



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SUENNE TAYNAH ABE SATO

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA CLIVAGEM ÁCIDA (ESCALAS
ANALÍTICA E PILOTO) DE PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EM EXTRATOS
DE MATRIZES VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

BELÉM

2014

SUENNE TAYNAH ABE SATO

ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA CLIVAGEM ÁCIDA (ESCALAS
ANALÍTICA E PILOTO) DE PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EM EXTRATOS DE
MATRIZES VEGETAIS DA AMAZÔNIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Prof^o. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza (Orientador)

BELÉM

2014

SUENNE TAYNAH ABE SATO

ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA CLIVAGEM ÁCIDA (ESCALAS ANALÍTICA E PILOTO) DE PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EM EXTRATOS DE MATRIZES VEGETAIS DA AMAZÔNIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
(PPGBIOTEC/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva
(PPGBA/IECOS/UFPA – Suplente)

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO: _____

Dedico este trabalho a Deus, minha fonte de vida, sabedoria, amor e confiança; e em especial a todos da minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tem sido e sempre será o meu principal motivador à vencer diante das batalhas que a vida me impõe constantemente;

À minha mãe, minha grande intercessora, pessoa que até quando erra, acerta; e a todos da minha família, que juntos são a minha base, a minha fortaleza; agradeço por compreenderem a minha ausência e torcerem por mim. Vocês são a minha felicidade, e as pessoas que mais amo na vida e mesmo depois dela...

Ao meu esposo que tem caminhado lado a lado comigo, destinado a mim tanto amor e cuidado, sendo meu estímulo a todo o momento para eu não desanimar, e um dos meus grandes exemplos de profissional;

Aos meus amigos da vida inteira, e aos mais recentes, que durante as jornadas árduas são sempre as melhores pessoas para aliviar as dores, curar os arranhões adquiridos pelo meio do caminho, proporcionando a impossibilidade de não sorri;

A todas as pessoas que no início da caminhada no mestrado foram essenciais, pois sem o apoio delas, talvez não estivesse concluindo: as amigas e parceiras de profissão Rafaela Camarinha, Paula Valente, Joelma Martins, e Karine Silva que muito me encorajaram a não desistir no momento crucial, e juntamente, à professora Dra. Auxiliadora Menezes, que não pensou duas vezes antes de flexibilizar meus horários em nutrição clínica; bem como à amiga Viviane Santos por compreender as minhas necessidades de horários, se disponibilizando sempre que necessário a trocar os turnos comigo para que eu não perdesse as aulas no mestrado. Não tenho palavras para agradecer esses apoios iniciais!

Ao meu orientador Dr. Jesus Souza por ter me dado a oportunidade incrível de fazer parte de sua equipe, pela paciência e ensinamentos valorosos. Obrigada por acreditar em mim, e por me permitir aprender com o senhor;

Ao professor Dr. Hervé Rogez pelas grandes contribuições dadas a este trabalho e por ser o exemplo constante de excelente profissional, professor e pesquisador.

Aos professores Dr. Raul Nunes Jr. e Dr. Evaldo Martins pela disponibilidade em participar das bancas examinadoras e contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus queridos professores da vida inteira, todos sem exceção, pois sei que hoje sou um “mosaico” de conhecimento de cada um;

À empresa *Amazon Dreams* pelo apoio a esta pesquisa, fornecendo infraestrutura e compartilhando conhecimentos imprescindíveis para realização deste trabalho. Em especial à

Lívia Miyagawa, João Paulo Silva e Robson Carvalho pela ajuda durante a obtenção dos extratos;

A todos que compõem a Equipe CVACBA, pela parceria, amizade, que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta pesquisa; em especial aos meus “filhos” Anna Paula Barbosa, Washley Maciel e Mayumi Konagano pelo apoio fundamental nas realizações de análises;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPA) e todo o corpo docente pelos preciosos ensinamentos;

A CAPES pela concessão da bolsa, e incentivo à pesquisa;

A todos muito obrigada!

Suenne Taynah Abe Sato



“I found my peace in God  ”

Lucas Hungria

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

SATO, S. T. A. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. **Estudo comparativo do efeito da clivagem ácida (escalas analítica e piloto) de proantocianidinas presentes em extratos de matrizes vegetais da Amazônia.** 2014. 84 f.: Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2014.

A Região Amazônica apresenta grande fonte de plantas ricas em compostos bioativos, como as espécies *Euterpe oleracea* (açazeiro), *Byrsonima crassifolia* (murucizeiro) e *Inga edulis* (ingázeiro). A partir dessas matrizes tem-se produzido extratos purificados ricos em compostos fenólicos, tais como os flavonoides e taninos. Sabe-se que os taninos, mais especificamente os taninos condensados (proantocianidinas), são polímeros de compostos fenólicos simples, e quando presentes em alimentos estão envolvidos na sensação de adstringência, devido à sua complexação com proteínas da saliva, atuando assim como um agente antinutricional. Métodos têm sido desenvolvidos visando a despolimerização destes compostos, tais como a clivagem ácida, pois além de promover a redução de adstringência, estudos demonstraram que também contribuem para o aumentar a capacidade antioxidante e favorecer a absorção destes compostos. Vale ressaltar que, com o crescente interesse em compostos fenólicos monoméricos, os testes em escala piloto, para obtê-los em maior quantidade, tornam-se necessários. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da clivagem ácida de proantocianidinas, em escala piloto, presentes nos extratos de matrizes vegetais da Amazônia, avaliando a composição de compostos fenólicos, adstringência e capacidade antioxidante. Para isso, os extratos purificados aquosos de cada matriz foram caracterizados através de análises espectrofotométricas (concentrações de polifenóis totais, flavonóis e flavanóis totais, antocianidinas totais, proantocianidinas e capacidade antioxidante (DPPH)), análise de adstringência e identificação dos principais compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os extratos foram submetidos à clivagem ácida em meio reacional com 60% EtOH, HCl 3N, a 88 °C por 165 minutos. Os extratos purificados aquosos de açaí, muruci e ingá apresentaram elevada concentração de polifenóis totais (761,83, 493,59 e 531,55 mg EAG/g MS, respectivamente), bem como elevadas concentrações de flavanóis totais, flavonóis totais e proantocianidinas. O processo de clivagem ácida proporcionou aumentos do teor de polifenóis totais e foi eficaz para a hidrólise das proantocianidinas, a redução da adstringência e aumento da capacidade antioxidante, além da obtenção de compostos da subclasse das antocianidinas para os três extratos. A ampliação de escala do processo não resultou em diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à clivagem realizada em escala analítica, para todos os extratos. Além da despolimerização da proantocianidinas, o tratamento ácido proporciona a deglicosilação de flavonoides, como quecetinas glicosiladas (*Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*), miricetinas glicosiladas (*Inga edulis*) e cianidinas glicosiladas (*Euterpe oleracea*). Assim, a ampliação de escala do processo possibilitou a obtenção de extratos com compostos com elevada capacidade antioxidante o que permite uma possível utilização destes extratos como agentes antioxidantes em produtos alimentícios e farmacêuticos.

Palavras-chave: *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis*, *Euterpe oleracea*, Compostos fenólicos.

ABSTRACT

SATO, S. T. A. FEDERAL UNIVERSITY OF PARÁ. **Comparative study of the effect of acid cleavage (analytical and pilot scales) of proanthocyanidins present in extracts of Amazonic plants.** 2014. 84 f.: Dissertation (Masters) - Federal University of Pará, 2014, Institute of Technology, Graduate Program in Science and Food Technology, Belém, 2014.

The Amazon Region presents a great source of species rich in bioactive compounds, such as *Euterpe oleracea* (açazeiro), *Byrsonima crassifolia* (murucizeiro) and *Inga edulis* (ingazeiro). From these matrices, purified extracts rich in phenolic content have been produced containing compounds such as flavonoids and tannins. It is known that tannins, more specifically condensed tannins (proanthocyanidins) are polymers of simple phenolic compounds, and when present in foods, are involved in the sensation of astringency due to its complexation with saliva protein, thus acting as an anti-nutrition agent. Methods have been developed aiming the depolymerization of these compounds, such as acid cleavage, because apart from promoting the reduction of astringency, studies have shown that they also contribute to increased antioxidant capacity and to promote the absorption of these compounds. It is noteworthy that, with the growing interest in monomeric phenolic compounds, tests on a pilot scale, to produce them in larger quantities, are necessary. Therefore, the aim of this study was to verify the effects of the acid cleavage of proanthocyanidins, on a pilot scale, present in the extracts of Amazonic plants, thus evaluating the phenolic content, the astringent and antioxidant capacity. In order to achieve that, the purified aqueous extracts of each plant were characterized by spectrophotometric analysis (total phenolic content, total flavonols and total flavanols, total anthocyanidins, proanthocyanidins and antioxidant capacity (DPPH)), astringency analysis and identification of the main compounds by on High Pressure Liquid Chromatography. Subsequently the samples underwent an acid cleavage with a reaction medium of 60% Ethanol, HCl 3N, in a temperature of 88 °C for 165 minutes. The purified aqueous extracts of muruci, ingá and açai showed a high concentration of polyphenols (761.83, 493.59 and 531.55 mg GAE/g MS, respectively), as well as high concentrations of total flavanols, total flavonols, and proanthocyanidins. The process of acid cleavage promoted an increase in the content of total polyphenols and was effective in hydrolyzing the proanthocyanidins, in reducing the astringency, in increasing the antioxidant capacity as well as in obtaining subclass of compounds of anthocyanins for the three extracts. The scaling-up process resulted in no significant difference ($p > 0.05$) regarding the cleavage held in analytical scale, for all extracts. Besides the depolymerization of proanthocyanidins, the acid treatment provides the deglycosylation of flavonoids as glycosylated quercetins (*Byrsonima crassifolia* and *Inga edulis*), glycosylated miricetins (*Inga edulis*) and glycosylated cyanidins (*Euterpe oleracea*). Thus, the increase in scale of the process made possible the production of extracts rich in compounds with high antioxidant capacity which provided good indication to the possible use of these extracts as antioxidants agents in food and pharmaceutical products.

Key-words: *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis*, *Euterpe oleracea*, Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Via de síntese dos compostos fenólicos.....	19
Figura 2 -	Exemplos de taninos hidrolisáveis.....	21
Figura 3 -	A – Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxi-difênico.....	22
Figura 4 -	Reação de decomposição das proantocianidinas.....	23
Figura 5 -	Proantocianidinas diméricas do tipo A.....	24
Figura 6 -	Proantocianidinas diméricas de tipo B.....	24
Figura 7 -	Proantocianidina trimérica do tipo C.....	25
Figura 8 -	Estrutura geral de oligômeros e polímeros de proantocianidinas, mostrando as ligações (4→8) e (4→6).....	26
Figura 9 -	Estrutura básica dos flavonoides.....	27
Figura 10 -	Principais subclasses de flavonoides com respectivo exemplo de composto	27
Figura 11 -	Estrutura dos flavanóis.....	28
Figura 12 -	Estrutura química dos principais flavanóis.....	29
Figura 13 -	Estrutura química das principais antocianidinas.....	31
Figura 14 -	Folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i>	32
Figura 15 -	Folhas de <i>Inga edulis</i>	34
Figura 16 -	Frutos de <i>Euterpe oleracea</i> Martius.....	35
Figura 17 -	Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 1.....	36
Figura 18 -	Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 2.....	37
Figura 19 -	Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 3.....	37
Figura 20 -	Mecanismo de formação de agregados polifenol-proteína.....	39
Figura 21 -	Fluxograma do processo de obtenção dos extratos purificados aquosos.....	47
Figura 22 -	Extratos submetidos à clivagem ácida em escala analítica.....	52
Figura 23 -	A – Frasco de 1 litro. B - Extratos submetidos à clivagem ácida em escala piloto. C - Equipamento de banho termostático.....	53
Figura 24 -	Método cromatográfico gradiente exploratório.....	64
Figura 25 -	Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos das folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (A), <i>Inga edulis</i> (B) e frutos de <i>Euterpe oleracea</i> (C) eluídos através de método gradiente exploratório em diferentes comprimentos de onda.....	65

Figura 26 -	Método cromatográfico gradiente otimizado.....	66
Figura 27 -	Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos à clivagem ácida (B) de <i>Byrsonima crassifolia</i> eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 2, procianidina B1; 3, catequina; 5, procianidina B2; 7, epicatequina; 8, cianidina; e 12, quercetina.....	68
Figura 28 -	Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos à clivagem ácida (B) de <i>Inga edulis</i> eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 3, catequina; 5, procianidina B2; 8, cianidina; 9, miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo; 10, quercetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo; 11, miricetina e 12, quercetina.....	70
Figura 29 -	Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos a clivagem ácida (B) de <i>Euterpe oleracea</i> eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 2, procianidina B1; 3, catequina; 4, cianidina-3-glicosídeo; 6; cianidina-3-rutinosídeo e 8, cianidina.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes classes de compostos fenólicos em plantas.....	20
Tabela 2 -	Caracterização dos extratos purificados aquosos de <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>Inga edulis</i> e <i>Euterpe oleracea</i>	57
Tabela 3 -	Avaliação da clivagem ácida sobre a redução dos teores de proantocianidinas sobre os teores de polifenóis totais e da capacidade antioxidante nos extratos vegetais.....	59
Tabela 4 -	Avaliação da clivagem ácida sobre a redução da adstringência nos extratos vegetais.....	61
Tabela 5 -	Caracterização dos extratos vegetais submetidos à clivagem em escala analítica e em escala piloto quanto aos flavonoides	62
Tabela 6 -	Tempos de retenção de padrões de compostos fenólicos.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	17
3.1.1	Taninos	20
3.1.1.1	Taninos hidrolisáveis.....	21
3.1.1.2	Taninos condensados (Proantocianidinas)	22
3.1.2	Compostos flavonoides	26
3.1.2.1	Flavanóis.....	28
3.1.2.2	Antocianidinas e Antocianinas.....	30
3.2	MATRIZES VEGETAIS DA AMAZÔNIA.....	32
3.2.1	<i>Byrsonima crassifolia</i>	32
3.2.2	<i>Inga edulis</i>	33
3.2.3	<i>Euterpe oleracea</i>	34
3.3	CLIVAGEM DAS PROANTOCIANIDINAS.....	36
3.3.1	Mecanismo de reação de clivagem ácida	36
3.3.2	Efeito dos taninos sobre a adstringência (interação tanino/proteínas)	38
3.3.3	Efeito da clivagem na absorção das proantocianidinas	40
3.4	AMPLIAÇÃO PARA ESCALA PILOTO DO PROCESSO DE CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS.....	40
3.4.1	Avaliação do tipo e quantidade de álcool para a otimização da clivagem	41
3.4.2	Avaliação da influência das condições experimentais da clivagem	42
3.4.3	Determinação das condições ótimas e validação do modelo	44
3.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	44
3.5.1	Determinação de compostos fenólicos por HPLC	45
3.5.2	Detector de arranjos de diodos (DAD)	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE MATRIZES	

	VEGETAIS AMAZÔNICAS.....	47
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	48
4.3	DOSAGEM DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS.....	49
4.4	DETERMINAÇÃO DE FLAVANOIS TOTAIS.....	49
4.5	DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIS TOTAIS.....	50
4.6	DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANIDINAS TOTAIS.....	50
4.7	ESTIMAÇÃO DE SEUS GRAUS DE POLIMERIZAÇÃO.....	51
4.8	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
4.9	DETERMINAÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA.....	51
4.10	CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS.....	52
4.11	ESPECIFICAÇÕES DO EQUIPAMENTO HPLC.....	54
4.11.1	Preparo das amostras.....	54
4.11.2	Otimização do gradiente de eluição do método analítico.....	55
4.11.3	Identificação dos compostos de interesse.....	55
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS AQUOSOS.....	57
5.2	AVALIAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA SOBRE O TEOR DE POLIFENÓIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	58
5.3	AVALIAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE A REDUÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA.....	60
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ANTES E APÓS CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS QUANTO AOS FLAVONOIDES.....	61
5.5	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE ANÁLISE..	63
5.6	IDENTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS MATRIZES.....	67
6	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Estudos vêm demonstrando uma relação direta entre a atividade antioxidante e o conteúdo de substâncias fenólicas em plantas (VELIOGLU et al.,1998; SOUZA et al., 2008).

No Brasil, mais especificamente na Região Amazônica existe uma grande variedade de alimentos exóticos e plantas medicinais, que apresentam atividade antioxidante considerável, cuja caracterização pode tornar-se potencialmente interessante na contribuição para o desenvolvimento sustentável na Amazônia (SOUZA et al., 2008). Dentre essas matrizes vegetais, encontram-se os frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) (ROGEZ, 2000), as folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* (SILVA et al., 2007b; SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2008). Dentre as principais utilidades dessas matrizes vegetais, pode-se destacar a possível inserção em formulações de alimentos como forma de preservação contra a oxidação ou fontes de corantes naturais; suplementos que busquem a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis; e cosméticos, visando novas fontes para a implementação de fotoprotetores.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários muito difundidos no reino vegetal, apresentando-se como um grupo químico unificado, mas que têm uma imensa variedade de estruturas moleculares. Os taninos constituem-se em uma classe dentre esses compostos, sintetizados através da condensação de compostos fenólicos simples. Eles são geralmente divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (HASLAM, 1980).

Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, dependendo do grau de polimerização, podem ser dímeros, oligômeros e polímeros de flavonóis. Deve-se aos taninos a percepção da adstringência sentida em alguns alimentos em função da capacidade das proantocianidinas se ligarem às proteínas da saliva. Essa característica não se torna indesejável apenas com relação aos aspectos sensoriais, mas por interferirem também na qualidade nutricional e funcional dos alimentos, pois ao se complexarem com essas proteínas, assumem um papel de agente antinutricional importante, dificultando também a absorção de carboidratos e de outros nutrientes. Vale ressaltar ainda que a absorção dos compostos fenólicos é dificultada à medida que se aumenta o seu grau de polimerização (RASMUSSEN et al., 2005).

Diante disso, torna-se essencial a aplicação de processos que promovam a despolimerização das proantocianidinas, tal como a clivagem ácida, pois esse processo já demonstrou ser eficiente para a redução de adstringência e aumento da capacidade

antioxidante em extratos vegetais ricos em taninos, bem como eficaz para a obtenção de monômeros de compostos fenólicos (TOLOSA, 2011).

Há um interesse crescente por compostos fenólicos monoméricos. Dessa forma, a ampliação de escala do processo de clivagem ácida em extratos vegetais, visando proporcionar a obtenção desses compostos em maior quantidade, é indiscutivelmente muito atraente, tanto do ponto de vista comercial, quanto pelo fato de também poder contribuir significativamente para o uso sustentável da biodiversidade das regiões a serem exploradas, através da agregação de valor, transformando essas fontes de espécies vegetais amazônicas potencialmente mais úteis.

O conhecimento dos compostos fenólicos presentes nas matrizes vegetais a serem estudadas é de fundamental importância, principalmente após o processamento, a fim de se verificar o impacto deste processo sobre estas moléculas. Portanto, para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes em matrizes vegetais tem se utilizado frequentemente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos (DAD) e ao Espectrômetro de Massas (LUO et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do processo de clivagem ácida em proantocianidinas presentes em extratos de matrizes vegetais da Amazônia (*Byrsonima crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*) realizada em escala de bancada e escala piloto sobre a composição de compostos fenólicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os extratos purificados aquosos de *Byrsonima crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*;
- Avaliar o efeito da clivagem ácida em proantocianidinas presentes nos extratos sobre o teor de polifenóis totais, a redução da adstringência e a capacidade antioxidante, antes e após ampliação da escala do processo;
- Avaliar o impacto da clivagem ácida em escala analítica e escala piloto sobre a composição de flavonoides;
- Identificar os principais compostos antes e após a clivagem ácida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)-DAD.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de produtos naturais no reino vegetal, podendo ser encontrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001; TSAO, 2010).

Esses compostos são metabólitos secundários dos vegetais, essenciais para o seu crescimento, defesa e reprodução, sendo sintetizados durante o seu desenvolvimento normal; se formam em resposta às condições de estresse como exposição às radiações UV, atuando como agente antipatogênico nas infecções, ferimentos, defesa contra o ataque de pragas e ainda, dentre outras funções, contribuem com a pigmentação dos vegetais (SHAHIDI; NACZK, 1995, NACZK; SHAHIDI, 2004; GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

Nos últimos anos, os compostos fenólicos tem sido de grande interesse para indústria alimentar (BARROS et al., 2011), sendo responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa de alimentos (PELEG et al., 1998; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Muitos trabalhos vêm descrevendo o papel dos compostos fenólicos como antioxidantes, tanto para manter a qualidade dos alimentos de forma a prevenir ou retardar a deterioração, mantendo dessa forma o valor nutricional de alimentos e de produtos alimentícios, quanto para proteger os tecidos do corpo do dano oxidativo (VAN RUTH; SHAKER; MORRISSEY, 2001; MERTENS-TALCOTT et al., 2008; OOMAH; SITTE, 2009).

