

Ana Cristina Pinheiro do Prado

**Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã
[*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch]**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Jane Mara Block

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Prado, Ana Cristina Pinheiro do
Identificação e avaliação da atividade antioxidante e
antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã
[*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch] / Ana Cristina
Pinheiro do Prado ; orientadora, Jane Mara Block ; co-
orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. -
Florianópolis, SC, 2013.
243 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. noz-pecã. 3. Atividade
antioxidante. 4. atividade antimicrobiana. 5.
micropartículas. I. Block, Jane Mara. II. Ferreira, Sandra
Regina Salvador. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. IV. Título.

IMPORTANTE: Esta obra contém informações que foram depositadas no Departamento de Proteção Intelectual (DPI) da Universidade Federal de Santa Catarina; para qualquer reprodução das técnicas para obtenção e uso, para fins comerciais ou não, de extratos estudados nesta obra deverá ser consultada a autorização do autor.

Ana Cristina Pinheiro do Prado

Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch]

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2013.

Prof. Roseane Fett, Dra.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Jane Mara Block, Dr.^a Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.^a Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jorge Mancini Filho, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl, Dr.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cleide Rosana Werneck Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, Carlos e Ilone, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sonhado e realizado este projeto em minha vida, por ser o meu “Tudo” em “todos” os momentos, pela capacitação e por estar sempre presente em minha vida.

À minha família, pela confiança, apoio, investimento, ombro amigo nas horas difíceis e, de forma especial, pela companhia maravilhosa que me impediu de desistir quando tudo parecia estar muito difícil.

A minha igreja Assembléia de Deus, onde tive a honra de participar do Coral Jovem Esperança, Grupo de Jovens Tribo da Ilha, Banda de Música Clarins de São, Grupo do Círculo de Oração da Família, todos bençãos de Deus em minha vida, vocês estiveram sempre perto com suas orações me fortalecendo em todo instante.

À minha orientadora, pela confiança, respeito, oportunidade concedida, por acreditar que eu seria capaz de concluir mais este projeto, obrigada Professora Jane Mara Block pela sua compreensão preciosa em todos os momentos.

À minha coorientadora, Professora Sandra Regina Salvador Ferreira por aceitar trabalhar no nosso projeto, pela colaboração, apoio e compreensão.

Às equipes dos laboratórios de Microbiologia, Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Reologia, Frutas e Hortaliças, Micotoxinas, Termodinâmica e Extração Supercrítica, Central de Microscopia Eletrônica e Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, pelo acolhimento, colaboração na realização das análises e especialmente pela amizade de todos, vocês fazem parte dessa conquista.

À Gisele, secretária da Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, pela grande amizade.

Às estagiárias, Marisa, Priscila Policarpi e Priscila Santos, pela dedicação, compromisso, carinho e amizade, desejo muito sucesso na vida acadêmica de vocês.

Aos colegas, em especial a Helen Silvestre da Silva, Sheila Melo Silveira, Aureana Negrão, Sabrina Carvalho, Karina Koerich e Rafael Luchtenberg, além de amigos vocês foram imprescindíveis na parte experimental da minha pesquisa.

À minha grande amiga e colega Bianca Beal, palavras são incapazes de agradecer todo conhecimento que me passaste e descrever as saudades que senti quando saíste do PGCAL.

A todos os demais colegas, em especial a equipe do Laboratório de Óleos e Gorduras, obrigada pela amizade e carinho indispensáveis nessa trajetória, faltaria espaço para descrever o quanto todos vocês são especiais.

Ao Professor Pedro Manique Barreto, pela amizade acolhedora em seu laboratório onde sempre fui recebida com muito carinho, o laboratório de Reologia foi minha segunda “casa”; obrigada pelo aprendizado, confiança e em especial pela oportunidade em meu estágio de docência, aprendi muito contigo.

Ao Professor Marcelo Maraschin, pelo auxílio nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, pela amizade e por ceder gentilmente a estrutura de seu laboratório (LMBV), que Deus continue o abençoando cada dia mais.

Às Professoras Cleide Rosana Werneck Vieira e Edna Amante pelos conhecimentos compartilhados no decorrer da realização da minha pesquisa e pela infraestrutura cedida em seus laboratórios; jamais esquecerei a forma maravilhosa como fui recebida.

Aos Professores Daniel Barrera Arellano e Francisco Carlos Deschamps pela realização de algumas análises nos laboratórios da Unicamp e Epagri; esse trabalho não seria possível sem a vossa ajuda.

A Bruce Manion da Universidade de Guelph (Canadá) pela colaboração valiosa para a produção e finalização do primeiro artigo desta tese, obrigada por acreditar nesse projeto.

A Fábio Murakami da Universidade Federal do Paraná pela colaboração da realização das análises no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia e auxílio na interpretação dos resultados.

A todos os demais professores do programa de Pós-Graduação, à coordenação e secretaria do PGCAL-UFSC, sou grata pelo ensino e colaboração na realização e conclusão deste trabalho, minha formação com certeza é fruto do vosso trabalho.

Às Indústrias de Nozes Divinut Ltda da cidade de Cachoeira do Sul (RS) e Siol Alimentos Ltda de Barueri (SP), pelo fornecimento das amostras de noz-pecã e óleo de soja, respectivamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela aprovação e financiamento do presente projeto.

E a todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para que este sonho fosse concretizado, os meus sinceros agradecimentos.

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o SENHOR. Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos."

(Isaías 55:8-9 - Bíblia Sagrada).

RESUMO

No presente trabalho foram determinadas a composição química e a estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã; a composição centesimal, parâmetros de cor, espectrofotometria no infravermelho (FTIR) do pó da casca e, o teor de compostos bioativos no óleo (fitosteróis totais e tocoferóis) e nos extratos obtidos através de infusão do pó das cascas das nozes (FT - fenólicos totais e TC - taninos condensados) e, a atividade antioxidante [métodos ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico e DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil] desses extratos de amostras de duas safras consecutivas (2009 e 2010) e diferentes variedades (MV: mistura de variedades e B: variedade Barton). Os efeitos do processo de extração (infusão, infusão seguida de atomização em Spray Dryer, extração etanólica e extração com fluido supercrítico) no conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos também foram avaliados. O perfil fenólico foi determinado através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) avaliando diferentes metodologias de preparo de amostra (básico / ácida, hidrólise enzimática e separação através de resina Sephadex® LH-20). Finalmente, micropartículas contendo extrato da casca de noz-pecã, maltodextrina, goma arábica e L- α -fosfatidilcolina foram obtidas através de atomização em Spray Dryer. Estas micropartículas, o extrato alcoólico da casca da noz e o TBHQ (terc-butilidroquinona) foram adicionados em óleo de soja e sua atividade antioxidante comparada. De acordo com os resultados observou-se um efeito significativo do ano de colheita e variedade da amostra estudada na qualidade nutricional e no teor de fitoquímicos no óleo e na casca das nozes. Nas amêndoas de noz-pecã, colhidas na safra 2010, foram detectados teores superiores para ácidos graxos insaturados (22,6 e 23,1 % de ácido linoleico comparados a 17,8% e 16,7% na colheita de 2009 para a mistura de variedades e variedade Barton, respectivamente), assim como níveis mais elevados na casca de fenólicos totais (145,41 e 181,49 mg GAE.g⁻¹ comparados a 130,30 and 94,04 mg GAE.g⁻¹ na colheita de 2009 para a mistura de variedades e variedade Barton, respectivamente) e atividade antioxidante através dos métodos ABTS (1723,60 e 1809,01 μ mol TEAC.g⁻¹ comparados a 1467,90 and 1333,10 μ mol TEAC.g⁻¹ na

colheita de 2009 para a mistura de variedades e variedade Barton, respectivamente) e DPPH (561,67 e 612,24 mg TEAC.g⁻¹ comparados a 590,86 and 346,57 mg TEAC.g⁻¹ na colheita de 2009 para a mistura de variedades e variedade Barton, respectivamente). Os resultados obtidos indicaram uma relação entre o teor de ácidos graxos insaturados presentes no óleo e na concentração de compostos antioxidantes na casca e, embora os compostos fenólicos sejam considerados termicamente instáveis, não foram observadas perdas significativas na análise espectrofotométrica no infravermelho (FTIR), nos teores totais (FT e TC), e na atividade antioxidante, após o processamento por atomização com Spray Dryer. O conteúdo de compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante da infusão e extrato etanólico foram significativamente superiores aos extratos obtidos através de extração com fluido supercrítico. O processo de atomização em Spray Dryer do extrato obtido através de infusão concentrou significativamente os compostos fenólicos nas amostras, acentuando a atividade antioxidante avaliada *in vitro*. A amostra preparada com uso de resina Sephadex® LH-20 possibilitou a identificação de cinco compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzoico, epigalotequina e epicatequina galato. Todos os extratos obtidos através de extração convencional inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicando que a casca apresenta atividade antimicrobiana e bactericida para estes micro-organismos de interesse em alimentos. As micropartículas obtidas em Spray Dryer que apresentaram resultados superiores para fenólicos totais e atividade antioxidante (Extrato A > F4 > F2 > F1 > F3), também demonstraram através da análise dos parâmetros de cor b* e a* uma maior tendência ao amarelo e ao vermelho, exceto para a formulação F4 que apresentou valores com tendência para o verde, provavelmente relacionado à adição de L- α -fosfatidilcolina, que também influenciou na análise dos espectros de FTIR das amostras. A presença do agente emulsificante favoreceu a formação de uma emulsão mais estável, melhorando a solubilização de todos os componentes da fórmula, refletindo também um procedimento de secagem mais homogêneo. Na análise microscópica de fluorescência observou-se emissão de fluorescência

natural amarela em todas as amostras, caracterizando a presença de compostos fenólicos no interior e exterior da partícula. A microscopia eletrônica de varredura de todas as formulações testadas revelou uma forte tendência à aglomeração. Considerando os dados obtidos nas análises de DSC (Calorimetria Diferencial Exploratória), TGA (Análise Termogravimétrica) e a perda de água por dessecação, a formulação F4 apresentou as melhores características. Na avaliação da liberação do antioxidante da micropartícula para o óleo de soja, o *Schaal Oven Test* (Teste de Estufa) representou a metodologia de escolha quando comparado ao OSI (Índice de Estabilidade Oxidativa), através da qual foi possível observar que os polímeros (maltodextrina e goma arábica) proporcionaram uma melhor estabilidade para os antioxidantes contidos na micropartícula.

Palavras-chave: noz-pecã, óleo, casca, fenólicos totais, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, micropartículas.

ABSTRACT

In this study were determined the chemical composition and oxidative stability of pecan nut oil; the composition, color parameters, infrared spectroscopy (FTIR) of the pecan nut shell powder and, the content of bioactive compounds in oil (total phytosterols and tocopherols) and in extracts obtained by infusion of the pecan nut shell powder (TP: total phenolic and CT: condensed tannins) and antioxidant activity [ABTS - 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid and DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl methods] of these extracts for samples of two consecutive years (2009 and 2010) and different varieties (MV: mixture of varieties and B: Barton variety). The effects of the extraction processes (infusion, infusion followed by atomization in Spray Dryer, ethanol extraction and supercritical extraction) on the total phenolic content, antioxidant activity and antimicrobial activity of the extracts also were evaluated. The phenolic profile was determined by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) evaluating different methodologies for sample preparation (basic / acidic and enzymatic hydrolysis; separation by resin Sephadex® LH-20). Finally microparticles containing extract of pecan nut shell, maltodextrin, gum arabic and L- α -phosphatidylcholine were obtained through atomization by Spray Dryer. These microparticles, alcoholic extract of pecan nut shell and TBHQ (tert-butylhydroquinone) were added in soybean oil and its antioxidant activity was compared. According to the results there was a significant effect for different harvest year and variety for sample quality and nutritional content of phytochemicals in the oil and in pecan nut shell. In pecan nuts harvested in 2010, higher levels were detected for polyunsaturated fatty acids (22.6% and 23.1% linoleic acid compared to 17.8% and 16.7% for 2009 harvest for the mixture of varieties and Barton variety respectively), as well as higher levels in the pecan nut shell phenolic content (145.41 and 181.49 mg GAE.g⁻¹ compared to 130.30 and 94.04 mg GAE.g⁻¹ for 2009 harvest for the mixture of varieties and Barton variety respectively) and antioxidant activity measured by ABTS (1723.60 and 1809.01 μ mol TEAC.g⁻¹ compared to 1467.90 and 1333.10 μ mol TEAC.g⁻¹ for 2009 harvest for the mixture of varieties and Barton varieties), DPPH (561.67 and 612.24 mg TEAC.g⁻¹ compared to 590.86 and 346.57 mg TEAC.g⁻¹

for 2009 harvest for the mixture of varieties and Barton variety respectively). These results indicated a relationship between the content of unsaturated fatty acids present in the oil and the concentration of antioxidant compounds in the shell. Although phenolic compounds are considered to be thermally unstable, no significant losses were observed in the spectrophotometric analysis in infrared (FTIR), for the total phenolic compounds and for the antioxidant activity (ABTS and DPPH) after the spray drying process. The content of total phenolic compounds, condensed tannins and the antioxidant activity in the infusion and alcoholic extracts were significantly higher than in extracts obtained through supercritical extraction. The Spray Dryer atomization process of the extract obtained by infusion concentrated the phenolic compounds in the samples significantly, accentuating the antioxidant activity evaluated *in vitro*. The sample prepared with Sephadex® LH-20 allowed the identification of five phenolic compounds: gallic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic, epigallocatechin and epicatechin gallate. The extracts obtained through infusion and alcoholic extraction were effective in inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicating that these extracts may exhibit antimicrobial and bactericidal activity for these microorganisms of interest in food. The microparticles obtained by Spray Dryer that showed higher total phenolics content and antioxidant activity (Extract A> F4> F2> F1> F3) also demonstrated through the analysis of b* and a* color parameters greater tendency to yellow and red, except for F4 formulation which showed tendency to green, probably related to the addition of L- α -phosphatidylcholine, which also affected the analysis of the FTIR spectra of samples. The presence of an emulsifying agent favored the formation of an emulsion more stable, improving the solubilization of all components of the formula, reflecting also a more homogeneous drying procedure. Through the fluorescence microscopic analysis a yellow fluorescence emission was observed in all samples, indicating the presence of phenolic compounds inside and outside of the particles. Scanning electron microscopy showed that all formulations tested exhibited a significant tendency for agglomeration. According to the results obtained for DSC (Differential Scanning

Calorimetry), TGA (Thermogravimetric Analysis) and water loss on drying, formulation F4 showed the best characteristics. In assessing the release of antioxidant in the microparticle to soybean oil, the Schaal Oven Test was the methodology of choice when compared to OSI (Index Oxidative Stability), whereby it was observed that the polymers (maltodextrin and gum arabic) provided better stability to the antioxidant contained in the microparticle.

Keywords: pecan oil, shell, total phenolics, antioxidant activity, antimicrobial activity, microparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – NOGUEIRA-PECÃ.	43
FIGURA 02 – NOZ-PECÃ: A) CACHO; B) NOZES COLHIDAS SENDO DESCASCADAS; C) CASCA DE NOZES MOÍDAS PARA CHÁ.	47
FIGURA 03 - ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS: BHA, BHT, TBHQ E GALATOS.	57
FIGURA 04 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS.	59
FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTABILIZAÇÃO DE UM RADICAL LIVRE POR UM ANTIOXIDANTE.	60
FIGURA 06 – A: ÁCIDO ASCÓRBICO; B: ÁCIDO ERITÓRBICO.	62
FIGURA 07 – CICLO BIOSINTÉTICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.	68
FIGURA 08 - EXEMPLOS DE ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS (A) E HIDROXICINÂMICOS (B).	70
FIGURA 09 - ESTRUTURA GENÉRICA DE UMA MOLÉCULA FLAVONÓIDE.	73
FIGURA 10 - EXEMPLO DE ESTRUTURA QUÍMICA DE UM TANINO HIDROLISÁVEL - B 1,2,3,4,6-PENTAGALOIL-D-GLUCOSE.	75
FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DE UM TANINO CONDENSADO (PROANTOCIANIDINA) SOFRENDO CATÁLISE ÁCIDA ORIGINANDO SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO... 76	
FIGURA 12 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE MATRIZES SÓLIDAS, ONDE R1 CORRESPONDE AO REGULADOR DE PRESSÃO DO CILINDRO, S1 AO PISTÃO DE COMPRESSÃO, R2 AO REGULADOR DE PRESSÃO, C1 À SERPENTINA, E1À COLUNA	

DE EXTRAÇÃO, V À VÁLVULA ABRE-FECHA E VM À VÁLVULA MICROMÉTRICA.....	84
FIGURA 13 - MORFOLOGIA DOS DIFERENTES TIPOS DE MICROPARTÍCULAS.....	85
FIGURA 14 – ESQUEMA DO SPRAY DRYER E DO FLUXO DE AR DE SECAGEM.	87
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO DA VANILINA COM LEUCOANTOCIANIDINA.	89
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.	92
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RADICAL ABTS E RADICAL CÁTION ABTS.	94
FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EQUIPAMENTO OSI.	98
FIGURA 19. ESPECTRO FTIR DAS AMOSTRAS DA SAFRA DE 2010. A: PÓ DAS CASCAS DE NOZ-PECÃ DAS VARIEDADES BARTON (B), MISTURA DE VARIEDADES (MV) E VARIEDADE BARTON ATOMIZADA POR SPRAY DRYER (B – SD); B: PÓ DAS CASCAS DE NOZ-PECÃ DA VARIEDADE BARTON (B) E SUAS FRAÇÕES SOLÚVEL E INSOLÚVEL; C: PÓ DAS CASCAS DA MISTURA DE VARIEDADES DE NOZ-PECÃ (MV) E SUAS FRAÇÕES SOLÚVEL E INSOLÚVEL; D: FRAÇÕES SOLÚVEIS DO PÓ DAS CASCAS DE NOZ-PECÃ DAS VARIEDADES BARTON (B), MISTURA DE VARIEDADES (MV) E BARTON SUBMETIDA AO PROCESSO DE SPRAY DRYER (B – SD).	146
FIGURA 20 – A: ESPECTRO VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DO PÓ DAS CASCAS DE NOZ-PECÃ DA MISTURA DE VARIEDADES (MV); B: CURVAS PADRÃO GERADAS A PARTIR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DO PÓ DAS CASCAS DE NOZ-PECÃ B, MV E B – SD, EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES A 420 NM. *TODAS AS AMOSTRAS DA SAFRA 2010.	149
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ACP REALIZADA PARA AS AMOSTRAS ESTUDADAS DAS SAFRAS	

DE 2009 E 2010. A: ÓLEO DE NOZ-PECÃ PARA A MISTURA DE VARIEDADES (MV) E VARIEDADE BARTON (B). B: PÓ DA CASCA DE NOZ-PECÃ DAS AMOSTRAS MV (MISTURA DE VARIEDADE) AND BARTON (B)..... 153

FIGURA 22 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) E FT (COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS) E DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (A: ÁCIDO GÁLICO, B: ÁCIDO CLOROGÊNICO, C: ÁCIDO P-HIDROXIBENZÓICO, D: EPIGALOCATEQUINA, E: EPICATEQUINA GALATO) DAS 5 FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DE RESINA SEPHADEX® LH-20 E IDENTIFICADOS ATRAVÉS DE CLAE..... 183

FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ACP REALIZADA PARA AS AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES (COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DOS DIFERENTES EXTRATOS (INFUSÃO, INFUSÃO SEGUIDA DE SPRAY DRYER E EXTRATO ETANÓLICO), E OS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NAS CINCO FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DA RESINA SEPHADEX® LH-20. 186

FIGURA 24 – ANTIBIOGRAMAS PARA *LISTERIA MONOCYTOGENES* (A), *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (B), *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* (C) E *BACILLUS CEREUS* (D), AVALIADOS NOS EXTRATOS DE INFUSÃO (I), INFUSÃO SEGUIDA DE SPRAY DRYER (SD) E EXTRATO ETANÓLICO (ET)..... 190

FIGURA 25 - ESPECTRO FTIR. A: EXTRATO A (INFUSÃO ATOMIZADA EM SPRAY DRYER); B: F2 (42,5% DE MALTODEXTRINA + 7,5% DE GOMA ARÁBICA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO); C: F4 (42,5% DE MALTODEXTRINA + 7,5% DE GOMA ARÁBICA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO + 0,35% DE L-A-FOSFATIDILCOLINA); D: GOMA ARÁBICA; E: L-A-FOSFATIDILCOLINA; F: MALTODEXTRINA. 219

FIGURA 26 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A: PÓ DA CASCA DE NOZ-PECÃ MOÍDO E PENEIRADO A 60 MESH.; B: EXTRATO A (INFUSÃO ATOMIZADA EM SPRAY DRYER); C: F1(35% DE MALTODEXTRINA + 15% DE

GOMA ARÁBICA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO) ; D: F2 (42,5% DE MALTODEXTRINA + 7,5% DE GOMA ARÁBICA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO); E: F3 (50% DE MALTODEXTRINA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO); F: F4 (42,5% DE MALTODEXTRINA + 7,5% DE GOMA ARÁBICA + 47% ÁGUA + 2% DE EXTRATO + 0,35% DE L-A-FOSFATIDILCOLINA). 223

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS, TEOR DE FITOQUÍMICOS E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE NOZ-PECÃ DE DIFERENTES SAFRAS E VARIEDADES.....	140
TABELA 02- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E COR DO PÓ DA CASCA DE NOZ-PECÃ OBTIDO POR MOAGEM E ATRAVÉS DA ATOMIZAÇÃO DA INFUSÃO DO PÓ MOÍDO ATOMIZADO POR SPRAY DRYER, DE DIFERENTES SAFRAS E VARIEDADES.....	143
TABELA 03 - TEOR DE EXTRATO SECO, FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS (INFUSÃO E INFUSÃO ATOMIZADA POR SPRAY DRYER E RESSUSPENSÃO EM ÁGUA), DA CASCA DE NOZ-PECÃ PARA AS DIFERENTES SAFRAS E VARIEDADES ESTUDADAS.....	150
TABELA 04 - TEOR DE EXTRATO SECO, FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE DIFERENTES EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ.....	179
TABELA 05 – PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ DETERMINADOS ATRAVÉS DE CLAE A PARTIR DAS FRAÇÕES OBTIDAS COM USO DE COLUNA DE SEPARAÇÃO SEPHADEX® LH-20.....	188
TABELA 06 – HALOS DE INIBIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA PARA OS DIFERENTES EXTRATOS E PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	192
TABELA 07 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DOS EXTRATOS (MG/ML) DA CASCA DE NOZ-PECÃ PARA <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> E <i>Bacillus cereus</i>	193
TABELA 08 – FORMULAÇÕES TESTES PARA OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO EXTRATOS AQUOSOS DA	

