoras e estrutura química sendo que, tais propriedades apresentam um papel importante agindo na inibição da oxidação através do sequestro de radicais livres e quelação com metais de transição nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. O radical formado pelos compostos fenólicos em geral possuem baixa reatividade graças à estabilização que a ressonância do anel aromático proporciona (HASLAM, 1996; CHUN et al., 2005)

O café solúvel ou extrato de café desidratado é definido como o produto resultante da desidratação do extrato aquoso de café (*Coffea arabica*) e outras espécies do gênero *Coffea*, e deve ser preparado com café recentemente torrado e moído e água potável, sem a adição de conservantes e aditivos. Deve apresentar composição tal que quando reconstituído, segundo as indicações contidas no rótulo, reproduza exatamente o café bebida comum (BRASIL, 1978)

As etapas de produção do café solúvel, descritas por Viotto (1991), incluem: i) Limpeza dos grãos; ii) Moagem; iii) Extração e Secagem; iv) Clarificação em centrífuga contínua; v) Concentração e vi) Secagem (por Spray Drying ou Freeze Drying), a borra é o resíduo sólido obtido após a etapa de extração. Em alguns

processos industriais, a borra é prensada para reduzir a umidade e posteriormente pode ser seca ou não, para finalmente ser usada como fonte de energia em caldeiras adaptadas. No processo industrial para a obtenção do café solúvel é gerada uma quantidade de aproximadamente 480 kg de borra para cada tonelada de café verde sendo, portanto uma quantidade significativa (ADANS, 1985). Alternativas para o aproveitamento da borra têm sido pesquisadas como o seu uso em ração animal, fertilizante e até como fonte de fibra alimentar em biscoitos, com o intuito de propor um fim mais sustentável a este coproduto que é tratado como resíduo pela indústria (VIOTTO, 1991).

Alguns estudos encontraram quantidades apreciáveis de compostos fenólicos na borra de café, com destaque para o ácido clorogênico, trigonelina e a cafeína, sendo que os extratos hidro alcoólicos obtidos apresentaram elevada atividade antioxidante e se apresentaram como uma fonte de compostos bioativos (YEN et al., 2005; RAMALAKSHMI et al., 2009; ACEVEDO et al., 2013). No entanto, não foi encontrada na literatura uma metodologia otimizada padrão, ou seja, que extraia a maior quantidade de compostos fenólicos da borra de café, sendo que as variáveis que mais se diferem entre os estudos são, o tempo de extração, o grau de hidratação do etanol e a temperatura utilizada na preparação dos extratos.

Neste contexto os objetivos do presente trabalho foram otimizar o processo de extração de compostos fenólicos da borra de café através da metodologia de superfície resposta, utilizando como variáveis exploratórias, tempo, concentração de etanol e temperatura, e avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos, a fim de valorizar este resíduo produzido em grandes quantidades pelas indústrias do setor.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante

As amostras de borra de café arábica foram doadas já secas por uma indústria do setor de café solúvel. As amostras foram trituradas em processador em potência máxima por aproximadamente 5 minutos para obtenção de um pó de menor granulometria. Em seguida a borra foi acondicionada em sacos escuros de polietileno de baixa densidade e armazenada em freezer comercial a -18° C até o momento das análises.

Para obtenção dos extratos as amostras trituradas foram colocadas juntamente com o solvente em uma proporção de 1:30 (m/v) em banho-maria com agitação sob condições de baixa luminosidade, sendo que variou-se o tempo, a temperatura e a concentração de etanol (solvente) de acordo com o delineamento experimental. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 5000 g por 20 minutos, filtrados em papel de filtro Whatman nº 2 e armazenados em frascos âmbar a -26°C até o momento da realização das análises.

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes ao ácido gálico (GAE) por grama de amostra seca.

A atividade antioxidante do extrato produzido nas condições otimizadas foi determinada *in vitro*, em termos de porcentagem de inibição e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) frente ao radical livre estável 2,2-di(4-t-octilfenil)-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILIANS et al., 1995). A porcentagem de inibição do extrato da borra de café foi comparada ao o antioxidante sintético terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), mantendo-se as mesmas concentrações em fenólicos. O estudo comparativo foi realizado por meio da medição da inibição do radical DPPH a cada minuto, até completar o tempo proposto pelo método para encerrar a reação (45 minutos).

3.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

Para a otimização da extração de compostos fenólicos da borra de café foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo 3 variáveis exploratórias e uma variável dependente (concentração de fenólicos). As faixas de estudo são apresentadas na Tabela 1 e o delineamento experimental utilizado é apresentado no Quadro 1.

Tabela 1 - Faixas de estudo das variáveis exploratórias em análise no processo de extração de fenólicos em borra de café

Variável exploratória	Nível de variação				
	-1,68	-1	0	1	+1,68
Temperatura	25	32,08	42,5	52,92	60
Tempo (h)	0	4,86	12	19,14	24
% etanol	0	20,04	49,5	78,96	99

No total foram realizados 18 ensaios combinando-se as variáveis e incluindo quatro repetições do ponto central. Todos os experimentos foram realizados de maneira aleatória e utilizando os mesmos equipamentos. Após análise dos efeitos foram analisados pela metodologia de superfície de resposta e análise de regressão múltipla. O modelo matemático de segunda ordem foi ajustado, incluindo termos lineares e quadráticos, e interações entre variáveis exploratórias. Os modelos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) e teste *de F*. A fórmula do modelo esta representada pela equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

Em que Y é a resposta predita, x_1 , x_2 , e x_3 representam os níveis codificados de variáveis independentes, β_0 é o coeficiente de intercepção e os β 's são os coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadráticos. O coeficiente de determinação é uma medida da proporção da variação total da resposta explicada pelo modelo. O teste F, que testa a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo, foi realizado por meio da análise de variância com auxílio do aplicativo "Statística 12.0" e comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Otimização do processo de extração de compostos fenólicos da borra de café

Através da ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível avaliar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre as variáveis, além de obter o valor das variáveis que otimizem o processo em estudo (SANTOS et al., 2012).

No Quadro 1, é possível observar os resultados experimentais obtidos para concentração de fenólicos em cada ensaio realizado no experimento.

Ensaio	Variáveis exploratórias						Variável dependente
	Tempo (horas)		Temperatura (°C)		% Etanol		Fenólicos borra de café (mgGAE.g ⁻¹)
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	
1	-1	4,86	-1	32,08	-1	20,04	7,05
2	1	19,14	-1	32,08	-1	20,04	8,24
3	-1	4,86	1	52,92	-1	20,04	10,83
4	1	19,14	1	52,92	-1	20,04	11,66
5	-1	4,86	-1	32,08	1	78,96	8,51
6	1	19,14	-1	32,08	1	78,96	10,47
7	-1	4,86	1	52,92	1	78,96	11,71
8	1	19,14	1	52,92	1	78,96	15,13
9	-1,68	0	0	42,5	0	49,5	8,45
10	1,68	24	0	42,5	0	49,5	16,83
11	0	12	-1,68	25	0	49,5	11,58
12	0	12	1,68	60	0	49,5	20,88
13	0	12	0	42,5	-1,68	0	10,34
14	0	12	0	42,5	1,68	99	5,62
15	0	12	0	42,5	0	49,5	16,83
16	0	12	0	42,5	0	49,5	17,05
17	0	12	0	42,5	0	49,5	17,81
18	0	12	0	42,5	0	49,5	17,62

Quadro 1 - Compostos fenólicos totais (mg GAE.g⁻¹) obtido nos extratos hidroetanólicos de borra de café

A Tabela 2 apresenta a estimativa dos efeitos sobre o teor de compostos fenólicos totais. Verificou-se que as variáveis tempo e temperatura apresentaram efeito linear significativo e que as três variáveis apresentaram efeitos quadráticos significativos e negativos ($p \leq 0,05$), indicando passagem por uma região de máxima extração de fenólicos. Apesar de significativa, a variável que apresentou o menor efeito sobre o a extração de fenólicos foi o tempo, ou seja, o aumento de cerca de 4 horas para 20 horas proporcionou aumento de apenas 3,14 mg GAE.g⁻¹. Além disso, a interação entre esta variável e as demais não foi significativa.

Tabela 2 - Estimativa dos efeitos das variáveis exploratórias sobre o teor de compostos fenólicos totais de extratos de borra de café

	Efeito	Desvio padrão	Nível descritivo (P)
Média	17,40338	0,231093	0,000005
Tempo (L)	3,14822	0,250639	0,001088
Tempo (Q)	-3,98090	0,260701	0,000610
Temperatura (L)	4,49754	0,250639	0,000377
Temperatura (Q)	-1,43697	0,260701	0,011758
Etanol (L)	0,01618	0,250639	0,952583
Etanol (Q)	-7,28306	0,260701	0,000101
Tempo X Temperatura (L)	0,27500	0,327331	0,462515
Tempo X Etanol (L)	0,84000	0,327331	0,082766
Tempeatura X Etanol (L)	0,16500	0,327331	0,648898

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ($P \leq 0,05$). L = linear; Q = quadrático

Os termos não significativos, com exceção da interação do tempo e o etanol (uma vez que apresentou um valor próximo ao da significância) foram ignorados e com os coeficiente de regressão um modelo matemático de segunda ordem foi ajustado:

Foi realizada a análise de variância e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para resultados obtidos na extração de fenólicos para borra de café

Fonte variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	292,331	6	48,7218	13,91
Resíduo	38,536	11	3,503266	
Falta de ajuste	37,8930	8	4,7366	22,10
Erro puro	0,6429	3	0,2143	
Total	330,8667	17		

$R^2 = 0,88$ $F_{0,95;6;11} = 4,03$ $F_{0,95;8;3} = 4,07$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido para o modelo foi de 0,88; demonstrando que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi 88%. Na análise de variância de um modelo parte da variação total das observações em torno da média é descrita pela equação de regressão, enquanto o restante faz parte dos resíduos; assim, quanto maior for a fração descrita pela regressão, ou seja, quanto mais próximo de 1 for o valor do coeficiente de determinação melhor será o ajuste do modelo aos dados observados (BARROS NETO et al., 2001).

O teste F encontra-se a razão entre o F calculado e o F tabelado. Quando esta relação for maior que 1, significa que a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. No entanto para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também possua fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS NETO et al., 1996). No presente trabalho a relação entre o F calculado e tabelado foi de 5,48 para a falta de ajuste sendo portanto significativa ($p < 0,05$) e para a regressão de 3,45; portanto, também significativa ($p < 0,05$), porém não possuindo fins preditivos.

Apesar da falta de ajuste significativa, a Figura 2 indica que há distribuição aleatória entre valores previstos e valores observados em toda faixa estudada, sendo possível concluir que os dados do modelo matemático podem ser utilizados para tomada de decisão no estudo da extração. Dessa maneira, as superfícies de resposta que representam o modelo matemático ajustado foram utilizadas para interpretação dos resultados (Figuras 3 a 5).

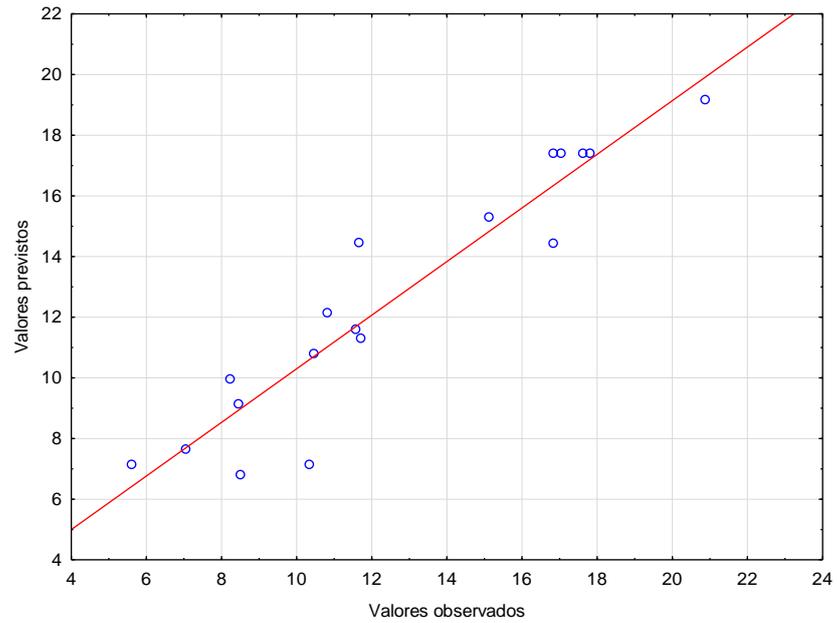


Figura 2 - Valores previstos e baseado no estudo da extração de compostos fenólicos de borra de café

A Figura 3 mostra a superfície resposta obtida pela interação da temperatura e etanol na extração de compostos fenólicos da borra de café, mantendo-se o tempo de 12 horas.