Em animais e humanos tem-se observado que os compostos fenólicos são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis (GIADA; MANCINI-FILHO, 2006). Um conjunto substancial de evidências a respeito dos radicais livres tem sido desenvolvido, apontando que esses radicais apresentam importante função em muitas reações celulares fundamentais e sugerindo que o estresse oxidativo, que consiste no desequilíbrio homeostático entre oxidantes e antioxidantes no organismo ocasionado por uma carga hiperfisiológica de substâncias reativas do oxigênio (ROS), pode ser importante na fisiopatologia de doenças comuns, incluindo aterosclerose, insuficiência renal crônica e diabetes *mellitus* (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

As formas mais comuns de substâncias reativas do oxigênio (ROS) incluem radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais livres hidroxila, oxigênio *singlet* e óxido nítrico,

que têm significativamente maior atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*. Eles podem conduzir diretamente à mutação no DNA, a alteração da expressão gênica, modificação da transdução de sinal celular, apoptose celular, peroxidação lipídica e a degradação da proteína (NORDBERG; ARNER, 2001).

Devido a sua alta capacidade antioxidante e pela sua habilidade de neutralizar radicais livres, os compostos fenólicos são uma importante e diversificada categoria de fitoquímicos (LI FU et al., 2011). Esse poder de neutralização das estruturas radicalares tem sido atribuído à sua estrutura química que compreende em pelo menos um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxílicos. Essas estruturas englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, estando presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998; GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

Quimicamente, os compostos fenólicos são sintetizados primariamente através da via pentose fosfato (VPF), e vias chiquimato e fenilpropanoide (Figura 1). A VPF fornece como precursor a eritrose-4-fosfato para via do chiquimato. A via chiquimato converte estes açúcares fosfatos em aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, que se torna o precursor para a via fenilpropanoide, onde esta via é responsável pela síntese de uma grande variedade de metabólitos secundários, tais como ligninas, salicilatos, cumarinas, amidas hidroxicinâmicas, fitoalexinas, pigmentos e os flavonoides (RANDHIR; LIN; SHETTY, 2004).

Assim, com a desaminação da fenilalanina, catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), se obtém o ácido cinâmico (SHAHIDI; NACZK, 2006), e a partir das reações posteriores às catalisadas pela PAL são originadas as demais classes de compostos fenólicos (TAIZ, ZEIGER, 2004). A condensação do fenilpropanoide com três moléculas de malonil-CoA origina a chalcona. Este composto sofre uma série de reações de hidroxilação, metilação, dimerização e glicosilação que resultam nas diferentes classes de flavonoides (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (pelo seu efeito no citocromo) e infecção por fungos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Bem como a primeira enzima da via chiquimato (*3 – desoxi-arabino-heptulosonato - DHAP*) é induzida por diversos estresses, como injúria e infecção por patógenos, confirmando a importância dessa rota metabólica na produção de metabólitos secundários (SODEK, 2004).

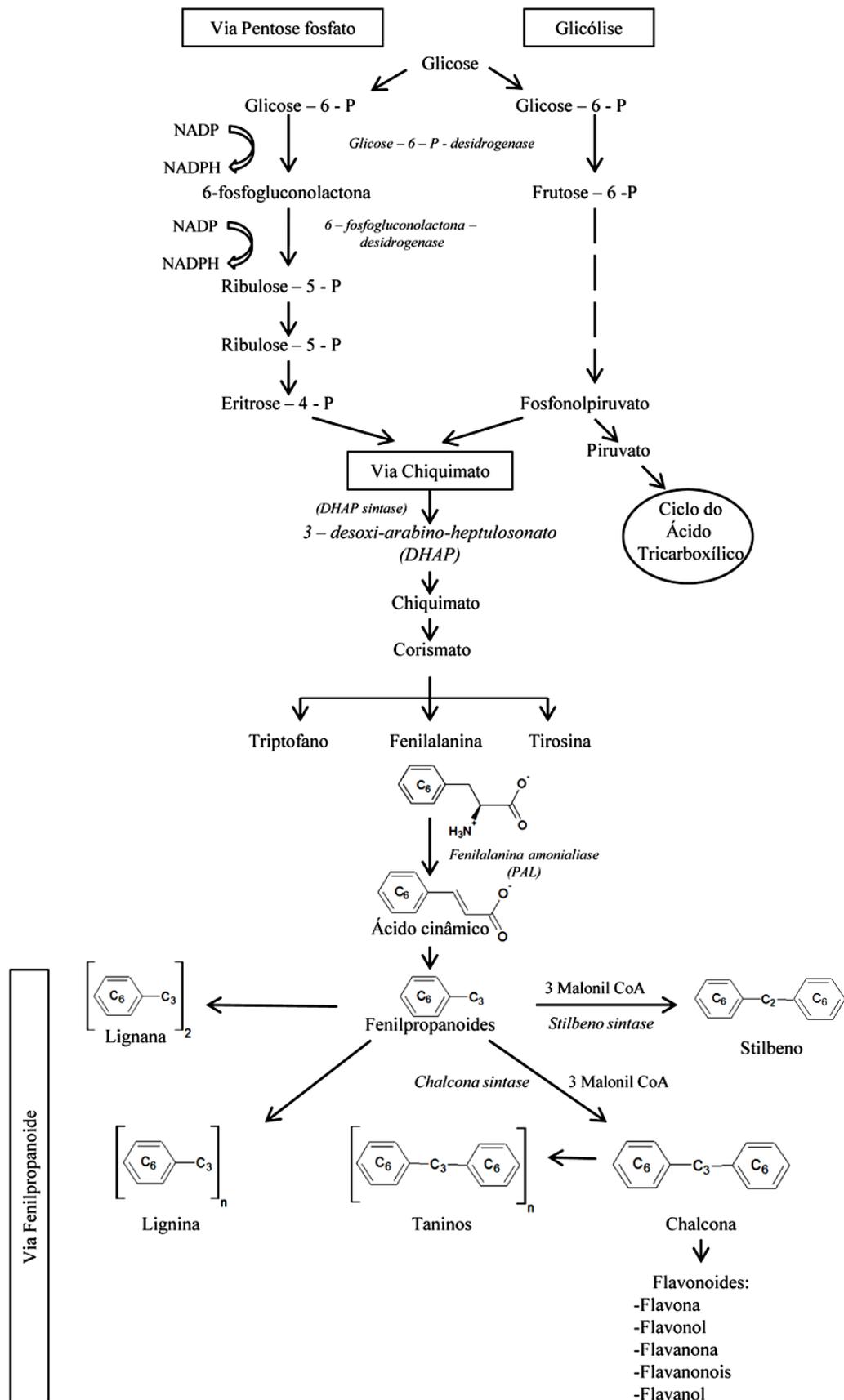


Figura 1 – Via de síntese dos compostos fenólicos.

Fonte: Adaptado de Randhir, Lin e Shetty (2004) e Shahidi e Naczck (2006).

Existe uma grande diversidade de compostos fenólicos, e isso deve-se a variedade de estruturas encontradas tanto a nível dos esqueletos carbonados quanto dos grupos funcionais, permitindo que esses compostos sejam categorizados em classes de moléculas semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes classes de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: BALASUNDRAM et al. (2006)

3.1.1 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos que possuem o peso molecular variando de 500 a 23.900 Daltons (SERRANO et al., 2009, SALMINEM; KARONEN, 2011). Confere em muitos frutos e vegetais de forma geral a sensação de adstringência ocasionada pela precipitação de glucoproteínas salivares, resultando na perda do poder lubrificante; tornando-se importante na função de defesa e proteção dos vegetais, por impedirem o ataque de herbívoros às partes das plantas, além da característica antimicrobiana comprovada, onde atuam contra ataques de microrganismos patogênicos (MONTEIRO et al., 2005). Segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (proantocianidinas) (OSZMIANSKI et al., 2007).

Nesse trabalho serão enfatizados os taninos condensados, pois trata-se do objeto de estudo; porém uma breve explicação sobre os taninos hidrolisáveis será realizada.

3.1.1.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são formados através da via do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar, que consistem em um poliol central, geralmente beta-D-Glicose, ou outro poliol, são esterificados com ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico) (FERRÃO, 2003; MONTEIRO et al., 2005).

De acordo com o tipo de ácido fenólico constituinte, os taninos hidrolisáveis podem ser ainda galotaninos ou elagitaninos (Figura 2). Nos galotaninos os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico são constituídos por ácido gálico (ou galoi), seu dímero ou um oligômero; já nos elagitaninos, os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexahidroxidifênico (ácido elágico) (PIZZI, 1983; BATTESTIN et al., 2004).

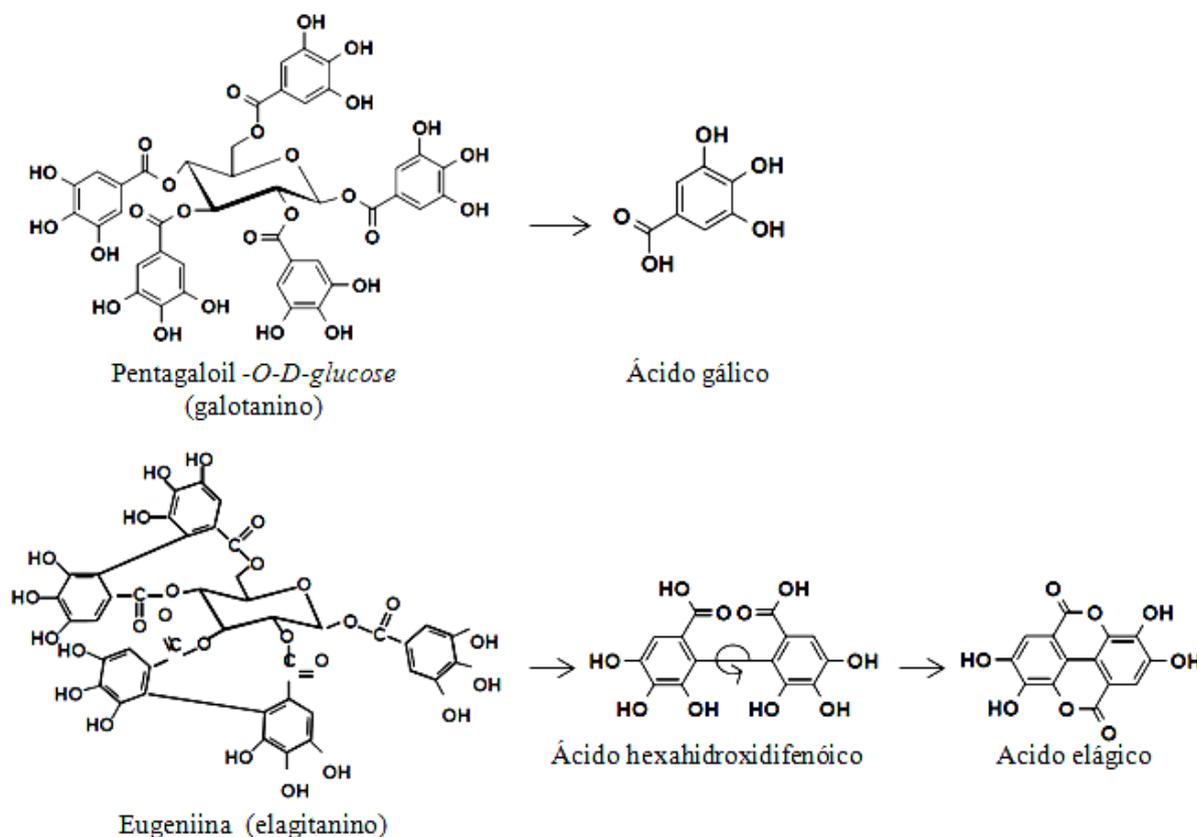


Figura 2 – Exemplos de taninos hidrolisáveis.

Fonte: HAGERMAN (2011).

Estes taninos são facilmente hidrolisáveis com ácidos, bases, aquecimento ou enzimas. Dessa forma, os galotaninos ou taninos gálicos, quando submetidos a reações de hidrólise, decompõem-se em ácido gálico e açúcares, e os elagitaninos ou taninos elágicos resultam em ácido elágico e açúcares sob as mesmas condições. E a condensação oxidativa de 2 unidades galoil converte taninos gálicos em elágicos (Figura 3) (RICE-EVANS et al., 1996; CROFT, 1998; BRAVO,1998; CANNAS, 2014).

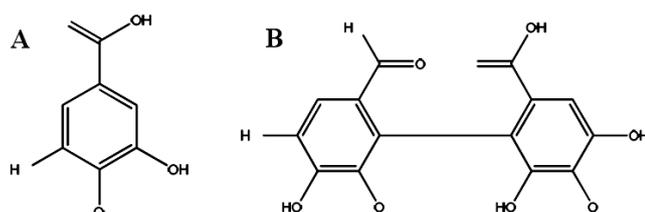


Figura 3 - A – Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxi-difênico.

Comparando a toxicidade dos taninos condensados e taninos hidrolisáveis, o segundo são mais tóxicos, em virtude de após hidrólise, liberarem ácido gálico, podendo estes serem levados a órgãos como rins e fígado, fazendo com que o nível de toxicidade no sangue fique além da capacidade de desintoxicação destes órgãos (LIAO; LU; SHI, 2003).

3.1.1.2 Taninos condensados (Proantocianidinas)

Os taninos condensados são também denominados de proantocianidinas, devido ao fato destas apresentarem pigmentos avermelhados da classe dos flavonoides e mais especificamente da subclasse das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, mediante à ruptura das suas ligações interflavânicas. Consoante se liberte cianidina ou delphinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas (Figura 4). As procianidinas são polímeros de flavonoides do tipo catequina e epicatequina e as prodelfinidinas são constituídas por flavonoides do tipo galocatequina e epigalocatequina (BATE-SMITH, 1954; NASCIMENTO, 2011).

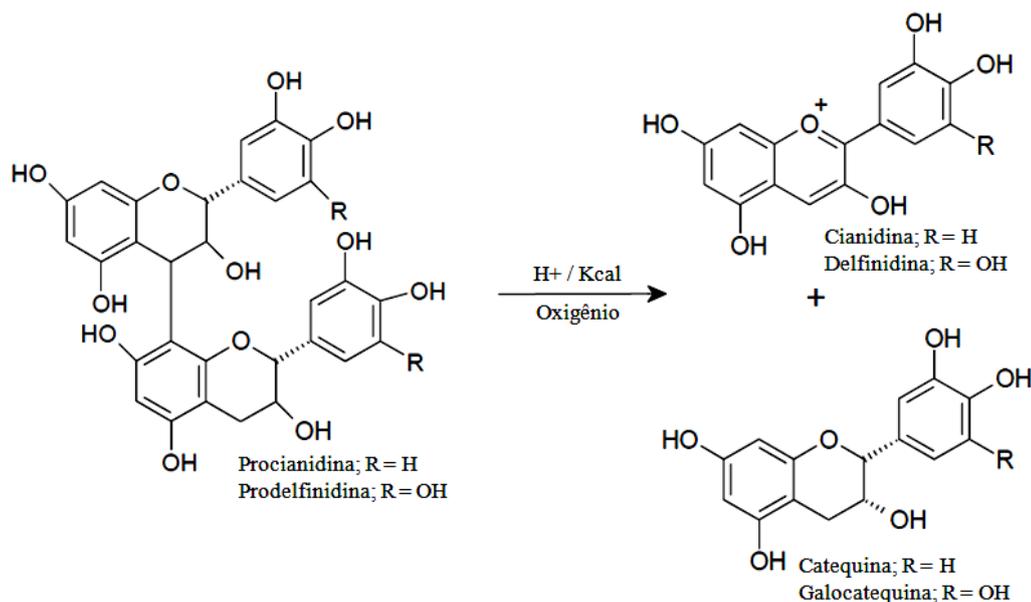


Figura 4 - Reação de decomposição das proantocianidinas.

Fonte: BATE-SMITH (1954).

Dependendo do grau de polimerização, os taninos condensados, podem ser dímeros, oligômeros e polímeros de flavonóis, podendo alcançar um grau de polimerização de até cinquenta (KHANBABAE; REE, 2001; SCHOFIELD et al., 2001; NASCIMENTO, 2011). Apresentam-se ligados covalentemente, seus pesos moleculares podem atingir até 23900 Daltons, e as suas propriedades químicas e de afinidade de ligação a macromoléculas dependem do tipo e número de ligações cruzadas entre os grupos flavanol na molécula dos taninos condensados (SALMINEM; KARONEN; SINKKONEN, 2011, PATRA; SAXENA, 2011, FRAZIER et al., 2010).

- *Proantocianidinas diméricas*

As proantocianidinas diméricas são classificadas de acordo com o seu tipo de ligação interflavânica, o que resulta na existência de dois grupos: as proantocianidinas diméricas do tipo A e as do tipo B; utiliza-se ainda um subscrito numérico para a caracterização da hidroxilação do anel B.

As proantocianidinas diméricas do tipo A possuem uma ligação do tipo C4-C8 (Figura 5), onde as unidades monoméricas são ligadas entre si por ligações carbono-carbono (C-C) entre a posição C4 de uma unidade e a posição C8 da segunda unidade, acrescida de uma ligação do tipo éter entre o grupo hidroxila do carbono 5 ou 7 do anel A de uma unidade e o carbono 2 do anel pirânico da outra unidade (KHANBABAE; REE, 2001; HAGERMAN, 2011).

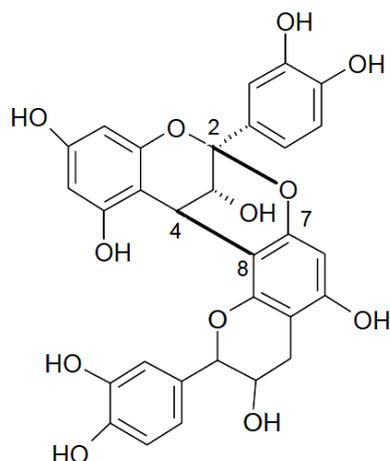


Figura 5 - Proantocianidinas diméricas do tipo A.

Fonte: GONÇALVES (2007)

As proantocianidinas diméricas de tipo B possuem apenas ligações interflavânicas covalentes entre o carbono 4 de uma unidade flavanol e o carbono na posição 8 ou 6 da outra unidade subsequente. São ainda classificadas, através de um subscrito numérico, de acordo com a estereoquímica do carbono de posição 3 do anel C de cada uma das unidades (Figura 6).

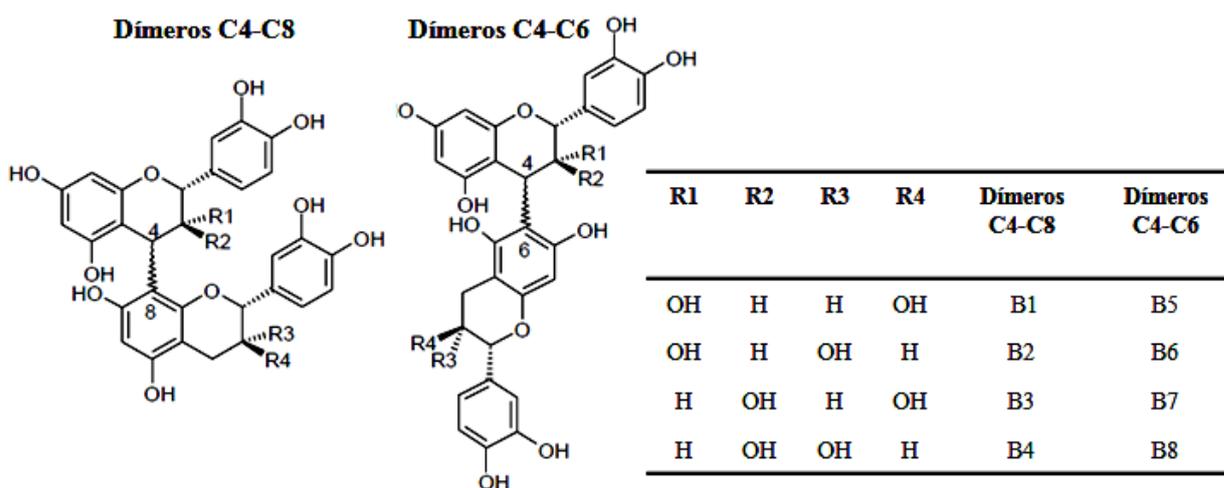


Figura 6 - Proantocianidinas diméricas de tipo B.

Fonte: GONÇALVES (2007).

- *Proantocianidinas triméricas*

As proantocianidinas triméricas são também divididas de acordo com o tipo de ligação interflavânica em proantocianidinas do tipo C que possuem duas ligações interflavânicas do tipo B (Figura 7) e do tipo D que possuem duas ligações, sendo uma do tipo B e outra do tipo C.

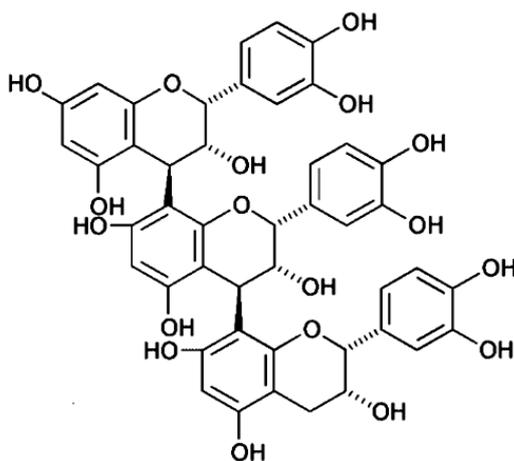


Figura 7 - Proantocianidina trimérica do tipo C.

Fonte: Khanbabaee e Ree (2001).

- *Oligômeros e polímeros de proantocianidinas*

Os oligômeros são estruturas mais polimerizadas de unidades de flavanóis, que apresentam até 6 unidades de monômeros, já os polímeros caracterizam-se por apresentarem mais de 6 monômeros na sua estrutura. Em ambos podem existir ligações de tipo C4-C8 e C4-C6 que permitem a formação de um número ilimitado de isômeros (Figura 8) (HASLAM, 1998).