CASCA DE NOZ-PECÃ ATRAVÉS DE ATOMIZAÇÃO EM SPRAY DRYER.....	210
TABELA 09 – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) E ANÁLISE INSTRUMENTAL DA COR DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS EM SPRAY DRYER.....	216
TABELA 10 - TEOR DE UMIDADE, ATIVIDADE DE ÁGUA E DENSIDADE PARA AS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS EM SPRAY DRYER.....	221
TABELA 11 - ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA A INFUSÃO ATOMIZADA EM SPRAY DRYER (EXTRATO A), FORMULAÇÕES F2 E F4 E OS DIFERENTES MATERIAIS DE PAREDE UTILIZADOS (GOMA ARÁBICA E MALTODEXTRINA).....	225
TABELA 12 - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E PERCENTUAL DE PERDA DE MASSA POR DESSECAÇÃO (35 A 105°C) PARA A INFUSÃO ATOMIZADA EM SPRAY DRYER (EXTRATO A) E FORMULAÇÕES F2 E F4, ATRAVÉS DO USO DE DIFERENTES CURVAS DE AQUECIMENTO.....	226
TABELA 13 – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA UTILIZADO PARA LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS EM SPRAY DRYER.....	229
TABELA 14 - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS TESTADOS, AO LONGO DE 14 DIAS, NA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NAS MICROPARTÍCULAS COM EXTRATO DA CASCA DE NOZ-PECÃ.....	231
TABELA 15 – AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE ESTABILIDADE OXIDATIVA (OSI) DO ÓLEO DE SOJA ADICIONADO DO ANTIOXIDANTE COMERCIAL (TBHQ), EXTRATO ALCOÓLICO DA CASCA DE NOZ-PECÃ E DAS MICROPARTÍCULAS (F4) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	233

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA** Atividade de Água
- AAPH** 2,2'-azobi (2-aminodinopropano) dihidroclorido
- ABTS** 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotizolina-6-ácido sulfônico
- ACP** Análise de Componentes Principais
- B – SD** Barton atomizada em Spray Dryer
- B** Barton
- BHA** Butilidroxianisol
- BHT** Butilidroxitolueno
- CE** Equivalentes em Catequina
- CLAE** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CMB** Concentração Mínima Inibitória
- CMi** Concentração Mínima Bactericida
- CP¹** Componente Principal 1
- CP²** Componente Principal 2
- CUPRAC** Capacidade antioxidante / redutora cúprica (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*)
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** Ácido Desóxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- DPPH** 2,2-difenil-1-picrilidrazil
- DSC** Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimeter*)
- ES** Extrato Seco
- ET** Extrato Etanólico
- F1** Formulação 1
- F2** Formulação 2
- F3** Formulação 3
- F4** Formulação 4
- FDA** (*Food and Drug Administration*)
- FID** Detector de Ionização de Chama (*Flame Ionization Detector*)
- FRAP** Poder antioxidante / redutor férrico
- FT** Fenólicos Totais
- FTIR** Análise Espectrofotométrica no Infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- GAE** Equivalentes em Ácido Gálico

GRAS Geralmente Reconhecido como Seguro
GSH Glutathiona
HCl Ácido Clorídrico
IF Infusão
IP Índice de Peróxidos
ISD Infusão seguida de atomização em Spray Dryer
MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
MV Mistura de Variedades
NaOH Hidróxido de Sódio
ORAC Capacidade de Absorver Radicais Oxigênio (*Oxygen radical absorbance capacity*)
OSI Índice de Estabilidade Oxidativa (*Oil Stability Index*)
PDA Agar Batata Dextrose (*Potato Dextrose Agar*)
SD Spray Dryer
SOD Superóxido Dismutase
TBARS Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (*Thiobarbituric acid reactive substances*)
TBHQ Terc-butilidroquinona
TC Taninos Condensados
TEAC Capacidade Antioxidante Equivalente em Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
TGA Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis*)
TRAP Método do Sequestro Total de Radicais Peroxil (*Total Peroxyl Radical-Trapping Ability*)
TROLOX 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico
TSA Agar Triptona de Soja (*Trypticase soy agar*)
TSB Caldo Triptona de Soja (*Trypticase soy Broth*)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	33
OBJETIVOS.....	39
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>39</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>39</i>
CAPÍTULO 1.....	41
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
1.1 NOZ-PECÃ	43
1.1.1 <i>Características botânicas, origem e produção.....</i>	<i>43</i>
1.1.2 <i>Variedades de Noz-pecã.....</i>	<i>45</i>
1.1.3 <i>Beneficiamento e aplicações.....</i>	<i>46</i>
1.1.4 <i>Composição nutricional, fitoquímica e atividade biológica da noz-pecã.....</i>	<i>47</i>
1.2 OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM ALIMENTOS.....	53
1.3 ANTIOXIDANTES	56
1.3.2 <i>Classificação quanto à Origem.....</i>	<i>56</i>
1.3.3 <i>Classificação quanto ao mecanismo de ação</i>	<i>60</i>
1.4 ANTIMICROBIANOS.....	62
1.4.1 <i>Classificação quanto à origem</i>	<i>63</i>
1.4.2 <i>Classificação quanto ao mecanismo de ação</i>	<i>65</i>
1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA.....	67
1.6 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS EM VEGETAIS.....	78
1.6.1 <i>Extrações Convencionais.....</i>	<i>80</i>
1.6.2 <i>Extração Supercrítica</i>	<i>82</i>
1.7 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS ATRAVÉS DE ATOMIZAÇÃO EM SPRAY DRYER	84
1.8 ANÁLISE DE COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS	88
1.8.1 <i>Análise fitoquímica.....</i>	<i>88</i>
1.8.2 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	<i>91</i>

1.8.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais
98

1.9 APROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS	100
2 CONCLUSÕES.....	102
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CAPÍTULO 2.....	127
RELAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO E DA CASCA DE NOZ-PECÃ [CARYA ILLINOINENSIS (WANGENH) C. KOCH]	127
1 INTRODUÇÃO	129
2 MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1 MATÉRIA PRIMA	132
2.2 REAGENTES QUÍMICOS.....	132
2.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA NOZ-PECÃ.....	132
2.4 OBTENÇÃO DO PÓ E DOS EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ....	133
2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE NOZ-PECÃ	133
2.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, ANÁLISE DE COR E ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CASCA DE NOZ-PECÃ.....	135
2.7 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ..	137
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	139
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE NOZ-PECÃ	139
3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, ANÁLISE DE COR E ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CASCA DE NOZ-PECÃ.....	142
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ..	150
3.4 RELAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO E DA CASCA DE NOZ-PECÃ	152

4	CONCLUSÕES.....	156
5	REFERÊNCIAS.....	157
	CAPÍTULO 3.....	165
	EFEITO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA E O PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ [<i>CARYA ILLINOINENSIS</i> (WANGENH) C. KOCH]	165
1	INTRODUÇÃO	168
2	MATERIAL E MÉTODOS	171
	2.1 MATÉRIA PRIMA	171
	2.2 REAGENTES QUÍMICOS.....	171
	2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	171
	2.3.1 <i>Obtenção do pó e dos extratos da casca de noz-pecã.....</i>	<i>171</i>
	2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E PERFIL FENÓLICO	173
	2.4.1 <i>Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais ..</i>	<i>173</i>
	2.4.2 <i>Determinação do conteúdo de Taninos Condensados</i>	<i>173</i>
	2.4.3 <i>Determinação do perfil fenólico através de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	<i>173</i>
	2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	175
	2.5.1 <i>Atividade antioxidante in vitro.....</i>	<i>175</i>
	2.5.2 <i>Atividade antimicrobiana.....</i>	<i>176</i>
	2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	178
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	179
	3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	179
	3.2 PERFIL FENÓLICO DETERMINADO POR CLAE	182
	3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	190
4	CONCLUSÕES.....	195
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196
	CAPÍTULO 4.....	203

MICROPARTÍCULAS OBTIDAS EM SPRAY DRYER CONTENDO EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ [<i>CARYA ILLINOINENSIS</i> (WANGENH) C. KOCH]		203
1	INTRODUÇÃO	206
2	MATERIAIS E MÉTODOS	208
2.1	MATÉRIA PRIMA	208
2.2	REAGENTES QUÍMICOS	208
2.3	OBTENÇÃO DO PÓ E DOS EXTRATOS DA CASCA DE NOZ-PECÃ....	209
2.4	OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS ATRAVÉS DE ATOMIZAÇÃO EM SPRAY DRYER	209
2.5	EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ...	210
2.6	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	213
2.7	LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEO DE SOJA.....	214
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	215
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	215
3.1	EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ...	215
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	221
3.3	LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÓLEO DE SOJA	228
4	CONCLUSÕES	234
5	REFERÊNCIAS	235
CONCLUSÕES		242

INTRODUÇÃO

A indústria agrícola produz anualmente um volume significativo de resíduos que causam sérios problemas de descarte e eliminação (RODRÍGUEZ-COUTO, 2008). Muitos desses resíduos possuem elevado potencial químico e nutricional e, têm recebido maior atenção em termos de controle de qualidade, sendo classificados como subprodutos agroindustriais (GRAMINHA et al., 2008). Nos últimos anos, a indústria e órgãos governamentais de pesquisa do mundo inteiro, têm investido esforços no sentido de encontrar novas alternativas de uso para esses subprodutos (ORZUA et al., 2009).

Essa realidade mundial pode ser reportada para o Brasil, onde várias indústrias de processamento de alimentos também produzem elevados teores de resíduos agroindustriais. No sul do Brasil, nas indústrias de processamento de amêndoas de noz-pecã, aproximadamente 40 a 50% do total da produção industrial é representada pelas cascas das nozes, que constituem o principal resíduo do processamento dessa amêndoa. Normalmente, a casca tem sido empregada como combustível de caldeira ou comercializada triturada na forma de chá. Ao chá da casca da noz-pecã é atribuído, pela população do sul do Brasil, várias propriedades benéficas a saúde entre elas: poder redutor do mau colesterol e açúcar no sangue, melhora de artrites, distúrbios estomacais e intestinais, efeito hepatoprotetor, melhora e prevenção de doenças degenerativas, entre outros benefícios relatados popularmente. Pesquisas indicam que os benefícios observados pelo uso popular do chá da casca da noz-pecã esteja relacionado à presença de compostos fenólicos presentes naturalmente em sua matriz vegetal. Compostos fenólicos de origem natural têm sido extensivamente estudados devido as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas exercidas em alguns vegetais, frutas, temperos, especiarias e outros subprodutos agrícolas (PRADO et al., 2009a; PECANTEA, 2008; DIMITRIOS, 2006; RAUHA et al., 2000).

Compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente a oxidação do mesmo, neutralizando a ação dos radicais livres (RL) (HALLIWELL, 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Os RL são moléculas que contêm um elétron isolado (não pareado), constituindo espécies instáveis e extremamente reativas. Essas

moléculas são responsáveis por alterações em alguns componentes celulares podendo desencadear reações em cadeia nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, afetando sua integridade estrutural e funcional causando diversas patologias, tais como doenças cardiovasculares, determinados tipos de câncer, aterosclerose e algumas doenças inflamatórias. Em alimentos, a oxidação dos ácidos graxos insaturados, e formação de RL resulta no desenvolvimento da rancidez, alteração caracterizada pelo desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis e perda de valor nutricional (SOARES, 2002; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; THOMAS, 2000; RICE-EVANS, MILLER e PAGANÇA, 1997).

Quanto a sua natureza, os antioxidantes são classificados em sintéticos e naturais. Entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados em alimentos estão o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), terc-butilidroxiquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Entre os antioxidantes naturais de importância comercial estão os tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides, ácido ascórbico e seus sais e, alguns extratos vegetais de uso industrial, tais como o extrato de alecrim (SHAHIDI e ZHONG, 2005).

Além dos antioxidantes naturais já utilizados comercialmente em muitos produtos industrializados, podem ser classificados como antioxidantes de origem natural, extratos vegetais ricos em compostos polifenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) com alto potencial antioxidante. Estes compostos estão presentes em alimentos de origem vegetal, tais como frutas, verduras, cereais e alguns subprodutos da indústria de alimentos (SERRANO, et al., 2009; WU et al., 2004; SOARES, 2002).

Além de apresentar atividade antioxidante, muitos vegetais e subprodutos da indústria agroalimentar de estrutura fenólica e polifenólica, são capazes de exercer atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes de alimentos. Esses compostos polifenólicos estão concentrados na casca dos vegetais superiores, como metabólitos secundários, envolvidos no processo de estresse oxidativo e proteção da planta contra a ação de patógenos (NOHYNEK et al., 2006).

Compostos antimicrobianos de estrutura fenólica foram extensivamente utilizados na clínica médica, sendo o fenol um dos primeiros agentes químicos utilizados como anti-séptico. Devido seus

efeitos tóxicos, foi substituído ao longo dos tempos por vários derivados químicos relacionados, menos tóxicos e mais ativos contra os micro-organismos (*o*-cresol, *m*-cresol, 4-etilfenol, *p*-cresol, *as-o*-xilenol, hexilresorcinol, hexaclorofeno). Entre os compostos com atividade antimicrobiana que apresentem estrutura química fenólica, permitidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em alimentos, podem ser citados o metilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de metila), propilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de propila) e heptilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de heptila). Além disso, aditivos sintéticos de estrutura fenólica, utilizados para outras finalidades, podem interferir indiretamente no crescimento de micro-organismos (BHA, BHT, TBHQ, PG etc) (JAY, 2008; PELCZAR et al., 1997).

Entre os compostos fenólicos naturais que exercem atividade antimicrobiana, estão os ácidos fenólicos (caféico, gálico, *p*-cumárico, protocatecuico e ferúlico) capazes de interferir no crescimento de várias bactérias (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli spp*, *Salmonella spp*) e compostos do grupo dos flavonóides (catequinas, quercetinas, entre outros) que interagem no crescimento de vários micro-organismos (*Bacillus*, *E. coli spp*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus e Vibrio*) (VAQUERO et al., 2008; NAZ et al., 2007; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; RAUHA et al., 2000; HERALD e DAVIDSON, 1983). Rauha et al., (2000) obtiveram resultados efetivos de extratos ricos em flavonóides da subclasse das flavonas frente a *Candida albicans*.

Compostos fenólicos, de forma geral, exercem a atividade antimicrobiana lesando as células do micro-organismo pela alteração da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando perda das substâncias intracelulares vitais. Além disso, também podem agir desativando e desnaturando enzimas importantes do metabolismo microbiano (PELCZAR et al., 1997). Em termos gerais, os polímeros de compostos fenólicos, taninos e flavonóides, encontrados abundantemente nas matrizes de vários resíduos agroindustriais, afetam o crescimento microbiano através de vários mecanismos: inibição das enzimas microbianas extracelulares, indisponibilizando substratos necessários para o crescimento, ação direta no metabolismo microbiano através da fosforilação oxidativa, e complexação de íons metálicos no meio de crescimento bacteriano, entre outros (SERRANO, et al., 2009; SCALBERT, 1991).

As vantagens do uso de aditivos (antioxidantes e antimicrobianos) de origem natural em alimentos estão relacionadas, principalmente, sob a ótica da segurança e toxicidade dos aditivos sintéticos até então, disponíveis no mercado. O aumento do conhecimento sobre a segurança e da capacidade para avaliá-la tem colocado, nos últimos anos, vários aditivos sob suspeita. As pesquisas em busca de novas substâncias com potencial para serem empregadas em alimentos devem atender a restrições regulamentadas, além, de considerar a preferência do consumidor por alimentos *naturais* (NYCHAS, 1995; BRANEN, 1993; MATTHEWS e HAAS, 1993). Nesse contexto, os avanços dos estudos envolvendo produtos naturais se justificam pelas propriedades antioxidantes, conservadores, aromáticas, corantes, cosméticas e nutracêuticas de diversos extratos de plantas. Assim, a obtenção das frações de extratos naturais de matérias-primas vegetais pouco estudadas é de grande importância para as indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas.

Dentre os métodos tradicionalmente utilizados para a obtenção desses extratos vegetais, ricos em antioxidantes e antimicrobianos naturais, podem ser citadas as extrações convencionais, incluindo a técnica de infusão e a extração com o uso de solventes orgânicos. A técnica de infusão, embora seja caracterizada por procedimentos relativamente simples, apresenta algumas desvantagens devido a eventual perda de componentes termolábeis, relacionadas às altas temperaturas envolvidas. A extração com solventes orgânicos de variadas polaridades tem como principais restrições à presença de resíduo de solvente no extrato, muitas vezes tóxico, e a obtenção de compostos indesejáveis no produto coextraídos com as substâncias desejadas. Dessa forma a tecnologia de extração através do emprego de fluido supercrítico representa uma alternativa aos processos de extração convencionais, com possibilidade de uso de temperaturas inferiores aos processos convencionais e, proporcionando alcance de maior seletividade de operação variando as condições de pressão do solvente (CO₂) (MENDIOLA et al., 2007; DINÇER et al., 2005; ZANCAN et al., 2002).

Os benefícios do uso da tecnologia de extração supercrítica para obtenção de extratos vegetais, já têm sido demonstrados através da extração de vários compostos de interesse nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (MENDIOLA et al., 2007; DINÇER et al., 2005; ZANCAN et al., 2002; POKORNY e KORCZAK, 2001).

No entanto, a busca de processos extrativos que preservem a qualidade dos compostos fenólicos não se constitui no único desafio importante na pesquisa desses compostos. Extratos vegetais ricos em compostos fenólicos apresentam considerável instabilidade oxidativa limitando sua utilização, além do sabor adstringente e desagradável conferido por alguns polifenóis. Na tentativa de preservar a efetividade da ação antioxidante dos polifenóis e melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dos compostos ativos presentes em extratos vegetais, tem sido estudada a possibilidade de encapsulação e desenvolvimento de micropartículas desses compostos utilizando diferentes metodologias (FANG e BHANDARI, 2010).

Uma das tecnologias utilizadas pela indústria de alimentos na obtenção de micropartículas com compostos ativos para adição em alimentos é a tecnologia de atomização por Spray Dryer. Esse processo tem sido utilizado para obtenção de micropartículas de vários compostos bioativos de origem natural para produção de nutracêuticos, tais como extratos com propriedades antioxidantes, fibras de frutas comestíveis e probióticos empregando diferentes materiais de parede para encapsulação (CHIOU e LANGRISH, 2007; HOMAYOUNI et al., 2008).

Face a importância das pesquisas envolvendo compostos polifenólicos com propriedades antioxidantes e antimicrobinas, a extração e obtenção de micropartículas contendo esses compostos bioativos surge como uma fonte alternativa de renda importante, pela agregação de valor econômico a um resíduo agroindustrial de cultura essencialmente orgânica, isenta de contaminantes agrotóxicos. A possibilidade de agregação de valor ao grande volume (40 a 50 %) de resíduo (casca) gerado no processamento da noz-pecã permitiria aos produtores uma maior lucratividade no final do processo. Esse fato incentivaria uma extensão no número de pomares de noqueiras na região sul do Brasil, que apesar de apresentar condições apropriadas de solo e clima para a cultura, o cultivo ainda é pouco expressivo na região.

Dados sobre a composição da casca e extratos da casca da noz-pecã, produzida no sul do Brasil, são escassos na literatura. Além da necessidade de elucidação da composição da matriz vegetal e dos fitoquímicos presentes nos extratos obtidos de cascas de nozes-pecã, são necessárias pesquisas de alternativas industriais para um melhor aproveitamento desse resíduo. Estudos sugerindo tecnologias de processamento e aplicação em sistemas alimentares, fazendo uso de

extratos obtidos da casca da noz-pecã, até o momento presente, são inexistentes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a relação entre o teor e identificação de compostos antioxidantes presentes no óleo de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] e a sua estabilidade oxidativa e a atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos da casca da noz-pecã obtidos através de diferentes métodos de extração.

Objetivos específicos

- Determinar a composição química (perfil de ácidos graxos, tocoferóis e fitosteróis totais) e a estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã de 2 safras consecutivas (2009 e 2010) em uma mistura de variedades e da variedade Barton.
- Obter extratos da casca de noz-pecã (variedade Barton) empregando diferentes métodos de extração: infusão, extração alcoólica e extração supercrítica e determinar nos extratos obtidos o teor de fenólicos totais (método colorimétrico Folin-Ciocalteu), e taninos condensados (método colorimétrico da Vanilina).
- Avaliar nos extratos da casca da noz-pecã, obtidos através das diferentes metodologias de extração, a atividade antioxidante através dos métodos ABTS e DPPH.
- Avaliar os possíveis efeitos ocasionados pelo emprego da tecnologia de secagem por atomização em Spray Dryer, na composição nutricional, perfil espectrofotométrico no infravermelho (FTIR), cor, fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã obtidos através de infusão.
- Identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de noz-pecã, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da casca da noz-pecã contra diferentes cepas de fungos e bactérias através de antibiogramas e da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Bactericida (CMB).
- Obter micropartículas de extratos da casca de noz-pecã através de atomização em Spray Dryer utilizando diferentes proporções de polímeros de encapsulação (maltodextrina e goma arábica).

- Avaliar a eficiência de incorporação do extrato à micropartícula obtidas pela atomização em Spray Dryer através da determinação do teor de fenólicos totais (método colorimétrico Folin-Ciocalteu), avaliação da atividade antioxidante (método DPPH), análise instrumental da cor, análise espectrofotométrica no infravermelho (FT-IR / NIR) e análise microscópica de fluorescência.
- Caracterizar as micropartículas obtidas através de atomização em Spray Dryer através da análise do conteúdo de umidade, atividade de água, densidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).
- Avaliar a liberação dos antioxidantes presentes nas micropartículas em óleo vegetal, comparando com a atividade antioxidante do extrato alcoólico da casca de noz-pecã e a de um antioxidante comercial indicado para óleos (TBHQ – terc-butilidroquinona), através de *Shaal Oven Test*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 NOZ-PECÃ

1.1.1 Características botânicas, origem e produção

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] pertence à família Juglandaceae e pode atingir, na idade adulta, 40 metros de altura, 40 metros de diâmetro de copa e 2 metros de circunferência de tronco (Figura 01 – pag. 43), podendo superar até 200 anos de longevidade. O fruto da noqueira é uma drupa, que se agrupa em cachos com três a sete unidades de nozes, sendo o epicarpo separado do fruto na maturação. O tamanho das nozes varia bastante de acordo com a variedade, sendo necessárias de 60 a 160 nozes para atingir o peso de 1kg (INC, 2008; ORTIZ, 2000).

Figura 01 – Noqueira-pecã.



A noz-pecã é nativa da América do Norte e sua cultura é bastante difundida no sul dos Estados Unidos. Seu fruto tem sido reportado na história da América como significativo suplemento alimentar na dieta indígena desde 1700. Com a exploração e colonização da América, a noz-pecã foi extensivamente utilizada como meio de comércio entre os índios e caçadores, que exploravam ao longo dos rios, espalhando junto com eles as pecãs. Geograficamente

as pecãs nativas tendem a crescer próximas aos rios navegáveis e no centro sul dos Estados Unidos (SWINK, 1996; DE CARVALHO, 1975).

A partir da década de 1900 a noz-pecã, teve seu cultivo para produção comercial disseminado em diversos países como a Austrália, África do Sul e alguns países da América do Sul (SHAHIDI e MIRALIAKBARI, 2005). Os Estados Unidos são responsáveis por mais de 80% da produção mundial de noz-pecã, tendo produzido entre 1999 e 2005 em torno de 78,47 a 181,44 milhões de quilogramas de nozes na casca. Outros países produtores incluem México, Austrália, Israel, Argentina e Brasil (VENKATACHALAM et al., 2007; VENKATACHALAM, 2004; WAKELING et al., 2001).

No Brasil, a noqueira-pecã foi introduzida pelos primeiros imigrantes norte-americanos, que estabeleceram núcleos em Santa Bárbara do Oeste e Americana no Estado de São Paulo. O marco inicial da cultura ocorreu na cidade de Piracicaba, no Estado de São Paulo em 1910, dando origem a variedade “Piracicaba”. Posteriormente, variedades comerciais norte-americanas foram importadas, proporcionando a cultura da noqueira em outros estados brasileiros (ORTIZ, 2000; DE CARVALHO, 1975).