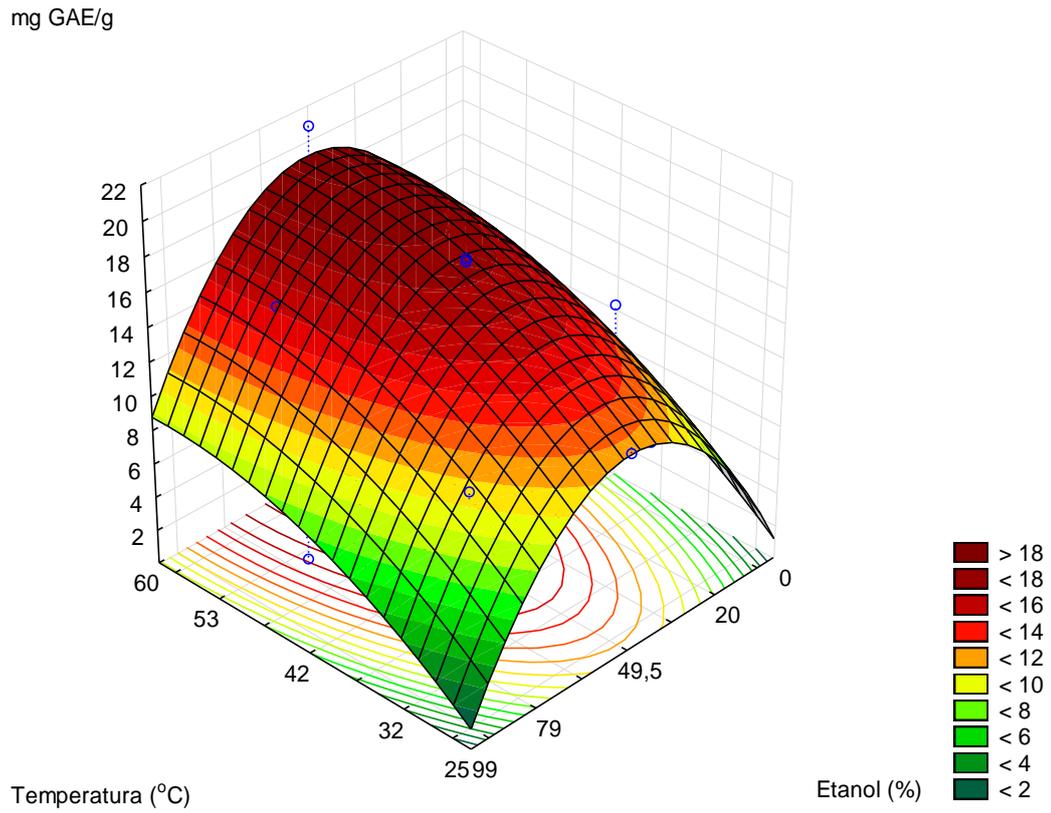


Figura 3 - Influência da concentração de etanol (%) e da temperatura (°C) na extração de compostos fenólicos da borra de café mantendo o tempo de extração fixo em 12 horas

mg GAE/g

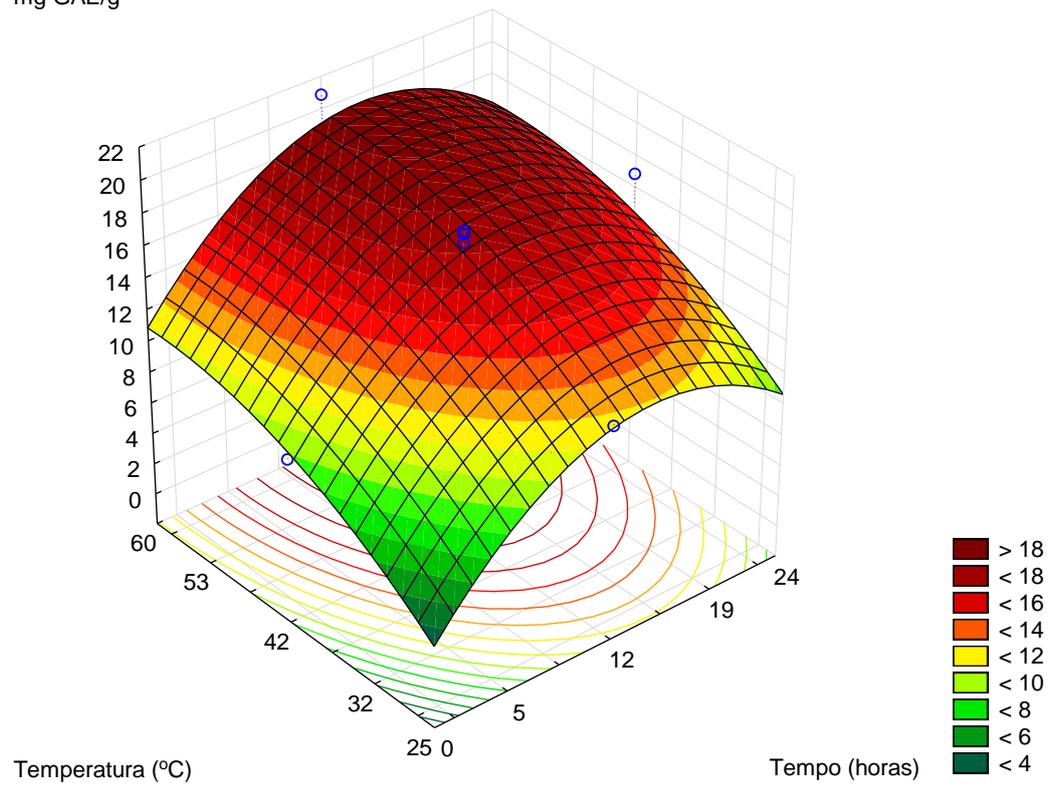


Figura 4 - Influência da temperatura (°C) e do tempo (horas) na extração de compostos fenólicos da borra de café mantendo a concentração de etanol fixa a 49,5%

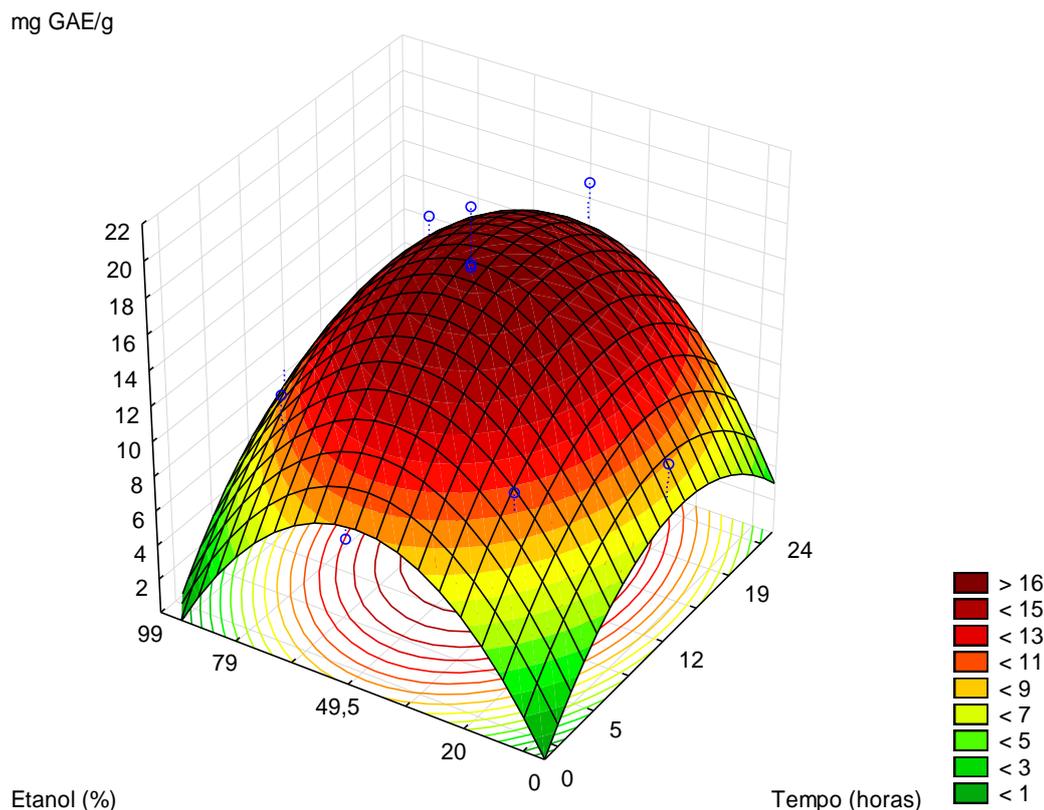


Figura 5 - Influência da concentração de etanol (%) e do tempo (horas) na extração de compostos fenólicos da borra de café mantendo a temperatura fixa a 42,5° C

Como se pode observar nas superfícies respostas, todas as variáveis exerceram influência na extração dos fenólicos, sendo que todas passaram por uma região de ótimo em que a concentração de etanol, nitidamente comportou-se de uma forma quadrática, demonstrando que tanto baixas e altas concentrações de etanol não são o método mais eficiente para a extração de fenólicos. A melhor concentração foi a região do ponto central, 49,5% (v/v). Ainda através das superfícies é possível notar que temperaturas superiores a 50°C e um tempo em torno de 12 horas permitem a obtenção de extratos com maior concentração de fenólicos.

Na literatura foram encontradas condições variáveis de tempo de extração, temperatura e concentração de etanol, sendo que nenhum trabalho apresentou as condições ótimas encontradas no presente estudo, o que pode indicar valores subestimados das amostras de borra de café analisadas em outros estudos (YEN et al., 2005; RAMALAKSHMI et al., 2009; ACEVEDO et al., 2013).

Como o primeiro delineamento não se mostrou preditivo e a falta de ajuste foi significativa, apesar do alto coeficiente de determinação de a baixa variabilidade

no ponto central, foi feito um segundo planejamento mantendo-se fixa a concentração de etanol em 49,5% (v/v), limitando o tempo estudado entre 20 e 120 minutos e a temperatura entre 40 e 60°C. O delineamento experimental é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Faixas de estudo das variáveis exploratórias do segundo delineamento para extração de fenólicos em borra de café

Variável exploratória	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Tempo (min.)	20	35	70	106	120
Temperatura (°C)	40	43	50	57	60

No Quadro 2 é possível observar o delineamento realizado e a concentração de fenólicos obtida para cada ensaio.

Ensaio	Variáveis exploratórias				Variável dependente
	Tempo (minutos)		Temperatura °C		Fenólicos (mgGAE.g ⁻¹)
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	
1	-1	35	-1	43	16,55
2	+1	106	-1	43	21,16
3	-1	35	+1	57	22,22
4	+1	106	+1	57	26,55
5	-1,41	20	0	50	19,37
6	+1,41	120	0	50	26,36
7	0	70	-1,41	40	17,42
8	0	70	+1,41	60	26,17
9	0	70	0	50	21,09
10	0	70	0	50	21,77
11	0	70	0	50	20,71
12	0	70	0	50	20,21

Quadro 2 - Quantidade de compostos fenólicos expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, obtido no segundo estudo de otimização do processo de extração de fenólicos em borra de café

A Tabela 5 apresenta a estimativa dos efeitos sobre o teor de compostos fenólicos totais. Verificou-se que as variáveis tempo e temperatura apresentaram efeito linear significativo e os efeitos quadráticos não foram significativos, bem como a interação entre eles ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 - Estimativa dos efeitos das variáveis exploratórias sobre o teor de compostos fenólicos totais de extratos de borra de café

	Efeito	Desvio padrão	Nível descritivo (P)
Média	20,9471368	0,328770044	0,00000852
Tempo (L)	4,71299616	0,465648363	0,00205
Tempo (Q)	1,56806088	0,522007388	0,05748
Temperatura (L)	5,86682882	0,465648363	0,00107
Temperatura (Q)	0,49165627	0,522007388	0,41574
Tempo X Temperatura (L)	-0,14	0,657545943	0,84504

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ($P \leq 0,05$)

L = linear; Q = quadrático

Os efeitos não significativos foram ignorados e com os coeficientes de regressão ajustou-se um modelo matemático de primeira ordem, representado pela equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Compostos Fenólicos Totais (mg GAE.g}^{-1}\text{)} = 20,94714 + 2,35650 (\text{tempo}) + 2,93341 (\text{temperatura})$$

A análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 6. Observa-se através do teste F que o F calculado para a regressão a partir dos dados experimentais foi maior que o F tabelado, indicando que a equação foi estatisticamente significativa, além de ser preditiva. A variação explicada pelo coeficiente de determinação (R^2) demonstrou que 97,7% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo. Através do teste F verificou-se que a falta de ajuste ao modelo não foi estatisticamente significativa (F tabelado foi maior que o F calculado).

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos na extração de fenólicos para borra de café

Fonte variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	116,5	2	58,25	170,71
Resíduo	3,071	9	0,3412222	
Falta de ajuste	1,774	6	0,2956667	0,6839
Erro puro	1,297	3	0,4323333	
Total	119,571	11	58,25	

$$R^2 = 0,977 \quad F_{0,95;2;9} = 19,385 \quad F_{0,95;6;3} = 4,757$$

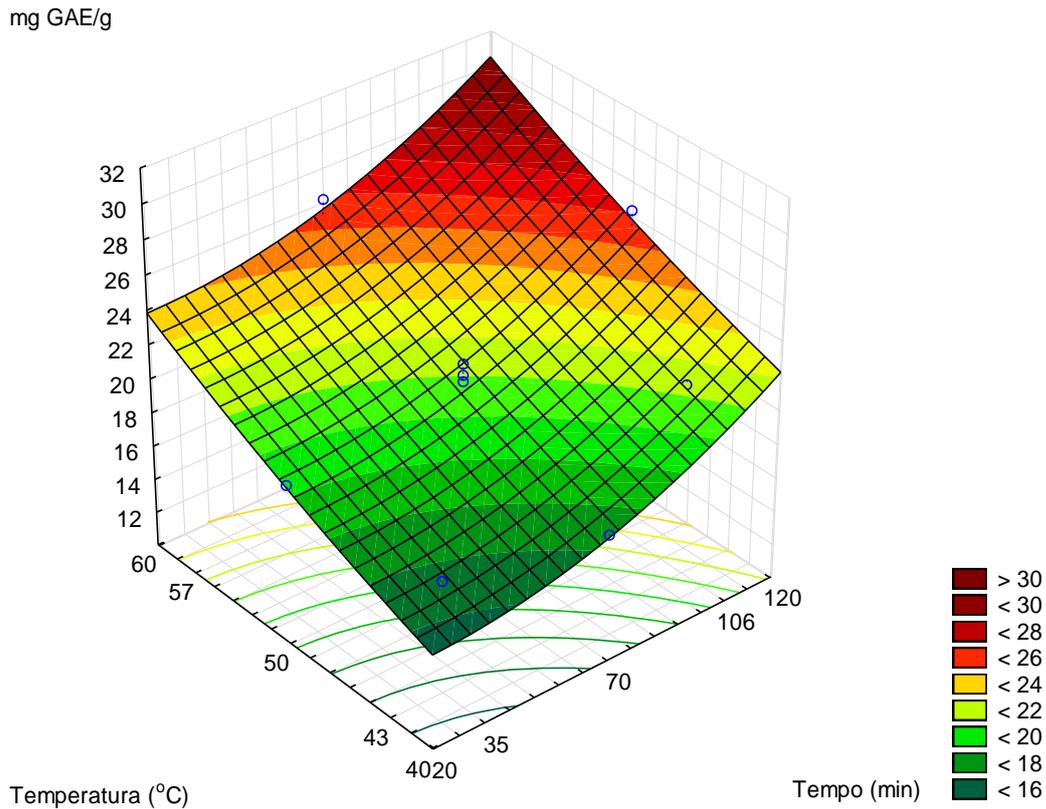


Figura 6 - Influência da temperatura (°C) e do tempo (min) na extração de compostos fenólicos da borra de café

Pode-se notar que tanto o tempo quanto a temperatura, não passaram por uma região de ótima, sendo que de acordo com a superfície vê-se claramente que um tempo superior a 120 minutos e uma temperatura mais elevada tendem a extrair mais fenólicos, tal fato este comprovado pelo primeiro delineamento. No entanto, derivando-se o modelo ajustado no segundo delineamento experimental, pode-se prever a obtenção de extratos com mais de 27 mg GAE.g^{-1} , indicando que a metodologia aplicada sequencialmente permitiu a identificação de condições ideais para extração. Como o processo pode ser facilmente adaptado para fins industriais, talvez um tempo e uma temperatura superior a estes possam representar uma grande demanda de energia e conseqüentemente de custos o que não seria de interesse. Dessa maneira, optou-se pela produção de extratos com utilização de solução etanólica 49% (v/v), sob agitação a temperatura de 60°C durante 120 minutos.