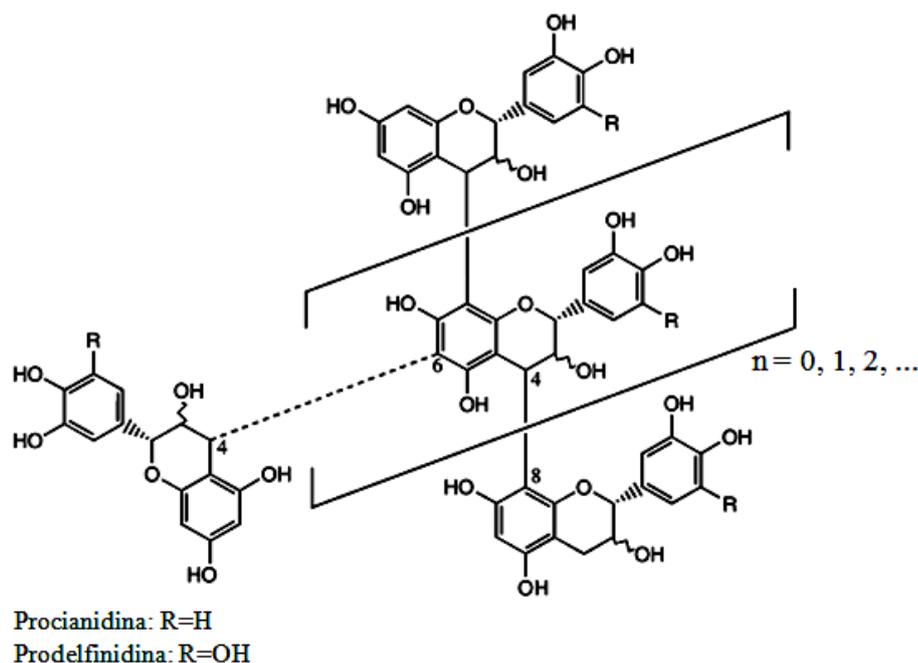


Figura 8 - Estrutura geral de oligômeros e polímeros de proantocianidinas, mostrando as ligações (4→8) e (4→6).

Fonte: Schofield et al., (2001).

3.1.2 Compostos flavonoides

Os compostos flavonoides constituem o mais estudado grupo de substâncias fenólicas, devido principalmente, às estruturas relativamente mais simples dessas substâncias (LEWIS; LANTZY, 1989).

Flavonoides (do latim *flavus*, "amarelo") é um termo genérico com o qual se identifica uma série de metabólitos secundários de plantas. Eles são sintetizados a partir de uma molécula de fenilalanina e 3 de malonil-CoA, através do que se conhece como via biosintética dos flavonoides. Os flavonoides constituem em uma classe de compostos, que se caracterizam por ser polifenóis, sendo a maioria solúvel em água (GARCIA-TIRADO et al., 2012). Essa solubilidade na água é fundamental para sua estocagem no vacúolo das células vegetais, onde o aumento da polaridade dependerá do aumento da glicosilação desses compostos (JUSTESEN et al., 1998), pois a maioria está ligada a carboidratos (CROZIER et al., 2009).

Os flavonoides apresentam a estrutura química básica como C₆-C₃-C₆ e diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares (NIJVELDT et al., 2001). De

acordo com Williams e Grayer (2004) já foram identificados e isolados em torno de 9.000 flavonoides a partir de fontes vegetais, afirmando ainda que muitos mais continuam a ser descobertos.

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 9).

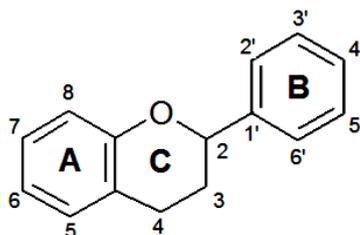


Figura 9 - Estrutura básica dos flavonoides.

O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000). Variações como grau de oxidação e saturação que promovem a substituição do anel C padrão resultam em importantes subclasses de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (Figura 10) (HOLLMAN; KATAN, 1999; D'ARCHIVIO et al., 2007). Substituições dos anéis A e B (que podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação) originam diferentes compostos dentro de cada subclasse de flavonoides (HOLLMAN; KATAN, 1999).

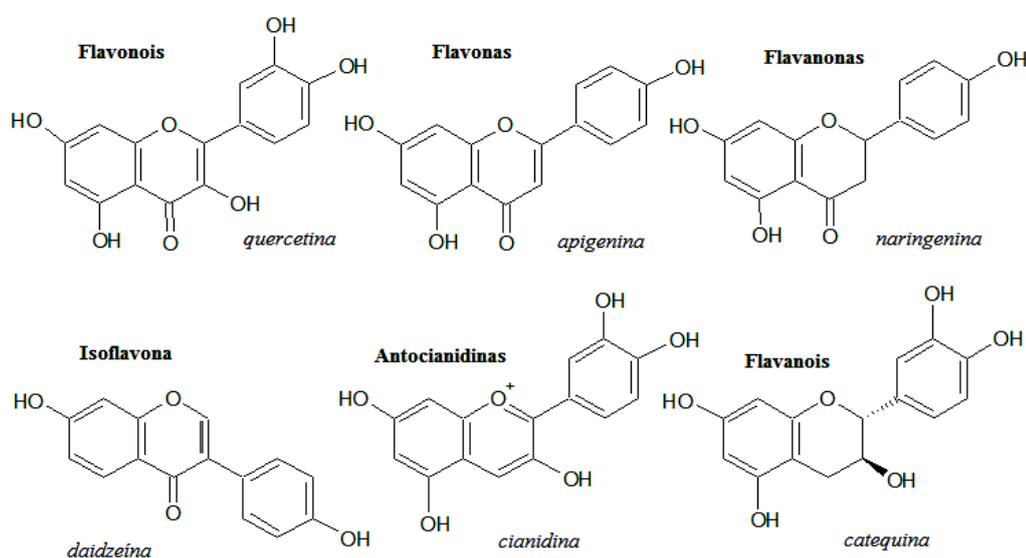


Figura 10 - Principais subclasses de flavonoides com respectivo exemplo de composto.

Fonte: CROZIER et al. (2009)

Os flavonoides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos (BRAVO, 1998).

A presença e distribuição dos flavonoides nos vegetais dependem de diversos fatores, como ordem e família do vegetal, bem como da variação das espécies. Podem ser encontrados em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho (NIJVELDT et al., 2001).

Em função da grande diversidade de estruturas encontradas de compostos fenólicos, o que leva a subdivisões desses compostos em vários subgrupos, nesta revisão apenas os compostos de maior interesse para este estudo serão descritos, portanto dentre a classe dos flavonoides, serão abordados apenas os flavanóis e as antocianidinas.

3.1.2.1 Flavanóis

Na família dos flavanóis, os compostos mais simples são as catequinas, galocatequinas e as epicatequinas.

Os flavanóis contêm uma cadeia de três carbonos saturada no anel C com um grupo hidroxila no C₃, a presença desta hidroxila somado ao fato da ausência de um grupo carbonila no C₄ e de dupla ligação entre os C₂ e C₃, promove a falta de planaridade da molécula e ainda, a formação de dois centros de assimetria (nas posições C₂ e C₃), como demonstra a Figura 11 (HOLLMAN; ARTS, 2000).

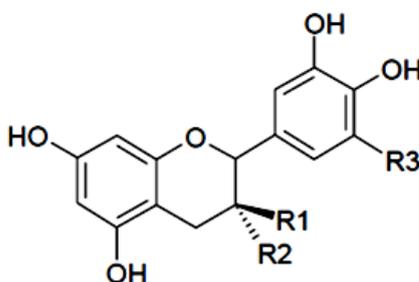


Figura 11 - Estrutura dos flavanóis.

Os dois centros quirais produzem quatro isômeros para cada nível de hidroxilação do anel B: (+)-catequina e (-)-epicatequina (Figura 12), amplamente encontrados na natureza; (-)-catequina e (+)-epicatequina comparativamente mais raros (CROZIER et al., 2009).

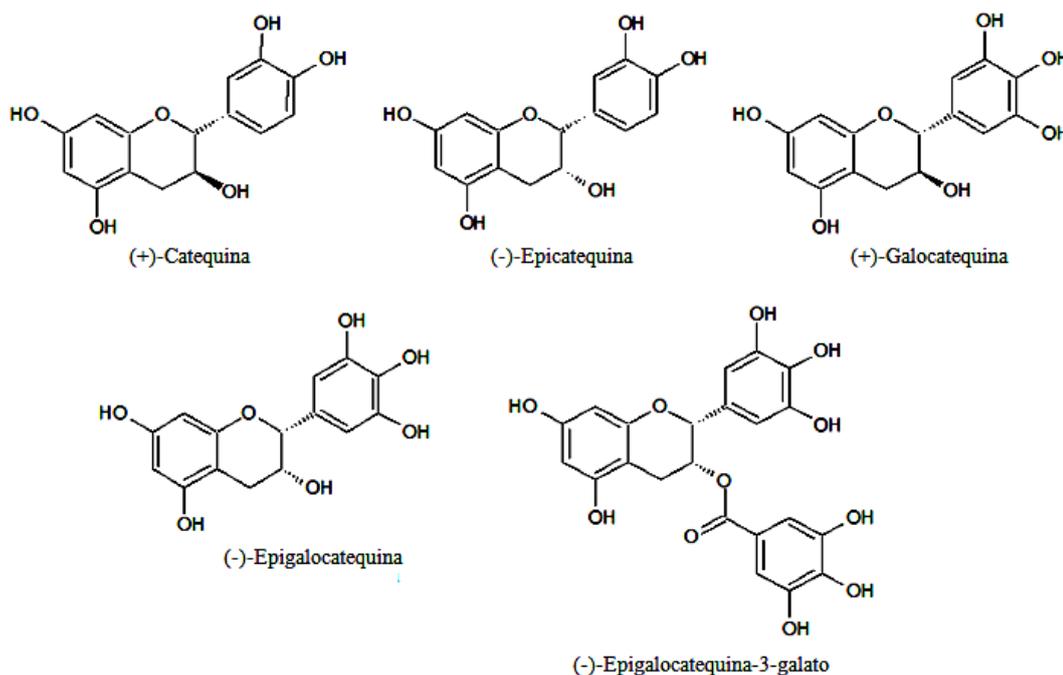


Figura 12 - Estrutura química dos principais flavanóis.

Fonte: CROZIER et al. (2009)

Os compostos flavanóis existem como monômeros e sob a forma de polímero. Ao contrário de outras subclasses de flavonoides, os flavanóis não são glicosilados em alimentos. Os principais representantes dessa classe de flavonoides em frutas são catequina e epicatequina, enquanto galocatequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato são encontradas principalmente nos chás (ARTS; VAN DE PUTTE; HOLLMAN, 2000a, ARTS; VAN DE PUTTE; HOLLMAN, 2000b). Porém, os flavanóis também podem ser encontrados em muitas frutas tais como damascos (250 mg/kg de peso fresco) e cereja (250 mg/kg de peso fresco), além do chá verde (até 800 mg/L), e do chocolate (até 600 mg/L), que constituem uma das fontes mais ricas desses compostos, que também estão presentes no vinho tinto (até 300 mg/L) (D'ARCHIVIO et al., 2007).

De acordo com Aron e Kennedy (2008) os flavanóis apresentam efetiva ação antioxidante, em função da sua configuração eletrônica, que possibilita a transferência dos elétrons para os radicais livres e consequentemente a formação de radicais quimicamente mais estáveis, onde nos compostos flavanóis, a adição de grupos galoil e hidroxila promovem o aumento dessa atividade.

Os flavanóis podem atuar como antioxidante através de vários mecanismos, incluindo a eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição, assim como a mediação e

inibição enzimática. Além disso, apresentam atividade anticarcinogênica, cardioprotetora, antimicrobiana, antiviral e neuroprotetora (CROZIER et al., 2009).

3.1.2.2 Antocianidinas e antocianinas

Antocianidinas são pigmentos vegetais da classe dos flavonoides, amplamente distribuídos na natureza, responsáveis pelas tonalidades de azul, vermelho e violeta encontrada em flores, frutos, folhas, caules e tubérculos de plantas (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Na natureza as antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, mas encontram-se com muita mais frequência, conjugados com moléculas de carboidratos ligados na posição C₃ ou nas posições C₅ e C₇, o que estabilizam a molécula, sendo então denominadas de antocianinas (FRANCIS, 2000; D'ARCHIVIO et al. 2007).

As antocianidinas fazem parte do grupo dos flavonoides, que apresentam como características o núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio), o qual consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos, que são condensados por um oxigênio. Enquanto que a molécula de antocianina é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, menos frequentemente, um grupo de ácido orgânico (FRANCIS, 1989). As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (PRIOR, 2003).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas 6 são importantes em alimentos (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina), estas demonstradas na Figura 13 (FRANCIS, 2000).

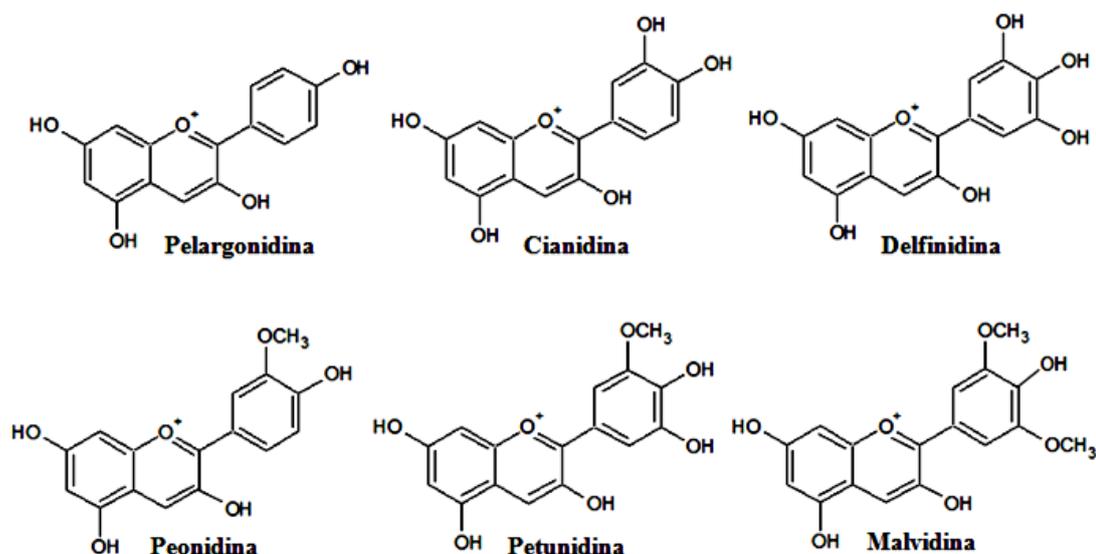


Figura 13 - Estrutura química das principais antocianidinas.

Fonte: CASTAÑEDA-OVANDO et al. (2009)

As antocianinas são moléculas polares, em função dos grupos substituintes polares (hidroxilas, carboxilas e metoxilas) e glicosilas residuais ligados aos seus anéis aromáticos. Conseqüentemente, elas são mais solúveis em água do que em solventes não-polares, porém, dependendo das condições do meio, as antocianinas podem ser solúveis em éter (XAVIER, 2004).

Em função da grande demanda de pesquisa para desenvolver corantes alimentícios a partir de fontes naturais, para diminuir (ou eliminar), gradativamente, a dependência do uso de corantes alimentícios sintéticos no processamento de alimentos, tem-se há algum tempo, estimulado a pesquisa de corantes naturais, não tóxicos. Nesse contexto, as antocianinas surgem como alternativa, pois compõem o maior grupo de corantes solúveis em água do reino vegetal (LOPES, 2002; XAVIER, 2004).

Os corantes de antocianinas são considerados como aditivos eficazes e seguros na indústria alimentar. No entanto, apresenta como desvantagem, frente aos corantes sintéticos, a mudança de coloração decorrente de reações químicas dos produtos alimentícios em razão de sua instabilidade decorrente de diferentes fatores físicos (como luz e pH), dificuldades de purificação e de síntese, e as possíveis reações com o dióxido de enxofre, muito empregado como conservante de alimentos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

No que diz respeito às atividades biológicas, Shahidi e Marian (2003), citam que vários estudos demonstram que as antocianinas atuam como antioxidantes naturais, promovendo vários benefícios à saúde. Estes compostos previnem a peroxidação de lipídeos,

a agregação de plaquetas, reduzem os teores elevados de colesterol e triacilgliceróis, o que torna-se um aliado no combate à doenças cardiovasculares, atuam como antioxidantes, evitando doenças degenerativas, podem ser usados como anti-inflamatórios, além de poderem evitar a ocorrência de cataratas no globo ocular de indivíduos diabéticos (RIBEIRO et al., 2004).

3.2 MATRIZES VEGETAIS DA AMAZÔNIA

3.2.1 *Byrsonima crassifolia*

O gênero *Byrsonima* pertence à família Malpighiaceae que compreende árvores, arbustos, subarbustos e lianas com aproximadamente 71 gêneros e 1250 espécies. Na América tropical existem aproximadamente 150 espécies nativas de *Byrsonima*, e só no Brasil concentra-se cerca de 50% das espécies, que são encontradas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, podendo também ser encontradas na região Sudeste do país, em áreas de cerrado (GUILHON-SIMPLÍCIO; PEREIRA, 2011; SANNOMIYA et al., 2007).

Byrsonima crassifolia (Figura 14) é uma pequena árvore frutífera polinizada por insetos (REGO et al., 2006), e dispersas por aves e humanos. É amplamente distribuída em várias regiões da América Central e do Sul e conhecido como murici ou muruci em português, nance em espanhol, e wild cherry em inglês (ORWA et al. 2009; PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010). Tem sido cultivado em sua área nativa, e fazem parte dos sistemas agrícolas tradicionais em algumas regiões (CASAS et al., 1996).



Figura 14 - Folhas de *Byrsonima crassifolia*.

No México, os frutos têm sido utilizados com fins medicinais desde tempos pré-hispânicos por vários grupos étnicos para fins antidiabéticos (ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005). As cascas e folhas também, há muito tempo já são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças como, tosse, doenças gastrointestinais, infecções da pele (HEINRICH et al., 1992) e picadas de cobra (GUPTA et al., 1979). Os extratos das folhas e das cascas apresentam efeitos espasmogênicos (BEJAR; MALONE, 1993) e atividade antimicrobiana (CACERES et al., 1991; AMARQUAYE et al., 1994).

Elevada capacidade antioxidante foi encontrada em extrato hidroalcoólico de folhas e casca de *Byrsonima crassifolia* em estudos experimentais realizados por Silva et al. (2007b). Souza et al. (2008) investigaram também a atividade antioxidante através da utilização de vários sistemas de ensaio *in vitro* utilizando extratos aquosos das folhas, cascas e frutos de *B. crassifolia*, e concluíram que esta espécie apresenta propriedade antioxidante interessante, demonstrando que os extratos das folhas foram os inibidores mais eficazes de oxidação do LDL-colesterol, nos testes realizados.

Vários compostos fenólicos já foram identificados nas folhas e na casca de *Byrsonima crassifolia*, como: ácidos fenólicos (ácido gálico e protocatecuico), flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina-3-O- β -D-galactosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo e quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo-2''-galato) e proantocianidinas (B₁ e B₂) (BEJAR et al., 1995; HÉRENT et al., 2010).

3.2.2 *Inga edulis*

O *Inga edulis* (Figura 15) é uma leguminosa arbórea da subfamília *Mimosoideae* nativo da América Tropical, encontrando-se generalizada na América Central e do Sul e cultivada pela população local por seu fruto comestível (PRANCE; SILVA, 1975; SILVA et al., 2007b).



Figura 15 - Folhas de *Inga edulis*.

Conforme Falcão e Clement (2000) o *Inga edulis* é uma árvore amplamente distribuída e cultivada também na Amazônia, tendo a espécie muitos nomes vulgares, como: ingá, ingá-cipó, ingá-de-metro, ingá-doce, ingá-de-macaco, ingá-macarrão, rabo-de-mico (Brasil); guamo, guama (Colômbia, Venezuela, Costa Rica); pacaie, sogá, pacaie silvestre (Peru).

Segundo Silva et al. (2007a) os extratos de suas folhas têm sido usadas na medicina popular como um produto anti-inflamatório, para curar artrite e reumatismo, e anti-diarreico; em seus estudos observaram que esses extratos dessa planta (folhas e cascas), dentre uma grande variedade de outras plantas da Amazônia, apresentam compostos fenólicos e atividades antioxidantes particularmente elevados.

A importante propriedade antioxidante que a espécie *Inga edulis* apresenta pode estar relacionada ao fato de que as folhas são particularmente ricas em compostos fenólicos (SILVA et al., 2007a), especialmente em flavan-3-óis ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e flavonóis (miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo, quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo e quercetina-3-O- α -L-glicopiranosídeo) identificados através dos estudos de Souza et al. (2007), sugerindo dessa forma um alto potencial da espécie como fonte de compostos fenólicos para o uso medicinal e alimentício.

3.2.3 *Euterpe oleracea*

A região amazônica tem condições climáticas adequadas para um grande número de árvores nativas e palmeiras exóticas subexploradas com interesse para a indústria agrícola, que podem oferecer uma fonte de renda futura para a população local (KOOLER et al., 2013).