A introdução progressiva da noz-pecã no Brasil fez com que diminuísse significativamente (17,35% em 1970) a importação da noz europeia, que se distingue da noz-pecã originária da América do Norte, principalmente por apresentar uma casca mais rugosa, menor teor de óleo e sabor diferenciado da noz-pecã. Atualmente, o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de noz-pecã do país, seguido pelos estados do Paraná e Santa Catarina (ORTIZ, 2000; DE CARVALHO, 1975). De acordo com dados do Ministério da Agricultura, a lavoura permanente de nozes em nível nacional no Brasil produzia até o ano de 2003, cerca de 1.022 kg/há, totalizando aproximadamente duas mil toneladas de nozes ao ano. Muitos pomares que se encontravam em situação de abandono vêm sendo recuperados, outros expandidos e alguns implantados. Além de muitos pomares que superam vinte mil árvores, existem regiões nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná onde existe um grande número de pequenas propriedades que oferecem quantidades significativas de nozes para o mercado (EMATER, 2009; ORTIZ, 2000).

1.1.2 Variedades de Noz-pecã

Nos Estados Unidos, existem mais de mil variedades da noz-pecã, sendo que aproximadamente 75% da produção provêm de cultivares melhoradas através de enxertia ou seleção de sementes. O melhoramento genético das variedades de noz-pecã iniciou no ano de 1880 e, no ano de 1990, variedades resultantes de melhoramento genético como Stuart (21,8%), Western Schley (14,5%), Desirable (10,9%), Wichita (10,2%) e Schley (5,4%) já somavam juntas mais de 60% do total de noz-pecã produzida nos Estados Unidos (VENKATACHALAM, et al., 2007; VENKATACHALAM, 2004). Atualmente, as variedades de maior relevância comercial nos Estados Unidos são a Kanza, Nacono, Kiowa, Pawnee, Shawnee, Desirable CW e Desirable BW, sendo que a variedade Nacono tem se destacado pelas melhores perspectivas de aumento de difusão e produção (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

As variedades pecã adaptadas a uma região podem não se adaptar a outras, pois certas características são muito influenciadas pelas condições de clima, solo, tratamentos culturais, entre outros. É de grande importância para o Brasil a cultura da noqueira-pecã, graças a sua grande adaptabilidade às condições climáticas brasileiras. Os primeiros cultivos de algumas variedades vindas dos Estados Unidos revelaram resultados promissores com um número significativo de plantas aclimatadas. Além disso, variedades híbridas naturais têm apresentado produtividade semelhante à da noz europeia importada (DE CARVALHO, 1975).

De acordo com Ortiz (2000), as variedades produzidas nas lavouras localizadas no sul do Brasil, compreendem uma mistura das variedades Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw e Cape Fear; sendo que 50% das lavouras são constituídas por plantações da variedade Barton. A variedade Barton, obtida por enxertia e melhoramento genético, tem recebido maior destaque devido à sua importância comercial. Além de ser economicamente mais rentável, sua produção tem se difundido nas principais lavouras de nozes nos estados da região sul do Brasil. Segundo a empresa Divinut (2011), localizada no município de Cachoeira do Sul no estado do Rio Grande do Sul, ao longo dos últimos cinco anos, cem mil mudas da variedade Barton

foram enviadas a campo. Do total de parceiros produtores e fornecedores de nozes para a referida indústria, que ultrapassam 1000 produtores nos três estados da Região Sul do Brasil, 90 % das árvores plantadas na última década são da variedade Barton, sendo os 10 % restantes constituídos pelas variedades Shawnee, Choctaw e Stuart. Nas demais empresas, que realizam trabalhos similares, observam-se uma rápida e pronunciada difusão da variedade Barton em relação às demais variedades de noz-pecã.

1.1.3 Beneficiamento e aplicações

A colheita e o beneficiamento da noz-pecã são processos relativamente simples. Após a colheita das nozes, que ocorre com a abertura do epicarpo e a queda do fruto, as mesmas são colocadas em sacos e transportadas para a indústria beneficiadora. Na indústria, as nozes são processadas através de uma lavagem inicial com água fria seguida pela primeira separação por tamanho em peneiras, ainda inteiras. Uma segunda lavagem é realizada com água aquecida (80°C – 5 minutos) com o objetivo de inativação de enzimas e eliminação de micro-organismos. Na sequência ocorre o descascamento, no qual as cascas são quebradas e separadas da amêndoa. Simultaneamente é realizada a segunda separação para classificação das nozes em diferentes tamanhos através de peneiras. As nozes são secas (40°C) até 4% de umidade e submetidas a uma terceira e última classificação para finalmente serem embaladas acondicionadas em potes de polipropileno com capacidade para 100 g ou a vácuo, em filmes de nylon-polietileno com capacidade de 1 kg (ORO, 2007).

As nozes são utilizadas em uma grande variedade de produtos alimentícios como saladas, sobremesas e como *snack*, podendo ser consumida crua, tostada, salgada ou revestida com açúcar ou mel. O fruto é comumente empregado em produtos de padaria, confeitaria, na decoração de *cookies*, bolos, doces, tortas e possui seu uso difundido nas indústrias lácteas adicionadas em sorvetes. A boa aceitação da noz-pecã no mercado consumidor se deve ao seu sabor e aroma agradável e a sua crocância. Além disso, refeições ricas em noz-pecã substituem parcialmente a farinha de trigo, além de aprimorar e finalizar produtos industrializados (SWINK, 1996).

O óleo da amêndoa da noz-pecã é comestível, e apesar do consumo pouco difundido, possui um mercado consumidor promissor,

principalmente na Europa, devido às suas qualidades nutricionais e características sensoriais de óleo *gourmet*. A obtenção do óleo resulta na produção da torta, que pode ser aproveitada para utilização em panificação e confeitaria e constitui uma fonte de nutrientes como proteínas e lipídios. A torta é comumente comercializada em potes de polipropileno ou a vácuo, em filmes de nylon-polietileno com capacidades variadas (PRADO, 2008; ORO, 2007).

Além de ser amplamente usada na forma in natura e possuir um mercado promissor para o óleo e a torta, o processamento da noz-pecã resulta na obtenção de um volume relativamente elevado de casca (40 a 50% do volume total de nozes inteiras que chega até a indústria) (WORLEY, 1994). Após a quebra da noz, essas cascas são reduzidas de tamanho, colocadas em embalagens plásticas de 100g e comercializadas na forma de chá (Figura 02 – pag. 47). Este produto é tradicionalmente utilizado pela população do sul do Brasil, que atribui ao mesmo propriedades benéficas para a saúde relacionadas, provavelmente, à atividade antioxidante já avaliada em estudos anteriores (PRADO et al., 2009a; PRADO, 2008).

Figura 02 – Noz-pecã: a) cacho; b) nozes colhidas sendo descascadas; c) casca de nozes moídas para chá.



1.1.4 Composição nutricional, fitoquímica e atividade biológica da noz-pecã

A amêndoa é caracterizada pelo alto conteúdo de óleo (entre 65 e 75%), além de proteínas (9,9%), carboidratos (7,8 %), fibras totais (7,8%), água (3,7%) e de cinzas ou minerais totais (1,4%), fornecendo uma média de 726,7 kcal/g (ORO et al., 2008). Na composição lipídica da amêndoa da noz-pecã, os ácidos graxos predominantes são o oléico e o linoléico (em torno de 62,5 e 27,5% respectivamente) e são encontrados ainda, em concentrações menores,

os ácidos graxos palmítico (5,65%), esteárico (2,84%) e gadoléico (0,24%) (ORO et al., 2008).

De acordo com De Carvalho (1975), a noz-pecã apresenta em sua composição protéica, um teor de aminoácidos aromáticos que varia de 7,6 a 8,1 g de aminoácidos/ 16 g de nitrogênio, sendo reportados teores mais significativos para leucina, valina e fenilalanina, e em menores concentrações isoleucina e tirosina. A média total de aminoácidos sulfurados pode variar de 2,1 a 2,65 g de aminoácidos/16 g de nitrogênio, sendo os maiores teores observados para o ácido glutâmico seguido da arginina, ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, serina e treonina. Teores inferiores foram observados para os aminoácidos lisina e histidina.

Entre os minerais presentes na amêndoa da noz-pecã merecem destaque os teores de fósforo (270,9 a 373,3 mg/100g), cálcio (60,5 a 77,8 mg/100g) e ferro (2,9 a 3,0 mg/100g). Além disso, também é considerada fonte de outros minerais tais como manganês, cobre, magnésio e zinco (VONDERHEIDE et al., 2002; DE CARVALHO, 1975).

Na composição nutricional da casca da noz-pecã foi observado um valor calórico de 331 kcal/100g, sendo que o conteúdo de fibras representa a fração principal (48,6%), seguido do teor de carboidratos (29,6%), umidade (16,8%), proteínas (2,2%), minerais (1,44%) e lipídios totais (1,1%) (PRADO et al., 2009a).

Em relação aos teores de compostos fitoquímicos presentes na noz-pecã, Firestone (1999) reportou teores entre 1000 a 2900 mg/kg de esteróis totais em sua composição. Entre os fitosteróis presentes, destacam-se o β -sitosterol, o qual se encontra presente numa faixa de 81 a 93% do total dos esteróis presentes no óleo da noz-pecã. Também são encontrados, em teores reduzidos, o campesterol (3,5 a 4,5%) e o estigmasterol (1 a 2 %).

Encontram-se presentes também, no óleo e na torta da amêndoa da noz-pecã, compostos fitoquímicos bioativos, antioxidantes naturais, como os tocoferóis e compostos fenólicos, respectivamente (PRADO et al., 2009b; KAMAL-ELDIN, 2005; SHAHIDI e MIRALIAKBARI, 2005; KRIS-ETHERTON et al., 1999). O óleo da amêndoa da noz-pecã possui em torno de 88 a 420 mg/kg de tocoferóis totais. Entre os

tocoferóis encontrados no óleo da noz-pecã estão o α -tocoferol (50 - 370 mg/kg), o γ -tocoferol (20 - 125 mg/kg) e o δ -tocoferol (0 - 40 mg/kg), destacam-se por apresentarem as maiores concentrações (FIRESTONE, 1999).

Os compostos fenólicos presentes na amêndoa e na casca da noz-pecã, tais como os taninos e ácidos fenólicos são responsáveis por características como a cor e o sabor adstringente característicos da noz. Além disso, apresentam atividade antioxidante e podem inibir a ação de enzimas, como as lipoxigenases, responsáveis por alterações oxidativas (SHAHIDI e NACZK, 2004a). Os ácidos hidroxibenzoico elágico e gálico são reportados como os compostos fenólicos predominantes, seguidos dos flavonóides catequina e epicatequina. Podem ser encontrados também nas nozes, em menores quantidades, ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, *p*-cumárico e quantidades traços de ácido síringico. Além dos monômeros citados, as nozes também são conhecidas por serem ricas em taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagiotaninos) e taninos condensados (proantocianidinas). Esses compostos fenólicos estão diretamente relacionados com a atividade antioxidante de extratos obtidos da torta da noz-pecã observada em vários estudos (MALIK et al., 2009; SERRANO et al., 2009; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; SENTER, HORVAT e FORBUS, 1980).

Jurd (1956) investigando os polifenóis constituintes da película de frutos de nogueiras (*Juglans regia*) observaram que a deterioração oxidativa dos frutos era retardada pela presença intacta da película dessas amêndoas. Esse autor atribuiu esse fato à possível oxidação preferencial de compostos encontrados na película da amêndoa, tais como ácido gálico, ácido elágico, metil-galatos, e quantidades de taninos hidrolisáveis. Além disso, estudos indicam que a noz-pecã possui em torno de 0,7 a 1,7 % de taninos condensados em sua constituição, sendo que na casca existem cerca de 18 vezes mais substâncias tânicas, responsáveis pelas características organolépticas adstringentes mais pronunciadas (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; POLLES, HANNY e HARVEY, 1981).

Apesar de ainda existirem poucos dados na literatura sobre a composição fenólica de extratos da casca da noz-pecã, pesquisas relacionando dados de cor e teor de taninos condensados de cascas de noz-pecã sugeriram que a alteração da coloração vermelha-marrom observada, esteja relacionada com a presença de flobafenos, uma classe de taninos, polímeros de pigmentação vermelha e estrutura fenólica, podendo ser um indicativo da presença de compostos fenólicos da classe dos flavonoides (PRADO et al., 2009a; PRADO et al., 2010). No entanto, embora altas concentrações de proantocianidinas tenham sido reportadas em ensaios de Vanilina, estudos aplicando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrômetro de massas, reportaram apenas a presença dos ácidos gálico e elágico na casca de nozes-pecã (De La ROSA et al., 2011).

Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007) reportaram para a torta e casca de noz-pecã de diferentes variedades, em extratos obtidos com uma mistura de acetona: água (70: 30 v/ v), teores médios de compostos fenólicos totais de 76 e 448mg/g em equivalentes de ácido clorogênico respectivamente. Os mesmos autores reportaram aproximadamente 34 e 634 mg/g de equivalentes de catequina em taninos condensados, exercendo conjuntamente com os compostos fenólicos totais uma atividade antioxidante média de 97 e 487 mg/g de equivalentes em Trolox na torta e na casca da noz, respectivamente.

Prado et al. (2009b) realizaram pesquisas na torta da noz-pecã de uma mistura de variedades cultivadas no sul do Brasil com extratos obtidos a partir de diferentes solventes (éter, acetona, álcool e água). Nos extratos obtidos com acetona foi reportado um teor de 16 mg/g de equivalentes em ácido gálico para compostos fenólicos totais, 31 mg/g de equivalentes de catequina para taninos condensados. A atividade antioxidante foi de 100 mg/g de equivalentes em Trolox pelo método DPPH e, 85% de inibição do processo oxidativo através do sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico.

Os mesmos autores realizando estudos similares com extração sequencial (éter, acetona, etanol e água) para a casca da noz-pecã, obtiveram resultados significativos em extratos alcoólicos. Os teores para fenólicos totais (118 mg/g de equivalentes em ácido gálico),

taninos condensados (736 mg/g de equivalentes em catequina) e atividade antioxidante (617 mg/g de equivalentes em Trolox – sistema DPPH 24 h; 90% de inibição do processo oxidativo – sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico), foram significativamente superiores aos encontrados na torta da noz-pecã e, superiores aos reportados para os extratos da casca da noz-pecã de diferentes variedades cultivadas nos Estados Unidos (PRADO et al., 2009b; PRADO et al., 2010; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

Prado et al. (2009a) também realizaram estudos analisando o chá da casca de uma mistura de variedades cultivadas no sul do Brasil (Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw e Cape Fear). Neste estudo, os autores reportaram dados semelhantes para o teor de fenólicos totais (138 mg/g de equivalentes em ácido gálico), atividade antioxidante (572 mg/g de equivalentes em Trolox) e inibição do processo oxidativo através do sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico (93%), aos valores encontrados no extrato alcoólico das cascas da noz. Para o teor de taninos condensados, o etanol demonstrou ser o solvente extrator mais eficaz (736 \pm 286 mg/g de equivalentes de catequina) que o extrato obtido por infusão (43 mg/g de equivalentes de catequina) (PRADO et al., 2010).

Reckziegel et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante do chá da casca de noz-pecã frente ao dano oxidativo induzido pela exposição à fumaça de cigarro e os parâmetros comportamentais da abstinência do tabagismo. Ratos de laboratório foram expostos passivamente ao fumo durante 3 semanas (6, 10, e 14 cigarros / dia) e tratados oralmente com chá (25 g / L). Os resultados indicaram uma diminuição da peroxidação lipídica no cérebro e células vermelhas do sangue, aumento das defesas antioxidantes e redução da atividade locomotora e ansiedade induzida por sintomas de abstinência do tabaco, nos ratos que foram tratados com chá da casca de noz-pecã.

Müller et al. (2013) avaliaram a atividade hepatoprotetora do extrato aquoso da casca de noz-pecã frente aos danos hepáticos causados por etanol em fígado de ratos. Ratos tratados cronicamente com etanol apresentaram níveis de defesas antioxidantes diminuídos (glutathiona GSH-33%- e superóxido dismutase SOD -47%), causando genotoxicidade nos eritrócitos. O tratamento, no entanto, com chá da

casca de noz-pecã preveniu o desenvolvimento da peroxidação lipídica (43%), depleção de GSH e SOD (33% e 109%, respectivamente), a genotoxicidade de eritrócitos induzida por etanol e manteve a atividade da catalase inalterada.

Além de pesquisas realizadas avaliando a atividade antioxidante, alguns estudos para a atividade antimicrobiana presente na casca de nozes são reportados na literatura para alguns micro-organismos. Esses estudos têm instigado a comunidade científica no sentido de aprofundar as descobertas nessa área.

Cruz-Vega et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis* de extratos de várias plantas medicinais cultivadas no México, entre elas a *Carya illinoensis*. Diferentes extratos obtidos com hexano, etanol e água, das cascas e folhas da planta foram avaliados. Resultados encorajadores foram obtidos para a casca em extratos de etanol e hexano (CMI - concentração mínima inibitória de 31 e 125 µg/mL, respectivamente), sendo que nos extratos aquosos não foi observada atividade frente à micobactéria testada. Considerando as opções limitadas para o tratamento da tuberculose e a resistência de algumas cepas aos antibióticos em uso atualmente, a casca da *Carya illinoensis* surge como uma opção interessante. Pesquisas ainda são necessárias no sentido de obter extratos que apresentem uma CMI inferior e mais aproximada a reportada pela rifampicina, antibiótico bastante eficaz, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,1 a 0,2 µg/mL (COLL, 2003).

Apesar dos extratos aquosos não terem apresentado atividade antibacteriana nos estudos conduzidos por Cruz-Vega (2008), pesquisas demonstram que extratos aquosos podem ser muito efetivos frente ao crescimento fúngico. Cano-Cabrera et al. (2009) estudando o efeito antimicrobiano de extratos aquosos da casca de noz-pecã, observou 100% de inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium pinophylum*, *Aspergillus fumigatus* e *Mucor griseocyanus*, nas concentrações de 33 e 66% (v/v), e 100% de inibição para *Aspergillus ustus* na concentração de 66% (v/v).

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Osorio et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos (70%) obtidos da casca de noz-pecã, evaporados e redissolvidos em água sob

refluxo durante 12 h a 60°C. Os autores observaram 100% de inibição do crescimento fúngico para a concentração testada (0,20 mg/L) frente aos micro-organismos *Pythium sp*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium sambucinum* e *Rhizoctonia solani*; 75% de inibição do crescimento fúngico para *Fusarium solani* e 50% de inibição do crescimento fúngico para *Alternaria alternata* e *Fusarium verticillioides*.

1.2 OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM ALIMENTOS

Os processos de oxidação em alimentos são responsáveis pela redução da vida de prateleira das matérias-primas e dos produtos industrializados levando a importante perda econômica. Desta forma, o conhecimento dos mecanismos de reação e formas de controle é de suma importância para a indústria de alimentos. Entre as principais reações de oxidação em alimentos se destacam o escurecimento enzimático e a oxidação de lipídios (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os mecanismos de ação da oxidação dos ácidos graxos em alimentos são diversos e extremamente complexos e estão relacionados com o tipo de estrutura química e o meio onde o lipídio se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios (FRANKEL et al., 1994).

A oxidação pode ocorrer por via enzimática ou não enzimática. A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos polinsaturados, catalisando a adição do oxigênio à cadeia hidrocarbonada polinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos que podem ser degradados dando origem a moléculas de sabor e odor desagradáveis (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

A oxidação por via não enzimática ocorre através da autooxidação promovida pelo oxigênio e fotoxidação mediada pela luz através de moléculas fotossensíveis. A autooxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, consistindo na deterioração oxidativa de ácidos graxos através de um processo

autocatalítico mediado por radicais livres. A autooxidação ocorre basicamente quando as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados da molécula de gordura reagem com o oxigênio atmosférico. É uma reação quase espontânea favorecida por altas temperaturas, incidência de luz, presença de metais pró-oxidantes e grande concentração de duplas ligações (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; SHERWIN, 1978).

A oxidação de um lipídio é iniciada pelo ataque do oxigênio molecular às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados que o compõem (GORDON, 2001). O oxigênio molecular é quimicamente pouco reativo, por isso ataca as duplas ligações somente em condições extremas, como alta temperatura e/ou pressão. Dessa forma, é pouco provável que ele inicie um processo de rancidez oxidativa. Porém, a estrutura eletrônica do oxigênio permite que ele possa receber ou perder elétrons, fazendo com que ocorra um despareamento eletrônico que converte a molécula do oxigênio em um radical livre de alta reatividade química. Por este processo, o oxigênio pode sofrer diferentes tipos de reduções que o transformam em diferentes radicais livres. Os radicais livres de maior importância e reatividade química que se formam a partir da redução sequencial univalente do oxigênio são o radical livre superóxido e o radical livre hidroxil (VALENZUELA e NIETO, 2001). Esses radicais são formas ativas do oxigênio e podem atacar a estrutura dos ácidos graxos insaturados de um lipídio iniciando o processo de rancidez oxidativa. Essas reações caracterizam o chamado período de iniciação, que é conhecido por gerar radicais livres a partir do substrato (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Quando o radical livre de oxigênio ataca uma molécula de ácido graxo insaturado, esta se converte em um radical livre de alta reatividade que pode ser atacado pelo oxigênio molecular gerando diferentes tipos de produtos intermediários, como peróxidos, alcóxidos, epóxidos, etc (GORDON, 2001). Estes produtos possuem propriedades radiculares que ao estabilizarem-se subtraem hidrogênios de ácidos graxos, transformando-os em radicais livres de ácidos graxos. Esta etapa, chamada de propagação, é um processo autocatalítico que não requer a participação dos radicais livres de oxigênio da etapa de iniciação. Durante a propagação, a formação de peróxidos adquire velocidade, acompanhada pelo consumo elevado de

oxigênio causando grandes modificações estruturais no lipídio (VALENZUELA e NIETO, 2001).

As transformações moleculares sofridas pelos lipídios durante a propagação geram uma grande variedade de produtos pela ruptura de sua cadeia carbônica. Eles podem ser álcoois, aldeídos, cetonas, hidroperóxidos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, geralmente são voláteis e de baixo peso molecular e originam o sabor e o odor das substâncias oxidadas. Esses compostos possuem potencial tóxico e o seu consumo pode acarretar riscos para a saúde. Esta etapa, caracterizada pela formação de produtos secundários e que é responsável pela formação das alterações organolépticas do óleo ou da gordura é conhecida por terminação (GORDON, 2001).

O mecanismo da fotoxidação ocorre de forma diferenciada da autoxidação mediada por radicais livres e, utiliza uma rota alternativa na formação de hidroperóxidos. A oxidação ocorre na presença de componentes naturalmente presentes no sistema lipídico e luz. Estes componentes são conhecidos como fotossensibilizadores ou cromóforos, devido à sua capacidade de capturar e concentrar energia luminosa (GORDON, 2001).