3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da borra de café

O extrato obtido com a maior concentração de compostos fenólicos (ensaio 4) foi utilizado para determinar a atividade antioxidante. A concentração de fenólicos foi de 22 mg GAE. g⁻¹ de amostra seca. Na literatura a concentração de fenólicos da borra de café varia de forma discrepante, sendo que Acevedo et al. (2013) encontraram 273,34 mg GAE. g⁻¹ amostra seca, em quanto que Ramalakchmi et al. (2009) encontraram 6,32 mg GAE. g⁻¹ amostra seca. Zorro e Lavecchia (2012) encontraram 21,56 mg GAE. g⁻¹ amostra seca, estando portanto, similar ao valor encontrado no presente trabalho. Estas variações podem ser devidas as condições de produção do café solúvel que diferem entre as empresas, ou do tipo e a origem do café processado.

O resultado obtido para a atividade antioxidante da borra de café, expresso em μmol de Trolox. g⁻¹ de matéria seca foi de 38,74; sendo que este valor foi maior do que o encontrado para frutas consideradas como fonte de antioxidantes como o bacuri, cupuaçu, graviola, buriti, araçá, tamarindo, maracujá doce, granadilla e carambola no trabalho realizado por Gonçalves (2008).

O TBHQ é um antioxidante sintético e é considerado o mais eficiente para óleos vegetais devido a sua resistência a altas temperaturas e por ser pouco volátil. No entanto o seu uso é limitado no Brasil, sendo que em alguns países como Canadá seu uso é proibido. Por esse motivo diversos trabalhos têm estudado a sua substituição por antioxidantes naturais (COPEN, 1994; REISCHE, 1998, 2008). Neste sentido foi feita uma comparação da redução do radical DPPH com o extrato da borra de café e uma solução de TBHQ na mesma concentração, expressa em teor de equivalente ao ácido gálico. Pela análise da Figura 7 pode-se observar comportamento cinético obtido para a neutralização do radical DPPH na presença de TBHQ e de extrato da obtido da borra de café nas condições otimizadas.

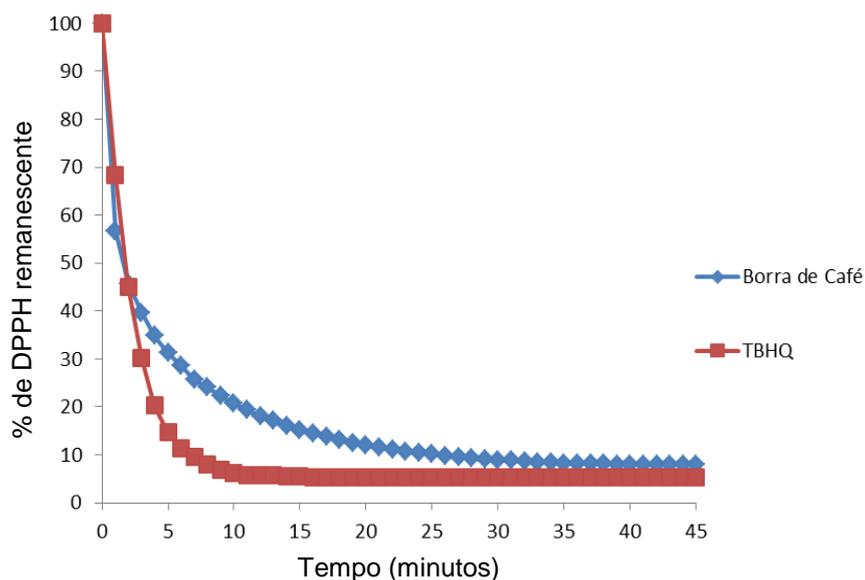


Figura 7 - Comportamento cinético do extrato da borra de café e do TBHQ frente o DPPH

Pode-se observar que ao fim do tempo de reação ambos os antioxidantes apresentaram uma quantidade de DPPH remanescente similar, sendo que o extrato da borra e o TBHQ apresentaram 7,8 e 5,4%, respectivamente. No entanto, é possível notar que a cinética da reação comportou-se de forma distinta para ambos, uma vez que com aproximadamente 10 minutos o TBHQ já estabilizou o radical, em quanto que o extrato da borra somente estabilizou o radical a partir de aproximadamente 35 minutos. Isto indica que para aplicação prática em sistemas lipídicos ou mesmo em estudos *in vivo* é necessário uma adequação das curvas para posterior comparação de eficiência entre os antioxidantes, uma vez que o tempo de estabilização do radical pode determinar a eficiência da substância, já que nessas condições o radical gerado se não estabilizado rapidamente pode reagir com outros compostos como o próprio lipídio levando à formação de produtos de oxidação por exemplo.

Uma alternativa para se atingir eficiência similar ao TBHQ seria o aumento da concentração do antioxidante natural, o que possivelmente diminuiria o tempo de estabilização do radical. No entanto, o uso de maiores quantidades de extratos pode

prejudicar aspectos físicos, visuais e sensoriais dos produtos em que serão utilizados.

3.4 Conclusão

Foi possível determinar condições ótimas de tempo, temperatura e concentração de etanol para extração de compostos fenólicos da borra de café, que apresentou concentrações apreciáveis destes compostos bem como uma boa atividade antioxidante, com potencial para aplicação como antioxidante em alimentos. No entanto o resultado obtido com a estabilização do radical DPPH mostra que estudos relacionados com a cinética da reação do extrato da borra de café comparados ao TBHQ são necessários para aumentar o potencial antioxidante do extrato em bases lipídicas e/ou em modelos *in vivo*.

Referências

ACEVEDO, F.; RUBILAR, M.; SCHEUERMANN, E.; CANCINO, B.; UQUICHE, E.; GARCÉS, M.; INOSTROZA, K.; SHENE, C. Spent coffee grounds as a renewable source of bioactive compounds. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, Valencia, v. 7, n. 20, p. 1-9, 2013.

ADANS, M.R.; DOUGAN, J. Waste products. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee: technology**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 2, p. 282-291.

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

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução CNNPA nº 12, de 24 de Julho de 1978 aprova as “NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS”, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_cafe_soluvel.htm>. Acesso em: 12 mar. 2014.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 2, p. 25-30. 1995.

CHUN, S.S.; VATEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

COPEN, P.P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. London: Blackie Academic Professional, 1994. chap. 5, p. 84-103.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpa de frutas nativas e determinação de teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 48, n. 59, p. 205-215, 1996.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetal waste into value added products: a- the upgrading concept; b- practical implementations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

_____. **Como fazer experimentos-pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 2001. 401 p.

RAMALAKSHMI, K.; RAO, L.J.M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M. Bioactivities of low-grade green and spent coffee in different *in vitro* model systems. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 1, p. 79-85, 2009.

REISCHE, D.W. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 5, p. 433-444.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2008. chap. 15, p. 409-434.

SANTOS, S.F.M.; MACEDO, G.R.; SILVA, F.L.H.; PINTO, G.A.S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

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

VIOTTO, L.A. **Projeto e avaliação econômica de sistemas de secagem de borra de café**. 1991. 274 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

YEN, W.; WANG, B.; CHANG, L.; DUH, P. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, 2005.

ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 34, p. 49-56, 2012.

4 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE RESPOSTA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ACEROLA

Resumo

O consumo de frutas tropicais é crescente devido o seu alto valor nutritivo e terapêutico. A acerola, originária das Antilhas, apresenta características desejáveis para cultivo além de consideráveis concentrações de compostos bioativos como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos. Este trabalho objetivou realizar um estudo de extração de compostos fenólicos através da aplicação da metodologia de superfícies resposta, bem como avaliar a sua capacidade antioxidante em ensaios *in vitro*. Para a otimização da extração de compostos fenólicos de frutos frescos de acerola foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, envolvendo 2 variáveis exploratórias (temperatura e concentração de etanol) e uma variável dependente (concentração de fenólicos). A atividade antioxidante foi medida através da redução do radical estável DPPH, com resultados expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox e porcentagem de inibição, através da determinação da cinética de estabilização comparada ao TBHQ. Foi possível observar que a temperatura não exerceu influência na extração dos compostos fenólicos, e que houve uma relação inversa entre o aumento da concentração de etanol e o teor de compostos fenólicos nos extratos. A atividade antioxidante encontrada foi de 650,53 μmol de μM trolox g^{-1} de amostra. A cinética de estabilização do radical DPPH foi quase idêntica a do TBHQ o que pode indicar uma alta eficiência na prevenção da oxidação em sistemas lipídicos.

Palavras-chave: Extração; DPPH; Cinética

Abstract

The consumption of tropical fruits is growing due to its high nutritional and therapeutic value. Acerola originating from the Antilles, presents desirable characteristics for cultivation, in addition of considerable amounts of bioactive compounds such as ascorbic acid, carotenoids, and phenolic compounds. This study aimed to optimize the extraction of phenolic compounds by means of response surface methodology and evaluate its *in vitro* antioxidant activity. To optimize the extraction of phenolic compounds from fresh acerola fruits, a full factorial experimental design involving two independent variables (temperature and ethanol concentration) and a dependent variable (concentration of phenolics) was applied. Antioxidant activity was measured using the DPPH Radical and results were expressed in Trolox equivalent antioxidant activity and percentage of inhibition by kinetic stabilization study, compared to TBHQ. It was observed that the temperature did not influence the extraction of phenolic compounds, and that there was an inverse relationship between the concentration of ethanol and phenolic compound in extracts. The antioxidant activity was 650.53 micromol of trolox. g sample⁻¹. Kinetic

stabilization of DPPH was almost identical to that of TBHQ, which may indicate a high efficiency in preventing lipid oxidation systems.

Keywords: Extraction; DPPH; Kinetic

4.1 Introdução

O consumo de frutas tropicais é crescente ano após ano. Tal fato se deve ao valor nutritivo e terapêutico que estas frutas geralmente apresentam. Estas apresentam, além de nutrientes essenciais como vitaminas, minerais e fibras, compostos secundários como os fenólicos, que auxiliam na prevenção de doenças crônico-degenerativas como hipertensão e Alzheimer, diabetes entre outras (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

A aceroleira é originária do mar das Antilhas e é cultivada nos Estados Unidos e Japão, onde é amplamente consumida. No Brasil seu plantio em larga escala começou em 1949, sendo que atualmente praticamente toda produção tem como fim o mercado interno. Ela é conhecida por ser uma planta rústica e resistente, propagando-se com facilidade em várias regiões com diferentes condições climáticas. Embora possua essas características, o interesse pela acerola e os estudos sobre suas potencialidades econômicas, só começaram a serem explorados nos anos 40, quando foi descoberto na porção comestível da fruta, altos teores de vitamina C (ARAÚJO, 1994).

A acerola atrai o interesse de produtores de diferentes regiões do Brasil, tal fato se deve pelo seu alto potencial como fonte natural de vitamina C (que pode chegar a mais de $4.800 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e sua grande capacidade de aproveitamento industrial (SANTOS et al., 1999; GOMES et al., 2000). Devido a isso a acerola passou a representar grande importância econômica em determinadas regiões do Brasil para seu consumo *in natura* ou como matéria-prima na indústria farmacêutica e alimentícia para a elaboração de diversos outros produtos (NOGUEIRA et al., 2002).

Alguns trabalhos relatam a presença de quantidades apreciáveis de substâncias fenólicas, como antocianinas, bem como uma elevada atividade antioxidante da acerola, sendo superior a outras frutas consideradas importantes

fontes desses compostos, tais como uva, açaí, morango, pitanga e manga. Diferentes metodologias são utilizadas para extração dos compostos fenólicos, com uso de diversos sistemas de solvente e temperaturas, o que torna difícil a comparação de resultados (KUKOSKI et al., 2006; MELO et al., 2008; CANUTO et al., 2010).

O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo da extração de compostos fenólicos de frutos da acerola utilizando a metodologia de superfície resposta, bem como avaliar a atividade antioxidante do extrato obtido.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Obtenção e preparo das amostras

As acerolas maduras produzidas no município de Piracicaba, SP foram lavadas em água corrente, sanitizadas com água clorada (100 ppm de hipoclorito de sódio CRT) por 10 minutos. Após, foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm e colocadas para secar em estufa com circulação de ar forçada a 40° C por 48 horas. Em seguida as amostras foram trituradas em processador por aproximadamente 5 minutos para obtenção de um pó de menor granulometria. O pó de acerola foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer comercial a -18° C até o momento das análises.

4.2.2 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante

Para obtenção dos extratos as amostras foram colocadas juntamente com o solvente (solução hidroalcolólica) em uma proporção de 1:30 (m/v), em banho com agitação a 200 rpm sob condições de baixa luminosidade, sendo que variou-se a temperatura e a concentração de etanol de acordo com o delineamento experimental. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 5000 g por 20 minutos, filtrados e armazenados em frascos âmbar a -26°C até o momento da realização das análises.