Dentre elas, encontra-se a *Euterpe oleracea* Mart. Que é uma das espécies de palmeiras economicamente mais importantes da Amazônia brasileira (AGUIAR et al., 1980; GALOTTA; BOAVENTURA, 2005) e tornou-se um dos principais produtos do estuário amazônico exportado para outras regiões do mundo.

Os frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (Figura 16) é uma baga globosa, fibrosa com 0,5 cm de diâmetro, de cor pardo-violácea, contendo uma polpa oleaginosa e comestível, a semente possui o endocarpo duro e fibroso. Quando completamente maduro, é recoberto por uma capa branco-acinzentada (SANTOS et al., 2008).



Figura 16 - Frutos de *Euterpe oleracea* Martius.

O crescimento internacional do comércio de açaí tem sido atribuído à indústria de bebidas de açaí e produtos relacionados (MENEZES et al., 2005), onde muita atenção tem sido dada em função da potencial atividade anti-inflamatória, à sua capacidade antioxidante extremamente alta, associadas aos potenciais benefícios à saúde (LICHTENTHALER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006).

Segundo Rogez (2000) o açaí tem uma capacidade antioxidante elevada devido ao seu alto teor de antocianinas e tocoferóis. Além das antocianinas, também já foram identificadas outros compostos fenólicos tais como, flavonas (homorientina, orientina, taxifolina e isovitexina), vários derivados de flavanóis (incluindo (+)-catequina e a (-)-epicatequina), dímeros e trímeros de proantocianidinas e alguns ácidos fenólicos (PACHECO-PALENCIA et al., 2009); no entanto, predominantemente encontram-se as antocianinas, que são responsáveis por atribuir a coloração violácea da fruta e ainda, por grande parte de sua capacidade antioxidante (método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - TEAC) (PACHECO-PALENCIA et al., 2008).

A qualidade antioxidante da bebida de açaí é atribuída as altas concentrações de compostos fenólicos, porém principalmente à concentração de cianidina-3-rutinosídeo (C-3-R) e cianidina-3-glicosídeo (C-3-G) presentes, responsáveis pela cor púrpura, que representam 30% dos compostos fenólicos, e orientina e homorientina de forma secundária (ROGEZ et al., 2011).

3.3 CLIVAGEM DAS PROANTOCIANIDINAS

3.3.1 Mecanismo da reação de clivagem ácida

A clivagem ácida tem sido aplicada, para quebrar as ligações interflavonoides e, também, abrir o anel heterocíclico, ocorrendo, assim, formação de um carbon-cátion, com capacidade de reagir com outros nucleofílicos presentes (SOWUNMI et al., 2000). Dessa forma a clivagem reduz a viscosidade dos extratos tânicos, porque hidrolisa gomas hidrocoloidais de alto peso molecular e açúcares (PIZZI, 1983).

De acordo com Beart et al. (1985), na clivagem ácida, inicialmente ocorre a protonação do carbono C₈ da proantocianidina B₂ (Figura 17) através do ataque eletrofílico do próton H⁺.

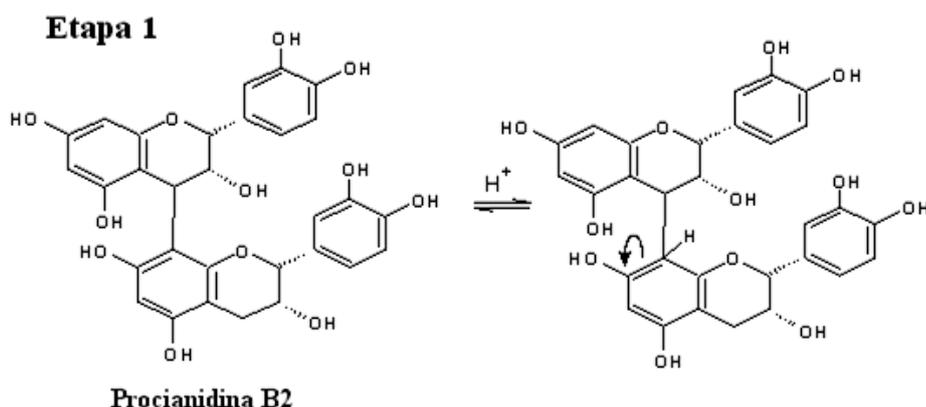


Figura 17 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 1.

Fonte: Beart et al., 1985.

Em seguida ocorre uma ligação σ entre o próton H⁺ e o carbono C₈, onde passa a adquirir os elétrons da ligação π , transformando o C₇ em um carbocátion (carregado

positivamente). Em função da densidade de elétrons, o carbocátion C_7 então é atraído, formando uma ligação π com o $-OH$

Na etapa 2 (Figura 18), esta ligação entre o C_7 e o grupamento $-OH$ é rapidamente desfeita com a liberação do H^+ para o meio reacional. Como consequência, uma ligação $C_7=C_8$ é formada, recuperando desta forma a aromaticidade do composto. A formação desta ligação promove a ruptura heterolítica da ligação interflavonoide $C_8 \rightarrow C_4$, resultando na formação do carbocátion e flavanol.

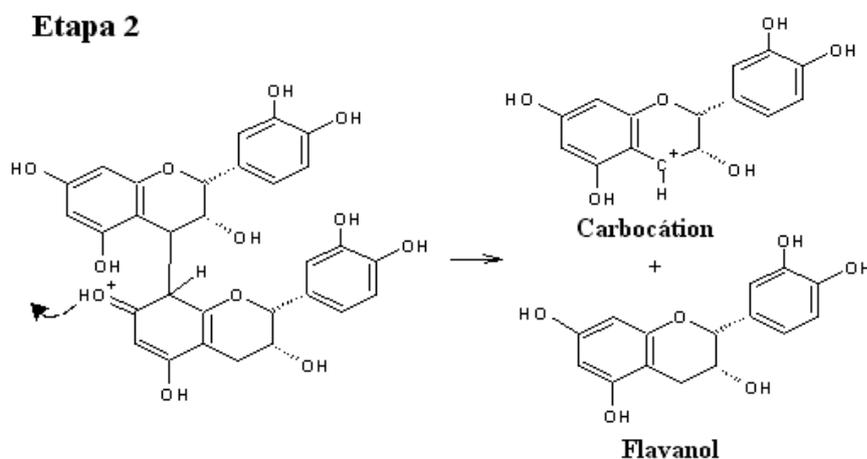


Figura 18 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 2.

Fonte: Beart et al., 1985.

Na Etapa 3 (Figura 19), para a formação da ligação $C_4=C_3$, o carbocátion C_4 promove a eliminação do hidreto ($-H$) do C_3 , e o heteroátomo na posição C_1 forma dupla ligação com o C_2 , para tornar o anel central aromático e assim mais estável, originando a partir disso a antocianidina.

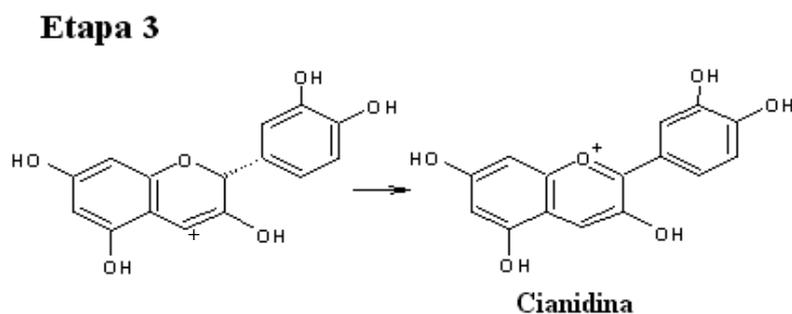


Figura 19 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 3.

3.3.2 Efeito dos taninos sobre a adstringência (interação tanino/proteínas)

Os polifenóis intervêm de forma decisiva no sabor e especialmente na sensação de adstringência característica, sobretudo dos vinhos novos. A adstringência é um conjunto de percepções sentido com uma grande variedade de alimentos, incluindo frutos, chocolate, chá vinho e cerveja. Um exemplo clássico da sensação de adstringência é a sensação de secura e aspereza sentida quando se come um fruto verde (MATEUS, 2009).

De fato, a adstringência é normalmente descrita como um conjunto de várias sensações bucais incluindo a aspereza, secura e constrição, descritas como uma falta de lubrificação ou umidade que provocam atrito e fricção entre as várias superfícies orais e uma sensação de aperto e contração sentida na boca, lábios e interior das bochechas (NOBLE, 1990).

Segundo Haslam (1998), essa sensação de adstringência é causada pela ligação dos taninos presentes nos alimentos às proteínas presentes na saliva, causando possivelmente uma precipitação destes agregados.

Os taninos têm a capacidade de interagir com as proteínas. Apesar de não haver dados muito concretos na literatura sobre os mecanismos envolvidos na formação dos complexos tanino/proteína, é consensual que estas interações se efetuam através de ligações cruzadas (“cross-linking”) entre as cadeias peptídicas e os taninos que atuam como ligantes polidentados à superfície da proteína envolvendo ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações do tipo iônicas (BATE-SMITH, 1954; GOLDSTEIN; SWAIN, 1963; BATE-SMITH, 1973; OH et al., 1980; ASANO et al., 1982; SALGUES; RAZUNGLES, 1983; LUCK et al., 1994).

As interações proteína-tanino podem ser influenciadas por diversos fatores, nomeadamente as estruturas das proteínas e dos taninos, as suas concentrações relativas e as características do solvente, tais como força iônica, a presença de outras substâncias em solução tais como os polissacarídeos e o pH, que segundo Leinmüller et al. (1991), parece possuir um papel fundamental na formação do complexo tanino-proteína, sendo favorável em pH com variação de 3,5 a 7,0; em caso de pH superior a 8,0, o complexo tende a ser desfeito rapidamente e, em pH 1,0 a 3,0, cerca de 90% da proteína está na forma livre.

Quanto aos polissacarídeos, estes têm uma grande influência na adstringência. De fato, tem-se a noção de que frutos pouco maduros, por exemplo, banana verde ou maçã verde, são mais adstringentes que frutos maduros. Também se sabe que durante o amadurecimento existem alterações no conteúdo de polissacarídeos do fruto. Pensa-se que a perda de

adstringência com o amadurecimento está relacionada com a solubilização de pectinas, que poderiam impedir a interação proteínas-taninos e diminuir a sensação de adstringência (MATEUS, 2009).

Diversos estudos foram efetuados usando várias metodologias para avaliar a interação entre proteínas e polifenóis (HAGERMAN et al., 1981; HASLAM et al., 1988; MAKKAR et al., 1995; SIEBERT et al., 1998; CHARLTON et al., 2002; CARVALHO et al., 2004). A partir dos resultados foi confirmado um modelo anteriormente proposto para a interação (HASLAM et al., 1988), apresentado na Figura 20.

De acordo com a Figura 20, a baixas concentrações de proteína (Figura 20 A) existirá um grande excesso de tanino. Cada molécula polifenólica poderá associar-se em pontos distintos da proteína criando uma camada exterior com menor hidrofiliicidade do que a proteína forçando esta a sair de solução e precipitar. No caso de se verificarem concentrações mais elevadas de proteína (Figura 20 B) existe a possibilidade de os polifenóis atuarem como ponte entre moléculas proteicas levando à formação de micelas (agregados) que poderão na parte externa ficarem cobertas de moléculas polifenólicas levando à sua precipitação.

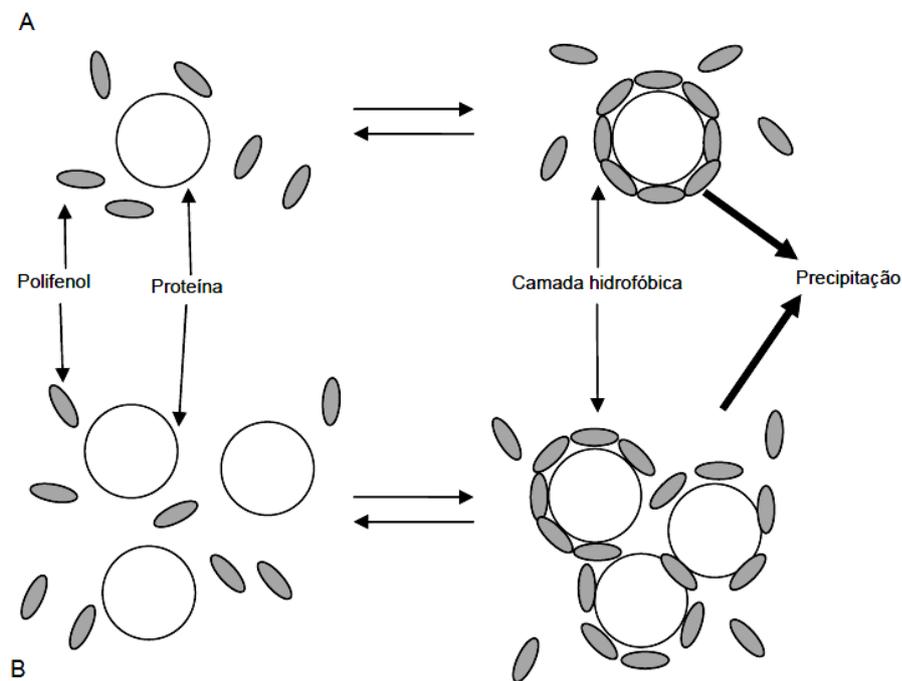


Figura 20 - Mecanismo de formação de agregados polifenol-proteína.

Fonte: Adaptado de Haslam et al. (1988)

3.3.3 Efeito da clivagem na absorção das proantocianidinas

A quantidade de proantocianidinas ingeridas corresponde a mais de metade do total de compostos polifenólicos ingeridos diariamente. Esta ingestão deve-se à sua grande abundância em vegetais, mas sobretudo, à larga distribuição em legumes e frutas (GU et al., 2004). De um modo geral a concentração de proantocianidinas nos alimentos aumenta com o seu grau de polimerização (GU et al., 2004). No entanto, estudos recentes apontam para uma maior absorção dos compostos com um grau de polimerização inferior a 3, indicado que serão estes os que apresentam maior atividade intraplasmática (DEPREZ et al., 2001).

Os efeitos biológicos da ingestão de taninos condensados dependem geralmente do seu grau de polimerização e solubilidade (SERRANO et al., 2009). Com relação à absorção desses compostos, metabolização das formas polimerizadas a formas mais simples, absorvíveis, ainda não foi inequivocamente provada. Existem estudos que apontam para a decomposição de procianidinas de chocolate em ambiente gástrico simulado (SPENCER et al., 2000). Por outro lado, existem estudos que referem a estabilidade *in vivo* (em rato) de procianidinas diméricas e oligoméricas não estando disponíveis para absorção (DONOVAN et al., 2002; GONTHIER et al., 2003).

Caso esta degradação em estruturas monoméricas não ocorra, as proantocianidinas permanecerão no estômago e intestino durante períodos de tempo mais longos. A presença em grande quantidade e por algum tempo no tubo digestivo, aliada com a sua capacidade para complexar com proteínas, faz destes compostos potenciais inibidores de enzimas digestivas, tornando-se, portanto agente antinutricionais.

3.4 AMPLIAÇÃO PARA ESCALA PILOTO DO PROCESSO DE CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS

Na grande maioria dos processos, o desenvolvimento natural parte de uma escala de produção menor para uma escala maior. A variação de escala nesse sentido é conhecida como aumento de escala ou *scale-up*.

Segundo Branco (2010), na escala de bancada, visando menor custo de operação, os dados básicos sobre o processo devem ser levantados com maior nível de detalhes possíveis. Nessa escala são realizadas tarefas básicas. Já no trabalho em maior escala, como em escala piloto, como a operação é mais onerosa, deve-se manter constante grande parte das possíveis

variáveis. De acordo com os conhecimentos obtidos do processo deve-se definir um determinado critério de ampliação de escala, ou seja, uma determinada grandeza, que deverá ser a mesma nessa maior escala em relação à empregada na escala de bancada. A operação de uma escala piloto objetiva especialmente o teste do critério de ampliação de escala.

Por definição, o processo de aumento de escala é o de transferência de um processo controlado de uma escala para o outro. Isso implica que o processo em pequena escala é compreendido e controlado, e, idealmente, que algumas regras básicas podem ser seguidas para obter rapidamente otimização e controle do processo em escala maior (FAURE et al., 2001).

Diante disso, o processo de clivagem ácida das proantocianidinas presentes nos extratos purificados aquosos de *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis* e *Euterpe oleracea* foi otimizado por Tolosa (2011), em escala de bancada, através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O processo de otimização é apresentado resumidamente a seguir:

3.4.1 Avaliação do tipo e quantidade de álcool para a otimização da clivagem

No estudo de Tolosa (2011), para o processo de otimização da clivagem ácida, foi realizada previamente, a avaliação do álcool, a fim de determinar qual o tipo e a quantidade a serem utilizados no meio reacional durante a clivagem e diminuir o número de variáveis na planificação experimental. Dessa forma, foram avaliados os álcoois metanol, por ser o álcool normalmente utilizado para as reações de hidrólise, e etanol por não ser tóxico para fins alimentícios. Os ensaios consistiram na clivagem do extrato de folhas de *I. edulis* sem álcool, com 30% e 60% de cada álcool, na presença de HCl 0,1N, a 90°C por 240 min, onde foram avaliadas a percentagem de redução de proantocianidinas (RP) e a concentração de polifenóis totais (mgEAG/gES). Como resultado, verificou que a adição de álcool (metanol ou etanol) favorece a ocorrência da reação de clivagem, desde que seja igual a 60%, pois as proantocianidinas são moléculas apolares e por isso encontram-se mais solúveis em meio hidroalcoólico do que em aquoso. Apesar de Tolosa (2011) não ter obtido para os tipos de álcool, diferença significativa sobre a RP, optou por utilizar no processo de clivagem, o etanol, pois observou que o teor de polifenóis aumentou conforme houve o aumento da concentração de álcool, principalmente quando utilizado no meio reacional 60% de etanol. Dessa forma, a utilização desse álcool é mais interessante para o trabalho, já que no

tratamento ácido ocorre a formação de compostos apolares (RAZMARA et al., 2010) e o etanol possui polaridade superior ao metanol.

3.4.2 Avaliação da influência das condições experimentais da clivagem

Posteriormente, no estudo de Tolosa (2011), foi avaliada a influência das condições experimentais da clivagem (concentração de HCl, tempo e temperatura da reação) sobre as variáveis de resposta: redução de proantocianidinas (%), redução adstringência (%), relação TEAC/PT ($\mu\text{Mol ET/g EAG}$) e a concentração de cianidina (mg/gES) para os três extratos.

- *Efeito da clivagem sobre a redução de proantocianidinas*

Com relação à RP, verificou que o efeito das variáveis de entrada (concentração de ácido, temperatura e tempo) foram similares para os 3 extratos, tendo em vista a semelhança dos valores de RP obtidos na maioria dos ensaios experimentais. Após a submissão dos resultados ao teste de variância (ANOVA) verificou-se que o modelo proposto apresentou coeficientes de determinação elevados (R^2) de 0,9580, 0,9682 e 0,9464 para os extratos de BC, EO e IE, respectivamente, indicando juntamente com a falta de ajuste não significativa ($p>0,05$) que a variabilidade dos dados experimentais pôde ser explicada pelo modelo. E ao obter os coeficientes de regressão para o modelo polinomial de 2ª ordem da RP, o efeito positivo dos termos lineares indicaram que a elevação do nível de qualquer variável ocasiona maior RP dos extratos vegetais, entretanto o efeito quadrático negativo das variáveis de entrada significa que a partir do ponto máximo a elevação de seus valores ocasiona diminuição na variável de resposta.

- *Efeito da clivagem sobre a redução de adstringência*

Com relação à redução do percentual de adstringência, no estudo de Tolosa (2011) foi encontrado que os tratamentos empregados para a clivagem ácida das proantocianidinas contribuíram positivamente para a redução da adstringência dos extratos. E após a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste encontrada não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), indicando que o modelo ajustou-se bem os dados experimentais da RA, confirmando com os valores de $R^2>0,77$ para os 3 extratos.

Através dos valores de coeficiente de regressão, os extratos apresentaram comportamento diferente para a redução da adstringência. Foi verificado que o extrato de BC

apresentou comportamento diferente dos extratos de EO e IE, e observado que o efeito da temperatura e do HCl mesmo sendo significativos não influenciaram grandemente a RA. Este fato foi confirmado pelos baixos coeficientes de regressão destas variáveis e pela pequena variação de RA encontrada nos ensaios do planejamento (81,7 a 91,8%). Para os extratos de EO e IE ficou evidente o forte efeito linear das variáveis HCl e temperatura, afirmando que RA para esses dois extratos foi favorecida pelo aumento do nível de HCl e da temperatura.

- *Efeito da clivagem sobre a relação entre a capacidade antioxidante e o teor de polifenóis totais (TEAC/PT)*

Os dados obtidos para a relação TEAC/PT demonstraram que não houve grandes alterações ocasionadas pela clivagem ácida das proantocianidinas. Na Análise de Variância (ANOVA) o modelo não foi estatisticamente significativo para o extrato de EO. O comportamento do extrato de EO indica que a perda de TEAC/PT decorrente da redução das proantocianidinas foi compensada pelo valor TEAC/PT dos compostos formados durante o tratamento ácido. Para os demais extratos, somente o efeito quadrático da temperatura (BC) e HCl (IE) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Para o efeito quadrático negativo da temperatura no extrato de BC, Tolosa (2011) afirma que significa que o aumento da temperatura é benéfico até certo ponto (valor máximo de TEAC/PT) a partir do qual aumentos sucessivos ocasionam a redução na relação TEAC/PT. Isso se deve provavelmente a degradação térmica dos compostos fenólicos presentes no extrato.