A fotoxidação é a reação direta da luz ativada e oxigênio singlete com ácidos graxos insaturados formando hidroperóxidos. A fotoxidação ocorre devido à presença de moléculas fotossensíveis (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que podem absorver energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e na região da radiação ultravioleta (UV) tornando-se eletronicamente excitadas capazes de sensibilizar fotoquimicamente radicais livres e transferir essa energia para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$), estabelecendo a fase inicial da fotoxidação. Na sequência, o oxigênio singlete, mais reativo e instável que o oxigênio no estado fundamental, reage diretamente com os elétrons das duplas ligações dos ácidos graxos polinsaturados para formar hidroperóxidos diferentes dos que são observados na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

1.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que, quando presentes em baixas concentrações comparados a do substrato oxidável (ácidos graxos polinsaturados, proteínas, carboidratos ou DNA), podem retardar a oxidação de lipídios ou outras moléculas, atuando nas etapas de iniciação ou propagação das reações em cadeia do processo oxidativo (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010; ZHENG e WANG, 2001).

Na seleção de antioxidantes, algumas características são importantes, entre elas a eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento. Deve ser observada também, a compatibilidade com o alimento, o fácil emprego, a estabilidade do antioxidante nas condições de processamento e armazenamento e a ausência de toxicidade do composto e seus produtos de oxidação, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante devem-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e a preferência pelos consumidores cada vez mais conscientes por produtos toxicologicamente mais seguros (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; RAFECAS et al., 1998).

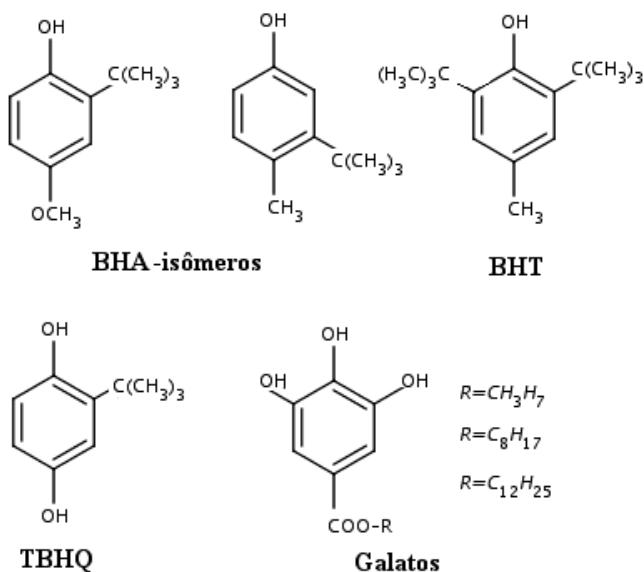
1.3.2 Classificação quanto à Origem

De acordo com a origem, os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são utilizados para estabilizar óleos, gorduras e alimentos contendo altos teores de lipídios. Geralmente são compostos sintéticos derivados de estruturas fenólicas, um anel aromático substituído por grupamentos hidroxila (OH), contendo mais que um grupo OH ou metoxila. Estes agentes antioxidantes tendem a estabilizar os ácidos graxos em alimentos através da reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica. Os antioxidantes fenólicos sintéticos são *p*-substituídos e sua solubilidade é aumentada em óleos e gorduras através da substituição com grupos alquil (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Existe uma grande quantidade de compostos sintéticos com ação antioxidante, porém somente alguns são incorporados em

alimentos devido às restrições de uso e regulamentações das legislações de vários países. Essas restrições se devem a estudos de toxicidade e pesquisas que têm demonstrado uma relação entre o uso de certos antioxidantes sintéticos e o surgimento de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; BIRCH et al., 2001). Entre os antioxidantes sintéticos amplamente empregados em alimentos, os mais utilizados são o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), terc-butilidroxiquinona (TBHQ) e o ácido cítrico, como sinergista (SHAHIDI e ZHONG, 2005). Na Figura 03 (pag. 57), podem ser observadas as estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, TBHQ e galatos.

Figura 03 - Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos: BHA, BHT, TBHQ e galatos.



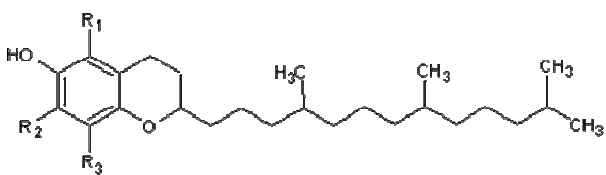
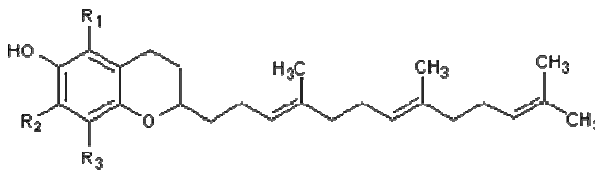
Fonte: SHAHIDI e ZHONG (2005).

A partir do início dos anos 1980, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente, com o intuito de evitar problemas ocasionados pelo uso de alguns antioxidantes

sintéticos de segurança toxicológica questionável (ZHENG e WANG, 2001; POKORNY, 1991). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados industrialmente estão o ácido ascórbico e seus derivados, carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis e compostos fenólicos de extratos de diversas fontes vegetais (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Segundo Wanasundara e Shahidi (2005), os tocoferóis e os tocotrienóis, também denominados como vitamina E, são comumente utilizados como antioxidantes na estabilização de óleos e gorduras. Eles possuem estruturas químicas derivadas do anel cromanol, substituídas por um grupamento hidroxila e por um, dois ou três grupos metílicos no anel fenólico. A principal diferença estrutural entre os tocoferóis e tocotrienóis, consiste no fato dos primeiros possuírem ligações do tipo saturadas e os segundos, ligações insaturadas, na cadeia terpênica lateral (POKORNÝ e PARKÁNYIOVÁ, 2005). A substituição dos grupamentos metílicos origina quatro homólogos presentes em óleos vegetais, que são α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e tocotrienóis. O isômero α - destaca-se por ser mais ativo biologicamente, e o isômero- δ por atuar como melhor antioxidante, estando presente, principalmente, em óleos ricos em ácido linolênico (AHMED, DAUN e PRZYBYLSKI, 2005; O'BRIEN, 2004; KOLAKOWSKA, 2003). O aumento da atividade antioxidante ocorre na ordem $\alpha < \beta < \gamma < \delta$, e é mais fácil de ser observado a baixas temperaturas (LAMBELET, SAUCY e LÖLIGER, 2001). As estruturas das moléculas de tocoferóis e tocotrienóis e suas possíveis substituições podem ser observadas na Figura 04 (pag. 59).

Figura 04 - Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis.

Tocoferóis		R ₁	R ₂	R ₃	
		CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocoferol
		CH ₃	H	CH ₃	β-tocoferol
		H	CH ₃	CH ₃	γ-tocoferol
		H	H	CH ₃	δ-tocoferol
Tocotrienóis		R ₁	R ₂	R ₃	
		CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotrienol
		CH ₃	H	CH ₃	β-tocotrienol
		H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotrienol
		H	H	CH ₃	δ-tocotrienol

Fonte: SHAHIDI e ZHONG (2005).

Os tocoferóis são capazes de inibir a oxidação lipídica em alimentos pela estabilização dos radicais livres que influenciam as reações em cadeia (O'BRIEN, 2004). A atividade antioxidante é significativamente afetada pelos hidrogênios do grupo hidroxil e pela sua habilidade em formar radicais tocoferóis que são capazes de reagir entre si e formar dímeros e trímeros. Ao final, estes radicais são inativados e novas moléculas são geradas com atividade antioxidante menor comparada a dos tocoferóis iniciais (NOGALA-KALUCKA, 2003).

A inibição da produção de peróxidos e a eficiência dos tocoferóis homólogos dependem, entre diversos fatores, do sistema lipídico testado, da temperatura, luz, tipo de substrato, solvente utilizado, bem como da presença de sinergistas e de espécies químicas que possam agir como pró-oxidantes. Além disso, a atividade antioxidante de tocoferóis é dependente da concentração utilizada (NOGALA-KALUCKA et al., 2005; BRAMLEY et al., 2000). A legislação brasileira permite a adição de até 0,05 g/100g (500 ppm) de

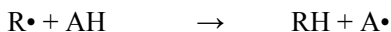
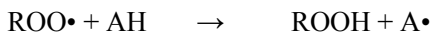
tocoferol, α -tocoferol e mistura de tocoferóis como antioxidantes em alimentos, de acordo com a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada – Anvisa) nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 (BRASIL, 2005).

Os tocoferóis podem ser encontrados nos óleos vegetais polinsaturados na forma livre e no gérmen das sementes dos cereais, sendo que suas principais fontes são as frutas, verduras, cereais e os óleos vegetais. Os tocotrienóis são encontrados na camada de aleurona e subaleurona das sementes de cereais e no óleo de palma (YOSHIDA, NIKI e NOGUCHI, 2003; FIRESTONE, 1999).

1.3.3 Classificação quanto ao mecanismo de ação

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários atuam removendo ou inativando os radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Dessa forma o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; MADHAVI e SALUNKHE, 1995). O mecanismo de estabilização de um radical livre por um antioxidante pode ser observado na Figura 05 (pag. 60).

Figura 05 – Representação esquemática da estabilização de um radical livre por um antioxidante.



Onde: “ROO•” e “R•” são radicais livres, “AH” antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e “A•” um radical inerte.

Fonte: WANASUNDARA e SHAHIDI (2005).

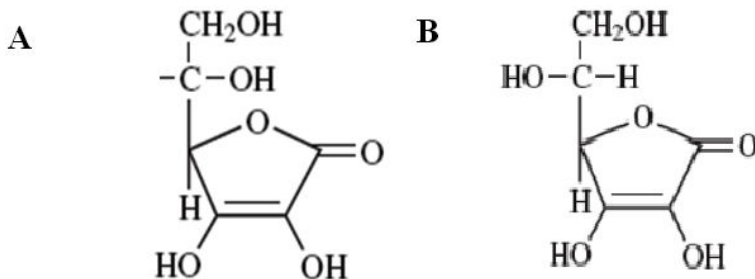
Os compostos que possuem atividade antioxidante primária incluem moléculas que na sua estrutura possuem um anel aromático substituído por grupamentos hidroxila. Quanto mais substituído for o anel aromático, maior será a atividade antioxidante. Entre os

antioxidantes considerados primários usados em alimentos, destacam-se o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), terc-butilidroxiquinona (TBHQ), os galatos (propilgalato, octilgalato e dodecilgalato), ácidos fenólicos, flavonóides, carotenóides, tocoferóis e tocotrienóis (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; MADHAVI e SALUNKHE, 1995).

A principal diferença entre os antioxidantes primários e secundários consiste no fato de que os antioxidantes secundários não são capazes de converterem radicais livres para moléculas estáveis. Os antioxidantes secundários, também classificados como agentes preventivos, atuam como sinergistas dos antioxidantes primários. Os compostos que podem atuar, com efeito, sinergista são substâncias com pouca ou nenhuma atividade podendo aumentar a ação dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Eles podem agir através de diferentes mecanismos de ação (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005). Alguns antioxidantes secundários agem como quelantes e/ou sequestrantes através da complexação de metais. Esses agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que são responsáveis por catalisar a oxidação lipídica. Esse mecanismo ocorre através da ação de um par de elétrons não compartilhado na estrutura molecular da molécula sequestrante. Entre os quelantes de metais destacam-se os ácidos cítrico, málico, succínico, tartárico, etilenodiaminotetracético (EDTA) e os fostatos (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; MADHAVI e SALUNKHE, 1995).

Os antioxidantes secundários podem agir também como removedores de oxigênio através de reações químicas estáveis, tornando as moléculas de oxigênio indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação. Além disso, podem atuar como agentes redutores, retardando o processo oxidativo. Os ácidos ascórbico e eritórbito (Figura 06 – pag. 62), o eritorbato de sódio, o palmitato de ascorbila e os sulfitos são exemplos de agentes redutores e removedores de oxigênio (RAMALHO e JORGE, 2006; WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Figura 06 – A: ácido ascórbico; B: ácido eritórbito.



Fonte: WANASUNDARA e SHAHIDI (2005).

Além dos mecanismos citados, os antioxidantes secundários podem prover hidrogênios para os antioxidantes primários; decompor hidroperóxidos para espécies não radiculares; desativar o oxigênio singlete, ou ainda, absorver a radiação ultravioleta (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

1.4 ANTIMICROBIANOS

Agentes antimicrobianos são substâncias químicas com ação bactericida e/ou bacteriostática, ou ainda fungicidas e/ou fungistáticos que atuam no crescimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos, sem causar danos aos seus hospedeiros. Essas substâncias podem diferir bastante em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, espectro antimicrobiano e mecanismo de ação. Muitos foram identificados quimicamente e obtidos de substâncias naturais, enquanto outros foram obtidos por síntese química (BLACK, 2002; GILMAN, GOODMAN e GILMAN, 1983).

Na ciência de alimentos, agente antimicrobiano é qualquer substância capaz de prevenir ou retardar a deterioração causada por micro-organismos, podendo possuir a propriedade de agir no controle de micro-organismos patogênicos, quando utilizados num produto alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Este tipo de aditivo tem caracterizado a indústria de alimentos moderna e são utilizados para o controle natural de deterioração (conservação de alimentos) e para prevenção e / ou controle do crescimento de micro-organismos

inclusive patogênicos (segurança alimentar) (TAJKARIMI, IBRAHIM e CLIVER, 2010; BRANEN, 1993; DAVIDSON e PARISH, 1989).

Apesar da reconhecida necessidade da aplicação desses aditivos na produção de alimentos, os aspectos envolvendo a segurança para o consumidor têm sido questionados. O aumento do conhecimento sobre a segurança e a capacidade para avaliá-la tem colocado, nos últimos anos, vários aditivos sob suspeita (BRANEN, 1993).

Além da necessidade iminente por novas substâncias, toxicologicamente seguras, deve-se considerar a preferência do consumidor por alimentos livres de aditivos químicos em geral. Essa realidade tem estimulado a realização de estudos e pesquisas em busca de novas substâncias com potencial para serem empregadas como conservadores antimicrobianos em alimentos que atendam não somente as necessidades atuais, como também às restrições regulamentadas para essa classe de aditivos alimentares (NYCHAS, 1995; MATTHEWS e HAAS, 1993).

1.4.1 Classificação quanto à origem

Agentes antimicrobianos podem ser classificados, de acordo com sua origem, em sintéticos ou de ocorrência natural. Segundo Franco e Landgraf (2008), agente antimicrobiano, utilizado como conservador químico de origem sintética em alimentos é qualquer substância adicionada a um alimento para prevenir ou retardar a deterioração causada por micro-organismos, excluindo os sais comuns, açúcares, vinagres, condimentos ou óleos extraídos de condimentos, ou mesmo substâncias provenientes de defumação.

Historicamente, compostos antimicrobianos sintéticos de estrutura fenólica foram extensivamente utilizados na clínica, sendo o fenol um dos primeiros agentes químicos utilizados como anti-séptico. Devido seus efeitos tóxicos, foi substituído ao longo dos tempos por vários derivados químicos relacionados, de menor toxicidade e maior atividade antimicrobiana (*o*-cresol, *m*-cresol, 4-etilfenol, *p*-cresol, *as-o*-xilenol, hexilresorcinol, hexaclorofeno). Entre esses compostos, permitidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em alimentos, são exemplos o metilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de metila), propilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de propila) e

heptilparabeno (*p*-hidroxibenzoato de heptila) (JAY, 2008; PELCZAR et al., 1997).

Entre os agentes antimicrobianos sintéticos de uso mais frequente em alimentos estão os ácidos lipofílicos e seus derivados como o ácido benzóico (benzoatos), ácido propiônico (propionatos), ácido sórbico (sorbatos), ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico (*parabens*), os sulfitos, nitratos, etileno e óxido de propileno, entre outros. Além dos agentes classificados como conservadores em alimentos, outros aditivos sintéticos utilizados como antioxidantes, que apresentam estrutura química fenólica, podem interferir indiretamente no crescimento de micro-organismos (BHA, BHT, TBHQ, PG, etc) (JAY, 2008; PELCZAR et al., 1997). Em função da necessidade pela busca de aditivos toxicologicamente mais seguros, muitos antimicrobianos de origem natural têm sido obtidos de fontes microbianas e vegetais. Os resultados das pesquisas têm demonstrado a existência de um considerável potencial dessas substâncias para uso em alimentos, especialmente em frutas, vegetais frescos, produtos derivados de carnes, aves, peixes e lácteos (TAJKARIMI, IBRAHIM e CLIVER, 2010).

Entre os antimicrobianos obtidos de fontes microbianas estão as bacteriocinas. Elas são definidas como peptídeos antimicrobianos que destroem ou inibem o crescimento de outras bactérias taxonomicamente relacionadas com a cepa produtora. Muitas bactérias ácido-láticas produzem uma grande diversidade de bacteriocinas, sendo a nisina a única bacteriocina até então reconhecida pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como conservador em alimentos (SCHULZ et al., 2003).

Segundo Novaes et al. (2003), os vegetais constituem uma excelente fonte de substâncias com atividade antimicrobiana, além de possuírem uma diversidade molecular relativamente superior à encontrada nos compostos obtidos através de processos de síntese química. As plantas vêm se tornando ao longo dos anos, objetos de inúmeras pesquisas científicas que têm avaliado suas atividades antimicrobianas. Os vegetais ricos em compostos fenólicos em sua estrutura química (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, etc) estão entre os extratos e óleos essenciais mais testados para esta atividade

(TAJKARIMI, IBRAHIM e CLIVER, 2010; SERRANO et al., 2009; REIS, 2006).

1.4.2 Classificação quanto ao mecanismo de ação

Antimicrobianos de origem sintética da classe dos ácidos lipofílicos e derivados apresentam mecanismo de ação relacionado à sua solubilidade na membrana celular. Eles atuam influenciando a bioquímica das necessidades energéticas da célula e alterando a manutenção de seu pH interno, relativamente alcalino. Os ácidos benzoico, propiônico e seus sais e, os ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico atuam no processo respiratório bacteriano, bloqueando a oxidação da glucose a piruvato. Os sorbatos e ácido sórbico inibem a ação de desidrogenases, interferindo na assimilação oxidativa de bolores e leveduras. Nos esporos bacterianos, o ácido sórbico e seus sais atuam na fase de germinação, prevenindo a multiplicação das células vegetativas (FRANCO e LANDGRAF, 2008; JAY, 2008).

Em estudos realizados com *Clostridium botulinum*, os nitratos e nitritos demonstraram interferir nas enzimas que apresentam Fe e S em sua estrutura, impedindo a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Além disso, o nitrito parece inibir o transporte ativo e transporte de elétrons interagindo com enzimas como a ferredoxina e hidrogenase (FRANCO e LANDGRAF, 2008; JAY, 2008).

Os gases utilizados no controle microbiano como antifúngicos (óxido de etileno e propileno), por serem agentes alquilantes, presume-se que a ação antimicrobiana dos mesmos ocorra na presença de átomos lábeis de hidrogênio, onde o anel instável do óxido de metila quebra-se, e o átomo de hidrogênio liga-se ao oxigênio formando o radical hidroxietila. Este radical, ao ligar-se na posição livre deixada pelo átomo de hidrogênio na molécula orgânica, bloqueia grupos reativos na proteína microbiana, inibindo o micro-organismo (FRANCO e LANDGRAF, 2008; JAY, 2008).

Para as bacteriocinas, antimicrobianos considerados de origem natural, o mecanismo de ação varia bastante de acordo com a espécie e meio ambiente onde se encontram. Elas podem promover um efeito letal bactericida sem lise celular, com lise celular ou com efeito bacteriostático. A maioria das bacteriocinas de bactérias ácido-láticas

caracterizadas parece ter um mecanismo de ação comum, no qual elas promovem modificações no potencial de membrana e no gradiente de concentração de prótons (H^+). Tais efeitos, em micro-organismos-alvo, levam à formação de poros na membrana citoplasmática. Além disso, estudos evidenciam que o mecanismo de imunidade das bactérias produtoras de bacteriocinas é capaz de distinguir entre a bacteriocina produzida pela própria cultura e por outras (NASCIMENTO, MORENO e KUAYE, 2008; SCHULZ et al., 2003).

Os compostos naturais encontrados em vegetais, que exercem atividade antimicrobiana e apresentam estrutura química fenólica, podem agir de acordo com mecanismos de ação diversos. A expressão da atividade antimicrobiana desses compostos fenólicos naturais apresenta-se clara, no entanto seu mecanismo de ação não está completamente entendido. Essas substâncias podem atuar em nível de inibição da síntese da parede celular do micro-organismo ou na destruição da função da membrana citoplasmática pela inibição da síntese de proteínas, ou ainda por agirem como antimetabólitos (HOLLEY e PATEL, 2005; MURRAY et al., 1999).

O modo de ação de agentes antimicrobianos naturais de origem vegetal é estabelecido considerando-se um entre os três a seguir: (1) reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (2) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou (3) destruição ou inativação funcional do material genético (KIM et al., 1995; DAVIDSON e BRANEN, 1993). A membrana citoplasmática da bactéria e a membrana mitocondrial das leveduras constituem uma barreira permeável à passagem de pequenos íons como H^+ , K^+ , Na^+ e Ca^{++} , além de serem responsáveis pela entrada e saída de diferentes compostos. Essa permeabilidade da célula é vital estando relacionada com várias funções celulares tais como, manutenção da energia no processo de transdução, transporte de solutos, regulação do metabolismo e controle da pressão (COX et al., 2000; BOOTH, 1985). Existe um consenso de que compostos aromáticos e fenólicos atuam na membrana citoplasmática, alteram sua estrutura, função e transporte ativo (BURT, 2004; SIKKEMA et al., 1995).

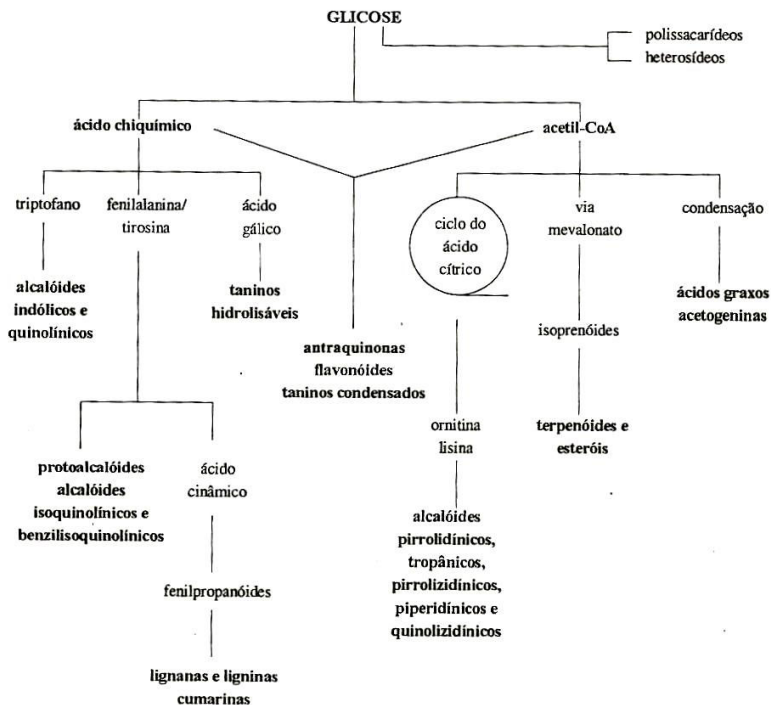
Além do mecanismo explicado, alguns autores acreditam que quanto maior o grau de hidroxilação dos grupamentos fenólicos, maior a sua toxicidade para micro-organismos. De acordo com essa teoria, os compostos resultantes da oxidação inibiriam a atividade enzimática celular através de uma reação de grupos sulfidril ou por interações não específicas com proteínas (COWAN, 1999).