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta conforme descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) por grama de amostra seca.

A atividade antioxidante foi determinada por ensaio *in vitro* com utilização do extrato que apresentou a maior concentração de fenólicos. Foi determinada a atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) no radical livre estável 2,2-di(4-t-octilfenil)-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A porcentagem de inibição do extrato de acerola foi comparada ao antioxidante sintético terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) na mesma concentração que o extrato da fruta, por meio de estudo de cinética da inibição do radical DPPH a cada minuto até completar o tempo m que o método propõe para o fim da reação (45 minutos).

4.2.3 Delineamento experimental para estudo da extração e análise estatística dos dados

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo 2 variáveis exploratórias (temperatura - °C, e concentração de etanol -% de etanol) e uma variável dependente (concentração de fenólicos). O delineamento experimental aplicado pode ser verificado na Tabela 1, que apresenta os níveis codificados e reais das variáveis, compreendendo os pontos inferior (-1), superior (+1) e axiais (+ α e - α).

Tabela 1 - Faixas de estudo das variáveis exploratórias em análise no processo de extração de fenólicos da acerola

Variável exploratória	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Concentração de etanol	0	14,4	49,5	84,6	99
Temperatura (°C)	30	34,4	45	55,6	60

No total foram realizados 12 ensaios (o delineamento aplicado é apresentado no Quadro 1) combinando-se as variáveis e incluindo quatro repetições do ponto central. Todos os experimentos foram realizados de maneira aleatória e utilizando os mesmos equipamentos. Os efeitos foram analisados pela metodologia de superfície de resposta e análise de regressão múltipla. O modelo matemático foi ajustado, incluindo termos lineares e quadráticos, e interações entre variáveis exploratórias. Os modelos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) e teste de F. O coeficiente de determinação é uma medida da proporção da variação total da resposta explicada pelo modelo. O teste F, que testa a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo, foi realizado por meio da análise de variância com auxílio do aplicativo “Statistica 12.0” e comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Estudo da extração de compostos fenólicos

Por meio da ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível investigar a influência de variáveis explanatórias em um processo, além da forma de interação entre estas variáveis, obtendo valores que otimize os resultados esperados (SANTOS et al., 2008). No Quadro 1, têm-se os valores de fenólicos (resposta) obtidos para cada ensaio no experimento realizado.

Ensaio	Variáveis exploratórias				Variável dependente Fenólicos (mgGAE.g ⁻¹)
	% Etanol		Temperatura °C		
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	
1	-1	14,4	-1	34,4	173,85
2	+1	84,6	-1	34,4	134,12
3	-1	14,4	+1	55,6	166,12
4	+1	84,6	+1	55,6	136,35
5	-1,41	0	0	45	175,86
6	+1,41	99	0	45	86,05
7	0	49,5	-1,41	30	149,98
8	0	49,5	+1,41	60	158,54
9	0	49,5	0	45	152,49
10	0	49,5	0	45	145,46
11	0	49,5	0	45	158,05
12	0	49,5	0	45	155,27

Quadro 1 - Quantidade de compostos fenólicos expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, obtido no estudo de otimização do processo de extração de fenólicos da acerola

A análise dos efeitos pelo teste de T-student indicou que apenas o grau de hidratação do etanol (efeito linear e quadrático) foi estatisticamente significativo ao nível de 5% de probabilidade. Os efeitos foram negativos, indicando que quando se aumenta a concentração de etanol na solução, diminui-se o teor de compostos fenólicos no extrato. O efeito da temperatura não foi significativo, assim como interação em as duas variáveis estudadas. A Figura 1 apresenta o diagrama de pareto para os efeitos do processo em estudo.

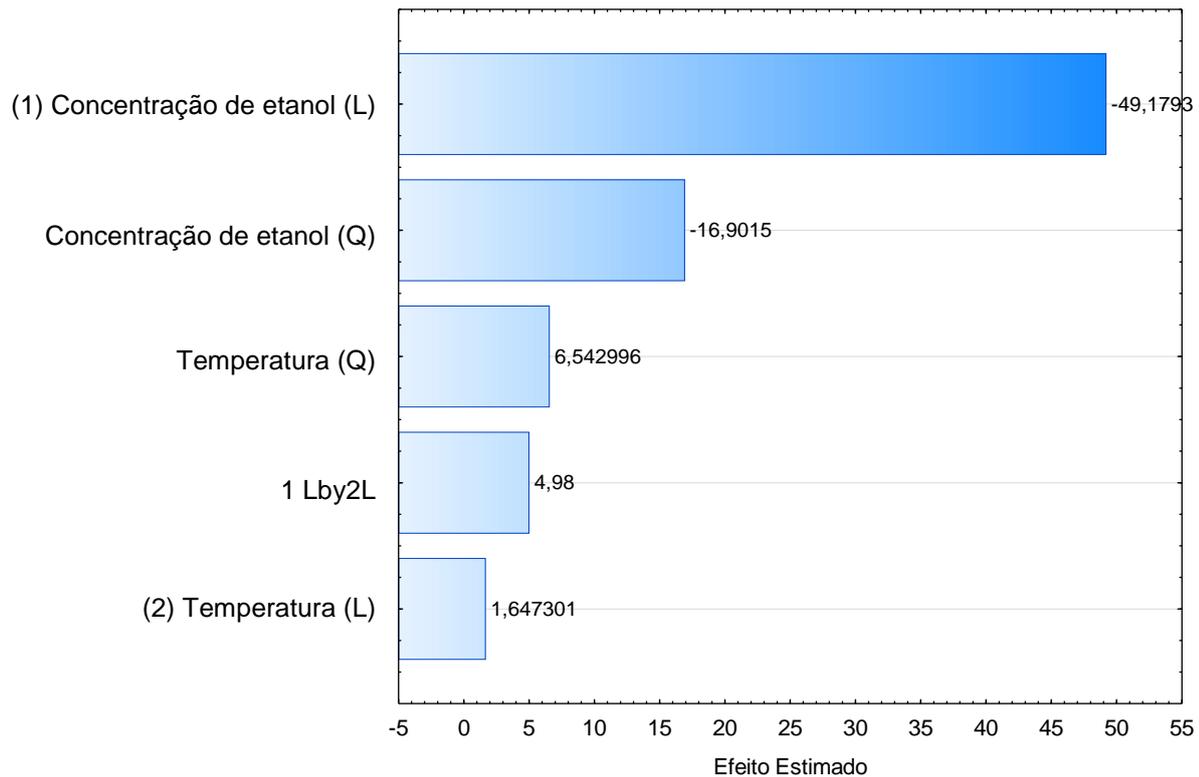


Figura 1 - Diagrama de Pareto para a extração de compostos fenólicos de frutos da acerola

Os efeitos não significativos foram ignorados e com os coeficientes de regressão ajustou-se um modelo matemático de segunda ordem, representado pela equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Compostos Fenólicos Totais (mg GAE.g}^{-1}\text{)} = 155,3907 - 24,5897 \times (\% \text{ etanol}) - 9,0956 \times (\% \text{ etanol})^2$$

A análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 2. Observa-se através do teste F que o F calculado para a regressão a partir dos dados experimentais foi maior que o F tabelado, indicando que a equação foi estatisticamente significativa, apesar de não ser preditiva. A variação explicada pelo coeficiente de determinação (R^2) demonstrou que 86% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo. Através do teste F verificou-se que a falta de ajuste ao modelo não foi estatisticamente significativa (F tabelado foi maior que o F calculado).

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na extração de fenólicos de frutos de acerola

Fonte variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	5639,127	2	2819,5635	30,08215
Resíduo	843,559	9	93,72877778	
Falta de ajuste	755,926	5	151,1852	5,175626
Erro puro	87,633	3	29,211	
Total	6212,686	11		

$R^2 = 0,864$ $F_{0,95;2;9} = 19,385$ $F_{0,95;5;3} = 5,409$

Mesmo não havendo uma região de ótimo, o estudo da extração dos compostos fenólicos de frutos de acerola pode fornecer informações importantes para a extração destes compostos, como percebe-se pela análise da Figura 2.

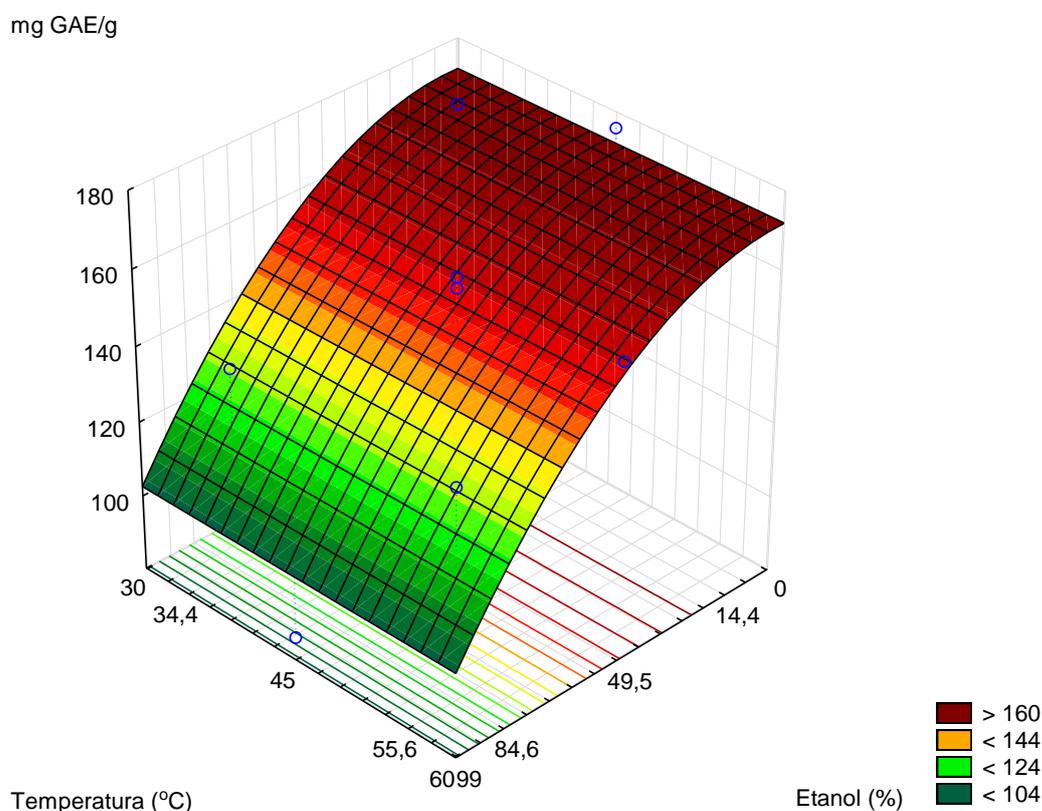


Figura 1 - Influência da concentração de etanol (%) e da temperatura (°C) na extração de compostos fenólicos da acerola

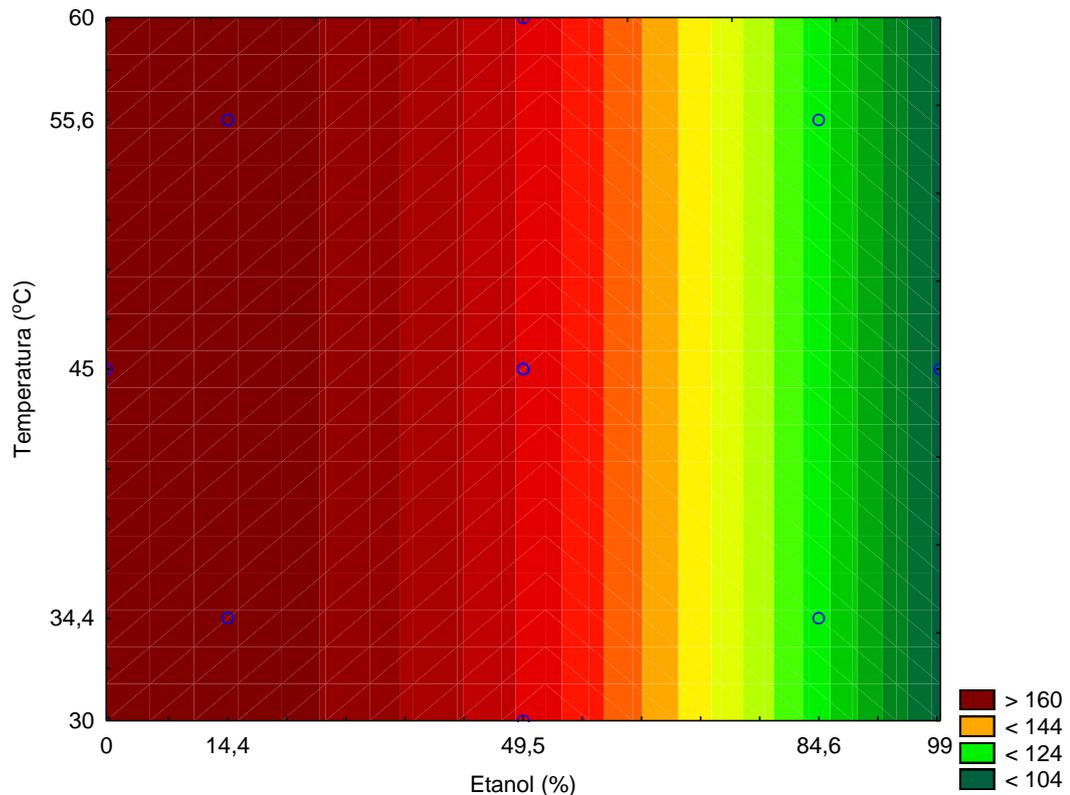


Figura 2 - Influência da concentração de etanol (%) e da temperatura (°C) na extração de compostos fenólicos da acerola

Através da superfície é possível observar que há uma tendência de maior extração de fenólicos quanto menor a concentração de etanol sem influência da temperatura na faixa estudada. O maior resultado obtido foi no ensaio de condição 5 ($175,86 \text{ mg GAE.g}^{-1}$), em que utilizou-se somente água a uma temperatura de 45°C . A análise dos resultados permite concluir que utilizando-se somente água e temperaturas mais brandas é possível obter a mesma eficiência da extração dos compostos fenólicos da acerola.