- *Concentração de cianidina após a clivagem das proantocianidinas*

Após a clivagem ácida dos extratos de BC, EO e IE, as cianidinas foram quantificados por HPLC. A presença desta antocianidina nos extratos após a clivagem confirma a presença das proantocianidinas.

Com base na análise de variância, verifica-se que o modelo polinomial de 2ª ordem adaptou-se aos dados experimentais de concentração de cianidina para todos os extratos. A falta de ajuste não foi significativa e os modelos apresentaram $R^2 > 0,9$.

Os coeficientes de regressão obtidos, mostraram que o efeito linear foi significativo para as variáveis HCl (BC e EO), temperatura (BC, EO e IE) e tempo (IE). Este comportamento indica que o aumento no nível de qualquer destas variáveis favorece a redução das proantocianidinas através da clivagem e consequente formação da cianidina. O efeito quadrático negativo do HCl para os três extratos, da temperatura para o EO e tempo

para o IE indica que aumentos sucessivos no nível destas variáveis, a partir do ponto de curvatura da superfície, promovem a degradação da cianidina.

3.4.3 Determinação das condições ótimas e validação do modelo

As melhores condições foram determinadas por Tolosa (2011) através da avaliação da desejabilidade máxima (D) para todas as variáveis de resposta. A escolha da condição ótima priorizou condições experimentais nas quais a redução das proantocianidinas e da adstringência fossem superior a 90% e 77%, respectivamente, sendo que os compostos formados durante a clivagem fossem preservados e que a relação TEAC/PT variasse o mínimo possível após o tratamento ácido. De acordo com os dados obtidos no estudo de Tolosa (2011), verifica-se que os valores preditos e experimentais, para cada variável de resposta, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Isto mostra que o modelo proposto é adequado para explicar a influência das variáveis de entrada sobre a redução de proantocianidinas (RP) e de adstringência (RA), relação TEAC/PT e concentração de cianidina.

Baseado nestes condicionamentos, a otimização das variáveis de resposta estipula o uso de HCl com concentração de 3N sob aquecimento a 88°C durante 165 minutos, para os três extratos vegetais, sendo estas condições o ponto de partida deste trabalho.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia se destaca devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS, 2006). Segundo Cass e Degani (2001), a cromatografia é um método físico-químico de separação de compostos que se fundamenta nas diferenças de velocidades de suas migrações numa mistura, sob a influência das interações específicas desses componentes com duas fases imiscíveis, denominadas de fase estacionária e fase móvel.

De acordo com Lanças (2009) existem diversas técnicas cromatográficas, e para essa classificação pode-se levar em consideração vários critérios, como a geometria da superfície

na qual a separação irá ocorrer (cromatografia de coluna ou plana), a natureza física da fase móvel e da fase estacionária (cromatografia líquida, gasosa ou supercrítica e cromatografia líquido-sólido ou líquido-líquido, respectivamente), o mecanismo de separação (por afinidade e exclusão por tamanho) e a quantidade de amostra (analítica, semipreparativa e preparativa).

Collins (2006) reporta que a cromatografia líquida em coluna se divide em dois grupos: cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel devido à força da gravidade; e a cromatografia líquida que normalmente utiliza colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão, possibilitando uma vazão da fase móvel mais rápida, atribuindo a esta modalidade a expressão inglesa *high performance liquid chromatography* (HPLC), traduzido como cromatografia líquida de alta eficiência, em função da eficiência atingida na separação ser a característica mais importante.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica que consegue separar misturas que contenham um grande número de compostos similares, ou compostos variados presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempos de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade, empregando colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, podendo os instrumentos serem totalmente automatizados (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Pode-se utilizar como uma técnica analítica para a identificação e quantificação de compostos (HPLC analítico) ou como uma técnica de isolamento (HPLC semi-preparativo e preparativo), onde basicamente um sistema HPLC é constituído por uma bomba de alta pressão, um injetor, uma coluna e um detector (CASS; DEGANI, 2001).

3.5.1 Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A análise para a determinação de compostos fenólicos de plantas é normalmente realizada em três passos. Em primeiro lugar, a extração de compostos fenólicos a partir de amostras, tanto na forma livre ou ligado. Em seguida, a limpeza dos extratos para eliminar interferências ou, em alguns casos, a pré-concentrado para os compostos fenólicos. Finalmente, a análise dos compostos fenólicos dos extratos. Todos os passos são importantes para fornecer resultados exatos e precisos (VICHAPONG et al., 2010).

As análises realizadas por HPLC para a determinação de compostos fenólicos os modos de separação utilizados são em fase reversa e fase normal (utilizada para polifenóis

mais apolares) (NATSUME et al., 2000). Em fase reversa, a fase móvel possui polaridade maior que a fase estacionária, sendo este modo de separação o mais utilizado para compostos fenólicos, por permitir a separação de uma grande variedade de compostos, usando água, acetonitrila e metanol como principais componentes da fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

O princípio da separação dos compostos fenólicos consiste na ocorrência de alguns fatores, como da estereoquímica das moléculas e a polaridade total, a qual é influenciada, principalmente, pelas substituições dos anéis, pela natureza, posição e número de açúcares ligados e pela acilação desses açúcares. Em consequência disso, em cromatografia de fase reversa, os compostos glicosilados são eluídos em tempos mais breves que os compostos agliconas, bem como os compostos que apresentam mais grupamentos hidroxilas também apresentam um tempo de eluição mais curto que os seus análogos menos substituídos (SAKAKIBARA et al., 2003; TSAO; YANG, 2003; MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Apesar do alto custo das análises e o elevado tempo requerido para cada uma se incluído o tempo de preparação das amostras, devido às vantagens de sua alta sensibilidade, exatidão e precisão, e a possibilidade de determinação da composição de misturas, as análises por HPLC tem sido cada vez mais empregada nos laboratórios e utilizada para a análise de polifenóis (SILVA, 2006; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

3.5.2 Detector de arranjos de diodos (DAD)

O cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um detector UV/visível de arranjo de diodos (DAD), tem sido utilizado para a separação, identificação e quantificação de diversos compostos fenólicos (SAKAKIBARA et al., 2003; TSAO; YANG, 2003), pois permite a obtenção em tempo real do espectro completo de absorção UV-VIS de 200 a 800 nm e, portanto, pode fornecer informações adicionais para a identificação de um pico (LUO et al. 2013).

No DAD a cela é iluminada com luz branca (não monocromática) e a luz emergente da cela chega à rede de difração, sendo dispersa até o elemento fotossensível; assim, cada diodo monitora uma faixa estreita de comprimentos de onda e, no final da análise, toda a região de interesse foi varrida e os dados acumulados no computador permite, com software adequado, a obtenção de espectro da substância, sendo dessa forma, muito empregado para verificar a pureza de um pico cromatográfico (LANÇAS, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS

As amostras dos extratos purificados aquosos das espécies *B. crassifolia*, *I. edulis* e *E. oleracea* foram obtidas utilizando a estrutura e os protocolos cedido pela Empresa *Amazon Dreams*. Os extratos foram obtidos após a realização de técnicas adequadas para a extração, concentração e purificação (adsorção/desorção) dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *B. crassifolia*, *I. edulis* e dos frutos de *E. oleracea*, de acordo com o fluxograma, ilustrado na Figura 21.

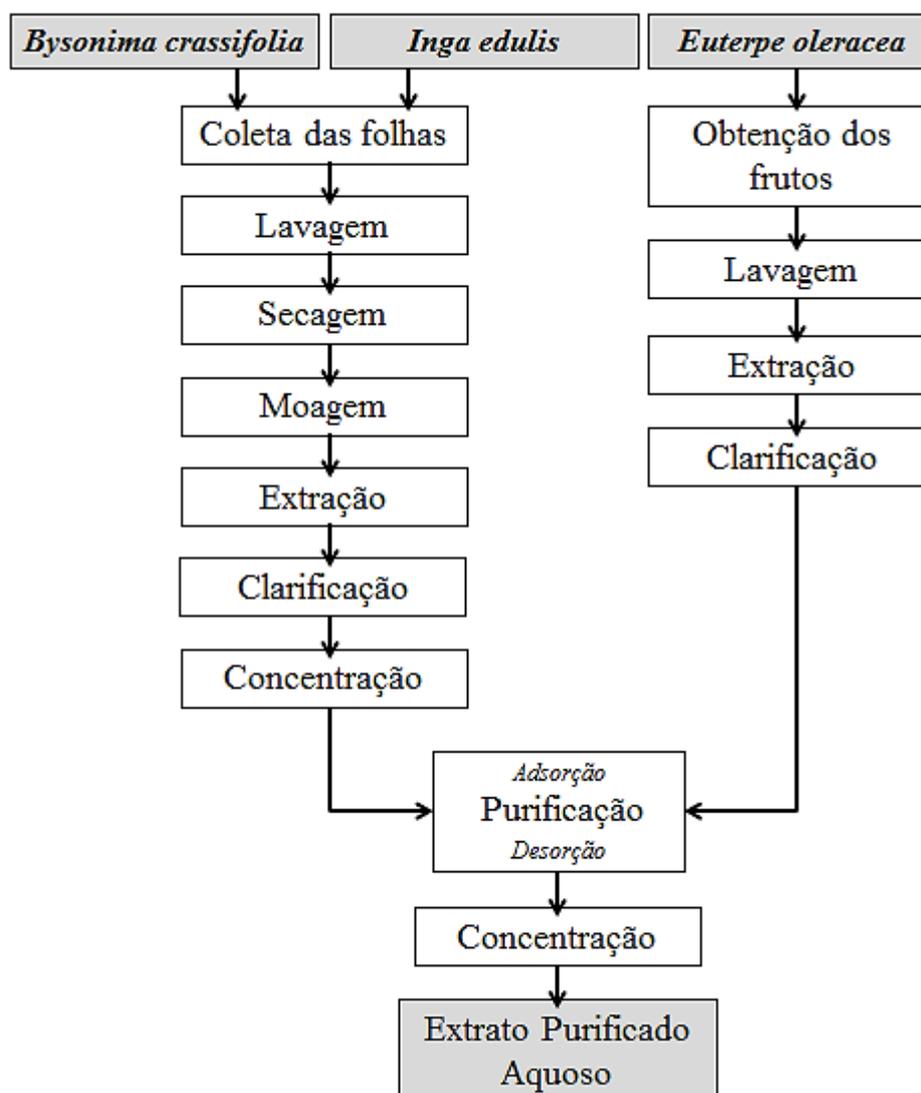


Figura 21 – Fluxograma do processo de obtenção dos extratos purificados aquosos.

Para a obtenção dos extratos purificados aquosos de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, as folhas das duas espécies foram submetidas aos mesmos procedimentos, como mostra a Figura 21. As folhas de *Inga edulis* foram coletadas no município de Santa Izabel do Pará - PA e as folhas *Byrsonima crassifolia* no município de Santo Antônio do Tauá - PA. Após a coleta, as folhas foram transportadas imediatamente para o laboratório onde foram logo em seguida submetidas à lavagem com água corrente e posterior secagem em estufa. As folhas secas foram moídas em moinho de facas.

Para a extração, as folhas moídas foram imersas a uma solução hidroalcolica e submetidas à temperatura e tempo pré-definidos, segundo o protocolo de extração da empresa *Amazon Dremis*. Após resfriamento, os extratos brutos hidroalcolicos obtidos, foram clarificados em filtro prensa, contendo terra diatomácea acidificada. Posteriormente os extratos clarificados foram concentrados para evaporação do etanol.

A purificação foi realizada através da eluição dos extratos em coluna aberta, contendo resina macroporosa para a adsorção dos compostos fenólicos e posterior dessorção com solução etanólica. Subsequente à este processo, os extratos foram novamente concentrados para a obtenção dos extratos purificados aquosos.

Para a obtenção do extrato de *Euterpe oleracea*, os frutos foram adquiridos da Ilha do Combú – PA, com extração dos compostos fenólicos realizada no mesmo dia da coleta. Os procedimentos para essa matriz consistiu na imersão rápida dos frutos em água, a fim de remover sujidades aparentes, e em seguida a extração com água em despulpadeira por período curto. Após a extração, o extrato bruto obtido foi submetido à clarificação, nas mesmas condições utilizadas para os extratos das folhas, procedeu-se a purificação do extrato de açaí, que a partir dessa etapa, o procedimento foi o mesmo utilizado para a obtenção dos extratos purificados de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.

Os rendimentos dos extratos purificados aquosos de *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis* e *Euterpe oleracea*, foram respectivamente em torno de 9,0%, 4,9% e 8,3%; e a matéria seca de 8,3%, 8,2% e 6,62%, também respectivamente.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

A concentração de polifenóis totais foi estimada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). A metodologia consiste na mistura de uma alíquota de 500 µL de amostra com 250 µL de reagente de Folin-

Ciocalteu (Sigma Chemicals – S.L., EUA) diluído em água destilada (1:1 v/v) e 1250 µL de carbonato de sódio a 7,5%, nesta ordem. A mistura então é mantida protegida da luz por 30 minutos em repouso, e em seguida a absorbância é lida a 750 nm em espectrofotômetro de absorção.

Para este trabalho todas as análises foram feitas em triplicatas sendo refeitas aquelas que apresentaram um erro relativo maior ou igual a 12%.

Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de matéria seca de extrato (mg de AGE/ g MS), determinado a partir da curva de calibração do padrão.

4.3 DOSAGEM DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS

A determinação de proantocianidinas foi determinado pelo método Butanol/HCl proposto por Julkunen-Tiitto (1985), que consiste na dosagem das antocianidinas produzidas pela clivagem oxidativa ácida das proantocianidinas.

A metodologia propõe para a reação, a mistura de 200 µL de amostra e 4 mL de solução de Butanol:HCl (95:5, v/v) aquecida por 2 horas a 95 °C em banho-maria. Após resfriamento a mistura reacional será lida a 550 nm e um branco de cada amostra será medido sem aquecimento. As análises serão realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes em cianidina (Sigma Chemicals – S.L., EUA) por grama de matéria seca de extrato (mg ECI/g MS) a partir da curva de calibração.

4.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVANÓIS TOTAIS

Os flavanóis foram determinados utilizando o *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), segundo o protocolo proposto por Delcour e Varebeke (1985). A análise consiste na reação de 400 µL de amostra com 2000 µL de solução de DMACA na concentração de 0,5 mg/mL solubilizada em solução de HCl:Metanol na proporção de 1:3. Após a homogeneização, a mistura foi acondicionada ao abrigo da luz por 10 minutos, para posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 640 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por grama de matéria seca de extrato (mg ECA)/g MS).

4.5 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIS TOTAIS

O método para a determinação de flavonóis foi baseado na reação com cloreto de alumínio (QUETTIER-DELEU et al., 2000). O método consiste na mistura de 1000 µL de amostra e 1000 µL de solução de AlCl₃ 2% (m/v), diluída em metanol e preparada no dia da análise, nesta ordem. A absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm após 10 minutos mantida em repouso ao abrigo de luz. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo por grama de matéria seca de extrato (mgEMR)/g MS.

4.6 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANIDINAS TOTAIS

Para a quantificação de antocianinas nas amostras foi utilizado o método pH diferencial, estabelecido por Askar e Treptow (1993), que consiste na diluição das amostras em tampões pH 1 e pH 4,5, seguido de leitura das absorbâncias das amostras em dois comprimentos de onda (514 nm e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes em cianidina (Sigma Chemicals– S.L., EUA) por grama de matéria seca de extrato (mgECi/g MS) a partir da curva de calibração

4.7 ESTIMAÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO

A estimação do grau de polimerização das proantocianidinas foi obtida pela relação entre os teores de polifenóis totais e de flavanóis, de acordo com Souza et al. (2008).

4.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi determinada através do método colorimétrico indireto, via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, o DPPH. Este radical possui coloração púrpura, e tem absorção em comprimento de onda máximo em aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o

DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, com coloração amarela e consequente decréscimo da absorbância, que será monitorada durante a análise.

O procedimento consiste em adicionar em uma cubeta 75 µL de amostra (apropriadamente diluída em metanol) e 2925 µL da solução metanólica de DPPH. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 515nm em diferentes intervalos de tempo até se manter constante. As leituras foram feitas em triplicata e o branco da análise utilizou-se MeOH ao invés da amostra.

As atividades de sequestro do radical de cada amostra foram calculadas de acordo com a porcentagem de inibição do radical DPPH (% Inb), segundo a Equação 2.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Ab = Absorbância do branco

Aa = Absorbância da amostra

O valor da atividade antioxidante é expresso em µM ET (Equivalentes Trolox) a partir do coeficiente de regressão calculado da curva de calibração construída a partir de solução de Trolox, conforme a Equação 3.

$$DPPH (\mu MET) = \frac{\% \text{ Inibição}}{\text{Coeficiente}} \times \text{diluição} \quad (\text{Equação 3})$$

4.9 DETERMINAÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA

A determinação da adstringência foi realizada de acordo com o método proposto por HORNE et al. (2009), que avalia a modificação sensorial dos extratos em virtude da ocorrência efetiva da clivagem das proantocianidinas. Este método baseia-se na medida da turbidez ocasionada pela formação de complexos entre proantocianidinas e proteínas ricas em prolina, presentes na saliva humana.

Saliva humana foi coletada e centrifugada a 10.000g durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -18 °C. As amostras a serem analisadas foram previamente submetidas à neutralização com solução de NaOH, e em seguida, foram diluídas com tampão pH 4,5 (CH₃COONa 0,2M em 12% EtOH). Após a homogeneização de 4500 µL de amostra

com 4500 μL saliva a turbidez foi lida em turbidímetro TB1000 (Tecnoyon – São Paulo, BRA). A calibração do equipamento foi realizada antes das leituras com padrões de formazina (Tecnoyon – São Paulo, BRA) em diferentes concentrações. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Nefelométrica de Turbidez por grama de extrato seco (NTU/gES).

4.10 CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS

Para a realização da clivagem ácida das proantocianidinas, foi utilizado o método otimizado por Tolosa (2011), que determinou as condições ótimas em escala analítica quando as amostras foram submetidas em solução com 60% etanol, HCl a uma concentração de 3N sob aquecimento a 88 °C, durante 165 minutos. Os volumes adicionados a cada tubo de ensaio foram 12 mL de etanol, 5 mL de HCl e 3 mL de extrato purificado.

Para a clivagem ácida em escala analítica (ou de bancada), os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio com tampa rosqueada e septo de teflon (Figura 22). O aquecimento procedeu-se em banho termostático, devidamente tampado para manutenção da temperatura constante (Figura 23 – C). Após a finalização do tempo de reação, os tubos contendo as amostras foram imediatamente resfriados em banho de gelo, ao abrigo da luz. Posteriormente os extratos foram acondicionados em frascos âmbar, devidamente identificados, saturados com nitrogênio e armazenados em freezer a -22 °C até a realização das análises.



Figura 22 – Extratos submetidos à clivagem ácida em escala analítica.

Para a clivagem em maior escala (escala piloto), foram utilizados frasco de borosilicato com volume para 1000 mL, com tampa rosqueada e resistente ao aquecimento com ácidos, para uma boa vedação (Figura 22 – A).

Todos os procedimentos realizados em escala analítica foram seguidos rigorosamente no processo em escala piloto (meio reacional com 60% etanol, HCl a uma concentração de 3N, aquecimento a 88 °C, durante 165 minutos). Em cada frasco, portanto, foi adicionado 600 mL de etanol, 250 mL de HCl e 150 mL de extrato.

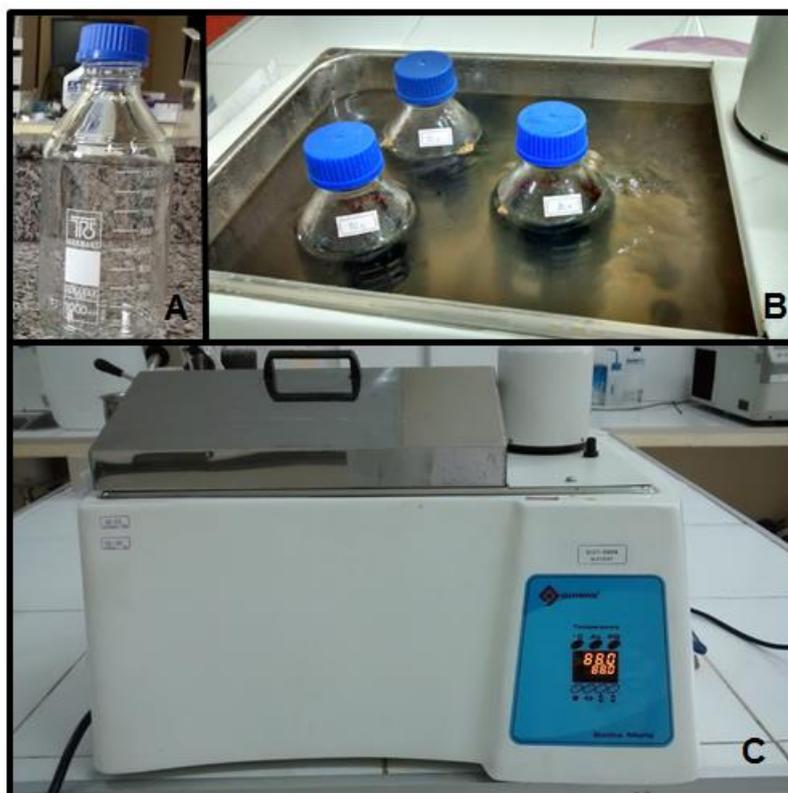


Figura 23 – A – Frasco de 1 litro. B - Extratos submetidos à clivagem ácida em escala piloto. C - Equipamento de banho termostático.