1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Os compostos fenólicos constituem produtos secundários de plantas, envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (CLIFFORD, 1989). A síntese dessas substâncias também está relacionada à adaptação a condições de estresse ambiental, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FARAH e DONANGELO, 2006).

Aproximadamente 40% dos compostos fenólicos provêm da via do acetato-polimalato, sendo os 60% restantes originados da rota do ácido chiquímico, a partir de carboidratos. Metabólitos derivados do acetato são originados do processo de condensação da unidade iniciadora, o acetil-SCoA com a unidade propagadora, o malonil-SCoA sendo a sua função fornecer unidade C₂ para a síntese de ácidos graxos, prostaglandinas e polifenóis, entre outros componentes (Figura 07 – pag. 68) (BRUNETON, 1991). A sua biossíntese é mais pronunciada durante o crescimento vegetal ou na fase de diferenciação celular (SIQUEIRA et al., 1991).

Figura 07 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: SANTOS (2007).

Esses compostos fenólicos, de origem natural, pertencem a uma classe de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, as quais possuem um anel aromático no qual um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila e/ou seus derivados funcionais tais como ésteres, metoxilas, glicosídeos entre outros (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007; ZUANAZZI, 2007).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos (forma conjugada com açúcares). Em sua forma livre, são muito reativos quimicamente sendo facilmente oxidáveis. Possuem propriedade de complexação de metais e por serem aromáticos,

apresentam intensa absorção na região do ultravioleta (UV) (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007).

Entre os compostos fenólicos naturais com ampla distribuição no reino vegetal, estão os derivados dos ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, flavonóides, e derivados de polimerização (taninos e ligninas). As demais classes de substâncias fenólicas naturais abrangem compostos de distribuição mais restrita e menos abundante no reino vegetal (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007).

Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos dividem-se em ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos. Os ácidos benzóicos apresentam sete átomos de carbono em sua estrutura química (C_6-C_1). Entre os mais comuns estão os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siríngico, salicílico, gálico e seu dímero de condensação, o ácido elágico (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Além disso, os ácidos hidroxibenzóicos, especialmente o ácido gálico, fazem parte de estruturas complexas como os taninos hidrolisáveis (CLIFFORD e SCALBERT, 1999).

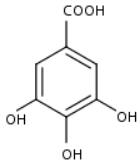
Os ácidos cinâmicos possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3) na sua estrutura. Entre eles estão o ácido *p*-cumárico, caféico, férúlico e sináptico (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; SOARES, 2002).

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os hidroxibenzóicos e raramente são encontrados na forma livre, exceto em alimentos processados. Seus ligantes são derivados glicosilados de ésteres do ácido quínico, chiquímico e tartárico. Esses ácidos fenólicos podem se ligar entre si ou com outros compostos dando origem ao ácido caféico, o qual, associado ao ácido quínico, origina o ácido clorogênico, que é encontrado em vários tipos de frutas e no café (SHAHIDI e NACZK, 2004a; CLIFFORD, 2000).

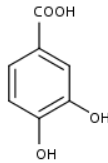
Algumas estruturas de ácidos fenólicos de origem natural são apresentadas na Figura 08 (pag. 70).

Figura 08 - Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

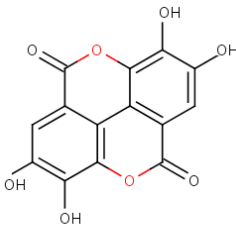
a)



Ácido gálico

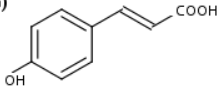


Ácido protocatequínico

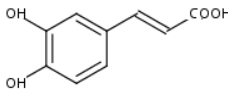


Ácido Elágico

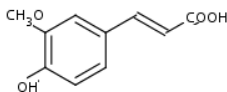
b)



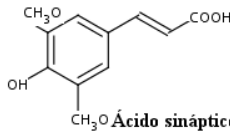
Ácido p-cumárico



Ácido caféico



Ácido ferúlico



Ácido sinápico

Fonte: BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN (2006).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham um papel importante na absorção e neutralização de

radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010; BRENNA e PAGLIARINI, 2001; ZHENG e WANG, 2001).

A relação da estrutura das moléculas de ácidos fenólicos e sua atividade antioxidante depende do número e posições de grupos hidroxil em relação ao grupo funcional carboxila. De forma geral, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos se eleva com ao aumento do grau de hidroxilação. Ácidos hidroxicinâmicos exibem maior atividade antioxidante comparada com os ácidos hidroxibenzóicos. Essa maior atividade, pode ser devida ao grupamento $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, que assegura uma maior habilidade em doar átomos de hidrogênio e estabilização de radicais que o grupo $-\text{COOH}$ nos ácidos hidroxibenzóicos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; RICE-EVANS, MILLER e PAGANÇA, 1996).

Entre os ácidos fenólicos hidroxibenzóicos, o ácido gálico destaca-se por apresentar maior atividade antioxidante *in vitro* (3,62 mmol de Trolox/L) quando comparado ao seu dímero ácido elágico (1,05 mmol de Trolox/L) e o ácido *p*-hidróxibenzóico (0,13 mmol de Trolox/L). Dos ácidos hidróxicinâmicos, destacam-se o ácido clorogênico (1,45 mmol de Trolox/L) em relação ao ácido ferúlico (0,98 mmol de Trolox/L) e ácido 3-cumárico (0,17 mmol de Trolox/L) (SOBRATTEE et al., 2005).

Além da atividade antioxidante, os ácidos fenólicos podem exercer também atividade antimicrobiana. Várias pesquisas da atividade antimicrobiana dos ácidos fenólicos têm sido realizadas ao longo dos últimos 30 anos e resultados diferenciados tem sido reportados. As diferenças nos resultados obtidos podem ter sido influenciadas por fatores tais como: diferenças na metodologia experimental, composição do meio, micro-organismos empregados, concentrações investigadas, baixa solubilidade de muitos compostos fenólicos em determinados solventes, dentre outros (WEN et al., 2003; DAVIDSON, 1993).

Analisando ácidos fenólicos de estrutura simples, Rauha et. al (2000) observaram atividade antimicrobiana bactericida exercida pelo ácido gálico, frente a bactéria *P. aeruginosa* (ATCC 9027), sendo que o ácido protocatecuico, nas mesmas condições de teste, apresentou somente efeito bacteriostático. Vaquero et al. (2007) avaliaram a

atividade antimicrobiana de compostos fenólicos presentes em vinhos sobre bactérias patogênicas e investigaram entre outros, o ácido hidroxibenzóico e protocatecuico em concentrações que variaram entre 5 e 1000 mg/L, empregando-se o método de difusão em ágar. Esses autores observaram atividade antimicrobiana do ácido protocatecuico (1000 mg/L) contra *E. coli*, com zonas de inibição de 2 a 3 mm. Penna et al. (2001) isolaram através de cromatografia em coluna, vários compostos com atividade antimicrobiana de extratos de plantas, entre eles, o galato de metila e o ácido protocatecuico. O galato de metila apresentou atividade antibacteriana frente ao *S. aureus* (CMI = 128 µg/mL), enquanto o ácido protocatecuico apresentou atividade antifúngica para *Mucor sp.* (CMI = 128 µg/mL).

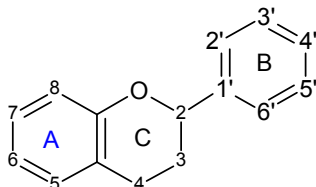
Em estudos realizados com ácidos hidroxicinâmicos, Chenson et al. (1982) mostraram que os ácidos *p*-cumárico e ferúlico inibiam totalmente o crescimento de bactérias do rúmex. Herald e Davidson (1983) observaram atividade antimicrobiana dos ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico contra *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*. Esses autores demonstraram que o ácido ferúlico a 1000 µg/mL e o ácido *p*-cumárico a 500 e 1000 µg/mL inibiam o crescimento, principalmente das bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*. Leifertova et al. (1975) observaram um efeito antimicrobiano de derivados dos ácidos hidroxicinâmicos contra espécies de fungos. Esses autores testaram 10 derivados, incluindo ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico, empregando o método do disco difusão e concentrações de 300 µg/mL, demonstrando inibição contra o fungo *Penicillium notatum*.

Flavonóides

Os flavonóides constituem uma classe importante de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, representando um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Os flavonóides constituem compostos de baixo peso molecular e um grande número ocorre conjugado com açúcares, constituindo um heterosídeo (ZUANAZZI, 2007). Esses compostos podem ser categorizados em seis classes (flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas), compreendendo mais de cinco mil compostos conhecidos, sendo os mais comuns os flavonóis, flavonas e seus glicosídeos (BRAVO, 1998 apud KRIS-

ETHERTON et al., 2002). As variações padrões nas substituições do anel C e A resultam nas diferentes classes de compostos flavonóides dentro de cada classe, respectivamente. A estrutura básica da molécula pode ser observada na Figura 09 (pag. 73) (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Figura 09 - Estrutura genérica de uma molécula flavonóide.



Fonte: BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN (2006).

As moléculas dos flavonóides são conhecidas por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido, atuando por sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Alguns flavonóides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Esta atividade é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante de ferro, atividade seqüestrante de radicais livres, inibição de enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Dessa forma, os flavonóides são capazes de interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres (TRUEBA e SANCHEZ, 2001).

A relação da estrutura da molécula flavonóide e sua atividade antioxidante é bastante complexa. Geralmente, ela varia de acordo com os recursos estruturais da molécula e as substituições nos anéis B e C. Essas moléculas podem ter sua capacidade antioxidante aumentada conforme aumenta o grau de hidroxilação no anel B (grupos catecol e pirogallol), quando possuem ligações duplas entre C-2 e C-3 combinadas com um grupo 3-OH no anel C, e ainda, quando ocorrem substituições de grupos -OH no anel B por grupos metoxila capazes de alterar o potencial redox, afetando a capacidade sequestrante dos flavonóides (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Sobrattee et. al (2005) avaliaram a atividade antioxidante de vários compostos flavonóides de referência observando que a atividade antioxidante decresce entre as subclasses de grupos flavonóides na seguinte ordem: flavanol ou flavan-3-ol > flavonol > flavona > antocianidina > isoflavonóide > flavanona.

De acordo com Sobrattee et al. (2005), das subclasses de flavonóides, os flavanóis e flavonóis recebem maior destaque por sua atividade antioxidante. Entre os flavanóis, os galatos de epigalocatequina e os galatos de epicatequina são responsáveis por apresentarem 4,39 e 4,23 mmol de Trolox/L de atividade antioxidante *in vitro*, seguidos dos flavanóis de epigalocatequina, epicatequina e catequina apresentando 3,86; 3,58 e 3,16 mmol de Trolox/L de atividade antioxidante respectivamente. Os flavonóis com atividade antioxidante mais representativa reportados por Sobrattee et al. (2005) foram a quercetina (3,68 mmol de Trolox/L) e a miricetina (3,07 mmol de Trolox/L).

Além da atividade antioxidante, os flavonóides são capazes de agir em micro-organismos como bacteriostáticos, bactericidas e fungicidas. A ação antibacteriana de extratos etanólicos de várias plantas ricas em flavonóides, testadas contra bactérias multiresistentes, foi comprovada em estudos realizados por Ahmad e Beg (2005).

A subclasse dos flavanóis, em estudos realizados por Rauha et al. (2000), apresentaram atividade antimicrobiana para a (+)-catequina frente aos micro-organismos *S. aureus* (DSM 20231), *S. epidermidis* (FOMK) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027) (RAUHA et al., 2000).

Entre as subclasses dos flavonóis, a quercetina apresentou, em estudos de atividade antimicrobiana, efeito bactericida frente *S. aureus* (DSM 20231), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (FOMK), *M. luteus* (YMBL), *B. subtilis* (ATCC 9372), *B. subtilis* (ATCC 6633) e *E.coli* (ATCC 11775) (RAUHA et al., 2000).

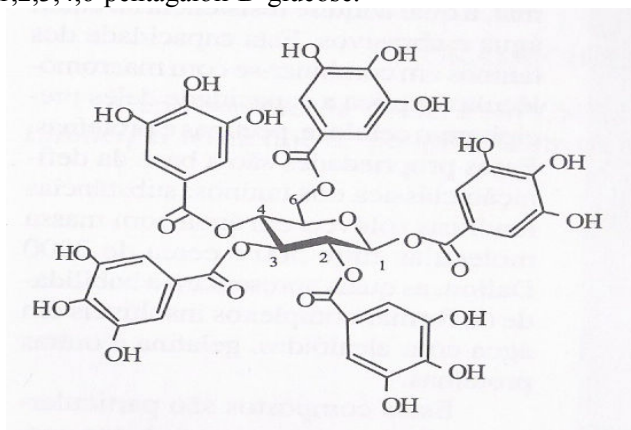
Rauha et al. (2000) obtiveram resultados efetivos para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, quando avaliaram pelo método de difusão em Agar, alguns extratos ricos em flavonóides. A subclasse das flavonas apresentou atividade antimicrobiana frente ao *M. luteus* (YMBL), *S. aureus* (DSM 20231), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *B. subtilis* (ATCC 9372) e *E.coli* (ATCC 11775). O mesmo

grupo apresentou atividade antimicrobiana bactericida frente aos micro-organismos *B. subtilis* (ATCC 6633) e *E. coli* (ATCC 8739). Quando avaliado o potencial antifúngico das flavonas, foi observado efeito antimicrobiano para *S. cerevisiae* (FOMK) e *C. albicans* (ATCC 10231).

Polímeros

Entre os compostos antioxidantes com características fenólicas de ampla distribuição no reino vegetal, estão os derivados de polimerização, destacando-se os taninos e as ligninas (SOARES, 2002). Os taninos possuem alto peso molecular, e conferem a sensação de adstringência de muitos frutos e vegetais de forma geral. Baseado em sua estrutura, os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e taninos condensados. Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico, sendo subdivididos em galotaninos e elagitaninos (Figura 10 – pag. 75). São facilmente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas (MELLO e SANTOS, 2007).

Figura 10 - Exemplo de estrutura química de um tanino hidrolisável - β 1,2,3,4,6-pentagalatol-D-glucose.

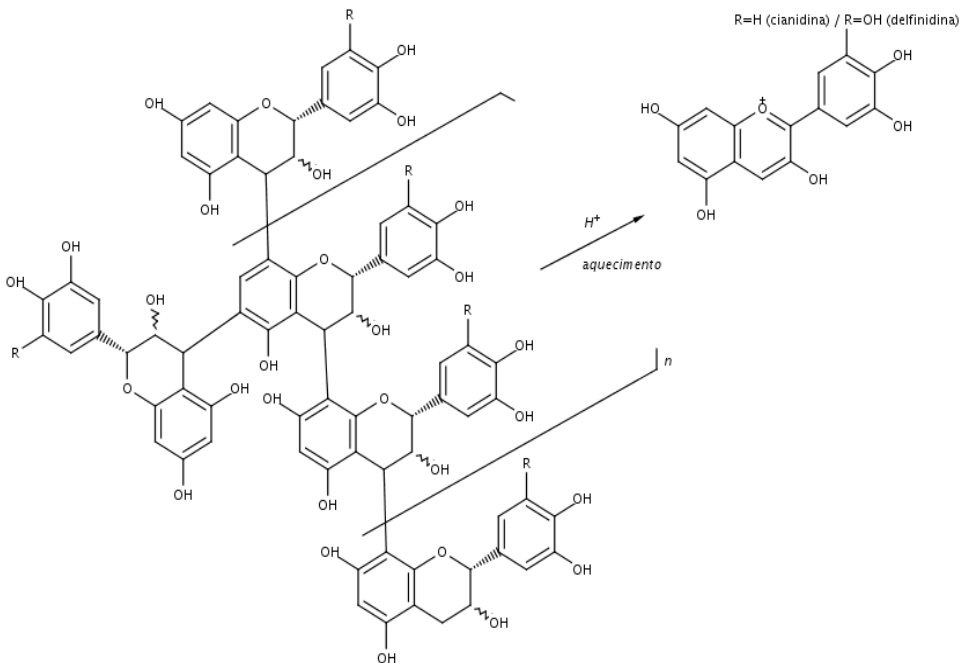


Fonte: MELLO e SANTOS (2007).

Os taninos condensados são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina, não sendo hidrolisáveis com facilidade por tratamento ácido (SOARES, 2002). Essas moléculas são oligômeros e

polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos também é denominada como proantocianidina, devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como a cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral e aquecimento (Figura 11 – pag. 76) (MELLO e SANTOS, 2007).

Figura 11 - Estrutura química geral de um tanino condensado (proantocianidina) sofrendo catálise ácida originando seus produtos de degradação.



Fonte: MELLO e SANTOS (2007).

Os taninos possuem três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e

hidrolisáveis. Eles são capazes de complexar com íons metálicos, entre eles o ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio e cálcio, e exercer atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Além disso, possuem a habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (MELLO e SANTOS, 2007).

Pesquisas realizadas por Sobrattee et al. (2005) reportaram dados de atividade antioxidante para procianidinas oligoméricas (proantocianidina B₁ e proantocianidina B₂), de 7,58 e 6,55 mmol de Trolox/L, respectivamente. Os taninos também são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica causada por lipoxigenases *in vitro*, além da habilidade de sequestrar radicais, tais como hidroxil, superóxido e peroxil. A atividade antioxidante aumenta, particularmente, nos taninos de maior grau de polimerização e, procianidinas B₁ e B₃ têm demonstrado maior capacidade antioxidante que o ácido ascórbico e o α -tocoferol, frente à oxidação do ácido linoléico em sistemas aquosos (SERRANO, et al., 2009).

Além da capacidade antioxidante, a propriedade antimicrobiana dos taninos, presentes em muitas plantas comestíveis, tem sido reportada em vários estudos. Em termos gerais, os taninos afetam o crescimento bacteriano através de vários mecanismos: inibição das enzimas microbianas extracelulares, indisponibilizando substratos necessários para o crescimento, ação direta no metabolismo microbiano através da fosforilação oxidativa, além da complexação de íons metálicos no meio de crescimento bacteriano (SERRANO, et al., 2009; SCALBERT, 1991).

Proantocianidinas têm sido associadas com a inibição da aderência de *E. coli* no uroepitélio, devido, provavelmente, a potente atividade de anti-adesão bacteriana exercida por essas moléculas de taninos. Além disso, estudos revelaram que compostos ricos em taninos exercem atividade antibacteriana contra vários patógenos intestinais. Outros estudos relataram que extratos ricos em elagitaninos foram capazes de exercer forte inibição do crescimento de *Staphylococcus spp.*, *Candida albicans* e *Campylobacter jejuni* (NOHYNEK et al., 2006; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2005).

Estudos em extratos de *Syzygium jambos* demonstraram que taninos presentes apresentaram atividade antibacteriana significativa

(77% no extrato aquoso e 83% no acetônico) superior ao de outras plantas até então estudadas (DJIPA et al., 2000). Ahmad e Beg (2005) também observaram ação antimicrobiana contra várias bactérias multiresistentes, em extratos etanólicos de plantas cultivadas na Índia, e relacionaram ao teor de taninos presente nos extratos estudados.

Além dos taninos as ligninas, outros compostos derivados de polimerização encontrados em vegetais, podem exercer atividade antioxidante e antimicrobiana. Ligninas são substâncias que se depositam nas paredes das células vegetais, conferindo a esta notável rigidez e resistência mecânica. Elas são macromoléculas, polímeros de unidades básicas $(C_6-C_3)_n$, abrangendo, usualmente, muitas unidades fenilpropânicas. Sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzóico e cinâmico. Subdividem-se em lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides de acordo com a complexidade de cada estrutura química (FILHO, 2007; SOARES, 2002).

Estudos evidenciam que esse grupo de substâncias está envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas. Sabe-se que as lignanas se acumulam em alguns tecidos vegetais como resposta a ferimentos mecânicos, exibindo também propriedades de defesa ao ataque de micro-organismos e insetos. Esse mecanismo de proteção, provavelmente, esteja relacionado com as atividades antioxidantes e antimicrobianas relatadas por alguns autores (FILHO, 2007).

Entre as ligninas, as neolignanas destacam-se por possuírem atividade antioxidante e antifúngica mais significativa. Seu representante mais conhecido é o ácido nor-di-hidroguaiarético (NDGA) (FILHO, 2007).

1.6 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS EM VEGETAIS

Entre as diversas técnicas de extração de compostos fenólicos bioativos, a mais utilizada ao longo dos anos, tem sido a extração com uso de solventes orgânicos (maceração, soxhlet e percolação). Porém, de acordo com Shahidi e Nacz (1995), não existe um sistema de extração com solventes orgânicos que seja satisfatório para o isolamento de todas ou de uma classe específica de antioxidantes

naturais em alimentos, uma vez que a natureza química e a quantidade destes compostos é muito variada. Além disso, existe a possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes. Dessa forma, sob o ponto de vista químico é difícil selecionar a metodologia mais eficiente para a extração desses compostos que podem sofrer a influência de diversos fatores.

Para o isolamento de compostos bioativos em fontes naturais (como frutas, sementes e especiarias), muitas vezes faz-se necessária a extração sequencial com solventes de polaridades diferentes. Estudos comparativos para a seleção do solvente ótimo são necessários, uma vez que a atividade dessas substâncias depende de que compostos polifenólicos estejam presentes e que exista uma atividade antioxidante máxima exigida para cada substrato. Várias pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de comparar seus resultados e encontrar a melhor alternativa para a sua aplicação em alimentos (ANDREO e JORGE, 2006; MOURE et al., 2001).

O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis, podendo variar de 1 minuto a 24 horas, ou até mesmo vários dias. No entanto, longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Além da natureza química dos compostos presentes na amostra, solvente utilizado e tempo de extração, a temperatura é outra variável importante durante o processo extrativo, pois ela pode afetar significativamente a estabilidade dos compostos polifenólicos. A decomposição térmica se constitui na maior causa da redução do conteúdo de compostos fenólicos, pois estes podem reagir com outros componentes impedindo a extração adequada e alterando o rendimento de extração (MOURE et al., 2001).

A extração com solventes orgânicos de variadas polaridades tem como principais restrições à presença de resíduo de solvente no extrato e a obtenção de compostos indesejáveis no produto. De acordo com Shahidi e Naczk (1995), normalmente são necessários procedimentos adicionais de extração a fim de purificar e remover compostos fenólicos indesejáveis ou substâncias não fenólicas. Por essas razões, processos de extração utilizando solventes orgânicos não

são totalmente eficientes para extrair todos os compostos fenólicos ou uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos (SHAHIDI e NACZK, 1995). No entanto, uma investigação com o uso de solventes orgânicos de diversas polaridades é muito útil quando se têm pouca ou nenhuma informação sobre a solubilidade dos compostos presentes no vegetal alvo de estudo. Pesquisas subsequentes devem ser realizadas através de métodos fazendo uso de solventes que produzam resíduos de menor toxicidade aumentando as perspectivas da aplicação desses extratos em sistemas alimentares. Além disso, devem-se buscar processos que operem em condições mais brandas, principalmente de temperatura, preservando os compostos bioativos presentes na matriz vegetal.