Freire et al. (2013) encontraram um valor de fenólicos inferior ao do presente estudo, utilizando uma condição de 1:80 (m/v) na relação amostra solvente, metanol a 50% e temperatura de 80°C . No estudo a amostra foi utilizada *in natura*. Considerando-se o a umidade da acerola pela TACO (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011) (90,5%), pode-se depreender que os autores encontraram um valor de equivalente a 156 mg.g^{-1} matéria seca, com resultados expressos em

ácido tânico. Este resultado assemelha-se aos encontrados no presente trabalho quando utilizou-se uma concentração de etanol a 49,5%.

Rufino (2008) também encontrou um valor menor de fenólicos totais em acerola liofilizada. O autor preparou um extrato utilizando primeiro uma solução extratora de metanol (50%) e depois de acetona (70%), encontrando o resultado de 102,7 mg.g⁻¹ de matéria seca expresso em ácido gálico. Moura (2010) também utilizou uma metodologia parecida para extração de fenólicos de acerola orgânica em pó, utilizando as soluções extradoras de etanol (50%) e acetona (70%). No entanto a quantidade de fenólicos encontrada foi 60,04 mg.g⁻¹ de matéria seca, também expresso em ácido gálico.

Estes resultados indicam a importância em se realizar estudo do método de extração de fenólicos, uma vez que uma série de métodos e solventes podem ser combinados e muitas vezes resultando em extrações não eficazes.

4.3.2 Atividade antioxidante *in vitro* da acerola

Foi realizado estudo com extrato aquoso de frutos de acerola contendo 175,86 mg GAE.g⁻¹. O resultado obtido foi de 650,53 µmol de trolox. g⁻¹ de amostra. Este valor foi superior ao encontrado por Mezdri et al. (2008), em que os autores prepararam um extrato utilizando metanol e água para avaliar a atividade antioxidante de acerolas *in natura*. Le e Le (2012) também encontraram valores bem inferiores para a atividade antioxidante medida em suco de acerola, sendo que a preparação do extrato não se deu com aplicação de temperatura, sendo feito somente o preparo de um suco em proporção de água para acerola de 2:1.

No entanto Freire et al. (2013) encontraram um valor maior para atividade antioxidante (1336,42 µM trolox.g⁻¹ de amostra) pelo método de estabilização do radical estável ABTS. Estas diferenças relacionadas à atividade antioxidante podem estar ligadas não só aos métodos utilizados para extração e análise, mas também com diversos outros fatores extrínsecos e intrínsecos relacionados aos frutos, como o período de colheita (seca ou das águas) e genótipos, como constatado por Lima et al. (2005). Tais variáveis exercem influência sobre a quantidade de compostos bioativos da acerola, e em especial aos carotenoides e compostos fenólicos.

O TBHQ é um dos antioxidantes sintéticos mais eficientes na estabilização oxidativa de óleos e gorduras sendo estável quando submetido a altas temperaturas, o que o leva a ser considerado o melhor antioxidante para uso em produtos que contém alto teor de ácidos graxos insaturados. Devido a isso, o comportamento cinético do extrato de acerola em estabilizar o radical DPPH foi comparado ao TBHQ, ambos na mesma concentração ($0,75 \text{ mg GAE.mL}^{-1}$). A Figura 3 apresenta a cinética de estabilização do radical DPPH pelo extrato de acerola e pelo TBHQ.

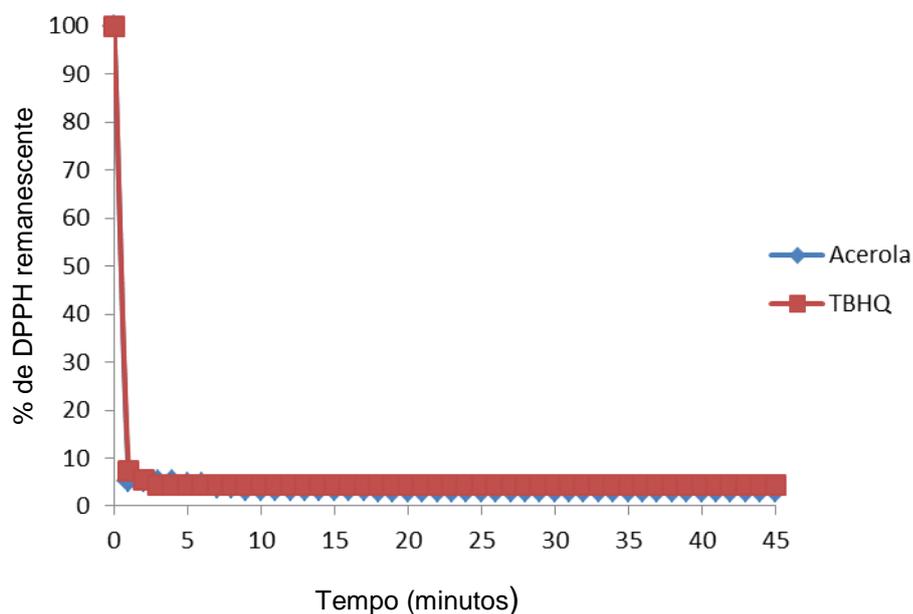


Figura 3 - Comportamento cinético do extrato da acerola e do TBHQ frente o DPPH

Pode-se observar que, o tempo que os antioxidantes levam para estabilizar o radical DPPH é semelhante tanto para a acerola quanto para o DPPH, uma vez que ambas as curvas estão sobrepostas durante a maior parte do tempo, sendo que no tempo final a acerola apresentou um valor ligeiramente menor de DPPH remanescente comparado com o TBHQ (3,15 e 4,27%, respectivamente).

Tal resultado pode indicar uma alta eficiência na estabilização de radicais pela acerola, uma vez que a velocidade em que o antioxidante é capaz de estabilizar o radical formado em sistemas lipídicos, por exemplo, é fundamental no seu desempenho, dado que enquanto não estabilizado, o radical gerado pode formar

outro radical dando sequência às reações de oxidação em cadeia (FENNEMA, 1996).

Vieira et al. (2011) também encontraram valores parecidos ao do presente trabalho para extratos hidroalcoólicos e aquosos de acerola, em concentrações de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ em que com 20 minutos de leitura a absorvância chegou a valores próximos de zero. No entanto, por tratar-se de um extrato aquoso, o potencial de aplicação em alimentos de base lipídica será restrito a emulsões e cremes.

4.4 Conclusão

Foi possível realizar um estudo da extração de compostos fenólicos da acerola, sendo que a concentração de etanol se mostrou um fator mais relevante do que a temperatura durante o processo. O extrato de frutos de acerola demonstrou uma apreciável atividade antioxidante, além de uma cinética de estabilização do radical DPPH comparável ao antioxidante sintético TBHQ, o que pode indicar uma alta eficiência no controle da oxidação em sistemas lipídicos como emulsões e cremes, consistindo em potencial alternativa ao uso deste antioxidante sintético.

Referências

- ARAÚJO, P.S.R. **Acerola**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. 81 p.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. da Unicamp, 1996. 299 p.
- BARROS NETO, B.; SARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos-pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP. 2001. 401p.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 2, p. 25-30, 1995.
- CANUTO, G.A.B.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T.I. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz Das Almas, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.
- FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 900 p.

FREIRE, J.M.; ABREU, C.M.P.; ROCHA, D.A.; CORRÊA, A.D.; MARQUES, N.R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 12, p. 2291-2296, 2013.

GOMES, E.; DILERMANDO, P.; MARTINS, A.B.G.; FERRAUDO, A.S. Análise de agrupamento e de componentes principais no processo seletivo de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 36-39, 2000.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 52, n. 1, p. 481-504, 2000.

KUKOSHI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LE, V.H.; LE, V.V.M. Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 1206-1214, 2012.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 4, p. 565-568, 2005.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; ARAÚJO, C.R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 67-72, 2008.

MEZADRI, T.; VILLANO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 4, p. 282-290, 2008.

MOURA, S.M. **Estabilidade de acerola em pó oriunda de cultivo orgânico**. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; SILVA JUNIOR, J.F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas da acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

RUFINO, M.S.M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 237 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2008.

SANTOS, A.R.L.; REINHARDT, D.H.; SILVEIRA, W.R.; OLIVEIRA, J.R.P.; CALDAS, R.C. Qualidade pós-colheita de acerola para processamento, em função de estádios de maturação e condição de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 3, p. 365-371, 1999.

SANTOS, S.F.M.; SOUZA, R.L.A.; ALCÂNTARA, S.R.; PINTO, G.A.S.; SILVA, F.L.H.; MACEDO, G.R. Aplicação de metodologia de superfície resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 101-109, 2008.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Bethesda, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)**. 4. ed. Campinas: UNICAMP, NEPA, 2011. 161 p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/downloads/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2014.

5 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE RESPOSTA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CASCA DE LICHIA

Resumo

A lichia é uma fruta bastante apreciada e destaca-se como alimento funcional. No entanto poucos estudos são voltados à sua casca, sendo que esta é tratada como um resíduo pelas indústrias do setor. Com isso o objetivo do presente estudo foi analisar a extração de compostos fenólicos da casca da lichia através da metodologia de superfície resposta, bem como avaliar a sua atividade antioxidante. Foi determinada a concentração de compostos fenólicos na casca, polpa e semente da fruta. Para a otimização da extração foi utilizada a metodologia de superfície resposta, tendo como variáveis exploratórias a concentração de etanol e a temperatura, e como resposta a concentração de fenólicos totais. A atividade antioxidante foi medida por meio do radical DPPH e expressa em equivalentes de trolox e pela cinética de estabilização do radical comparada ao antioxidante sintético TBHQ. Foi possível observar que a melhor concentração de etanol para extração dos compostos fenólicos totais com uso de soluções etanólicas foi a 50% e a temperatura de cerca de 45°C. A casca apresentou uma considerável atividade antioxidante, no entanto ao se comparar a porcentagem de redução do radical DPPH com o TBHQ, o extrato da casca de lichia se mostrou menos eficiente.

Palavras chave: Frutos de lichia; DPPH; Atividade antioxidante

Abstract

The lychee is a fruit widely appreciated and stands out as a functional food. However few studies have focused on its residues, such as seeds and skins, that are usually treated as waste by the industrial sector. Thus the aim of this study was to evaluate the conditions of extraction of phenolic compounds from the lychee residues with ethanolic solutions by response surface methodology and evaluate antioxidant activity of resulting extracts. The concentration of phenolic compounds in the skin pulp and seeds of the fruit was determined To optimize the extraction process, independent variables (ethanol concentration and temperature) were studied The antioxidant activity was measured by DPPH, expressed as trolox equivalent and the kinetic stabilization of the radical compared to the synthetic antioxidant TBHQ. It was observed that the optimal concentration of ethanol for the extraction of phenolic was around ethanol 50 % and the temperature around 45 °C. The skins showed considerable antioxidant activity, however when comparing the percentage of reduction of the radical with TBHQ, lychee extract was less efficient.

Keywords: Lychee fruits; DPPH; Antioxidant activity

5.1 Introdução

A Lichia (*Litchi chinensis* Sonn) é uma fruta de origem chinesa que pertence à família sapindaceae, gênero Litchi e espécie *Litchi chinensis*. Seu nome é originário do latim *Sapindus* e significa a junção das palavras *sapo* (sabão) e *indus* (índia) em virtude das saponinas presente em seus frutos e sementes que são usadas na elaboração de sabonetes (SMARSI et al., 2008; MOTTA, 2009). É um fruto tropical, de elevado valor comercial, possui casca com coloração vermelha, arilo translúcido, e é apreciado por seu sabor doce que apresenta quantidade significativa de açúcares, além de minerais como potássio, magnésio, fósforo e vitaminas como a riboflavina, niacina e tiamina (QUEIROZ, 2012).

Esta fruta chegou ao Brasil no ano de 1810, na cidade do Rio de Janeiro, onde se adaptou facilmente ao clima Brasileiro nos meados do século XX. Logo, ela começou a ser transportada para outras cidades do estado de São Paulo, Paraná e Minas Gerais onde passou a ser comercializada e cultivada, por ser uma fruta exótica e muito saborosa. No Brasil são cultivadas três variedades: a 'bengal', 'brewster' e 'americana', sendo a 'bengal' a mais comum (PIRES, 2012).

A Lichia, por ser uma fruta com alto teor de antioxidantes, apresenta diversos benefícios à saúde, sendo considerada um alimento funcional devido os seus compostos bioativos. Seus polifenóis na forma de oligômeros e monômeros de catequinas e proantocianidinas exercem efeito significativo sobre a síndrome metabólica, prevenindo o diabetes *mellitus* e reduzindo as reservas de gordura (IDEAL 2012; CHANG et al., 2013).

A polpa da lichia pode ser comercializada enlatada, como bebidas fermentadas, licores, processada na forma de sucos, desidratadas, em compotas e congeladas. Pode ser usada ainda em processamentos de sorvete e iogurtes. Suas sementes e cascas, que são descartadas pelos consumidores e na indústria ou usadas como fertilizante na ração animal, poderiam ser tratadas como uma fonte alternativa de nutrientes e compostos bioativos, pois apresentam vitaminas e minerais, (WANG et al., 2011). No entanto são escassos os trabalhos que estudam o potencial de fornecimento destes compostos pelos resíduos da Lichia.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a extração de compostos fenólicos da casca da lichia através da metodologia de superfície resposta, bem como avaliar sua atividade antioxidante *in vitro*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Obtenção e preparo das amostras

Lichias maduras da variedade 'bengal' produzidas em São Gotardo-MG, foram lavadas em água corrente e sanitizadas com água clorada (100 ppm de hipoclorito de sódio CRT) por 10 minutos. Após foram separadas as porções da casca, semente e polpa, as quais foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 40° C por 48 horas. Em seguida as amostras foram trituradas em processador por aproximadamente 5 minutos para obtenção de um pó de menor granulometria. O pó das diferentes porções da lichia foram acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer comercial a -18° C até o momento das análises.