O aquecimento procede-se em equipamento de banho termostático, devidamente tampado para manutenção da temperatura constante (Figura 23 – C), tendo ainda o cuidado para que o nível da água do banho estivesse compatível com o nível da mistura reacional contida dentro dos frascos (Figura 23 – B). Após a finalização do tempo de reação, os tubos contendo as amostras foram imediatamente resfriados em banho de gelo, ao abrigo da luz, com posterior acondicionamento em frascos âmbar, devidamente identificados, saturados com nitrogênio e armazenados em freezer a -22 °C até a realização das análises.

4.11 ESPECIFICAÇÕES DO EQUIPAMENTO HPLC

O sistema utilizado para as análises cromatográficas foi o HPLC Thermo Scientific série Ultimate 3000 (EUA), equipado com bomba quartenária (LPG-3400RS), injetor automático (WPS-3000SL Analytical), detector de arranjo de diodos - DAD (DAD-3000), software de dados (Chromeleon 7.1 SR2) e célula de fluxo (Standard Analytical).

A coluna utilizada foi a Kinetex C18 2,6 μm , 100 x 4,6 mm (Phenomenex). As fases móveis foram compostas de água ultrapura com 1% de ácido fórmico (solução A) e acetonitrila com 1% de ácido fórmico (solução B). Essas soluções foram preparadas, filtradas utilizando membranas de nylon com 0,22 μm de porosidade, acondicionadas nos frascos próprios ao equipamento de cromatografia e submetidas ao banho ultrasônico para degaseificação.

4.11.1 Preparo das amostras

- *Extratos purificados aquosos*

Todas as amostras de extratos purificados aquosos (*B. crassifolia*, *I. edulis* e *E. oleracea*) foram diluídos 50 vezes em água ultrapura acidificada com 1% de ácido fórmico (grau HPLC). Em seguida, foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45 μm .

- *Extratos clivados analiticamente e em escala piloto*

Todos os extratos clivados foram submetidos a um *clean up* prévio, utilizando cartuchos Strata C18-E, 55 μm , 70 A, dimensão de 50 mg/1 mL (Phenomenex, Torrance, CA), acoplados a um suporte *manifold*.

Previamente os cartuchos foram acondicionados com metanol (1mL) e água ultrapura acidificada com 1% de ácido fórmico (1mL). Posteriormente foram adicionadas as amostras diluídas 10 vezes em água ultrapura acidificada (1% ácido fórmico). Os compostos adsorvidos foram eluídos com 1 mL de metanol a 70%, com vazão de 1 mL/ min.

4.11.2 Otimização do gradiente de eluição do método analítico

Inicialmente realizou-se a eluição dos extratos em gradiente exploratório variando de 5% a 95% de B em 35 minutos. Posteriormente, foram feitos ajustes até chegar ao gradiente que permitisse a melhor separação dos picos cromatográficos obtidos para todos os extratos purificados aquosos de *B. crassifolia*, *I. edulis* e *E. oleracea* (antes e após clivagem ácidas), e em um menor tempo de corrida possível. As amostras dos extratos foram injetadas em triplicata.

Como auxílio para a otimização do gradiente, utilizou-se o cálculo do ângulo formado entre o % B com o tempo, a partir das fórmulas:

$$\boxed{\text{Tan } (\alpha) = \frac{\text{Cateto oposto}}{\text{Cateto adjacente}}} \rightarrow \boxed{\alpha = \arctan \text{Tan } (\alpha)}$$

Onde:

Tan = Tangente;

α = ângulo de inclinação;

Cateto oposto = Diferença entre [] da fase B final e [] fase B inicial de cada intervalo do gradiente;

Cateto adjacente = Diferença entre o tempo final e o tempo inicial de cada intervalo do gradiente.

4.11.3 Identificação dos compostos de interesse

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção obtidos a partir das injeções dos padrões comerciais de compostos de interesse, com os tempos de retenção dos compostos obtidos com a injeção das frações dos extratos trabalhados. Foram utilizados os padrões de procianidinas B1 e B2, cianidina, delphinidina, miricetina, miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (Extrasynthèse, Genay, França), ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina (Sigma, Steinheim, Alemanha).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Os valores foram expressos como médias aritméticas \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando um teste de Tukey para comparações entre grupos utilizando o *software Origin Pro* (Origin Lab. Corporation, Massachusetts, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS AQUOSOS

A Tabela 2 mostra os valores obtidos para a caracterização colorimétrica dos compostos fenólicos dos três extratos purificados aquosos das matrizes vegetais em estudo. Vale ressaltar que os resultados obtidos em cada análise foram expressos em seus equivalentes químicos, e portanto são valores aproximados.

Os extratos de *Byrsonima crassifolia* (BC), *Inga edulis* (IE) e *Euterpe oleracea* (EO) apresentaram valores elevados de compostos fenólicos. A maior concentração foi verificada para o extrato de BC, enquanto que a menor concentração foi encontrada no extrato de IE. Entretanto, essa menor concentração de polifenóis para a espécie de IE está coerente com os estudos de Pompeu et al. (2012) e Silva (2007) que apresentaram essa diferença para extratos dessas duas espécies.

Tabela 2 – Caracterização dos extratos purificados aquosos de *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis* e *Euterpe oleracea*.

Determinações	<i>B. crassifolia</i>	<i>I. edulis</i>	<i>E. oleracea</i>
Polifenóis totais (mg EAG/g de MS)*	761,83±6,07	493,59±4,17	531,55±5,32
Proantocianidinas (mg ECI/g de MS)	53,13±2,29	112,22±6,30	122,85±8,73
Antocianidinas totais (mg ECI/g de MS)**	-	-	296,63±2,73
Flavanóis totais (mg ECA/g de MS)	207,75±3,14	151,18±1,31	122,24±1,27
Flavonóis totais (mg EMR/g de MS)	62,60±4,93	112,99±9,70	118,55±7,42
Grau de polimerização	3,67±0,05	3,27±0,06	4,35±0,06

Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata±desvio padrão, exceto os valores para flavonóis totais, que foram realizadas em duplicata;

*Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG), de miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo (EMR), de catequina (ECA) e de cianidina (ECI) por g de massa seca (/g MS).

**Os extratos de *B. crassifolia* e *I. edulis* não apresentam naturalmente antocianidinas.

Todos os extratos apresentaram alta concentração de polifenóis totais, quantidades consideráveis de proantocianidinas e flavanóis totais. Dentre as espécies, o extrato que apresentou maior teor de proantocianidinas foi o extrato purificado aquoso de EO, bem como

maior concentração de flavonóis totais. Quanto aos flavanóis totais, foi observado que a maior concentração ocorre para o extrato de BC. Vale ressaltar que as antocianinas estão presentes somente nos extratos de EO. Quanto ao grau de polimerização, os valores encontrados para os três extratos purificados estudados neste trabalho foram semelhantes ao grau de polimerização de 4,21 encontrado por Souza et al. (2008) para o extrato de IE, demonstrando dessa forma que os extratos apresentam proantocianidinas menores, ou seja, com poucas unidades monoméricas (DIAS et al., 2010).

De acordo com a empresa *Amazon dreams*, que dispõe de fichas técnicas (2013) para os três extratos em estudo, com valores de referência para alguns compostos fenólicos expressos por mg do composto equivalente por 100g de extrato purificado seco, os valores de polifenóis totais encontrados para os três tipos de extratos devem ser maiores que 40 mg; para proantocianidinas, os valores devem ser maiores que 2,1 mg para os extratos de BC e IE, não especificando para o extrato de EO, que refere apenas a concentração de antocianidinas (maior que 20 mg). Referencia ainda, somente para os extratos de BC e IE que a concentração para flavanóis, deve apresentar-se maior que 8 mg; e quanto aos flavonóis, os valores para BC devem ser maiores que 3 mg e para IE maiores que 6,5 mg. A partir dessas informações, é importante ressaltar que todos os extratos apresentaram valores elevados em relação aos compostos quantificados.

5.2 AVALIAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA SOBRE O TEOR DE POLIFENÓIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

O método utilizado para a clivagem ácida das proantocianidinas foi eficaz tanto para os extratos purificados aquosos das folhas de BC e IE, quanto para os extratos dos frutos EO. Porém, observa-se na Tabela 3, que houve um percentual maior de proantocianidinas clivadas para o extrato de IE e EO, em função da maior quantidade inicial de proantocianidinas presentes nesses extratos. O menor percentual de redução de proantocianidinas para o extrato de BC também foi encontrado por Tolosa (2011) durante o processo de otimização da clivagem ácida em escala analítica. Em seu estudo verificou que, com a elevação da concentração de HCl de 2N para 3N, houve uma elevação do percentual de redução de proantocianidinas para todos os extratos, porém foi menor para extrato de BC quando comparado ao extrato de IE, afirmando ainda que o efeito linear positivo da temperatura também é similar ao do ácido, demonstrando que ao elevar a temperatura em 12,5 °C,

também se aumenta o percentual de redução de proantocianidinas. Entretanto, assim como ocorre com o aumento da concentração do ácido, no extrato de IE o percentual de redução foi maior do que nos extratos de BC e EO. Dessa forma, compreende-se que os extratos de IE e EO, são mais fortemente favorecidos pela concentração de ácido e temperatura do meio reacional quanto à ocorrência da clivagem ácida das proantocianidinas, do que o extrato de BC, dada a menor redução de proantocianidina encontrada.

É importante destacar, a partir dos resultados, que mesmo com a ampliação do volume do processo de clivagem ácida em 50 vezes, não houve diferença significativa ($p>0,05$) em relação à clivagem realizada em escala analítica, para todos os extratos.

Tabela 3 – Avaliação da clivagem ácida sobre a redução dos teores de proantocianidinas sobre os teores de polifenóis totais e da capacidade antioxidante nos extratos vegetais.

Amostra	Proantocianidinas* (mg ECI/g de MS)	Polifenóis totais* (mg EAG/g de MS)	DPPH* (mmol eq Trolox/g de MS)	
BC	Extrato Purificado Aquoso	53,13±2,29 a	761,83±6,07 b	9,15±0,89 b
	Extrato clivado analiticamente	38,34±0,65 b	802,86±25,20 b	11,72±0,12 a
	Extrato clivado em escala piloto	38,28±0,75 b	899,37±16,50 a	11,89±0,39 a
IE	Extrato Purificado Aquoso	112,22±6,30 a	493,59±4,17 b	6,42±0,58 b
	Extrato clivado analiticamente	41,26±1,66 b	481,34±9,10 b	10,27±0,05 a
	Extrato clivado em escala piloto	41,87±2,33 b	557,35±6,61 a	10,04±0,53 a
EO	Extrato Purificado Aquoso	122,85±8,73 a	531,55±5,32 a	1,86±0,30 b
	Extrato clivado analiticamente	45,04±3,60 b	509,38±38,14 a	11,82±0,59 a
	Extrato clivado em escala piloto	48,48±1,11 b	493,70±3,65 a	12,44±0,37 a

Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata±desvio padrão; Letras iguais na mesma coluna, em uma a mesma espécie, não diferem significativamente $p>0,05$;

*Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina (ECI), de ácido gálico (EAG), e milimol equivalente de Trolox, por g de massa seca (/g MS).

O processo de clivagem ácida de proantocianidinas não promoveu redução significativa na quantidade de polifenóis totais para os extratos submetidos ao processo em escala analítica, porém houve um aumento significativo na concentração de polifenóis totais quando submetidos à clivagem em maior escala, exceto para o extrato de EO que apresentou

uma concentração menor, mas não significativa estatisticamente, se comparado com as concentrações de polifenóis no extrato submetido à clivagem em menor escala.

Após a realização da clivagem ácida das proantocianidinas, observa-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante dos extratos analisados. E mesmo com o aumento da escala do processo, a capacidade antioxidante manteve-se significativamente maior, apresentando resultados semelhantes ao obtido em escala de bancada. Vale salientar que para o extrato de açaí o aumento da capacidade antioxidante foi de seis vezes em relação ao extrato aquoso, enquanto que para os extratos de ingá e muruci o aumento foi de apenas 50% e 20%, respectivamente. No estudo de Tolosa (2011) este comportamento diferenciado no aumento da capacidade antioxidante para o extrato de açaí, também foi observado; esta justificativa consiste na formação de compostos durante o tratamento ácido, pois além da clivagem das proantocianidinas (em maior concentração no extrato de EO purificado aquoso) há também a hidrólise de flavonoides glicosilados. Dessa forma, à medida que ocorre despolimerização das proantocianidinas e deglicosilação de flavonoides, há um aumento de compostos aglicona no extrato e conseqüentemente o aumento da capacidade antioxidante, já que segundo Ross e Kasum (2002) os flavonoides aglicona possuem maior capacidade antioxidante do que os seus correspondentes glicosilados.

5.3 AVALIAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE A REDUÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA

Na Tabela 4 são apresentados os resultados do efeito da clivagem ácida das proantocianidinas sobre a redução da adstringência. Com base nos dados, pode-se verificar que em todos os extratos houve percentuais de redução da adstringência de mais de 60%, o que comprova que a redução de proantocianinas, exerce considerável influência para a diminuição dessa sensação gustativa. Isso demonstra conseqüentemente, que a despolimerização de grande parte dos compostos foi bem sucedida, já que uma maior adstringência está relacionada com o maior grau de polimerização e peso molecular dos compostos fenólicos.

O aumento de escala do processo não influenciou significativamente ($p > 0,05$) os resultados obtidos para os extratos de BC e EO, porém o extrato de IE apresentou menor redução da adstringência, quando submetido à clivagem em escala piloto. Apesar disso, esse

menor percentual obtido para o extrato de IE, ainda assim constituiu-se em um percentual superior de redução, se comparado aos extratos das outras espécies vegetais em estudo.

Tabela 4 - Avaliação da clivagem ácida sobre a redução da adstringência nos extratos vegetais.

Amostra		Adstringência (%RA)*
BC	Extrato Purificado Aquoso	0,00
	Extrato clivado analiticamente	62,98±2,23 a
	Extrato clivado em escala piloto	61,98±0,43 a
IE	Extrato Purificado Aquoso	0,00
	Extrato clivado analiticamente	79,50±1,61 a
	Extrato clivado em escala piloto	75,73±0,76 b
EO	Extrato Purificado Aquoso	0,00
	Extrato clivado analiticamente	65,99±5,41 b
	Extrato clivado em escala piloto	61,97±4,03 b

Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata±desvio padrão; Letras iguais na mesma coluna, em uma a mesma espécie, não diferem significativamente $p>0,05$;

*Adstringência apresentada como percentual de redução da adstringência (%RA) a partir do total correspondente aos extratos purificados aquosos.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ANTES E APÓS CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS QUANTO AOS FLAVONOIDES

Os valores apresentados na Tabela 5 demonstram que a clivagem ácida foi eficaz para a obtenção de antocianidinas totais, comprovando dessa forma a ocorrência da clivagem dos taninos condensados presentes nos extratos de BC e IE, dada a não detecção de antocianidinas nos extratos purificados aquosos, com posterior detecção pós clivagem. Nota-se ainda, que para esses dois extratos, o processo em escala piloto promoveu a obtenção de maior concentração de antocianidinas, diferindo significativamente da concentração obtida quando submetidos à clivagem ácida em menor escala.

Tabela 5 – Caracterização dos extratos vegetais submetidos à clivagem em escala analítica e em escala piloto quanto aos flavonoides.

Amostra	Antocianidinas		
	Antocianidinas totais* (mg ECI/g de MS)	Flavanóis totais (mg ECA/g de MS)	Flavonóis totais (mg EMR/g de MS)
Extrato Purificado Aquoso	0,00 c	207,75±3,14 a	62,60±4,93 b
BC Extrato clivado analiticamente	27,16±2,68 b	172,31±3,85 c	269,66±9,53 a
Extrato clivado em escala piloto	44,68±7,45 a	190,96±4,82 b	261,52±4,76 a
Extrato Purificado Aquoso	0,00 c	151,18±1,31 a	112,99±9,70 b
IE Extrato clivado analiticamente	43,44±0,98 b	82,91±2,79 b	350,52±2,60 a
Extrato clivado em escala piloto	92,39±3,46 a	89,14±4,40 b	335,22±8,03 a
Extrato Purificado Aquoso	296,63±2,73 a	122,24±1,27 a	118,55±7,42 c
EO Extrato clivado analiticamente	242,49±2,93 b	20,44±0,42 b	458,86±4,27 a
Extrato clivado em escala piloto	217,66±5,86 c	18,47±0,07 c	347,88±12,17 b

Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata±desvio padrão, exceto os valores para flavonóis totais dos extratos purificados aquosos, que foram realizadas em duplicata; Letras iguais na mesma coluna, em uma a mesma espécie, não diferem significativamente $p>0,05$;

*Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina (ECI), de catequina (ECA) e de miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo (EMR), por g de massa seca (/g MS).

Para o extrato de EO a reação de clivagem ácida promoveu redução nos valores de antocianidinas totais. Isso pode ter ocorrido em função da degradação de antocianinas presentes naturalmente no extrato durante o processo de aquecimento a 88 °C, pois estas moléculas são termolábeis e o tempo de submissão a essa temperatura foi relativamente prolongado (165 minutos).

O aumento significativo na concentração de antocianidinas totais para o extrato de BC e IE quando clivados em escala piloto pode ser justificado pelo menor tempo de exposição dos extratos à temperatura de 88 °C. Esse menor tempo de exposição à temperatura de 88 °C está relacionado aos fundamentos de transferência de calor. Sabe-se que para os líquidos, a transferência de calor ocorre por convecção, que caracteriza-se pelo movimento do fluido em função de uma diferença de densidade, causada por gradientes de temperatura (GEANKOPLIS, 1998). Dessa forma, é compreensível que o tempo para atingir a uma determinada temperatura em um fluido é maior à medida que se aumenta o volume a ser aquecido, devido ao aumento do deslocamento das partículas no movimento de convecção.

Portanto quando os extratos são submetidos à clivagem em escala piloto, a temperatura de 88 °C é atingida em um tempo maior, fazendo com que o tempo de exposição à temperatura de 88 °C seja menor que o tempo de exposição dos extratos clivados analiticamente, já que estes atingem a temperatura de análise mais rapidamente.

No estudo de Tolosa (2011) é demonstrado através dos ensaios experimentais realizados durante a otimização da clivagem em escala analítica, que para o extrato de IE, por exemplo, na mesma condição de concentração de HCl (3N) e temperatura (65 °C), quando há aumento do tempo (90 minutos para 240 minutos), há conseqüentemente diminuição da concentração de cianidina, demonstrando com isso que o tempo de exposição à temperatura de 65 °C, de fato teve alguma influência sobre a diminuição das cianidinas formadas durante o tratamento. Isso também pode ser relacionado ao efeito quadrático negativo do tempo obtido por Tolosa (2001) para o extrato de IE, que indica que aumentos sucessivos no nível dessa variável, promove a degradação da cianidina.

Ainda na Tabela 5, pode-se observar que com relação à concentração dos compostos da classe dos flavanóis, houve uma significativa redução em todos os extratos quando submetidos à clivagem em escala analítica e à clivagem em escala piloto, com exceção do extrato de IE onde o aumento de escala não resultou em diferença significativa em relação à clivagem analítica.

A concentração de flavonóis totais aumentou em todos os extratos submetidos à clivagem ácida, podendo este fato ter sido ocasionado pela degradação de polifenóis glicosilados durante o processo de clivagem ácida (CHIRINOS et al., 2008). Estatisticamente, não houve diferença entre os valores obtidos a partir do processo em menor e em maior escala, exceto para o extrato de EO, onde o processo em escala analítica foi mais eficaz. No entanto, observou-se que o aumento da escala do processo de clivagem ácida não interferiu significativamente para a obtenção desses compostos.

5.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE ANÁLISE

Para a obtenção do método analítico de trabalho, o processo de otimização partiu de um gradiente exploratório, ilustrado na Figura 24. O método consistiu em uma variação de 5 para 95% de solução B em 30 minutos, onde manteve o ângulo de inclinação do método gradiente constante (71,56°); em seguida de 95% para 5% de solução em um minuto, aumentando o ângulo para 89,36°; e ao final, manteve-se 5% de B por mais um minutos para

reestabelecimento das condições iniciais do método e preparação para a próxima corrida (0°). O fluxo foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C.