Existem alguns métodos para a extração de compostos fenólicos bioativos em vegetais reconhecidos como tecnologia limpa, com pouca ou nenhuma produção de resíduos tóxicos. Eles podem ser classificados, de forma geral, como convencionais, encontrando-se entre eles a infusão que emprega água como solvente, e a extração supercrítica, empregando CO₂ e uso de um cosolvente considerado *GRAS* (Geralmente Reconhecido como Seguro) (PEREIRA e MEIRELES, 2010; ANDREO e JORGE, 2006).

1.6.1 Extrações Convencionais

A água extrai com eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante devido à sua polaridade e várias metodologias de extração a utilizam como solvente. Um destes métodos é a infusão, que consiste no extrato preparado a partir da decocção do material em água fervente (98 a 100°C), seguida de filtração, sendo o extrato resfriado imediatamente depois de decorrido o tempo de extração. Esse procedimento é muito utilizado para preparação de chás e fitoterápicos em geral. A principal desvantagem da técnica de extração por infusão são as altas temperaturas empregadas que podem degradar compostos lábeis ao calor. Além disso, a água solubiliza outras substâncias, como polissacarídeos, aminoácidos, sais inorgânicos, entre outras impurezas, além dos compostos de interesse (IAL, 2008; DINÇER et al., 2005; MAU et al., 2005; CONDE et al., 1998).

Entre os processos de extrações convencionais que empregam o uso de solventes orgânicos, encontram-se a maceração, a percolação e a extração através de *Soxhlet*. O processo extrativo da maceração

constitui-se numa operação em que a extração dos compostos de interesse na matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado, sob a agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Entre as desvantagens no uso da maceração, destacam-se a baixa permeabilidade do solvente ao vegetal, reduzida solubilidade dos ativos a frio, saturação do solvente e lentidão do processo (SONAGLIO et al., 2007).

A percolação também é conhecida por lixiviação. É uma das técnicas mais eficientes para a extração de componentes ativos de vegetais. Caracteriza-se pela extração exaustiva de substâncias ativas submetendo o vegetal na forma pulverizada, previamente macerada e devidamente armazenada em um recipiente cilíndrico ou cônico (percolador de vidro ou metal), à ação de um solvente que atravessa toda a extensão do recipiente, se deslocando de cima para baixo. Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias ativas presentes em pequenas quantidades, quando estas são poucos solúveis ou ainda quando a disponibilidade de quantidades do vegetal é relativamente baixa. A principal desvantagem do uso da percolação são os grandes volumes de solvente necessários para a realização da extração (SONAGLIO et al., 2007).

A extração utilizando o equipamento *Soxhlet* é utilizada, sobretudo, para extrair compostos de interesse com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho de *Soxhlet*. Em cada ciclo de operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades usadas em outros processos extrativos, na obtenção dos mesmos resultados qualitativos e quantitativos. O principal inconveniente do emprego de *Soxhlet* são as altas temperaturas empregadas no processo, não caracterizando uma técnica indicada para extração de compostos termolábeis (BRUM, ARRUDA e REGITANO-D'ARCE, 2009).

1.6.2 Extração Supercrítica

As técnicas convencionais de extração de compostos bioativos, sejam as realizadas por arraste a vapor ou aquelas fazendo uso de solventes orgânicos, tem sido questionadas devido a possível degradação térmica de componentes termolábeis presentes na matéria-prima e pela contaminação do extrato com resíduos de solventes tóxicos. Além disso, a competitividade na área de compostos bioativos, que tem como fatores fundamentais a conquista de mercados, a qualidade, a disponibilidade e o preço, tornam necessário o emprego de técnicas modernas de extração, como a extração supercrítica, que se destaca por representar uma tecnologia que minimiza danos ao ambiente e que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (CASAS et al., 2007; MACHMUDAH et al., 2006).

A extração com fluidos supercríticos, em escala industrial, teve seu início na Alemanha, no final dos anos 1970, com o processo da remoção da cafeína do café. Essa tecnologia se destaca por fazer uso de uma tecnologia limpa, que não deixa resíduos, o trabalho com solventes menos agressivos ao meio ambiente, a inalteração das propriedades das matérias-primas e a extração de produtos de alta qualidade. A extração de matérias-primas naturais com CO₂ supercrítico resolve questões associadas com as altas temperaturas e com o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos à saúde do consumidor. As temperaturas empregadas podem ser relativamente baixas nesse processo e o gás carbônico, dissipa-se totalmente após a descompressão, no final da extração, sendo considerada uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, particularmente para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (PEREIRA et al., 2004; McNALLY, 1996; ANKLAM e MULLER, 1995; BRUNNER, 1994; ADAMS, 1991; PELLERIN, 1991). No entanto, o alto custo de instalação na planta industrial pode vir a ser um fator limitante ao uso dessa tecnologia em detrimento de outros processos mais econômicos, sendo necessários um rendimento e qualidade de extrato considerados significativos que justifiquem o custo de implantação da tecnologia de extração com fluido supercrítico.

Os princípios básicos da extração supercrítica são baseados nas propriedades físicas dos fluídos no estado supercrítico. Neste estado, a densidade é semelhante à de um líquido e a viscosidade próxima a dos gases, sendo o coeficiente de difusão maior que o observado para os líquidos. Esses fatores em conjunto, oferecem maior capacidade de dissolução para várias substâncias químicas, tornando a extração facilitada. Pequenas alterações nas condições de temperatura e pressão podem levar a mudanças significativas na solubilidade, permitindo um maior isolamento e seletividade dos compostos a serem extraídos (DINÇER et al., 2005; MAUL, WASICHY e BACCHI, 1996).

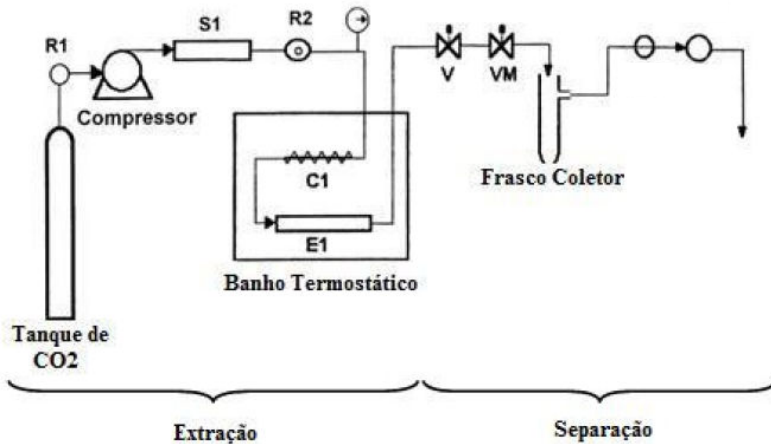
Devido às suas características e propriedades físicas (temperatura crítica = 31 °C e pressão crítica = 73,8 bar) o dióxido de carbono é o solvente supercrítico mais amplamente utilizado em comparação com outros gases ou líquidos. Entre as vantagens do uso do dióxido de carbono estão o fato deste solvente ser atóxico, bacteriostático, fisiologicamente inofensivo, facilmente acessível a baixo custo, considerado *GRAS* (geralmente reconhecido como seguro) e não ser inflamável ou explosivo (KASSING et al., 2010).

A desvantagem do uso do dióxido de carbono consiste no fato de que devido a sua baixa polaridade, a solubilidade de substâncias polares é bastante limitada, sendo necessária a adição de cosolvente para uma solubilização eficiente de compostos com características mais polares. Quando o objetivo é extrair esta classe de compostos, tais como os antioxidantes polifenólicos, combinações de dióxido de carbono e outros solventes, como o etanol, tem sido considerado como uma alternativa viável. O extrato final, com reduzida concentração do cosolvente, pode ser adicionado diretamente aos alimentos, sem maiores riscos para a saúde humana (KASSING et al., 2010; NAWZ et al., 1996). Em trabalho realizado por Sarmiento et al. (2008) foi observado que o percentual de etanol, em relação à massa da amostra, exerceu efeito positivo e significativo, contribuindo para uma melhora do rendimento na extração de polifenóis, embora limitada, a medida que era aumentada a concentração do cosolvente.

Os parâmetros mais típicos de produção fazendo uso da tecnologia supercrítica são pressões que variam de 100 a 500 bar, temperaturas de até 80°C, utilizando vazão de solvente de 6 a 30 kg de CO₂ por kg de material a ser extraído, e uso de cosolvente de até 20%

(KASSING et al., 2010). Na Figura 12 (pag. 84) pode ser observado o esquema geral de um equipamento de extração supercrítica.

Figura 12 – Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas, onde R1 corresponde ao regulador de pressão do cilindro, S1 ao pistão de compressão, R2 ao regulador de pressão, C1 à serpentina, E1 à coluna de extração, V à válvula abre-fecha e VM à válvula micrométrica.



Fonte: FERREIRA et al., 1999 adaptado por MEZZOMO, 2008.

1.7 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS ATRAVÉS DE ATOMIZAÇÃO EM SPRAY DRYER

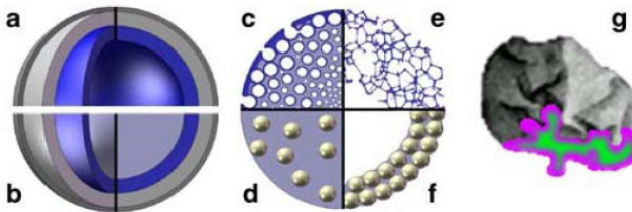
Pesquisas sobre a aplicação de polifenóis tem atraído grande interesse das indústrias de alimentos e farmacêutica, devido aos benefícios desses compostos para a saúde. No entanto, a efetividade dos polifenóis depende da preservação da estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos. Além disso, o sabor desagradável conferido por alguns compostos fenólicos também limita sua aplicação. A utilização de polifenóis encapsulados em vez de compostos livres, poderia efetivamente atenuar essas deficiências (FANG e BHANDARI, 2010).

O objetivo geral da microencapsulação é produzir partículas que controlem o transporte de massa, sendo a parede da microcápsula

encarregada de controlar a difusão do componente ativo do interior da microcápsula para fora (VILSTRUP, 2004).

Dependendo das características físico-químicas do material ativo, da composição da parede e da técnica utilizada no processo de microencapsulação, poderão ser obtidos diversos tipos de partículas. Os diferentes tipos de microcápsulas são classificadas de acordo com a complexidade da estrutura formada, podendo ser microcápsulas de sistema reservatório ou capsular (verdadeiras microcápsulas) e microcápsulas em sistema matricial (microesferas), sendo estes últimos, os modelos obtidos nos processos de atomização para os quais o termo micropartícula é mais apropriado. No sistema reservatório ou capsular o material ativo se encontra dentro de uma espécie de envoltório, uma fina camada de material de recobrimento, o polímero encapsulante. Na Figura 13 (pag. 85) são apresentadas partículas com o interior completamente recheado (13-a) e com o interior parcialmente vazio, caracterizando uma microcápsula oca (13-b). No sistema matricial, as microesferas, o material ativo se encontra disperso na matriz polimérica podendo apresentar estruturas em forma de espuma, onde o material de recheio se encontra repartido em toda a micropartícula (13-c) ou numa estrutura aberta em forma de rede (13-e). Também podem resultar micropartículas em que o material ativo está disperso na matriz e serve como uma espécie de cobertura, tanto em esferas completas (13-d) como na periferia (13-f). A forma das micropartículas poderá ser esférica ou apresentar formas irregulares (13-g).

Figura 13 - Morfologia dos diferentes tipos de micropartículas.



Fonte: VEHRING (2008).

Entre as tecnologias de encapsulação, a atomização através de Spray Dryer tem recebido destaque na indústria de alimentos desde a

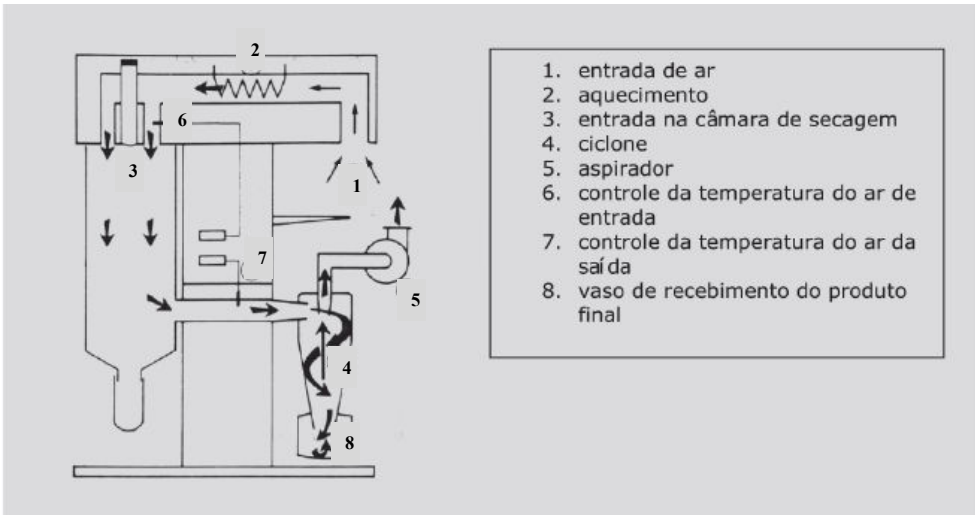
década de 1950. Devido constituir uma técnica relativamente econômica, flexível, de operação contínua e produzir partículas de boa qualidade é a mais utilizada na indústria de alimentos (DESAI e PARK, 2005).

No processo de atomização em Spray Dryer, o material a ser encapsulado é homogeneizado juntamente com o polímero (material de parede) e a mistura é atomizada com auxílio de um bico atomizador. A evaporação do solvente, que freqüentemente é a água, é rápida através do contato com o ar aquecido, sendo o composto envolvido pelo polímero formando a micropartícula quase que imediatamente. As partículas obtidas no final do processo são geralmente esféricas e variam de tamanho entre 10 e 100 μm (FANG e BHANDARI, 2010; GHARSALLAOUI et al., 2007; GIBBS et al., 1999).

Esse processo tem sido utilizado para obtenção de micropartículas de vários compostos bioativos de origem natural para produção de nutracêuticos, tais como extratos com propriedades antioxidantes, fibras de frutas comestíveis e probióticos (CHIOU e LANGRISH, 2007; HOMAYOUNI et al., 2008).

Na Figura 14 (pag. 87) pode ser observado o esquema de processo de atomização em Spray Dryer com sistema concorrente de ar de secagem.

Figura 14 – Esquema do Spray Dryer e do fluxo de ar de secagem.



Fonte: LANNES e MEDEIROS (2003).

Uma das limitações da tecnologia de atomização através de Spray Dryer para encapsulação de polifenóis é o número limitado de materiais de parede utilizáveis (DESAI e PARK, 2005). Misturas utilizando maltodextrinas e goma arábica (polímero de ácido D-glucurônico, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose e aproximadamente 2% de proteína), tem sido empregadas na obtenção de micropartículas desses compostos, especialmente de proantocianidinas, obtendo resultados satisfatórios em termos de eficiência de encapsulação (88,84%) e maior estabilidade do produto final (GHARSALLAOUI et al., 2007; ZANG, MOU e DU, 2007).

As maltodextrinas podem prover uma boa estabilidade oxidativa à micropartícula, porém apresentam reduzida capacidade emulsificante. A goma arábica, apesar de sua limitada capacidade de barreira à permeabilidade do oxigênio e conseqüentemente pouco efetiva na prevenção do processo de oxidação do material encapsulado, possui boa atividade emulsificante (GHARSALLAOUI et al., 2007). Considerando as características desses polímeros, misturas de polímeros de maltodextrina (dextrose equivalente entre 10

e 20) e goma arábica, associados a um emulsificante, podem constituir uma opção na encapsulação de polifenóis.

1.8 ANÁLISE DE COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS

1.8.1 Análise fitoquímica

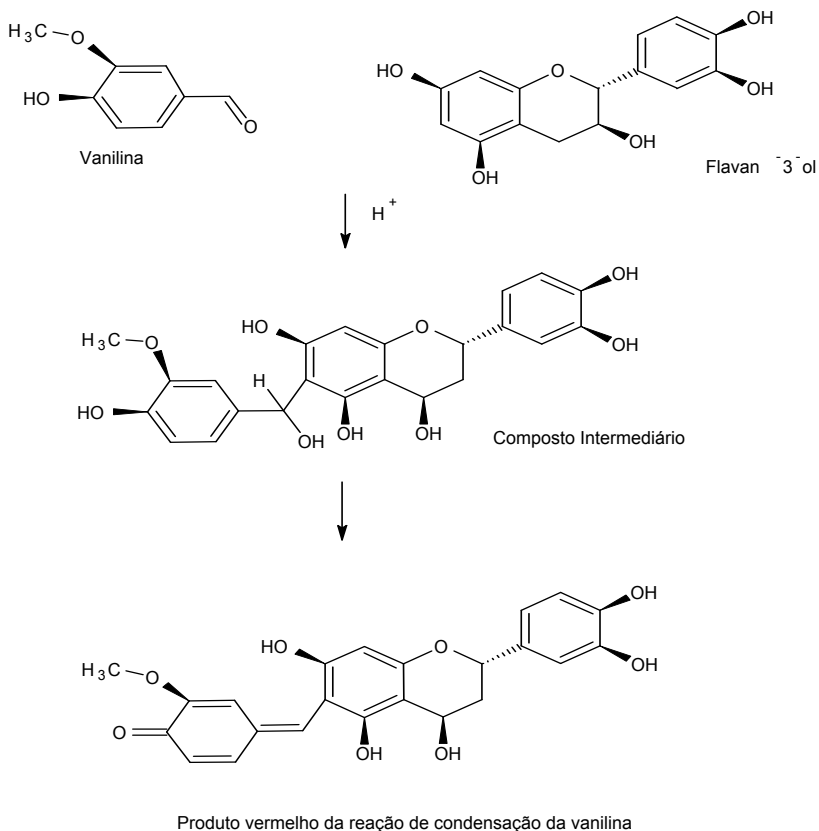
Vários métodos para análise de compostos fenólicos já foram desenvolvidos e um grande número de revisões sobre a análise de polifenóis publicados. Os resultados da análise de compostos fenólicos são influenciados pela estrutura química do composto, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método utilizado para análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de compostos fenólicos totais em amostras provenientes de plantas e alimentos (BEAL, 2006; SALUNKHE, CHAVAN e KADAM, 1989).

Para realizar o cálculo do conteúdo de compostos fenólicos totais presentes na amostra são utilizadas curvas analíticas e os resultados são expressos em termos de equivalentes molares do composto fenólico ocorrente mais comum, como o ácido gálico, a (+)-catequina, o ácido tânico e, com menor frequência, ácido ferúlico. O ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico) tem sido utilizado como equivalente molar na determinação de compostos fenólicos totais de forma universal em ensaios de várias frutas e vegetais, ervas, vinhos e extratos de plantas (KYOUN CHUN e KIM, 2004).

O método da Vanilina tem sido utilizado com bastante frequência por vários grupos de pesquisadores para a determinação de taninos condensados ou proantocianidinas em frutas e outros materiais provenientes de plantas devido a sua simplicidade, sensibilidade e especificidade. Este ensaio é específico para moléculas flavan-3-ol, diidrochalconas e proantocianidinas, que possuem uma ligação simples na posição 2, 3 e grupos livres na posição meta-hidroxi no anel B. O padrão equivalente normalmente utilizado no teste da Vanilina tem sido a catequina (SHAHIDI e NACZK, 2004b; PRICE, VANSCAYOC e BUTLER, 1978). O ensaio de Vanilina em metanol é mais sensível para taninos flavan-3-ol poliméricos que para os monoméricos e pode ser usado para quantificar taninos condensados

na faixa de 5 a 500 μg com precisão e exatidão maior que 1 μg quando a concentração ótima de reagentes e solventes é selecionada. Como pode ser observado na Figura 15 (pag. 89), o método da vanilina é baseado na condensação da vanilina com proantocianidinas em soluções acidificadas. A vanilina protonada, um radical eletrofílico fraco, reage com o anel flavonóide na posição 6 ou 8. O produto intermediário desta reação torna-se levemente rosa passando para um tom vermelho formando o produto final da reação (SHAHIDI e NACZK, 2004b; BROADHURST e JONES, 1978).

Figura 15 - Representação esquemática de reações de condensação da vanilina com leucoantocianidina.



Fonte: SHAHIDI e NACZK (2004b).

As metodologias colorimétricas permitem, de forma geral, a identificação de grupos de compostos, como os compostos fenólicos totais, taninos condensados e antocianinas. Porém para identificar os compostos específicos presentes em cada grupo analisado pelo método colorimétrico, metodologias adicionais são necessárias.

Análises cromatográficas, principalmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido uma técnica amplamente utilizada para determinação do perfil de compostos fenólicos em extratos vegetais. Os métodos cromatográficos de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de matrizes complexas, como a de produtos naturais. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas. Nas análises realizadas por CLAE, o uso de detectores como índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz, fluorescência e outros, aliados a *softwares* eficientes, permitem também a análise quantitativa dos componentes presentes em misturas, mesmo em concentrações reduzidas (LANÇAS, 2009).

O preparo das amostras para a análise por CLAE pode comprometer drasticamente o resultado do perfil de polifenóis. Métodos utilizando hidrólise básica e ácida tem sido utilizados por alguns pesquisadores para determinação do perfil fenólico de extratos de noz-pecã. Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007) identificaram os ácidos gálico e elágico e reportaram uma provável degradação de catequinas em extratos de torta de noz-pecã. De La Rosa et al. (2011) avaliando amostras da casca de noz-pecã empregando hidrólise ácido / básica seguida de análise em equipamento de CLAE acoplado a um espectrômetro de massas, também detectaram apenas os ácidos gálico e elágico. Malik et al. (2009) reportaram a presença de catequinas em amostras de torta de noz-pecã fazendo uso de uma coluna lipofílica (LH-20 Resina Sephadex ®) antes da injeção em equipamento de CLAE acoplado a um espectrômetro de massas, ressaltando que severas condições de hidrólise alcalina, podem comprometer a detecção desses compostos.

1.8.2 Avaliação da atividade antioxidante

Ensaio in vitro

Evidências epidemiológicas do papel de antioxidantes na neutralização de radicais livres em alimentos ricos em ácidos graxos insaturados, como também na prevenção de certas doenças relacionadas à oxidação de membranas biológicas, têm estimulado o desenvolvimento de ensaios para determinar a atividade antioxidante. Vários métodos têm sido desenvolvidos, nos quais a atividade antioxidante é avaliada através de diversas formas, seja pelo seqüestro de radicais peroxil (ORAC - Capacidade de absorver radicais oxigênio, TRAP - Método de sequestro total de radicais peroxil), poder redutor de metais (FRAP - poder antioxidante / redutor férrico, CUPRAC - capacidade antioxidante/ redutora cúprica), sequestro do radical hidroxil (ensaio de deoxirribose), quantificação de produtos formados durante a peroxidação lipídica (TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, oxidação do LDL) e sequestro de radicais orgânicos (ABTS - 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazil) em solventes como o metanol, a temperatura ambiente (ARUOMA, 2003; GORDON, 2001; FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI e SAURA-CALIXTO, 1998).