5.2.2 Preparo dos extratos, quantificação de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante

Primeiramente foi feito um extrato das 3 porções da fruta (casca, semente e polpa) nas mesmas condições, a fim de estimar qual parte possuía a maior concentração de fenólicos e atividade antioxidante. Para isso as amostras foram colocadas juntamente com o solvente (etanol 50%) em uma proporção de 1:30 (m/v), em banho a 50°C com agitação a 200 rpm por 50 minutos sob condições de baixa luminosidade. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 5000 g por 20 minutos, filtrados e armazenados em frascos âmbar a -26°C até o momento da realização das análises.

Para a amostra que apresentou maior quantidade de fenólicos, foi aplicado um delineamento experimental variando as concentrações de etanol, e a temperatura, visando a otimização do processo de extração.

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) por grama de amostra seca.

A atividade antioxidante relativa foi determinada em ensaio *in vitro*, em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg. g de matéria seca⁻¹) no radical livre estável 2,2-di(4-t-octilfenil)-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A porcentagem de inibição do extrato de lichia foi comparada ao antioxidante sintético terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) na mesma concentração que o extrato da fruta, por meio da medição da inibição do radical DPPH a cada minuto até completar o tempo em que o método propõe para o fim da reação (45 minutos).

5.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

Para a otimização da extração de compostos fenólicos da lichia foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo duas variáveis exploratórias (temperatura - °C, e concentração de etanol -% de etanol) e uma variável dependente (concentração de fenólicos).

As faixas de estudos são apresentadas na Tabela 1, que apresenta os níveis codificados e reais das variáveis exploratórias, compreendendo os pontos inferior (-1), superior (+1) e axiais (+ α e - α).

Tabela 1 - Faixas de estudo das variáveis exploratórias em análise no processo de extração de fenólicos da lichia

Variável exploratória	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Concentração de etanol	0	14,4	49,5	84,6	99
Temperatura (°C)	30	34,4	45	55,6	60

O delineamento do tipo fatorial rotacional completo com ponto central consiste em 12 ensaios, incluindo quatro repetições do ponto central. Todos os experimentos foram realizados de maneira aleatória e utilizando os mesmos equipamentos. Os efeitos foram analisados pela metodologia de superfície de resposta e análise de regressão múltipla. O modelo matemático foi ajustado, incluindo termos lineares e quadráticos, e interações entre variáveis exploratórias. Os modelos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) e teste de F. O coeficiente de determinação é uma medida da proporção da variação total da resposta explicada pelo modelo. O teste F, que testa a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo, foi realizado por meio da análise de variância com

auxílio do aplicativo “Statistica 12.0” e comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Estudo da extração de compostos fenólicos

Os resultados obtidos para a concentração de fenólicos bem como para a atividade antioxidante das diferentes partes da lichia são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Fenólicos totais e atividade antioxidante para as diferentes porções da lichia

	Conteúdo total de fenólicos (mg GAE. g matéria seca ⁻¹)*	Atividade antioxidante (TEAC)*
Casca	24,40	42,84
Semente	12,40	20,46
Polpa	20,02	12,20

* os valores representam a média de 3 determinações

Como se pode observar, a casca da lichia foi a fração da fruta que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos e a maior atividade antioxidante, sendo selecionada para o estudo sequencial. Wang et al. (2011) encontraram valores maiores, entre 50 e 103 mg GAE . g matéria seca⁻¹, no entanto os autores avaliaram a presença de fenólicos no pericarpo de diferentes cultivares chinesas. Somando-se uma estimativa da proporção de casca, polpa e semente e relacionando-a aos teores de compostos fenólicos apresentados na Tabela 2, tem-se 56,8 mg GAE.g⁻¹, com base em matéria seca, valor comparável ao que os autores encontraram entre 10 variedades diferentes.

Através da ferramenta de planejamento experimental e de superfície de resposta é possível investigar a influência de variáveis em um determinado processo, além da forma de interação entre elas, obtendo valores que permitam a obtenção dos melhores resultados (SANTOS et al., 2008).

No Quadro 1, têm-se os valores de compostos fenólicos totais obtidos para cada ensaio do delineamento experimental aplicado.

Ensaio	Variáveis exploratórias				Variável dependente
	% Etanol		Temperatura °C		Fenólicos (mgGAE.g ⁻¹)
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	
1	-1	14,4	-1	34,4	11,13
2	+1	84,6	-1	34,4	20,04
3	-1	14,4	+1	55,6	14,84
4	+1	84,6	+1	55,6	23,13
5	-1,41	0	0	45	7,75
6	+1,41	99	0	45	13,10
7	0	49,5	-1,41	30	19,87
8	0	49,5	+1,41	60	25,87
9	0	49,5	0	45	22,70
10	0	49,5	0	45	22,88
11	0	49,5	0	45	22,32
12	0	49,5	0	45	22,20

Quadro 1 - Teores de compostos fenólicos totais obtidos no estudo de otimização do processo de extração de casca de lichia

A análise dos efeitos pelo teste de T-student indicou que os efeitos lineares do grau de hidratação do etanol e da temperatura foram estatisticamente significativos. Os efeitos, positivos, indicam que o aumento da temperatura e da concentração do etanol do nível inferior para o superior (de 34,4 para 55,6°C e 14,4 para 84,6%, respectivamente) promoveram aumentos no teor de compostos fenólicos nos extratos, em média de 3,8 e 6,2 mg GAE.g⁻¹ de amostra. A interação entre concentração de etanol e temperatura não foi significativa. No entanto, o efeito quadrático da concentração de etanol foi estatisticamente significativo e representa um valor considerável, apresentando sinal negativo, o que indica passagem pela região de máxima extração (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativa dos efeitos das variáveis exploratórias sobre o teor de compostos fenólicos totais de extratos de casca de lichia

	Efeito	Desvio padrão	Nível descritivo (P)
Média	22,5230	0,159242	0,000001
Etanol (L)	6,2043	0,225539	0,000105
Etanol (Q)	-11,8321	0,252837	0,000021
Temperatura (L)	3,8264	0,225539	0,000446
Temperatura (Q)	0,6874	0,252837	0,072621
Etanol X Temperatura (L)	-0,3100	0,318486	0,402167

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ($P \leq 0,05$)

L = linear; Q = quadrático

O efeito quadrático da temperatura, apesar de não ser estatisticamente significativo, foi mantido por estar próximo ao nível de significância. Dessa forma, apenas o efeito da interação foi ignorado para a obtenção dos coeficientes de regressão e realização da ANOVA (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na extração de fenólicos da casca de lichia

Fonte variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	343,321	4	85,83025	45,59549
Resíduo	13,177	7	1,882428571	
Falta de ajuste	12,873	4	3,21825	31,75905
Erro puro	0,304	3	0,101333333	
Total	356,321	11		

$$R^2 = 0,963 \quad F_{0,95;4;7} = 6,09 \quad F_{0,95;4;3} = 6,591$$

Observa-se através do teste F que o F calculado para a regressão a partir dos dados experimentais foi maior que o F tabelado, indicando que a equação foi estatisticamente significativa. A variação explicada pelo coeficiente de determinação (R^2) demonstrou que 96% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo. Através do teste F verificou-se que a falta de ajuste ao modelo foi estatisticamente significativa, o que pode ser explicado pelo baixo valor do erro puro.

A Figura 1 apresenta a relação entre resultados preditos e observados, o que justifica o emprego da superfície de resposta para seleção da melhor condição de obtenção de extratos de casca de lichia mesmo com a significância da falta de ajuste. Devido ao alto R^2 e ajuste na região de maior teor de compostos fenólicos

extraídos. A Figura 2 apresenta a superfície de resposta, em que se pode identificar a melhor região para extração dos fenólicos.

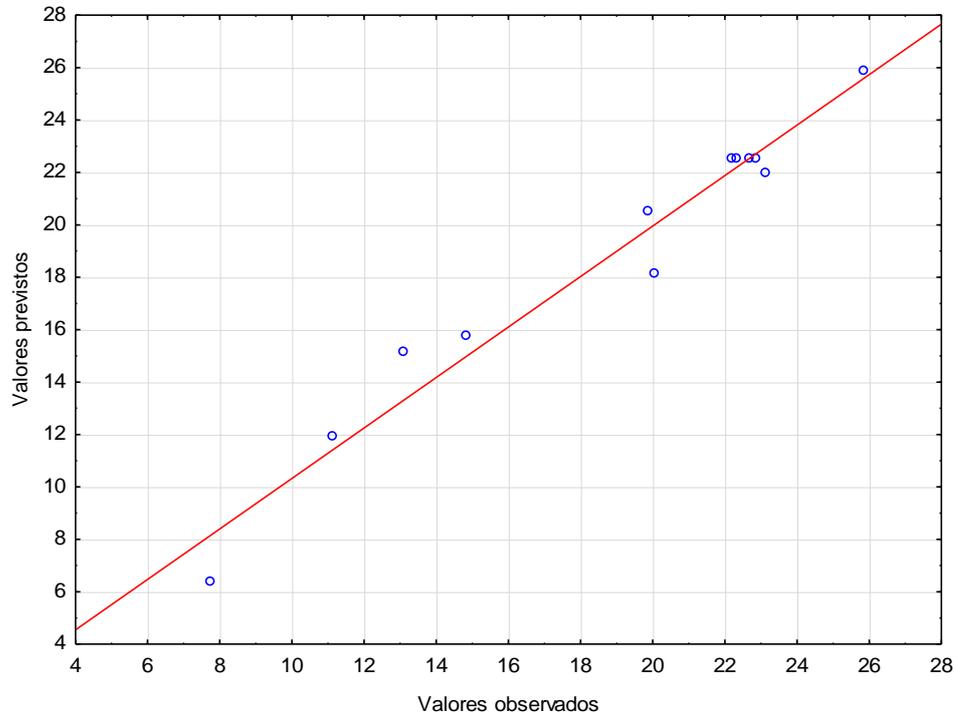


Figura 1 - Relação entre valores previstos e observados pelo modelo matemático ajustado ao estudo de extração de compostos fenólicos de casca de lichia

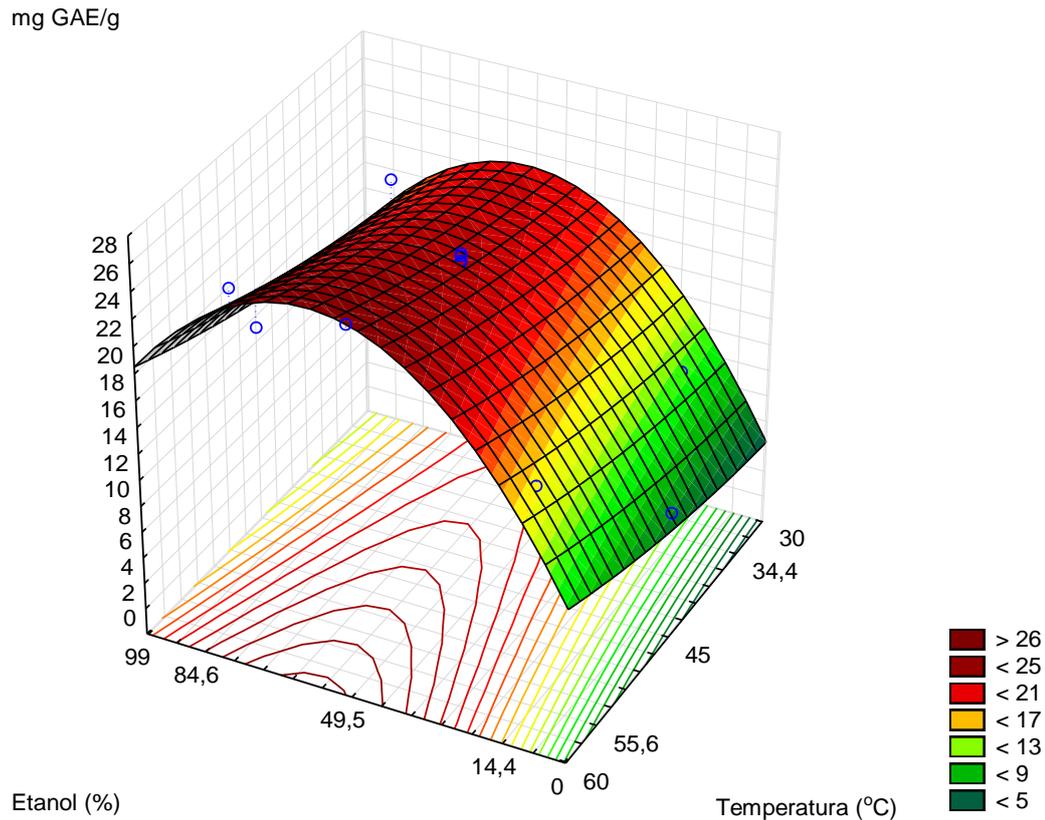


Figura 2 - Influência da concentração de etanol (%) e da temperatura (°C) na extração de compostos fenólicos da casca de lichia

É possível observar um efeito quadrático exercido pela concentração de etanol, indicando um ótimo em uma concentração de 50%, sendo que a temperatura acima de 45° C também se mostrou mais eficiente na extração de compostos fenólicos.

Os trabalhos que avaliaram a quantidade de fenólicos na casca de lichia são escassos, o que torna difícil a comparação de resultados, no entanto Queiroz (2012) avaliou a quantidade de fenólicos na casca com o preparo da amostra em condições semelhantes a do presente do estudo, mas com extração de fenólicos por diferentes meios, já que a proporção utilizada de amostra solvente foi 1:20 e o autor utilizou uma solução extratora contendo 3 diferentes solventes (acetona 70%, etanol 50% e metanol 50%) e os resultados foram expressos em equivalente de ácido tânico. Por fim o autor encontrou uma quantidade de 0,72 mg.g⁻¹ de matéria seca, sendo este resultado bastante inferior ao encontrado no presente trabalho, em que em uma condição próxima a região do ótimo (ensaio 8) foi encontrado 25,87 mg GAE . g⁻¹ de matéria seca.

Isto indica a importância de se estudar as variáveis na extração de compostos fenólicos da lichia, fim de se obter condições que forneçam uma maior quantidade dos compostos de interesse. Uma vez que mesmo para a extração de fenólicos da fruta como um todo os trabalhos divergem muito entre si quanto as condições utilizadas, com o uso de diferentes solventes como acetona, metanol e etanol e em concentrações e proporções de amostra/solvente variadas (DUAN et al., 2007; WANG et al., 2010).