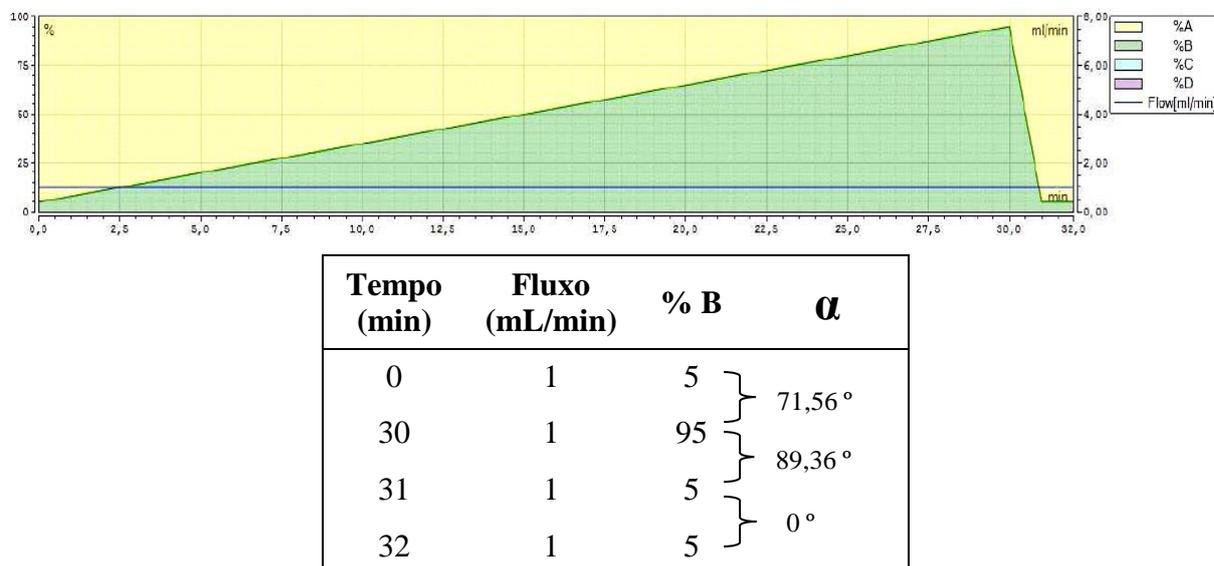


Figura 24 – Método cromatográfico gradiente exploratório.

Os extratos purificados aquosos das matrizes BC, IE e EO foram utilizados para esta etapa, e os resultados obtidos apresentados na Figura 25, onde disponibiliza os perfis cromatográficos de cada extrato nos comprimentos de onda específicos para a identificação dos compostos de interesse.

Os resultados preliminares fornecidos a partir da execução do método gradiente exploratório foram analisados de acordo com Dias et al. (2010). Dessa forma, pode-se verificar que muitos picos foram registrados no comprimento de onda de 280 nm para os três extratos, podendo ser um indicativo da presença de vários compostos fenólicos, já que essa classe de compostos absorve luz nesse comprimento de onda. Em 370 nm, onde são verificados a presença da subclasse dos flavonóis, os registros mais expressivos foram encontrados para os extratos de BC e IE; e em 515 nm, comprimento de onda de absorção das antocianinas, apenas o extrato de EO apresentou-se interessante.

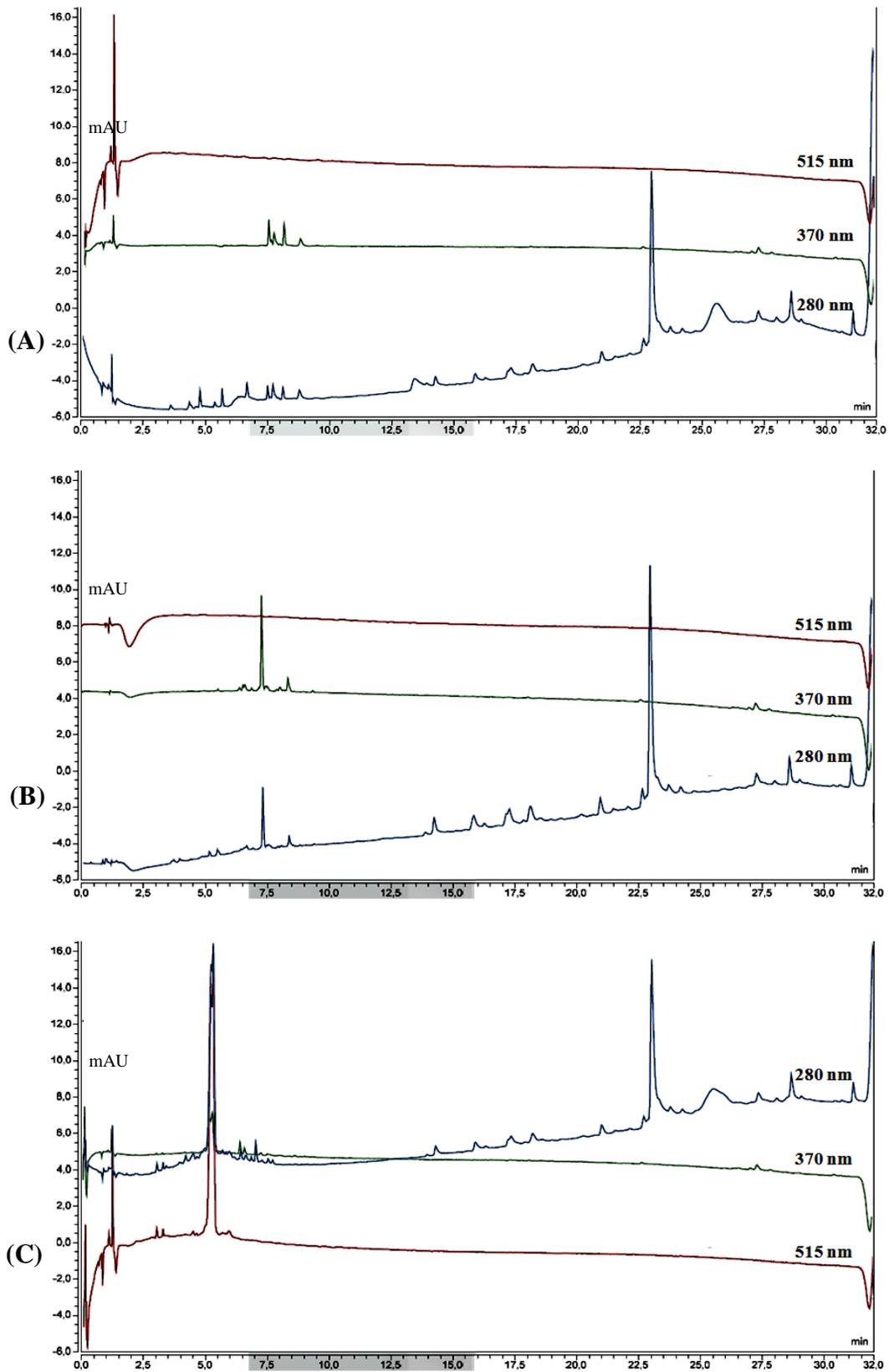
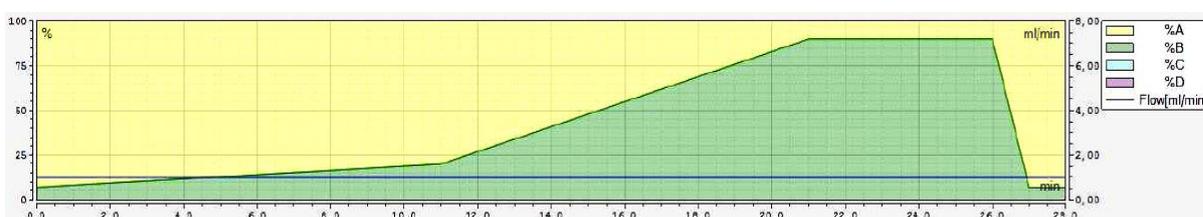


Figura 25 – Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos das folhas de *Byrsonima crassifolia* (A), *Inga edulis* (B) e frutos de *Euterpe oleracea* (C) eluídos através de método gradiente exploratório em diferentes comprimentos de onda.

Ainda na Figura 25, observou-se para todos os extratos, baseando-se na observação do perfil cromatográfico obtido em outros trabalhos já realizados (DIAS et al., 2010; SOUZA et al., 2007; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009), que os picos de maior interesse para este trabalho foram obtidos nos tempos iniciais da corrida do método aplicado, encontrando dessa forma, a oportunidade de diminuição do tempo de duração do método.

A Figura 26 apresenta o gradiente otimizado para uma melhor resolução dos picos no menor tempo possível a partir da modificação das concentrações das fases móveis segundo o tempo, ou do tempo segundo as concentrações das fases móveis.



Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	%B	α
0	1	7	49,72°
11	1	20	
21	1	90	83,13°
26	1	90	0°
27	1	7	89,30°
28	1	7	0°

Figura 26 – Método cromatográfico gradiente otimizado.

De forma geral, pôde-se verificar para os três extratos (BC, IE e EO) (Figura 27, 28 e 29, respectivamente), nas duas condições (purificado aquoso e os submetido à clivagem ácida), que o método otimizado promoveu uma melhor resolução para os cromatogramas, com boa separação dos picos, além do menor tempo de corrida, o que permitiu mais rapidez e diminuição dos custos de análise em consequência do menor uso de reagentes que compõem as fases móveis utilizadas durante as análises cromatográficas.

5.6 IDENTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS MATRIZES

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais purificados aquosos das três matrizes em estudo, padrões comerciais de cada composto de interesse foram eluídos utilizando o método otimizado. Os tempos de retenção (TR) de cada composto podem ser verificados através da Tabela 6.

Tabela 6 – Tempos de retenção de padrões de compostos fenólicos.

Comprimento de onda (nm)	Composto	TR (min)*
280	Ácido gálico	1,6
280	(+)-Catequina	4,8
280	(-)-Epicatequina	6,7
280	Procianidina B1	3,0
280	Procianidina B2	6,2
370	Miricetina	13,7
370	Miricetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo	10,7
370	Quercetina	15,1
370	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo	13,2
515	Delfinidina	5,1
515	Cianidina-3-glicosídeo	6,1
515	Cianidina-3-rutnosídeo	6,6
515	Cianidina	9,8

*Tempo de retenção dos compostos em minutos

A detecção foi monitorada de 200 a 600 nm, sendo apresentados os cromatogramas obtidos a 280 nm (todos os compostos fenólicos), 370 nm (flavonóis) e a 515 nm (antocianidinas). Os tempos de retenção variaram de 1,6 a 15,1 min. Dentre os compostos os flavonóis apresentaram os maiores tempos (TR > 10,7 min), sugerindo que são os compostos que apresentam menor polaridade.

A Figura 27 ilustra o perfil cromatográfico dos extratos purificados aquosos (A) e dos extratos submetidos à clivagem ácida (B) das folhas de BC eluídos através do método gradiente otimizado em diferentes comprimentos de onda. Na parte A da figura estão

apresentados os compostos detectados para o extrato purificado aquoso, onde se confirmou a presença do ácido gálico (ácido fenólico), da catequina e epicatequina (flavanóis) e da proantocianidina B2.

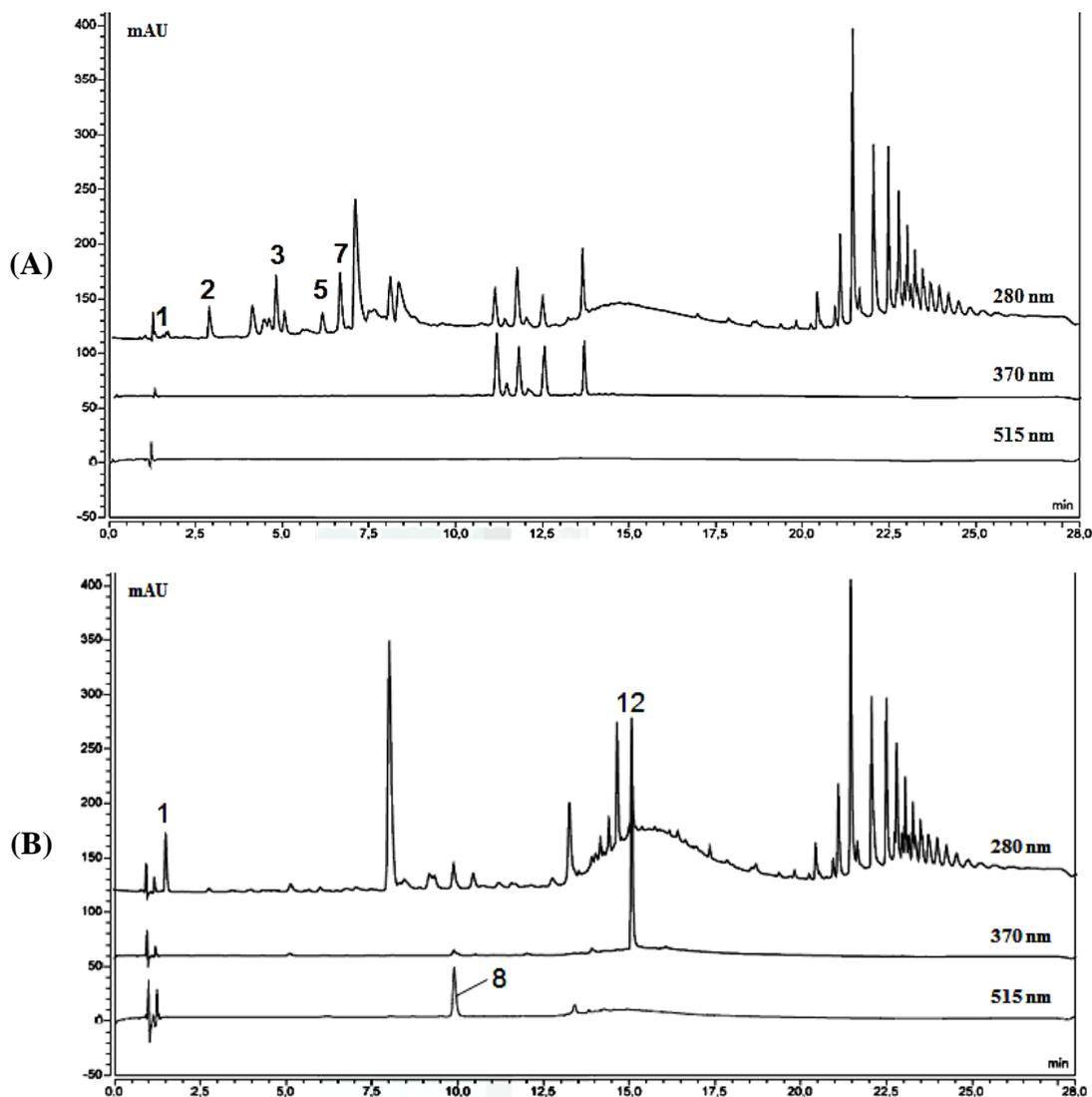


Figura 27 – Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos à clivagem ácida (B) de *Byrsonima crassifolia* eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 2, procianidina B1; 3, catequina; 5, procianidina B2; 7, epicatequina; 8, cianidina e 12, quercetina.

Pode-se verificar na parte B da Figura 27, que após a submissão dos extratos à clivagem ácida, além do aumento da concentração de ácido gálico, o que remete a uma

possível despolimerização de galotaninos que possam estar presentes no extrato dessa matriz, observa-se também o surgimento do pico correspondente a quercetina, que não são encontrados naturalmente nas formas agliconas (JUSTESEN; KNUTHSEN; LETH, 1998), o que pode ser um bom indicativo da presença de quercetinas glicosiladas, já que Chirinos et al. (2008) sugerem que a degradação desses compostos glicosilados podem contribuir para a produção da forma aglicona.

É importante notar também, ainda na parte B da Figura 27, a detecção de compostos formados de natureza antociânica, pela sua detecção no comprimento de onda de 515 nm. A presença de cianidina no extrato de BC após a clivagem ácida confirma a presença de proantocianidinas.

A Figura 28 ilustra o perfil cromatográfico dos extratos purificados aquosos (A) e dos extratos submetidos à clivagem ácida (B) de IE eluídos através do método gradiente otimizado.

Para o extrato purificado aquoso das folhas de IE (Figura 28 - A) observa-se também a presença de ácido gálico, catequina e procianidina B2, já identificado também em outro trabalho utilizando a mesma matriz (DIAS et al., 2010). Dentre a classe dos flavonóis, foram identificados os compostos miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo confirmando os encontrados por Souza et al. (2007) e Dias et al. (2010). Dessa forma, após clivagem ácida (Figura 28 - B), observa-se o surgimento dos picos referentes tanto de quercetinas, quanto de miricetinas agliconas, como possível resultado da degradação dos respectivos compostos glicosilados, bem como de outros dessa classe possivelmente existentes, de forma que contribuíram para a produção dos agliconas, como foi sugerido anteriormente. Para o extrato IE submetido à clivagem também foi identificada a presença de ácido gálico, no entanto chama atenção para a identificação de cianidinas, anteriormente não identificada, o que confirma a presença de proantocianidina, que após clivagem ácida promove a liberação de cianidinas.

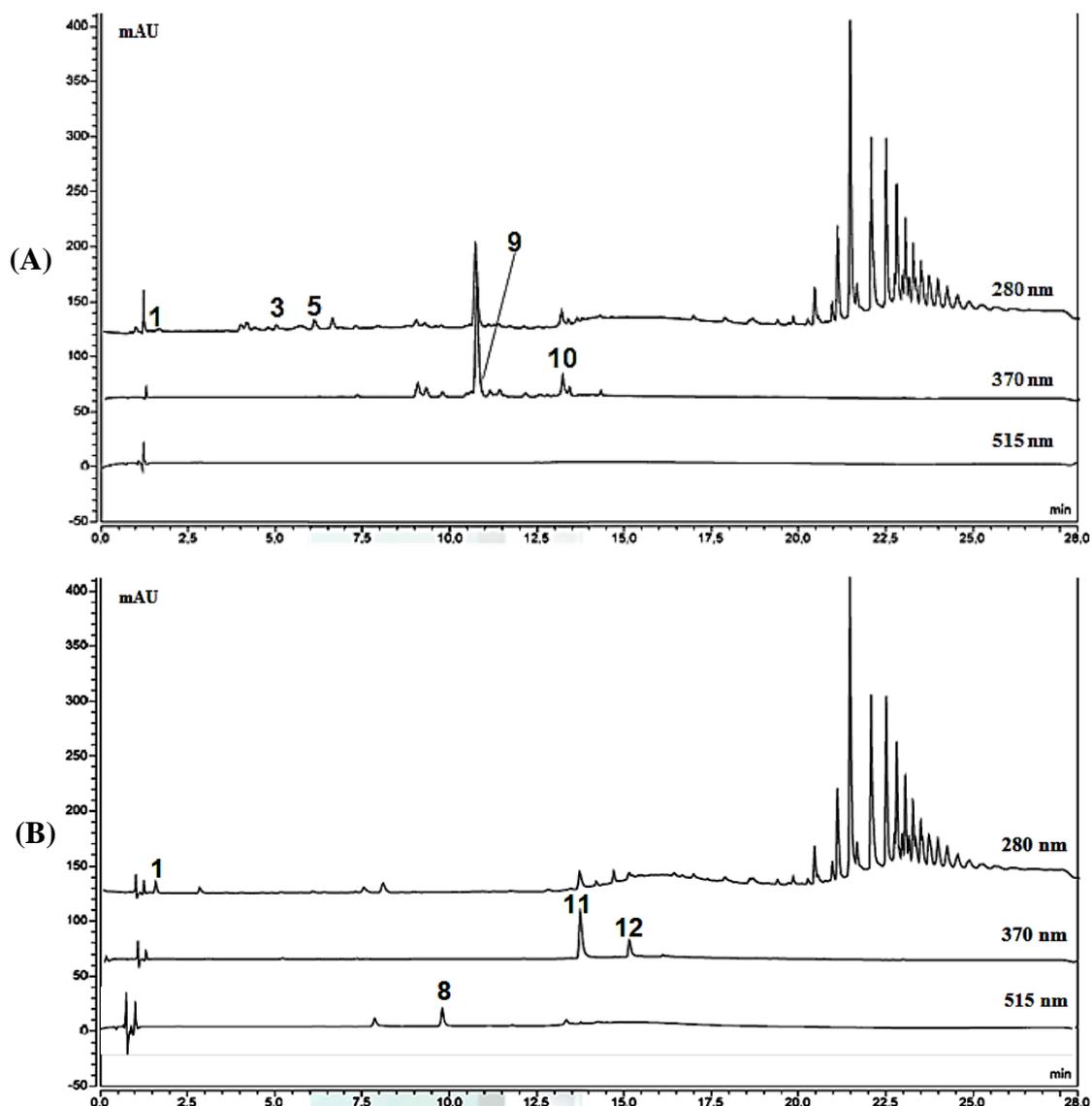


Figura 28 - Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos à clivagem ácida (B) de *Inga edulis* eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 3, catequina; 5, procianidina B2; 8, cianidina; 9, miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo; 10, quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo; 11, miricetina e 12, quercetina.

Os cromatogramas obtidos a partir da eluição dos extratos dos frutos de EO no método otimizado (Figura 29), permitiu a identificação dos principais compostos a serem investigados neste trabalho. Para os extratos purificados aquosos (Figura 29 - A) foram identificados o ácido gálico, procianidina B1, catequina e principalmente compostos da classe das antocianidinas, como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo já mencionados como compostos encontrados em concentrações elevadas no açaí (PACHECO-PALENCIA et al., 2010; ROGEZ et al., 2011). Assim observou-se que nesse extrato, encontram-se cianidinas

glicosiladas, que são naturalmente encontradas em vegetais. A forma aglicona das cianidinas são somente detectadas após a submissão do extrato à clivagem ácida (Figura 29 - B), a partir do qual observou-se também que as cianidinas glicosiladas (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo) não foram mais detectadas, sugerindo que as cianidinas agliconas resultantes foram produzidas tanto pela degradação de proantocianidinas quanto da deglicosilação das antocianinas.