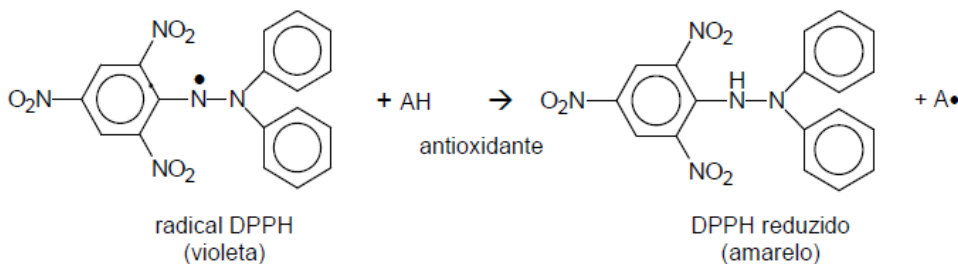
A metodologia ORAC é baseada no seqüestro do radical peroxil, gerado pelo processo oxidativo no corpo humano. Neste ensaio o radical peroxil é gerado pela molécula orgânica 2,2'-azobi (2-aminodinoopropano) diidrocloreto (AAPH) e ataca a molécula fluorescente 3,6'-diidroxí-espiro (isobenzofurano-1 (3H), 9'(9H)-xanten)-3-ona, gerando um decréscimo na emissão da fluorescência, que é monitorada. A área na curva é mensurada e interpolada para uma curva padrão e os resultados expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox). A molécula de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) é um antioxidante sintético derivado do α -tocoferol, com estrutura similar a vitamina E (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006; MADHAVI e SALUNKHE, 1995).

No ensaio de FRAP (baseado na habilidade de redução do ferro) o complexo férrico-tripiridiltriazina é reduzido em meio ácido, formando um composto colorido na presença de antioxidantes

causando um aumento na absorbância em 595 nm. A absorbância atinge um ponto final fixo e é interpolada através de uma curva analítica construída com diferentes concentrações de Trolox, e os resultados expressos em TEAC (BENZIE e STRAIN, 1996).

Na metodologia com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o decréscimo da absorbância é monitorado em 515 nm, que ocorre devido à redução do radical (Figura 16 – pag. 92), pela ação do antioxidante (AH) ou reação com uma espécie radicalar (R·) (MOLYNEUX, 2004).

Figura 16 - Representação esquemática da redução do radical DPPH.



Fonte: MOLYNEUX (2004).

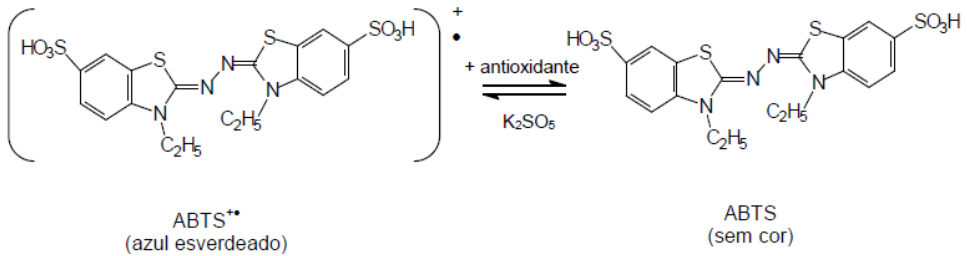
O radical DPPH reage rapidamente com alguns fenóis e α -tocoferol, mas ocorrem reações secundárias concomitantemente de forma lenta causando um progressivo decréscimo na absorbância, podendo demorar várias horas para que a reação seja estabilizada. Muitos trabalhos em que o método DPPH tem sido utilizado reportam o seqüestro do radical após 15 ou 30 minutos de tempo de reação. Os dados são comumente expressos como EC50, que é a concentração de antioxidante requerida para o sequestro de 50% do radical DPPH no período de tempo especificado. Paralelamente, com menor frequência, alguns trabalhos expressam os resultados do ensaio DPPH em TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox), através da medida do decréscimo da absorbância (BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER e

BERSET, 1995). Este método tem sido recentemente modificado para ser medido através de CLAE em substituição aos métodos espectrofotométricos (CHANDRASEKAR, et al., 2006).

Outra metodologia similar ao DPPH é o ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. O radical cátion ABTS é mais reativo que o radical DPPH e a reação do radical ABTS com o antioxidante pode ocorrer num período de 1 a 6 minutos. O método da geração do radical cátion tem sofrido muitas mudanças desde sua primeira descrição. Trabalhos recentes descrevem o uso de persulfato de potássio para oxidar o ABTS para o cátion radical. Os resultados do método ABTS são expressos como TEAC na maioria dos trabalhos que empregam essa metodologia (RE et al., 1999).

O método ABTS é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante. Foi primeiramente sugerido por Rice-Evans, et al. (1993) apud Beal (2006). O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical produzido pela oxidação do radical ABTS, causada pela adição de uma amostra contendo compostos com atividade antioxidante. O ABTS absorve na faixa de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de antioxidantes, o ABTS é estável, mas ele reage energeticamente com um doador de H, como os compostos fenólicos, sendo então convertido em uma forma incolor. A quantidade de radical ABTS consumida está relacionada à reação com os compostos fenólicos presentes na amostra (CAMPOS e LISSI, 1997). Na Figura 17 (pag. 94) podem ser observadas as estruturas do radical ABTS.

Figura 17 - Representação esquemática do radical ABTS e radical cátion ABTS.



Fonte: MOON e SHIBAMOTO (2009).

Outra metodologia bastante utilizada na pesquisa de substâncias com atividade antioxidante é o método β -caroteno/ácido linoléico. Esse ensaio baseia-se na perda de cor do β -caroteno durante sua cooxidação com o ácido linoléico em uma emulsão aquosa, monitorada com a diminuição da absorbância na região visível na faixa de 470 nm (MILLER, 1971). A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais (VON GADOV, JOUBERT e HANSMANN, 1997), ou extratos naturais (MOURE et al., 2000) resulta no retardo da perda de cor do β -caroteno. O ensaio quantifica a atividade antioxidante como porcentagem de inibição.

Todos os métodos utilizados na avaliação da atividade antioxidante em alimentos são fortemente influenciados pelos solventes utilizados durante o processo de extração (PELLEGRINI, et al., 2007). A efetividade do antioxidante nos alimentos deve ser estudada através de mais de uma metodologia, devido ao fato da atividade antioxidante sofrer influência de diversos fatores incluindo polaridade, solubilidade, e atividade quelante de metais (GORDON, 2001).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm observado a influência do solvente utilizado no procedimento de extração em diversas metodologias que avaliam a atividade antioxidante, como ORAC, DPPH, FRAP e ABTS. O tipo e polaridade do solvente

empregado pode afetar aspectos chave na medida da atividade antioxidante, como a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

Em estudos realizados com soluções de catequina e ácido gálico e constituintes de alimentos, foram encontradas diferenças significativas nos resultados da atividade antioxidante empregando o mesmo método em amostras solubilizadas com diferentes solventes. Para o método ABTS, foi reportado que o solvente mais polar registrou os maiores valores para a solução de catequina e ácido gálico, sendo que o DPPH apresentou uma influência menor nos resultados obtidos. As mesmas metodologias quando testadas utilizando uma amostra contendo constituintes presentes nos alimentos não-antioxidantes, demonstraram que certos constituintes como aminoácidos e ácidos urônicos também apresentam um efeito interferente nesses ensaios. Esses pesquisadores concluíram seu estudo sugerindo que medidas de atividade antioxidante de uma amostra só podem ser comparadas com segurança, quando analisadas pela mesma metodologia e extraídas com o mesmo solvente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

Algumas pesquisas com antioxidantes naturais produziram resultados conflitantes devido o uso de métodos unidimensionais não específicos para avaliar a atividade antioxidante. Existe uma grande necessidade de padronizar os testes utilizados na avaliação da atividade antioxidante com a finalidade de minimizar a atual confusão gerada pela diversidade de metodologias utilizadas. Infelizmente, muitos dos protocolos analíticos usualmente utilizados estão baseados em sistemas modelos que muitas vezes não são relevantes para serem aplicados em sistemas biológicos. Métodos mais específicos devem ser utilizados para obter informações químicas e avaliar a deterioração oxidativa de vários alimentos e sistemas biológicos. Marcadores da atividade *in vivo* da oxidação lipídica são necessários para testar a grande diversidade de antioxidantes naturais polifenólicos e definir de forma mais específica seu papel biológico (FRANKEL, 2007).

Aruoma (2003) recomenda a realização de estudos *in vitro* através de mais de uma metodologia para que os dados possam ser extrapolados para situações *in vivo*. Além disso, fatores como biodisponibilidade e o destino dos metabólitos dos componentes

antioxidantes devem ser considerados no estudo da compreensão e eficácia de uma substância com propriedades antioxidantes.

De acordo com estudos conduzidos por Olthof, Hollman e Katan (2001), os polifenóis que atingem o colo podem ser degradados em compostos menores pela microbiota presente nesse local, sendo desconhecida a real absorção e metabolização completa desses metabólitos até chegar à urina. Além disso, o problema da redução de atividade antioxidante encontrado em metabólitos pequenos originados de compostos parentais maiores aumenta o nível de incertezas sobre os estudos de biodisponibilidade, sendo difícil a previsão de efeitos de fitoquímicos em células hospedeiras (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Ensaio em sistemas lipídicos

Experimentos avaliando a atividade antioxidante em óleos e gorduras têm sido realizados por diversos pesquisadores. A maioria dos artigos publicados testa extratos naturais em óleos comestíveis, com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante, submetendo o óleo a processos acelerados de oxidação.

As metodologias mais utilizadas nos ensaios de avaliação do processo oxidativo em condições aceleradas são o método do oxigênio ativo ou teste de Swift, “*Schaal Oven Test*” ou estufa de Schaal e método OSI (Índice de Estabilidade Oxidativa) (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

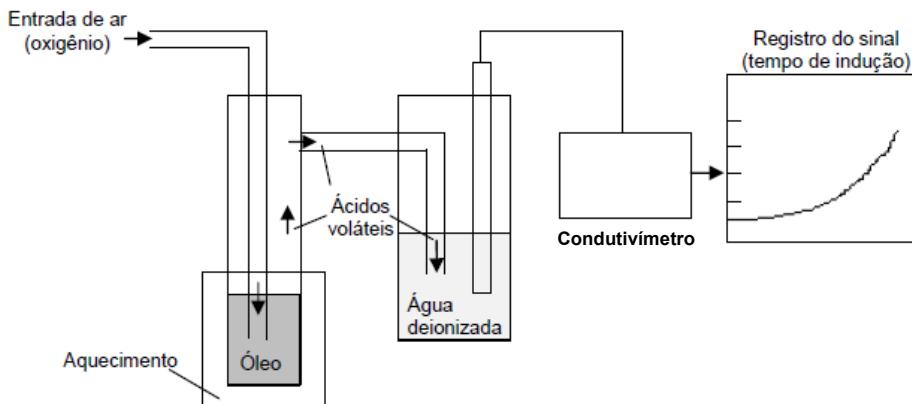
O teste de Swift consiste em aquecer o óleo ou gordura (vegetal ou animal) a 98°C, submetendo a uma corrente de ar purificado sob fluxo constante e borbulhamento. O índice ou teor de peróxidos (compostos formados durante o processo oxidativo) é determinado em intervalos regulares pelo método iodométrico. O teste decorre durante o tempo necessário até que atinja valores nos limites específicos da metodologia para o índice de peróxidos em óleos vegetais e gorduras animais. O período de indução (em que deve ser máxima a ação do antioxidante testado) é determinado através de um gráfico de valores do índice de peróxidos em função do tempo. O princípio desse método é criticado por alguns autores pelo fato de que mede simultaneamente o nível de peróxidos resultante de processos de formação e de decomposição (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

O “*Schaal Oven Test*” ou estufa de Schaal consiste no aquecimento a 60 – 70 °C da amostra (entre 20 e 100 g), em estufa termostatazada. O tempo de permanência na estufa pode variar de 7 a 15 dias. As amostras são analisadas em intervalos de tempos regulares. Os testes mais utilizados para a avaliação do estado de oxidação dos óleos e gorduras são o índice de peróxidos (produtos primários da reação de oxidação), extinção específica ou dienos e trienos conjugados (produtos secundários da reação de oxidação) e, o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA – avalia produtos secundários da reação de oxidação sendo mais específico para amostras de produtos cárneos), com a finalidade de avaliar a formação de compostos primários e secundários da oxidação, sendo o TBA específico para produtos secundários (GOLI, BARZEGAR e SAHARI, 2005; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; WANASUNDARA, SHAHIDI e AMAROWICZ, 1998).

Métodos mais sofisticados para a avaliação de compostos secundários da oxidação podem ser utilizados. A cromatografia a gás tem sido utilizada para o estudo da cinética de desaparecimento dos ácidos graxos presentes na amostra, após extração e derivatização. Análises por “*headspace*” também podem ser úteis na detecção de compostos voláteis, principalmente para o pentano e o hexanal, originários da degradação dos ácidos graxos linoléico e araquidônico (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

O método OSI é realizado em condições de trabalho similares à metodologia do oxigênio ativo, porém neste caso são avaliados os produtos secundários de oxidação ao invés de se determinar os produtos primários (peróxidos). A metodologia do OSI baseia-se na determinação automática do tempo decorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo. Esse tempo, conhecido como tempo de indução ou índice de estabilidade do óleo, é determinado pela medida do aumento da condutividade da água deionizada, devido aos compostos finais de oxidação que nela são borbulhados (FARHOOSH, 2007; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). Na Figura 18 (pag. 98) pode ser observada a representação esquemática do OSI.

Figura 18 - Representação esquemática do equipamento OSI.



Fonte: SILVA, BORGES e FERREIRA (1999).

1.8.3 Avaliação da atividade antimicrobina de extratos vegetais

Uma grande variedade de metodologias utilizadas em laboratório pode ser empregada para mensurar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias a agentes com atividade antimicrobiana. Os resultados desses testes são de grande importância em estudos sobre epidemiologia de resistência, e em investigações sobre novos agentes antimicrobianos (NCCLS, 20003ab, 2002ab). Os principais métodos microbiológicos utilizados na detecção de atividade antimicrobiana podem ser classificados em ensaios bioautográficos, ensaios de difusão e ensaios de diluição.

Os ensaios bioautográficos são métodos que empregam a placa de cromatografia de camada delgada (CCD) para a análise. Os compostos são separados por CCD e colocados por contato ou imersão em placas de ágar, previamente inoculadas com o micro-organismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas. Esses métodos têm importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos em vegetais, pois permitem a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa (BRANDÃO, 2004; HOSTETTMANN e MARSTON, 1994; RIOS et al., 1988).

Os ensaios de difusão são métodos que podem ser classificados como quantitativos, pois o efeito antimicrobiano pode ser graduado. Essa metodologia fundamenta-se na difusão da substância a ser testada em um meio de cultura sólido e inoculado com um micro-organismo. A partir da difusão, ocorre o aparecimento de um halo, onde não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados, incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura. A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão ou difusão em ágar, método dos cilindros e métodos dos orifícios. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição produzidos são medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos (VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991; RIOS et al., 1988).

A atividade antimicrobiana pode ser significativamente influenciada pelo tipo e tamanho do disco ou orifício, pH, pela capacidade do composto em se difundir no meio de cultura, pelas propriedades do meio e pelo micro-organismo investigado. Nesse método, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar. Entretanto, o pequeno volume de amostra necessário e a possibilidade de testar cinco a seis compostos por placa, frente a um único micro-organismo, são vantagens do método de difusão em ágar. Dentre os métodos de difusão, o que utiliza disco é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco antes da colocação no meio de cultura (BRANEN, 1993; VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991; RIOS et al., 1988).

Os métodos de diluição, por sua vez, são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testados são adicionados a meios de culturas líquidos ou sólidos adequados, previamente inoculados com o micro-organismo teste. Após a incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura teste com o controle negativo (meio de cultura inoculado sem adição de substância inibidora) ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado. O método de diluição pode ser

realizado de várias formas, dentre elas, o método da diluição em placa de microtítulo. Métodos que empregam placas de microtitulação são mais econômicos, pois permitem avaliar simultaneamente diversas concentrações da substância antimicrobiana (BRANDÃO, 2004; ELOFF, 1998; MANN e MARKHAM, 1998; VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991).

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta a metodologia mais complexa, entretanto, alguns pesquisadores o consideram como o mais preciso. Esse método é recomendado principalmente para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI). A CMI constitui-se na menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo num determinado tempo, observada nos ensaios realizados em tubos ou em placas. Alguns autores definem CMI como a concentração mínima bactericida e/ou bacteriostática (BURT, 2004; NCCLS, 2003ab, 2002ab; MANN e MARKHAM, 1998; DAVIDSON e PARISH, 1989; RIOS et al., 1988). Smith-Palmer et al. (1998) descreveram ambas diferenciando uma da outra como concentração bacteriostática aquela na qual a bactéria deixa de crescer em caldo, mas consegue se desenvolver quando o caldo é repicado para outro meio de cultura, e concentração mínima bactericida aquela que mesmo após o repique para outro meio de cultura, continua sem se desenvolver.

1.9 APROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

A indústria de alimentos processados gera uma quantidade substancial de subprodutos ricos em compostos fenólicos, que podem vir a constituir uma fonte de antioxidantes naturais. Alguns destes subprodutos com propriedades antioxidantes têm sido objeto de investigações provendo fontes efetivas de compostos fenólicos capazes de agir no processo oxidativo (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

A atividade antioxidante das substâncias fenólicas presentes em subprodutos tem sido avaliada frequentemente em pesquisas realizadas com alimentos ricos em ácidos graxos insaturados, suscetíveis ao processo de oxidação. Entre os alimentos ricos em lipídios, os óleos vegetais têm sido muito utilizados nas pesquisas, em

ensaios em que a estabilidade oxidativa dos mesmos é testada após a adição de extratos de substâncias naturais, confrontando com antioxidantes sintéticos de capacidade antioxidante conhecida (MOURE et al., 2001). Quando testado com óleos vegetais, óleo de peixe e produtos cárneos, os extratos ricos em compostos fenólicos têm demonstrado atividade antioxidante comparável e até mesmo superior a dos antioxidantes sintéticos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Kiristakis et al. (2010) testaram a adição de extratos ricos em compostos polifenólicos obtidos de folhas de oliva em óleo de oliva extra virgem. Esses autores comparam o efeito dos extratos metanólicos e aquosos com o efeito de um antioxidante natural (extrato de alecrim) e outro sintético (TBHQ), submetendo as amostras à análise pelo método OSI. Eles observaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante dos extratos das folhas de oliva e o conteúdo de compostos fenólicos totais. Além disso, o tempo de indução das amostras adicionadas dos antioxidantes padrões e extratos testados foi significativamente maior que o controle (sem adição de antioxidantes).

Iqbal e Bhangar (2007) realizaram estudos do emprego de extratos de alho em óleo de girassol durante armazenamento em que os óleos foram submetidos à oxidação acelerada. Os extratos foram adicionados nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm, utilizando como padrões 200 ppm de BHA e BHT. Os extratos de alho demonstraram uma potente atividade antioxidante na estabilização do óleo de girassol.

Suja et al., (2004) testaram a eficácia de extratos preparados a partir da torta de gergelim na proteção de óleos vegetais. A atividade antioxidante dos extratos foi testada nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 ppm nos óleos de soja, girassol e cártamo. Os índices de peróxido, dienos e p-anisidina foram monitorados durante armazenamento a 60°C sendo utilizado o óleo adicionado de 200 ppm de BHT como controle. O extrato da torta de gergelim demonstrou efetiva eficácia na proteção de óleos vegetais mesmo em baixas concentrações podendo ser usado como substituto de antioxidantes sintéticos.

Bera, Lahiri e Nag (2006) adicionaram extratos de *Carum copticum* no óleo de linhaça e reportaram um aumento na estabilidade

térmica do óleo constituindo-se uma fonte alternativa de antioxidante natural para o óleo de semente de linhaça.

Extratos metanólicos e aquosos de cascas de pistaches foram adicionados nas concentrações de 0,02 a 0,06 % em óleo de soja contendo aproximadamente 40 ppm de tocoferóis naturais. Outro estudo paralelo foi conduzido adicionando antioxidantes sintéticos (BHA e BHT) nas concentrações de 0,01 a 0,02 %. As amostras foram submetidas a teste de estufa para oxidação acelerada (60°C) durante 15 dias. O extrato obtido da casca de pistache mostrou-se efetivo no retardo da deterioração do óleo nas concentrações de 0,02 a 0,06 % sendo similar ao BHA e BHT, quando adicionado na concentração de 0,02 % (GOLI, BARZEGAR, SAHARI, 2005).

Óleo de palma adicionado de folhas de *Ficus exasperata* apresentou aumento na estabilidade oxidativa, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos e terpenóides presentes nas folhas de *Ficus exasperata* (UMERIE, OGBUAGU e OGBUAGU, 2004).

2 CONCLUSÕES

Considerando a importância das pesquisas envolvendo compostos polifenólicos com propriedades antioxidantes e antimicrobinas, e o despertar de uma consciência por alimentos mais saudáveis, a noz-pecã denota seu valor não somente como alimento, mas também como fonte de aditivos naturais. Pesquisas confirmatórias e investigativas das características nutricionais e fitoquímicas da amêndoa e da casca de noz-pecã e, a avaliação do uso de tecnologias para o aproveitamento dessa matéria prima é encorajada diante de seu significativo potencial nutritivo, bioativo e econômico.

A casca da noz-pecã, apesar de sua capacidade antioxidante equivalente a matérias primas como o chá verde, ainda possui uma participação discreta no mercado de produtos naturais. A obtenção de micropartículas contendo os compostos bioativos (polifenóis antioxidantes e antimicrobianos) surge como uma fonte alternativa de renda importante, pela agregação de valor econômico a um resíduo agroindustrial de cultura essencialmente orgânica, isenta de contaminantes agrotóxicos, além de permitir aos produtores uma maior lucratividade no final do processo. Esse fato incentivaria uma extensão no número de pomares de nogueiras na região sul do Brasil, que apesar

de apresentar condições apropriadas de solo e clima para a cultura, o cultivo ainda é pouco expressivo na região.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. K. Analysis of coffee: production and trade. Allentown: **Liquid Carbonic Industries Corporation**, 1991. p. 1-30.

AHMED, M. K.; DAUN, J. K; PRZYBYLSKI, R. FT – IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastoquinone-8 in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p. 359 – 364, 2005.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drugs resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 74, p. 113- 123, 2005.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. B.CEPPA, Curitiba v.24, n.2, p. 319 - 336, 2006.

ANKLAM, E.; MÜLLER, A. Extraction of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, v. 50, p. 364-5, 1995.

ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 9, n. 20, p. 523 - 524, 2003.

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

BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)** 2006. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2006].

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70 - 76, 1996.

BERA, D.; LAHIRI, D.; NAG, A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.542-545, 2006.

BIRCH, A.E. et al. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4502 - 4507, 2001.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 13, p.316-347. Título do original: Microbiology.

BOOTH, I.R. Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria. **Microbiological Reviews**,v. 49, p. 359 - 378,1985.

BRAMLEY, P. M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F. J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H. E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P. J. A.; WAGNER, K-H. Review Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 913 - 938, 2000.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER A.E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v.28, p. 25 - 30, 1995.

BRANDÃO, G.C. **Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de Polygonum Spectabilis e Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 194 p (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

BRANEN, A.L. Introduction to the use of antimicrobials. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) **Antimicrobials in foods**, 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1993, p. 1-9.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. **Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

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

BROADHURST, R.B.; JONES, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p 788 - 794, 1978.