5.3.2 Atividade antioxidante *in vitro* da casca de lichia

O resultado obtido com uso do extrato produzido com etanol 49,5% a 60°C foi de 43,09 μmol de trolox g^{-1} de amostra. Este se mostra um bom resultado, uma vez que é superior ao encontrado por Silva et al. (2011) ao analisarem a capacidade antioxidante no suco de 15 frutas diferentes produzidas na região sul do Brasil, consideradas fontes de antioxidantes, como mirtilo, amora preta e morango.

O valor encontrado também foi muito superior ao observado por Liu et al. (2009). Ao analisarem a capacidade antioxidante de flores de lichia em diferentes extratos produzidos com variados tipos de solvente, os autores observaram na melhor condição estudada uma atividade antioxidante expressa em 12,6 09 μmol de trolox g^{-1} de amostra seca, o que reforça a ideia de que a casca da lichia pode ser usada como uma fonte destes compostos.

O comportamento cinético do extrato de lichia ao estabilizar o radical DPPH foi comparado com o TBHQ, sendo ambos na mesma concentração (0,75 mg GAE mL^{-1}). Na Figura 3 é possível observar a cinética de estabilização do radical DPPH pelo extrato da casca de lichia e pelo TBHQ.

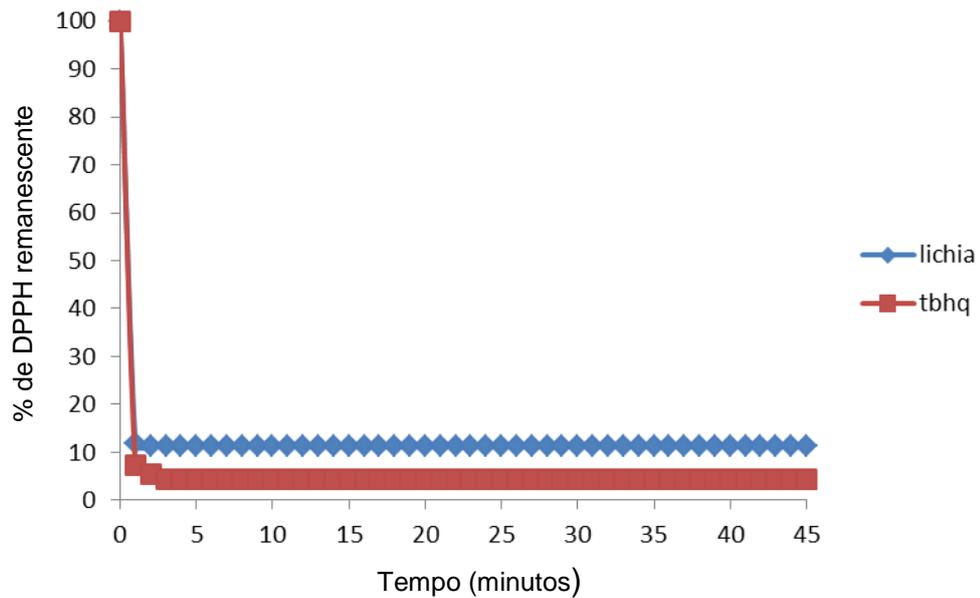


Figura 3 - Comportamento cinético do extrato de lichia e do TBHQ frente o DPPH

É possível observar que apesar do tempo de estabilização do radical para o extrato da casca de lichia ser semelhante ao TBHQ, a porcentagem de radical remanescente no fim da reação foi maior para o extrato que o TBHQ sendo 11,26 e 4,27% respectivamente. Isto indica uma menor eficiência antioxidante do extrato, quando comparado ao TBHQ na mesma concentração. Uma possível explicação seria que no extrato há uma mistura de compostos fenólicos, em condições não totalmente conhecidas, já o TBHQ foi utilizado na forma purificada, logo interações entre as diferentes moléculas podem explicar essa menor atividade antioxidante.

5.4 Conclusão

Foi possível obter um estudo das condições ótimas para a extração de compostos fenólicos da casca de lichia, sendo que esta foi à fração da fruta (entre casca e semente) que apresentou maior concentração de fenólicos e atividade antioxidante. A casca da lichia apresentou uma boa atividade antioxidante, no entanto sua cinética de estabilização do radical DPPH mostrou-se menos eficiente quando comparada ao TBHQ, indicando que mais estudos sobre as condições e as moléculas presentes na casca são necessários.

Referências

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 2, p. 25-30, 1995.

CHANG, Y.; YANG, D.; CHIU, C.; LIN, Y.; CHEN, J.; CHEN, Y. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) - flower-water-extract on livers of high-fat-diet fed hamsters. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 44-52, 2013.

DUAN, X.; WU, G.; JIANG, Y. Evaluation of the antioxidant properties of litchi fruit phenolics in relation to pericarp browning prevention. **Molecules**, Washington, v. 12, n. 4, p. 759-771, 2007.

IDEAL. **Lichial**. 2012 Disponível em: <<http://www.farmabin.com.br/files/Lichial.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2014.

LIU, S.; LIN, J.; WANG, C.; CHEN, H.; YANG, D. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, n. 2, p. 577-581, 2009.

MOTTA, E.L. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de *Litchi chinensis* Sonn. (“Lichia”) cultivada no Brasil**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

QUEIROZ, E.R. **Frações de lichia: caracterização química e avaliação de compostos bioativos**. 2012. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PIRES, M.C. **Efeito do anelamento e do paclobutrazol no florescimento e frutificação, sobrenxertia e análise sazonal de macro e micronutrientes em (*Litchi chinensis* Sonn)**. 2012. 115 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SANTOS, S.F.M.; SOUZA, R.L.A.; ALCÂNTARA, S.R.; PINTO, G.A.S.; SILVA, F.L.H.; MACEDO, G.R. Aplicação de metodologia de superfície resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 101-109, 2008.

SILVA, R.; VENDRUSCOLO, S.L.; TORALLES, R.P. Avaliação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região Sul do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3/4, p. 398-400, 2011.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Bethesda, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

SMARSI, R.C.; CHAGAS, E.A.; REIS, L.L.; OLIVEIRA, G.F.; MENDONÇA, V.; TROPALDI, PIO, R.; SCARPARE FILHO, A.S.F. Concentrações de ácido indolbutírico e tipos de substrato na propagação vegetativa de lichia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 1, p. 7-11, mar. 2008.

WANG, C.Y.; CHEN, H.; JIN, P.; GAO, H. Maintaining quality of litchi fruit with acidified calcium sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 8658-8666, 2010.

WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; CHEN, H.; HUANG, X. Phenolic compounds and the antioxidant activities in litchi pericarp: difference among cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 4, p. 784-789, 2011.

6 ESTUDO DO CONTROLE DA OXIDAÇÃO DE EMULSÕES COM EXTRATOS DE ACEROLA, BORRA DE CAFÉ E CASCA DE LICHIA E EM COMPARAÇÃO AO TBHQ

Resumo

A utilização de resíduos e matérias primas agroalimentares para obtenção de compostos de interesse como os fenólicos é de crescente interesse. O TBHQ é um antioxidante sintético muito utilizado, mas que pode apresentar efeitos adversos ao seres humanos. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de extratos ricos em compostos fenólicos, obtidos a partir de frutos de acerola, borra de café e casca de lichia, no controle da oxidação de emulsões. Os extratos foram preparados em condições otimizadas utilizando-se soluções hidroalcoólicas e aquecimento. As emulsões foram preparadas utilizando óleo de soja refinado, tween 20 e água destilada, com adição de concentrações de extratos em substituição a água. As emulsões foram submetidas a teste acelerado de oxidação em estufa por 9 dias e determinou-se o teor de hidroperóxidos formados. Observou-se que o extrato de acerola foi o único que apresentou a mesma eficiência que o TBHQ, enquanto os extratos de casca de lichia e de borra de café apresentaram baixa ou nenhuma proteção à oxidação. Tal fato pode ser explicado pelo melhor desempenho da cinética de estabilização do radical DPPH obtida nos ensaios anteriores, e pelo fato de que, além de compostos fenólicos o extrato de acerola também pode conter ácido ascórbico, que atua como um antioxidante sinérgico. Além disso, notou-se que em concentrações de 100 e 200 mg.kg⁻¹, tanto para o extrato e acerola quanto para o TBHQ, a concentração de hidroperóxido formada foi similar, indicando que 100 mg.kg⁻¹ de fenólicos em sistema de emulsão pode ser uma concentração ideal. Pôde-se concluir que o extrato de acerola foi o mais eficiente no retardamento da oxidação lipídica nas condições estudadas, sendo que mais estudos com diferentes condições além de estudos toxicológicos são necessários para determinar doses seguras de consumo.

Palavras chave: Teste acelerado; Oxidação lipídica; Peróxido

Abstract

The utilization of agroindustrial residues for obtaining active compounds such as phenolic is increasing. The synthetic antioxidant TBHQ is widely used; however it may present adverse effects to human beings. This study aimed to evaluate the effect of ethanolic extracts obtained from acerola fruits, coffee grounds and lychee skins in preventing oxidation process in emulsions during accelerated test. The extracts rich in phenolic compounds were prepared following optimized conditions, with ethanolic solutions and heating. The emulsions were prepared using RBD soybean oil, Tween 20, and distilled water, with required amounts of extracts replacing water. The emulsions were subjected to an accelerated oxidation test (oven test) for 9 days. Hydroperoxides were determined during the test. It was observed that the extract of acerola was the only one with the same efficiency of TBHQ; coffee and lychee extract showed lower or none effect in avoid oxidation. This fact can be explained by the better performance of acerola extracts in previous kinetic

stabilization of DPPH, and by possible presence of ascorbic acid which acts as a synergistic antioxidant. Moreover also noted that at concentrations of 100 and 200 mg.kg⁻¹ for both TBHQ and acerola extract led to same hydroperoxide rates, indicating that 100 mg.kg⁻¹ can be an ideal concentration. It was concluded that the acerola extract was the most effective in delaying lipid oxidation under the conditions studied. More studies with different conditions, as well as toxicological studies are needed to determine safe levels of consumption.

Keywords: Oven test; Oxidation; Peroxide

6.1 Introdução

A utilização de resíduos e matérias primas agroindustriais para obtenção de compostos com valor agregado tem despertado o interesse da comunidade científica. Entre estes compostos destacam-se os fenólicos, que são frequentemente encontrados em resíduos da indústria de alimentos oriundos de frutas, grãos, hortaliças entre outras, que podem apresentar elevada capacidade antioxidante para uso potencial em alimentos, bebidas e produtos contendo lipídeos em sua composição (LAUFENBERG et al., 2003).

As reações de oxidação em lipídeos estão entre as mais frequentes em alimentos e são causadas pelo oxigênio, esporadicamente pelo ozônio, peróxido ou metais. Sabe-se que esta reação pode afetar a qualidade do alimento de diversas maneiras, incluindo a cor, *flavor*, teor de vitaminas e minerais. Vários meios podem ser utilizados para retardar a oxidação lipídica, mas os antioxidantes frequentemente são utilizados para inibir ou retardar essas reações, atuando por diferentes meios, seja no bloqueio da ação dos radicais (antioxidantes primários) ou removendo oxigênio e/ou complexando com metais (antioxidantes sinérgicos) (FRANKEL, 1998; ARAÚJO, 2008).

Os compostos fenólicos, em especial os naturais, e seus derivados são uma família de antioxidantes extensamente estudadas devido a sua atividade antioxidante em matrizes de alimentos e também devido à sua ação biológica geralmente associada a efeitos benéficos ao organismo, como a prevenção de doenças crônico-degenerativas e aumento da atividade imunológica (HALLIWELL, 2007). No entanto, há poucos estudos sobre sua ação toxicológica.

O TBHQ é um antioxidante sintético considerado eficiente na inibição das reações de oxidação em lipídeos, por ser resistente a altas temperaturas e seu bom

poder *carry through* especialmente em produtos assados e em frituras. Porém, devido a seus possíveis efeitos deletérios a saúde seu uso é restrito em alguns países (COPPEN, 1994; VALENZUELA; NIETO, 1996; REISCHE, 1998). No Brasil a concentração máxima permitida do TBHQ em óleos e gorduras é de 200mg kg⁻¹ (sobre o teor lipídico) (BRASIL, 2005), sendo que em alguns países, como Canadá e em alguns da União Europeia, seu uso é proibido, (REISCHE et al., 2008). Tal fato instiga a busca de substitutos a este antioxidante sintético, que apresente a mesma eficiência em sistemas lipídicos.

Neste sentido o presente trabalho objetivou estudar o efeito de extratos ricos em compostos fenólicos, proveniente de diferentes resíduos e matéria prima agroalimentar, no controle da oxidação em emulsão comparado ao TBHQ.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Preparo e análise dos extratos

Os extratos de acerola, borra de café e casca de lichia foram preparados seguindo condições definidas em anteriormente. Com exceção do extrato de acerola, que foi produzido somente com água, os demais que foram preparados com soluções hidroalcoólicas e aquecimento, conforme descrito nos capítulos anteriores.

Antes da incorporação à emulsão, os extratos foram rotaevaporados a 40°C para retirada de todo o etanol presente, para que este não interferisse na estabilidade da emulsão. Foi determinado o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos através do método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) por mL de extrato.

6.2.2 Preparo e análise das emulsões

As emulsões foram preparadas de acordo com metodologia descrita por Huang et al. (1996). Para isso, foram misturados 200 g de óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos ou naturais (fornecido pela Cargill, Mairinque, SP), com 180 g de água destilada e 20 g de Tween 20 em béquer e a mistura foi realizada em homogeneizador de amostras do tipo Turrax, durante 1 minuto a 18000

rpm. Os extratos foram aplicados na emulsão em três concentrações, com base no teor de compostos fenólicos totais, de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹. O teor de água adicionado foi reduzido do volume de extrato adicionado em cada concentração, para que se mantivesse a proporção de água e óleo da emulsão. O TBHQ também foi adicionado a emulsão, em concentrações de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹.