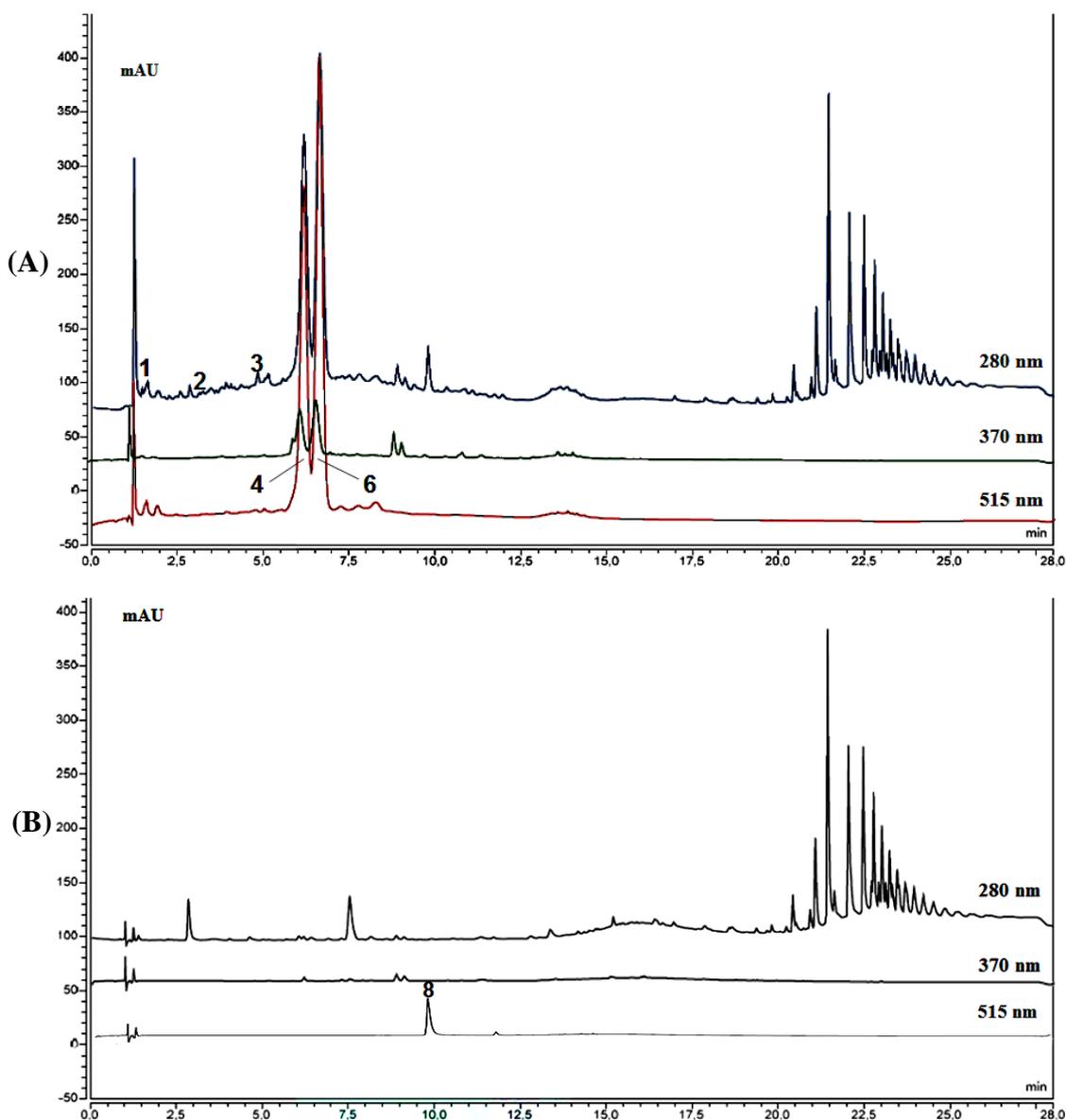


Figura 29 - Perfil cromatográfico de extratos purificados aquosos (A) e extratos submetidos a clivagem ácida (B) de *Euterpe oleracea* eluídos através do método gradiente otimizado. Os compostos identificados foram: 1, ácido gálico; 2, procianidina B1; 3, catequina; 4, cianidina-3-glicosídeo; 6, cianidina-3-rutinosídeo e 8, cianidina.

6 CONCLUSÕES

Os extratos purificados aquosos de BC, IE e EO apresentaram concentrações elevadas de polifenóis totais, flavanóis, flavonóis e proantocianidinas, enquanto que às antocianinas totais, apenas no extrato de EO foi detectado e quantificado.

O processo de clivagem ácida proporcionou aumentos do teor de polifenóis totais e foi eficaz para a redução das proantocianidinas, adstringência, obtenção de compostos da subclasse das antocianidinas e para o aumento da capacidade antioxidante para os três extratos. Com a ampliação da escala do processo de clivagem ácida, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à clivagem realizada em escala analítica, para todos os extratos. Somente quanto às concentrações das antocianidinas, mais especificamente para o extrato de IE, o processo em escala piloto promoveu maior concentração destes compostos.

O método cromatográfico otimizado foi único para todos os extratos (purificados aquosos e submetidos à clivagem ácida) e satisfatório para identificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos das matrizes em estudo, e poderá ser utilizado para quantificação desses compostos.

A partir dos perfis cromatográficos obtidos dos extratos vegetais estudados pode-se constatar a despolimerização de proantocianidinas, pela formação de cianidinas, principalmente nos extratos de BC e IE, que não apresentaram compostos da classe das antocianidinas antes de serem submetidos à clivagem ácida.

Contudo, além da despolimerização da proantocianidinas, o tratamento ácido proporciona a deglicosilação de flavonoides, como a quecetina (BC e IE) e miricetina (IE), além da cianidina no extrato de EO, que é proveniente da clivagem das proantocianidinas e das cianidinas glicosiladas presentes.

Assim, a ampliação de escala do processo possibilitou a obtenção de extratos com compostos com elevada capacidade antioxidante o que permite uma possível utilização destes extratos como agentes antioxidantes em produtos alimentícios e farmacêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. P. L., MARINHO, H.A., REBELO, Y.S., SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**; 10:755–8, 1980.

AMARQUAYE, A., CHE, C. T., BEJAR, E., MALONE, M. H., FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Med.* 60, 85–86, 1994.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press; p.471-553, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal Ethnopharmacol**, 99:325–348, 2005.

ARTS, I. C.; VAN DE PUTTE, B.; HOLLMAN, P. C. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. **Journal Agricultural Food Chemistry**,48:1746-51, 2000a

ARTS, I. C.; VAN DE PUTTE, B.; HOLLMAN, P. C. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 48:1752-7, 2000b

ASANO, K.; SHINAGAWA, K.; HASHIMOTO, N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Am. Soc. Brew. Chem.*, 40, 147-154, 1982.

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

BARROS, L., DUEÑAS, M., FERREIRA, I. C. F. R., CARVALHO, A. M.; SANTOS BUELGA, C. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry**, 127, 169–173, 2011.

BATE-SMITH, E. C. Astringency in foods. **Food** (23): 124, 1954.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, 12, 907-912, 1973.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BEART, J. E.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol Interactions. Part 2.' Covalent Binding of Procyanidins to Proteins during Acid-catalysed Decomposition; Observations on Some Polymeric Proanthocyanidins. **Journal of the chemical society**, Perkin Transactions 2, 1439-1443, 1985.

BEJAR, E.; MALONE, M. H. **Journal of Ethnopharmacology**. 39, 141,1993.

BÉJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C.T.; MALONE, M.H.; FONG, H.H.S. Constituents of *Byrsonima crassifolia*, and their spasmogenic activity. Int. **Journal Pharmacognosy**, 33, pp. 25–32, 1995.

BRANCO, L. S. C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenóides**. Dissertação (mestrado). UFCE, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, 56 (11): 317-33, 1998.

CACERES, A.; LOPEZ, B. R.; GIRON, M. A.; LOGEMANN, H. **Journal of Ethnopharmacology**. 31, 263, 1991.

CANNAS, A. **Tannins: fascinating but something dangerous molecules**. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>. Acesso em: 23 junho 2014.

CARVALHO, E.; MATEUS, N. et al. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. **Analytica Chimica Acta** 513(1): 97-101, 2004.

CASAS , A.; D EL CARMEN VAZQUEZ, M.; VIVEROS, J. L.; CABALLERO, J. Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas River basin, Mexico: **An ethnobotanical approach to the study of plant domestication**. **Human Ecology** 24 : 455 – 478, 1996 .

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 77p. (Série Apontamentos), 2001.

CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M.L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, 113: 859–871, 2009.

CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J. et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 50(6): 1593-601, 2002.

CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; COSTA, N.; ARBIZU, C.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic

extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. **Food Chemistry** 111, 98–105. 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas/SP, 2ªed, Editora Unicamp, 2006.

GEANKOPLIS, C. J. **Procesos de transporte y operaciones unitarias**. Compañía Editorial Continental, S.A. DE C.V. 3Ed. México, 1998.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annuary of New York Academy of Science**, v.854, 435, 1998.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, 26 (8): 965-1096, 2009.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, 43: 348–361, 2007.

DEPREZ, S.; MILA, I.; HUNEAU, J.F.; TOME, D.; SCALBERT, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Antioxidants Redox Signal**. 3, 957–967, 2001.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, Vol. 33, No. 1, 38-42, 2010.

DONOVAN, J. L.; MANACH, C. et al. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. **British Journal of Nutrition**, (87): 299–306, 2002.

FALCÃO, M. A.; CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do Inga-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônia**, 30 (2):173-180, 2000.

FAURE, A., YORK, P., ROWE, R.C. Process control and scale-up of pharmaceutical wet granulation processes: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2001.

FELDMANN, K. A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:162-7, 2001.

FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C.; NEUMANN, L. G.; KONZEN, P. H. A.; MORGANO, M. A.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. F. Técnica não destrutiva de análise de

taninos em café empregando espectroscopia no infravermelho e algoritmo genético. **Tecno-lóg.** v. 7, n. 1, p. 9-26, 2003.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, Chicago, v. 45, n. 5, p. 208-213, 2000.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 28, n. 4, p. 273-314. 1989.

FRAZIER, R. A.; DEAVILLE, E. R.; GREEN, R. J.; STRINGANO, E.; WILLOUGHBY, I.; PLANT, J. et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 51:490–495, 2010.

GALOTTA, A.; BOAVENTURA, M. Chemical constituents from roots and leaf stalks of açai (*Euterpe precatoria* Mart., *Arecaceae*). **Química Nova**, 28, 610–61, 2005.

GARCÍA-TIRADO, J.; RIEGER-REYES, C.; SAZ-PEIRÓ, P. Efecto de los flavonoides em la prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. **Medicina Clínica**. Barcelona;139(8):358–363, 2012.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GOLDSTEIN, J. L., SWAIN, T. Changes in tannins ripening fruits. **Phytochemistry**, 2, 371-383, 1963.

GONÇALVES, R. M. F. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais-efeito antinutricional de bebidas comuns**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

GONTHIER, M. P.; DONOVAN, J. L. et al. Metabolism of dietary procyanidins in rats. **Free Radical Biology & Medicine**, (35): 837–844, 2003.

GU, L.; KELM, M.A.; HAMMERSTONE, J.F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R.L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **Journal of Nutrition**. 134, 613–617, 2004.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (*Malpighiaceae*). **Química Nova**, Vol. 34, No. 6, 1032-1041, 2011.

GUPTA, M. P.; ARIAS, T. D.; CORREA, M. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**. 14, 115, 1979.

HAGERMAN, A. E. **The Tannin Handbook**. Internet. Disponível em: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>, 2011.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, 256(9): 4494-7, 1981.

HASLAM, E. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, 19, 2577-2582, 1980.

HEINRICH, M., RIMPLER, H.; BARRERA, N. **Journal of Ethnopharmacology**. 36, 63, 1992.

HÉRENT, M. F.; MAQUILLE, A.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y.; JIWAN, J. L. H. **Identification and quantification of phenolic compounds in leaves of *Byrsonima crassifolia* by HPLC-HRMS**. In: 58th ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY, Salt Lake City, 2010.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chemistry Toxicology**; 37 (9/10): 937-42, 1999.

HOLLMAN, P.C.; ARTS, I.C. Review: Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 1081-1093, 2000.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. **Free Radical Research**. London, v. 31, p. 75-80S, 1999.

HORNE, J.; HAYES, J.; LAWLESS, H. T. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substance. **Chemical Senses**, 27: 653-659, 2002.

JARDIM, I. C. S., COLLINS, C. H., GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: Collins, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas-SP: Ed. da Unicamp, 273-398, 2006.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 33: 213-217, 1985.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 799:101-110, 1998.

KHANBABAEE, K.; REE, T. V. Tannins: classification and definition. **The Royal Society of Chemistry**, 18, p. 641-649, 2001.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, 51, 467–473, 2013.

LANÇAS M. F. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas/SP, 1^oed, Editora Átomo, 2009.

LEINMÜLLER E., STEINGASS H., MENKE K.H. **Tannins in ruminant feedstuffs**. Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through Animal Research 33, 9-62, 1991.

LI FU; BO-TAO XU; XIANG-RONG XU; REN-YOU GAN; YUAN ZHANG; EM-QIN XIA; HUA-BIN LI. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, p. 345-350, 2011.

LIAO, X. P.; LU, Z. B.; SHI, B. Selective adsorption of vegetable tannins onto collagen fibers. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 3397-3402, 2003.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R. B.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) fruits. *Int. Food Science & Nutrition*, 56:53–64, 2005

LOPES, T. J. **Adsorção de Antocianinas do Repolho Roxo em Argilas**. 2002. 121f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

LUCK, G.; HUA, L.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIANSO, M. P.; LILLEY T. H.; HASLAM, E. Polyphenols, astringency and Proline-rich proteins. **Phytochemistry**, 37, 357-371, 1994.

LUO, C.; WANG, X.; GAO, G.; WANG, L.; LI, Y.; SUN, C. Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS. **Food Chemistry**, 141, 2697–2706, 2013.

MAKKAR, H. P.; BLUMMEL, M.; et al. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. **British Journal of Nutrition**, 73(6): 897-913, 1995.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Separation and quantification of flavonoids**. In: O. M. Andersen, & K. R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications* (p. 1-36). Boca Ration: CRC press, 2006.

MATEUS, N. A química dos sabores do vinho – os polifenóis. **Revista Real Academia Galega de Ciencias**. Vol. XXVIII. Págs. 5-22, 2009.

MENEZES, F. S.; FALCÃO, D.Q.; MENDONÇA FILHO, R. F. W.; SILVEIRA, C. S.; RENNÓ, M. N.; RODRIGUES, V. P. et al. Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacological information as a tool. **Acta Horticulturae**; 675:89–95, 2005.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal Agriculture Food Chemistry**; 48 (3): 577-99, 2000.

MERTENS-TALCOTT, S. U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A., MEIBOHM, B., TALCOTT, S. T. et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **Journal Agriculture Food Chemistry**; 56:7796–802, 2008.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quimica Nova**; 28 (5): 892-6, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography A**; 1054 (1/2): 95-111, 2004.

NASCIMENTO, A. P. R. **Quantificação dos taninos dos vinhos por transformada de fourier dos espectros no infravermelho médio (FTIR)**. Universidade do Porto. Faculdade de Ciências. Dissertação de mestrado. Lisboa, 2011.

NATSUME, M.; OSAKABE, N; YAMAGISHI, M; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; MIYATAKE, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Analyses of Polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64 (12), 2581-2587, 2000.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.

NOBLE, A. C. Bitterness and astringency in wine. Bitterness in foods and beverages edited by Rouseff R. **Elsevier**, Amsterdam, pp. 145-158, 1990.

NORDBERG, J., ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, 31, 1287–1312, 2001.

OH, H. I.; HOFF, J. E.; HAFF, L.A. Immobilized condensed tannins and their interactions with proteins. **Journal of Food Science**, 50, 1652-1654, 1985.

OOMAH, B. D.; SITTER, L. Characteristics of flaxseed hull oil. **Food Chemistry**, 114, 623–628, 2009.

ORWA C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. *Byrsonima crassifolia*. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0, 2009. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.

OSZMIANSKI, J., WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**. 100 (2): 579-83, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidants properties and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal Agricultural Food Chemistry**. 56: 4631-4636, 2008.

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

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal Science Food Agriculture**. 91:24–37, 2011.

PELEG, H.; BODINE, K.; NOBLE, A. The influence of acid on astringency of alum phenolic compounds. **Chemical Senses**, 23, 371-378, 1998.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MUÑIZ-RAMIREZ, A.; GOMEZ, Y. G.; RAMÍREZ, E. B. Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Plant Foods Human Nutrition**, 65:350–35, 2010.

PIZZI, A. **Wood adhesives: Chemistry and technology**. New York: Marcell Dekker, 364 p., 1983.

POMPEU, D. R.; BARATA, V. C.P.; ROGEZ, H. Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos do açaizeiro (*Euterpe oleracea*). **Revista Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p. 141-148, 2009.

POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazônica**, vol. 42(1), p. 165 – 172, 2012.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 312 p. 1975.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**., Arkansas, v. 78, n. 3, p. 570-578, 2003.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.-C.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F.; **Journal Ethnopharmacology**, 72, 35, 2000.

RANDHIR, R.; LIN Y.; SHETTY, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 39, 637–646, 2004.

RASMUSSEN, S.; FREDERIKSEN, H.; KROGHOLM, K. S.; POULSEN, L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Molecular Nutritional Food Research**, 49: 159 – 174, 2005.

REGO, M. M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; RAMOS, M. C.; CARREIRA, L. M. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris fl avifrons* (Fries) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do Murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth [sic], Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotropical Entomology**, 35 : 579 – 587, 2006 .

RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FLORES, A. V. Avaliação da Toxicidade da Antocianina de Uva, Através da Quantificação Espectrofotométrica de Constituintes do Sangue, e Medida de Massa Corporal de Coelhos Saudáveis. **Revista Analytica**. Nº12, 2004.

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

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2866-2887, 2003.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Belém: Edufpa, 2000.

ROGEZ, H.; POMPEU, D. R.; AKWIE, S. N. T.; LARONDELLE, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: a comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 796–800, 2011.

ROSS, J. A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Reviews Nutrition**, 22: 19-34, 2002.

SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(3), 571-581, 2003.

SALGUES, M.; RAZUNGLES, A. **Le collage des vins**. Vititechnique. 64, 32-35. 1983.

SALMINEN, J. P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, 25, 325–338, 2011.

SALMINEN, J.; KARONEN, M.; SINKKONEN, J. Chemical Ecology of Tannins: Recent Developments in Tannin Chemistry Reveal New Structures and Structure–Activity Patterns. **Chemistry a European Journal**. 17, 2806–2816, 2011.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F. V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima crassifolia* A. Juss. Leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 319-326, 2007.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W. PRADO, J. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos latinoamericanos de nutricion**. Vol. 58 N° 2, 2008.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8604–8610, 2006.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 91, p. 21-40, 2001.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMI, R.; DAUER, A.; AURA, A; SAURA-CALIXTO. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutritional Food Research**, 53: S310 –S329, 2009.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**; 32 (1): 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; MARIAN, N. Phenolics in food and nutraceuticals. In: RABAH, T. M.; KHALIL, I. E.; HOWARD, L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 53, n. 11, p. 4444-4447, 2003.

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

SHAHIDI, F; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

SIEBERT, K. J.; P. Y. LYNN. Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 56(1): 24-31, 1998.

SILVA, E.M. **Polyphenols from the Amazonia plant *Inga edulis*: process optimization for the production of purified extracts with high antioxidant capacity**. PhD Thesis, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, 2006.

SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., REES, J.F. AND LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101: 1012–1018, 2007a.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007b.

SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA – RAVENTOS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteau Reagent. **Methods in Enzimology**, 299: 152-178, 1999.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: Gilberto Barbante Kerbauy. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Kooga S.A., 94-113, 2004.

SOUZA, J.N.S., SILVA, E.M., SILVA, M.N., ARRUDA, M.S.P., LARONDELLE, Y. AND ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18: 1276–1280, 2007.

SOUZA, J.N.S., SILVA, E.M., LOIR, A., REES, J.-F., ROGEZ, H. AND LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, 106: 331–339, 2008.

SOWUNMI, S.; EBWELE, R. O.; CONER, A. H.; RIVER, B. H. Fortifield mangrove tannin-based adhesive. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 62, p. 577-584, 1996.

SPENCER, J. P. E., F. CHAUDRY, et al. Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.(272): 236–241, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4º ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2004.

TOLOSA, T. C. **Otimização da clivagem ácida de proantocianidinas presentes em matrizes vegetais amazônicas (*Byrsonima crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*)**. Dissertação (mestrado), UFPA, 2011.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, 2, 1231-1246, 2010.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Vol.1018(1), pp.29-40, 2003.

VAN RUTH, S. M.; SHAKER, E. S.; MORRISSEY, P. A. Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil. **Food Chemistry**, 75, 177-184, 2001.

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

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. **Dordrecht: Springer**, 2006.

VICHAPONG, J.; SOOKSERM, M.; SRIJESDARUK, V.; SWATSITANG, P. SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. **Food Science and Technology** 43, 1325-1330, 2010.

WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, 21:539–73, 2004.

XAVIER, M. F. **Estudo da Extração de Antocianinas em Colunas Recheadas**. 120f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, 54, 176–186, 2001.

ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre – RS: Editora da UFSC, pág. 577-604, 2004.