Para avaliar a atividade antioxidante, as emulsões contendo os extratos e o TBHQ (4 mL) foram acondicionadas em tubos 7cm de altura com 1cm de diâmetro e submetidas a aquecimento em estufa a 40° C ± 1°C, por nove dias, segundo o procedimento apresentado por Branco e Castro (2011).

Após 0, 3, 6 e 9 dias determinaram-se as concentrações de hidroperóxidos pelo método espectrofotométrico com tiocianato férrico. Os hidroperóxidos foram quantificados a partir da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroperóxido de cumeno, e os resultados foram expressos em mmol de hidroperóxido.Kg⁻¹, segundo a metodologia proposta por Shanta e Decker (1994), com modificações de Branco e Castro (2011). O experimento foi conduzido em triplicata.

6.3 Resultados e Discussões

O teor de compostos de fenólicos totais nos extratos de frutos de acerola, borra de café e casca de lichia está presente na Tabela 1.

Tabela 1 - Compostos fenólicos totais em extratos vegetais produzidos em condições otimizadas os extratos de acerola, borra de café e casca de lichia

Conteúdo total de fenólicos (mg GAE. mL de extrato⁻¹)	
Acerola	6,93
Borra de café	1,21
Casca de lichia	1,17

De acordo com a concentração de fenólicos dos extratos, determinou-se o volume a ser adicionado à emulsão em substituição a água para se atingir as concentrações desejadas de 50 a 200 mg.kg⁻¹. Após a homogeneização dos componentes para obtenção das emulsões, determinou-se a concentração de hidroperóxidos formados ao longo do tempo de oxidação induzida em estufa. As figuras a seguir apresentam o resultado das diferentes concentrações de extratos sobre a estabilidade oxidativa da emulsão.

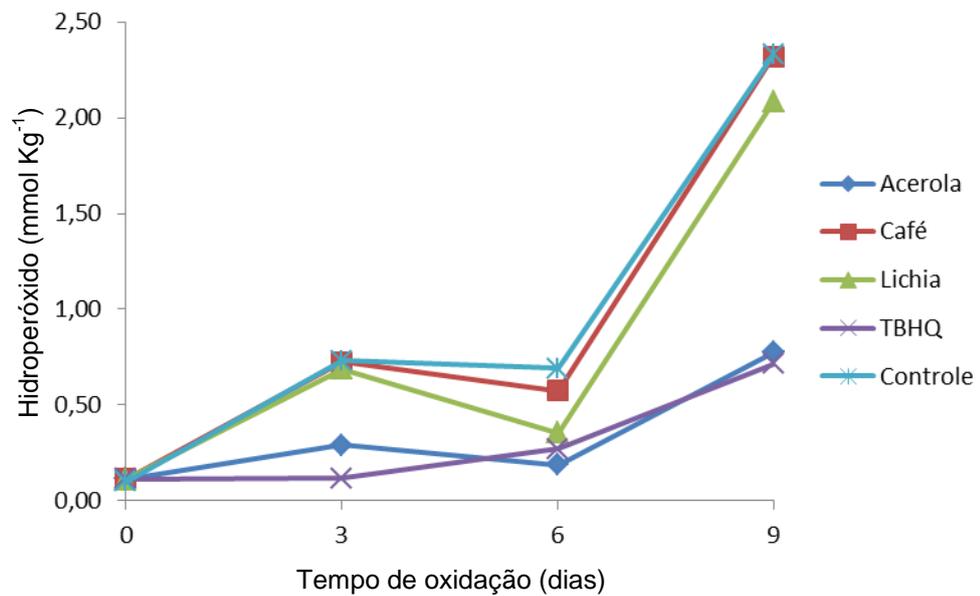


Figura 1 - Efeito dos extratos e do TBHQ na concentração de 50 mg.kg⁻¹ sobre a estabilidade oxidativa de emulsão durante teste acelerado (40°C)

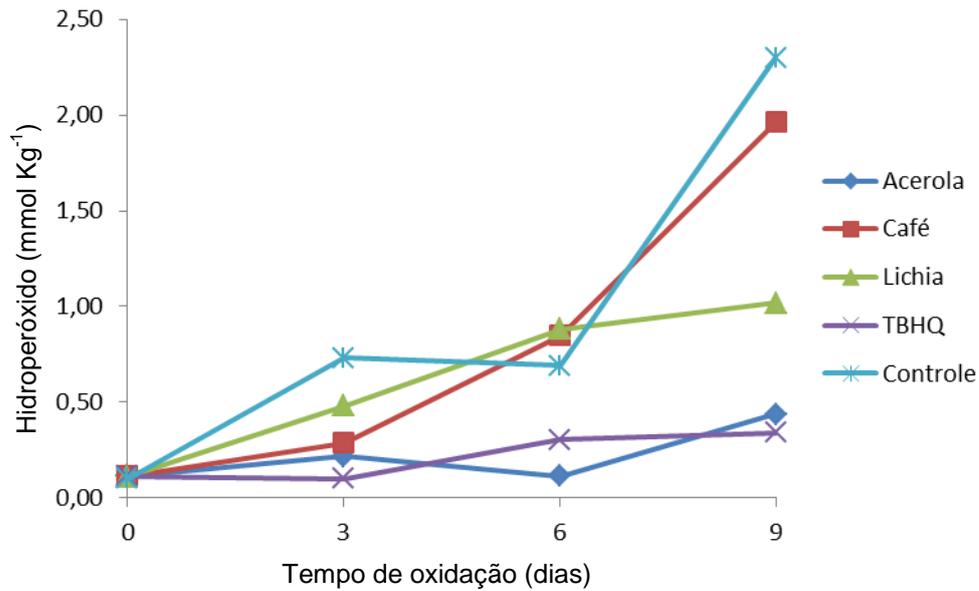


Figura 2 - Efeito dos extratos e do TBHQ na concentração de 100 mg.kg⁻¹ sobre a estabilidade oxidativa de emulsão durante teste acelerado (40°C)

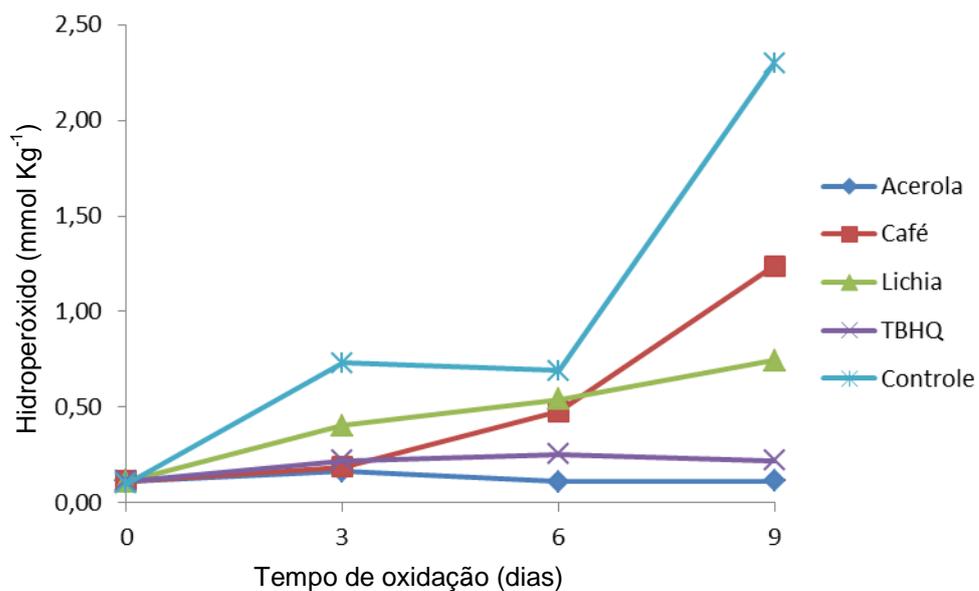


Figura 3 - Efeito dos extratos e do TBHQ na concentração de 200 mg.kg⁻¹ sobre a estabilidade oxidativa de emulsão durante teste acelerado (40°C)

É possível observar que em todas as concentrações o extrato de frutos de acerola foi o que apresentou o melhor desempenho, apresentando eficiência similar à do TBHQ, em todas as concentrações utilizadas. Quando se analisou o efeito da adição de extratos de borra de café e de casca de lichia, no entanto, notam-se resultados bastante distintos para adições nas mesmas concentrações, sendo que em concentração de 50 mg.Kg⁻¹ os resultados foram similares ao do controle,

indicando nenhuma e/ou baixa atividade antioxidante. Ambos apresentaram um efeito mais pronunciado com relação ao controle em concentrações de 100 e 200 mg.Kg⁻¹, no entanto ainda sim, inferior ao TBHQ e o extrato de acerola na menor concentração utilizada (50 mg.Kg⁻¹).

A eficiência de antioxidantes em sistemas de emulsão é mais complexa do que a avaliação do efeito de antioxidantes em óleos, pois fatores como pH, presença de emulsificantes, sistema tampão e características físico-química das moléculas dos antioxidantes, podem interagir (BARCLAY; VINQVIST, 1994).

Frankel et al. (1994) observaram isso, ao avaliar antioxidantes de diferentes polaridades na inibição da oxidação de emulsão e óleo, em que antioxidantes lipofílicos (γ -tocoferol e palmitato de ascorbila) se mostraram mais eficientes em emulsão do que em óleo, ao passo que o oposto foi encontrado para os antioxidantes hidrofílicos (trolox e ácido ascórbico). Tal evidência, segundo os autores, está relacionada com a maior interação na interface ar-óleo dos antioxidantes polares e na interface óleo-água dos antioxidantes apolares.

Outra possível explicação para a maior eficiência do extrato de frutos de acerola é o seu teor de ácido ascórbico, que pode apresentar efeito sinérgico com os compostos fenólicos. Segundo Araújo (2008), o ácido ascórbico é considerado um antioxidante sinérgico por conseguir reagir com o oxigênio, impedindo-o de dar início às reações de oxidação, aumentando a eficiência de compostos fenólicos. Logo o extrato de acerola possui antioxidantes primários (fenólicos) e sinérgicos (ácido ascórbico) atuando no retardamento das reações de oxidação.

Estes resultados obtidos no teste em estufa também podem ser relacionados à cinética de estabilização do radical DPPH observada nos capítulos anteriores, em que a acerola foi o único extrato que possuiu uma curva praticamente idêntica a do TBHQ. Tal observação indica a importância do estudo da cinética de estabilização do radical em ensaios de seleção de antioxidantes, uma vez que correlações positivas podem ser feitas com o estudo da cinética *in vitro* do antioxidante e seu desempenho em sistemas lipídicos.

Outro importante resultado observado foi de que 100 e a 200 mg.Kg⁻¹ de extratos de frutos de acerola e de TBHQ adicionados à emulsão apresentaram resultados entre 0,2 e 0,4 mmol de hidroperóxido Kg⁻¹ de amostra durante o teste acelerado, indicando que concentrações mais baixas já podem atuar de forma satisfatória na inibição da reação de oxidação. Um resultado similar foi observado

por Huang et al. (1994), em que os autores não observaram diferença na atividade antioxidante de γ -tocoferol em concentrações entre 200 e 1000 mg.kg⁻¹, sendo que em concentrações superiores a 500 mg.kg⁻¹ os antioxidantes apresentaram um ligeiro efeito pró-oxidante nas emulsões.

6.4 Conclusão

Observou-se que o extrato de frutos de acerola foi o único que apresentou uma eficiência comparável a do TBHQ nas condições de oxidação do experimento, indicando um uso potencial como substituto do TBHQ. No entanto é importante ressaltar que além de um maior número de estudos com diferentes condições de oxidação, estudos toxicológicos também são necessários para estipular concentrações inócuas ao consumo humano. Os extratos de casca de lichia e de borra de café não se mostraram com a mesma eficiência.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova “Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleo e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 09 abr. 2014.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.

AUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetal waste into value added products: a- the upgrading concept; b- practical implementations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

BARCLAY, L.R.C.; VINQVIST, M.R. Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 779-788, 1994.

BRANCO, G.F.; CASTRO, I.A. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 88, p. 1747-1758, 2011.

COPPEN, P.P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. London: Blackie Academic Professional, 1994. chap. 5, p. 84-103.

FRANKEL, E.N. **Lipid oxidation**. Dundee: Oily Press, 1998. 303 p.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 2, p. 1054-1059, 1994.

HALLIWELL, B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovascular Research**, London, v. 73, n. 2, p. 341-347, 2007.

HUANG, S.; FRANKEL, W.N.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 10, p. 2108-2114, 1994.

HUANG, S.W.; HOPIA, A.; SCHWARE, K.; FRANKEL, W.N.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 444-452, 1996.

REISCHE, D.W. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 5, p. 433-444.

SHANTHA, N.C.; DECKER, E. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, p. 421-424, 1994.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, Bethesda, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

VALENZUELA, B.A.; NIETO, S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 47, n. 3, p. 186-196, 1996.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da formação dos produtos de oxidação em alimentos e os mecanismos que podem ser utilizados para evitá-los é de grande importância, não somente para identificação de compostos alternativos aos antioxidantes sintéticos, para uso em adição ou substituição aos mesmos, como para identificação de aplicação para resíduos agroindustriais e produtos de baixo valor agregado. Por meio do estudo das variáveis que afetam a extração de compostos fenólicos, como o solvente e a temperatura, o processo de extração de borra de café, casca de lichia e frutos de acerola foi otimizado, sendo obtidas condições específicas para a máxima recuperação de compostos fenólicos de cada matriz, possibilitando a obtenção de extratos com a máxima concentração de compostos fenólicos com uso de etanol e água como solventes.

Os extratos obtidos em condições otimizadas apresentaram concentrações apreciáveis de compostos fenólicos, bem como uma considerável atividade antioxidante na estabilização do radical DPPH. Quanto à proteção antioxidante oferecida em sistema de emulsão com óleo de soja refinado, apenas o extrato de frutos de acerola apresentou ação protetora comparável ao TBHQ nas condições estudadas no trabalho, e apresenta potencial de aplicação em emulsões alimentícias ou cosméticas.

O estudo permitiu comprovar que é possível obter extratos ricos em compostos fenólicos através de diferentes condições de extração com diferentes matrizes alimentares, e que estes podem apresentar uma atividade antioxidante comparável a antioxidantes sintéticos em sistemas lipídicos.