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009 .

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1991, 1 ed., 594 p.

BRUNNER, G. **Gas extraction: na introduction to Fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. v.4. Darmstadt: Steikopff, 1994.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, p. 219 - 224, 1997.

CANO-CABRERA, J.C.; ALVARADO-ESPINOSA, J.; ILINA, A.; AGUILAR-GONZÁLES, C.N.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.L. Efecto de extractos acuosos de *Larrea tridentata*, *A. lecheguilla* Y Cáscara de Nuez (*Carya illinoensis*) contra micro-organismos fúngicos. **Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**, 2009.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterocíclicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F.A.; MARTÍNEZ, E. DE LA OSSA. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p.43–49, 2007.

CHANDRASEKAR, D.; MADHUSUDHANA, K.; RAMAKRISHNA, S.; DIWAN, P.V. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 460 - 464, 2006.

CHENSON, A.; STEWARD, C.; WALLACE, R. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 597- 603, 1982.

CHIOU, D.; LANGRISH, T.A.G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p.84-91, 2007.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1118 – 1125, 2000.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) **Coffee chemistry**. v. 1, London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 153-202.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins: occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362 - 372, 1999.

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.21, p. 299 - 308, 2003.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCIA-VALLEJO, M.C.; SIMÓN, B.F. Polyphenolic composition of *Quercus súber* cork from different spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8. p. 3166 – 3171, 1998.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564 - 582, 1999.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

CRUZ-VEGA, D.E.; VERDE-STAR, M.J.; SALINAS-GONZÁLEZ, N.; ROSALES-HERNÁNDEZ, B.; ESTRADA-GARCÍA, I.; MENDEZ-ARAGÓN, P.; CARRANZA-ROSALES, P.; GONZÁLEZ-GARZA, M.T.; CASTRO-GARZA, J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 557 – 559, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVIDSON, P.M. Parabens and phenolic compounds. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) **Antimicrobials in foods**, 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1993. p. 1-9.

DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, 1993. 647 p.

DAVIDSON, P.M.; PARISH, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, January, p. 148-155, 1989.

DE CARVALHO, V.D. Bromatological characteristics of pecan nuts (*Carya illinoensis* Koch) cultivated in Brazil. **Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo**, v.13, n.2, p.293 – 301, 1975.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DE LA ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.152-162, 2011.

DESAI, K.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v.23, p. 1361 – 1364, 2005.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p. 505 - 512, 2006.

DINÇER, S.; AKGUN, N.; AKGUN, M.; AKGERMAN, B. Aspectos gerais acerca de la extracción por fluido supercrítico. **Aceites & Grasas**, v. 4, n. 61, p. 652 – 661, 2005.

DIVINUT. Saúde, sabor e requinte. Disponível em www.divinut.com.br, acesso em 11/02/2011.

DJIPA, C.; DELMÉE, D.; QUETIN-LECLERQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **J Rethnoph.**, Limerick, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000.

ELOFF, J.N.P. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medicine**, v. 64, p. 711-713, 1998.

EMATER. ASSOCIAÇÃO RIOGRANDENSE DE EMPREENDIMENTOS DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL, disponível em [http://: www.emater.tche.br](http://www.emater.tche.br), acesso em 05/10/2009.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510 – 523, 2010.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 84, p. 205 – 209, 2007.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-45, 1999.

FILHO, M.B. Lignananas, neolignananas e seus análogos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.

FIRESTONE, D. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes. USA, AOCS Press, 152 p. 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 182 p., 2008.

FRANKEL, E.N. Effects of Antioxidants (Part II). **Inform AOCS**, v. 18, n. 8, p. 564 - 566, 2007.

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

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.-W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsionst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1054 - 1059, 1994.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL,R. Applications of Spray-drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213 – 224, 1999.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

GOLI, A.H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M.A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 521 – 525, 2005.

GORDON, M.H. Measuring antioxidant activity. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA,N.; GORDON, M.H. **Antioxidants in food:**

Practical applications. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England, CRC Press, 2001.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1 – 22, 2008.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical research Communications**, v. 9, n. 1, p. 1 - 32, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 4, p.129 - 135, 1989.

HERALD, P.J.; DAVIDSON, P.M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1378-1379, 1983.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobial. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292, 2005.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, N.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 10/11, p. 2231-2234, 1994.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed., 1ª Edição Digital, São Paulo, 2008, p. 1020.

INC – International Nut Tree Council – disponível em www.nuthealth.org, acesso em 28/01/2008.

IQBAL, S.; BHANGER, M.I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, v.100, p. 246 - 254, 2007.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6.ed., São Paulo, Ed. Artmed S.A., 2008.

JURD, L. Plant Polyphenols. I. The Polyphenolic Constituents of the Pellicle of the Walnut (*Juglans regia*). **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 3445 – 3448, 1956.

KAMAL-ELDIN, A. Minor Components of fats and Oils. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Specialty Oils & Oil Products**. 6.ed., v.3, EUA, Wiley – interscience, 2005.

KASSING, M.; JENELTEN, V.; SCHENK, J.; STRUBE, J. A new approach for process development of plant-based extraction processes. **Chemical Engineering Technology**, v. 33, n. 3, p. 377 – 387, 2010.

KIM, J.M.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A.; PRESTON, J.F.; WEI, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364-1374, 1995.

KIRITSAKIS, K.; KONTOMINAS, M.G.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MOUSTAKAS, A. e KIRITSAKIS, A. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 87, p. 369 – 376, 2010.

KOLAKOWSKA, A. (Eds). **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. CRC Press LLC, Boca Raton, 2003.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v.113, p.71 - 88, 2002.

KRIS-ETHERTON, P.M.; YU-POTH, S.; SABATÉ, J.; RATCLIFFE, H.E.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.504 - 511, 1999.

KYOUNG CHUN, O.K.; KIM, D. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. **Food Research International**, v. 37, p. 337 - 342, 2004.

LAMBELET, P.; SAUCY, F.; LÖLIGER, J. Mecanismos de Acción de los Antioxidantes. **Asociación Argentina de Grasas y Aceites. Libro 10º Aniversario. Recopilación de Artículos Técnicos de 1990/2000**. Ed. 1-41, Tomo II, p. 693 – 695, 2001.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35 – 61, 2009.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 115-123, 2003.

LEIFERTOVA, I.; HEJTMANKOVA, N.; HLAVA, H.; KUDRNACOVA, J.; SANTAVY, F. Antifungal and antibacterial effects of phenolic substances. **Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae**, v. 74, p. 83-89, 1975.

MACHMUDAH, S.; SULASWATTY, A.; SASAKI, M.; GOTO, M.; HIROSE, T. Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 39, p. 30–39, 2006.

MADHAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Antioxidants. In: MAGA, J.A.; TU, A.T. **Food Additive Toxicology**. 1.ed., v.1, New York-Basel-Hong Kong, EUA, Marcel Dekker, Inc. 1995.

MALIK, N.S.A.; PEREZ, J.L.; LOMBARDINI, L.; CORNACCHIA, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BRAFORD, J. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2207 – 2213, 2009.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MATTHEWS, P.D.; HAAS, G.J. Antimicrobial activity of some edible plants: Lotus (*Nelumbo nucifera*), coffee, and others. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 1, p. 66-68, 1993.

MAU, J.L.; TSAI, S.Y.; TSENG, Y.H.; HUANG, S.J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 641 – 649, 2005.

MAUL, A. A.; WASICHY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.

McNALLY, M. E. P. Method development in supercritical fluid extraction. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 380-7, 1996.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.

MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 234 – 246, 2007.

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêssego: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala**. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.48, p. 91, 1971.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211 – 219, 2004.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655 – 1666, 2009.

MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Evaluation of extracts from *Gevuina*

avellana hulls as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 (9), p. 3890 – 3897, 2000.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v.72, n.2, p. 145 - 171, 2001.

MÜLLER, L.G.; PASE, C.S.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLEUR, N.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; PAVANATO, M.A.; BAUERMANN, L.; ROCHA, J.B.T.; BURGER, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 165-171, 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; KOBAYASHI, G. S; PFALLER, M. A; **Microbiologia médica**. Washington D.C.: American Society of Microbiology Press, 1999.

NASCIMENTO, M.S; MORENO, I; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NAWAZ, H; SHI, S.; MITTAL, G.S.; KAKUDA, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration and concentration by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, p. 176 – 181, 1996.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S.A.; SAYEED, S.A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M341 - M344, 2007.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard – 6a edition. NCCLS document M7 – A6 (ISBN 1 – 56233 – 486 – 4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2003a.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; approved standard – 8a edition. NCCLS document M2 – A8

(ISBN 1 – 56238 – 485 – 6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2003b.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos**; Norma Aprovada - NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002a.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002b.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, p. 227 – 235, 2005.

NOGALA-KALUCKA, M. Fat Soluble Vitamins. In: SIKORSKI, Z. E. e KOLAKOWSKA, A. (Eds). **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. CRC Press LLC, Boca Raton, 2003.

NOHYNEK, L.J.; ALAKOMI, H.L.; KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M.; HELANDER, I.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutritional and Cancer**, v.54, p. 18 – 32, 2006.

NOVAES, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANCA, F.; GIULIETTE, A. M.; SOARES, M.; B. P.; SANTOS, R. R. . Atividade antimicrobiana em alguns extratos de vegetais de semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 (2), p. 5-7, 2003.

NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G.W. (Ed.). **New methods of food preservation**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 59 - 87.

O'BRIEN, R. D. **Fats and Oils – Formulating and Processing for Applications**. 2nd ed., CRC Press LLC, Boca Raton, 2004.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 66 – 71, 2001.

ORO, T. **Composição nutricional, compostos bioativos e vida útil de noz e óleo extra-virgem de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]** 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2007].

ORO, T.; OGLIARI P.J.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRERA-ARELLANO, D. y BLOCK, J.M. Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, n. 2, v. 59, p. 132-138, 2008.

ORTIZ, E. R. N. Propriedades nutritivas e nutracêuticas das nozes. **Monografia – Especialização em Tecnologia de Alimentos**, Universidade de Santa Cruz do Sul, RS, 2000.

ORZUA, M.C.; MUSSATTO, S.I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; RODRÍGUEZ, R.; GARZA, H.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization Carrier for solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 24 – 27, 2009.

OSORIO, E.; FLORES, M.; HERNÁNDEZ, D.; VENTURA, J.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C.N. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts Shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentate* Cov.) against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 153 - 157, 2010.

PECANTEA. Chá de casca de noz-pecã. Disponível em www.pecantea.com.br, acesso em 11/10/2008.

PELCZAR, M.J.JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. **Microbiologia – Conceitos e aplicações**. 2.ed., São Paulo, Ed. Makron Books do Brasil Ltda., 1997.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O.V.; GALAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R.N.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 103 - 111, 2007.

PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. **Perfumer & Flavorist**, v.16, p. 37-9, 1991.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUANES, M.C.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, G.F.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p. 37-40, 2001.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340 – 372, 2010.

PEREIRA, C.G.; MARQUES, M.O.M.; BARRETO, A.S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 30, n,1, p. 51-61, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791 - 800, 2006.

POLLES, S.G.; HANNY, B.W.; HARVEY, A.J. Condensed tannins in kernels of thirty one Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Kock] cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29(1), p.196 - 197, 1981.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science & Technology**, v.2, p.223 - 227, 1991.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHELIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. New York: CRC Press, 2001. P. 311 – 330.

POKORNÝ, J.; PARKÁNYIOVÁ, J. Lipids with antioxidant properties. **Healthful Lipids**. AOCS Press, 2005.

PRADO, A.C.P. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**, 2008. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, [2008].

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2010.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n. 4, p. 330-335, 2009 (a).

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n.5, p. 458-467, 2009(b).

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214 - 1218, 1978.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; ALAKOMI, H. L.; K. M. OKSMAN-CALDENTY. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 8 – 18, 2005.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.C.; MEIRE, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-

CALDENTEY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494 – 507, 2001.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J. Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 305 - 309, 1998.

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

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEIMONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJAL, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extrats containing flavonoids and outhers phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3- 12, 2000.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n. 9/10, p.1231 -1 237, 1999.

REIS, M.O.R. **Evaluation of the antimicrobial activity in vitro of the hydroalcoholic extracts of Persea gratissima Gaertn – Avocado tree – leaves (Lauraceae)** 2006. 76 p. Dissertação (Mestrado em Promoção da saúde) – Universidade de Franca, Franca-SP, [2006].

RECKZIEGEL, P; BOUFEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVEGNU', D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANÇA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v.2, n.4, p.152 - 159, 1997.

- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANÇA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933 - 956, 1996.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 859 – 870, 2008.
- SALUNKHE, O.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270 - 276, 1998.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.
- SARMENTO, L.A.V.; MACHADO, R.A.F.; PETRUS, J.C.C.; TAMANINI, T.R.; BOLZAN, A. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, p. 64 – 69, 2008.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875 – 3883, 1991.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130 (Suppl. 8S), p.2073S - 2085S, 2000.
- SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alim. Nutr.**, v. 14, n. 2, p. 229 - 235, 2003.

SENER, S.D.; HORVAT, R.J.; FORBUS JR, W.R. Relation between phenolic acid content and stability of pecans in accelerated storage. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1380 - 1382, 1980.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A-M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S310 – S329, 2009.

SHAHIDI, F.; MIRALIAKBARI, H. Tree Nut Oils. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Specialty Oils & Protects**. 6.ed., v.3, EUA, Wiley – interscience, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Cereals, Legumes and Nuts**. In: Phenolics in Food an Nutraceutical. Boca Raton, CRC Press LLC, 2004a.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Methods of Analysis and Quantification of Phenolic Compounds**. In: Phenolics in Food an Nutraceutical. Boca Raton, CRC Press LLC, 2004b.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: souces, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281 - 319.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.

SHERWIN, E.R. Antioxidants for vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 53, n.6, p.430 - 436, 1978.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, p.94 - 103, 1999.

SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMESRSCHIMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial

systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett. Food Microbiology**, v. 26, p. 118-122, 1998.

SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71 - 81, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2007.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I. ; BAHORUN, T. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, **Molecular Research**, v. 579, p. 200 - 213, 2005.

SUJA, K.P.; ABRAHAM, J.T.; THAMIZH, N.S.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. **Food Chemistry**, v.84, p. 393 - 400, 2004.

SWINK J.W. **Pecans as a "young" ingredient**. Food Tech Europe, v.3, n.2, p. 75 - 76, 1996.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199 – 1218, 2010.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p. 716 - 718, 2000.

TRUEBA, G.P.; SANCHEZ, G.M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 297 - 306, 2001.

UMERIE, S.C.; OGBUAGU, A.S.; OGBUAGU, J.O. Stabilization of palm oils by using *Ficus exasperata* leaves in local processing methods. **Bioresource Technology**, v.94, p. 307 - 310, 2004.

VALENZUELA, A. B.; NIETO S. K. Los antioxidantes: protectores de la calidad en la industria alimentaria. **Asociación Argentina de Grasas y Aceites. Libro 10º Aniversario. Recopilación de Artículos Técnicos de 1990 - 2000.** Ed 1 - 41, Tomo III, p. 85 – 94, 2001.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity.** London: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VAQUERO, M.J.R.; NADRA, M.C.M. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnol.**, v. 151, p. 342 – 352, 2008.

VAQUERO, M.J.R.; ALBERTO, M.C.; NADRA, M.C.M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93-101, 2007.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v.25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

VENKATACHALAM, M.; KSHIRSAGAR, H.H.; SEERAM, N.P.; HEBER, D.; THOMPSON, T.E.; ROUX, K.H.; SATHE, S.K. Biochemical composition and immunological comparison of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 9899 – 9907, 2007.

VENKATACHALAM, M. **Chemical composition of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] varieties and antigenic stability of pecan proteins.** 2004. 90p. (Dissertation) - College of Human Sciences, The Florida State University, [2004].

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p. 1241-1249, 2007.

VILSTRUP, P. Microencapsulation of Food Ingredients. Ed. Leatherhead International Limited, Surrey, UK. pp 1- 47, 2004.

VONDERHEIDE, A.P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATHA, S.S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYOÃ, N.M.; DE LEOÃ, N.C.P.;

CARUSO, J.A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p. 5722 - 5728, 2002.

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

WAKELING, L.T.; MASON, R.L.; D'ARCY, B.R.; CAFFIN, N.A. Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [Caraya illinoensis (Wangenh) K. Koch] grown in Australia. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 1277 - 1281, 2001.

WANASUNDARA, P.K.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F.; AMAROWICZ, R. Effect of processing on constituents and oxidative stability of marine oils. **Journal of Food Lipids**, v.5, p. 29-41, 1998.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, p. 305-311, 2003.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**. New York: Chapman &Hall, p. 39 – 45, 1994.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4026 - 4037, 2004.

YOSHIDA, Y., NIKI, E., NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry an Physics of Lipids**, v.123, p. 63 - 75, 2003.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solventes: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57 – 76, 2002.

ZANG, L.; MOU, D.; DU, Y. Procyanidins: extraction and microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 87, p. 2192 – 2197, 2007.

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

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2007.

CAPÍTULO 2

Relação entre as propriedades antioxidantes e a composição química do óleo e da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]¹

¹ Artigo “Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]” publicado no periodico **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64 – 73, 2013.



Relação entre as propriedades antioxidantes e a composição química do óleo e da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]

Resumo

Foram determinados no presente trabalho a composição química e a estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã; a composição centesimal, parâmetros de cor, espectrofotometria no infravermelho (FTIR) do pó da casca e, o teor de compostos bioativos (FT e TC) e a atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos obtidos através de infusão do pó das cascas das nozes, de amostras de 2 safras consecutivas (2009 e 2010) e diferentes variedades (MV: mistura de variedades e B: variedade Barton). Além disso, foram avaliados os possíveis efeitos ocasionados pelo emprego da tecnologia de secagem por atomização em Spray Dryer. Observou-se um efeito significativo do ano de colheita e variedade da amostra estudada na qualidade nutricional e teor de fitoquímicos no óleo e na casca das nozes. Os resultados obtidos indicaram uma relação entre o teor de ácidos graxos insaturados presentes no óleo e a concentração de compostos antioxidantes na casca. Embora os compostos fenólicos sejam considerados termicamente instáveis, não foram observadas perdas significativas após o processamento por atomização com Spray Dryer.

Palavras chave: casca de noz-pecã, composição química, atividade antioxidante, espectrometria no infravermelho, oxidação, óleo.

1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] pertence à família Juglandaceae e é originária da América do Norte (EUA). No início do século XX teve seu cultivo disseminado em diversos países como México, Austrália, África do Sul, Israel, Argentina e Brasil (VENKATACHALAM et al., 2007; SHAHIDI e MIRALIAKBARI, 2005; WAKELING et al., 2001). No Brasil, a noqueira-pecã foi introduzida inicialmente no estado de São Paulo, sendo atualmente o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor de noz-pecã do país, seguido pelos estados do Paraná e Santa Catarina (ORTIZ, 2000; DE CARVALHO, 1975).

A composição nutricional básica da noz-pecã produzida no sul do Brasil apresenta alto conteúdo de óleo (entre 65 e 75%), predominando na sua composição lipídica os ácidos graxos oléico (62,5%) e linoléico (27,5%). Encontram-se presentes também, no óleo da amêndoa de noz-pecã, compostos fitoquímicos bioativos, entre eles os tocoferóis e os fitosteróis (ORO et al., 2008; FIRESTONE, 1999). Os tocoferóis são compostos aromáticos reconhecidos por sua atividade vitamínica (E) e antioxidante, sendo esta, fortemente relacionada com sua estrutura química derivada do anel cromanol e, substituída por um grupamento hidroxila e grupos metílicos no anel fenólico (POKORNÝ e PARKÁNYIOVÁ, 2005; WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005). A atividade antioxidante dos tocoferóis é dependente da sua concentração, temperatura, luz, tipo de substrato e de solvente, sistema lipídico testado, bem como da presença de sinergistas e de espécies químicas que possam agir como pró-oxidantes (NOGALA-KALUCKA et al., 2005; BRAMLEY et al., 2000).

Os fitosteróis são compostos bioativos que atuam na estabilização oxidativa nas membranas celulares vegetais. Possuem na sua estrutura química, além de um núcleo esteróide, grupos hidroxilas (3- β -grupo hidroxil), os quais podem estar relacionados à atividade antioxidante exercida na bicamada de fosfolípidios da membrana celular (HOUNSOME et al., 2008; LAGARDA, GARCÍA-LLATAS e FARRÉ, 2006).

Além dos tocoferóis e fitosteróis, presentes no óleo da amêndoa da noz-pecã, outros compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e taninos condensados, foram reportados na amêndoa e na casca da noz, através de ensaios colorimétricos (Folin-Ciocalteu e Vanilina) e, de atividade antioxidante (ABTS, DPPH, ORAC e sistema β -caroteno ácido linoléico) realizados *in vitro* (PRADO et al., 2010; PRADO et al., 2009a; PRADO et al., 2009b; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Estudos *in vivo* também relataram que os compostos fenólicos presentes no chá da casca da noz-pecã, desempenham atividade biológica e farmacológica relacionadas a doenças desencadeadas pela ação de radicais livres prevenindo a ansiedade na síndrome de abstinência do cigarro e, minimizando os danos hepáticos causados pelo estresse oxidativo na ingestão crônica de álcool (MÜLLER et al., 2012; RECKZIEGEL et al., 2011).

A ação antioxidante dos compostos de estrutura química fenólica ocorre através da doação de um átomo de hidrogênio à moléculas quimicamente instáveis, os radicais livres, retardando assim o processo oxidativo nas membranas celulares e nos alimentos ricos em lipídios. Além disso, são capazes de inibir a ação de enzimas, como as lipoxigenases, responsáveis por alterações oxidativas em óleos e gorduras, melhorando a estabilidade desses alimentos (SHAHIDI e NACZK, 2004). No entanto, vários fatores podem afetar a capacidade antioxidante desses compostos, entre eles as condições de processamento envolvendo a tecnologia, solvente e temperatura de extração utilizada no isolamento das substâncias fenólicas (MOURE et al., 2001). A concentração, o grupo químico dos compostos fenólicos, a espécie e a variedade da noz cultivada, na qual os antioxidantes são sintetizados naturalmente, também podem influenciar significativamente nas características como a cor da casca e o sabor adstringente do chá obtido (PRADO et al., 2010; SHAHIDI e NACZK, 2004).

As lavouras localizadas no sul do Brasil compreendem uma mistura das variedades Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw e Cape Fear; sendo que em média, até 2008, 50% das lavouras eram constituídas por plantações da variedade Barton. Essa variedade é obtida por enxertia e melhoramento genético e, tem recebido maior destaque em volume de produção, em relação às demais variedades de noz-pecã, devido sua notável importância comercial (DIVINUT, 2011).

Sabe-se que além da variedade, fatores genéticos, condições ambientais, composição do solo, estágio de maturação e métodos de cultivo influenciam fortemente na composição nutricional e fitoquímica das nozes (MALIK et al., 2009; WAKELING et al., 2001; LAVEDRINE et al., 2000; DE CARVALHO, 1975), podendo afetar significativamente a estabilidade oxidativa e o poder antioxidante nos cultivos em diferentes regiões e hemisférios. Embora muitos estudos reportem uma relação simples entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, esta relação pode ser muito mais complexa na contribuição da capacidade antioxidante total, envolvendo outros componentes da matriz vegetal, tais como proteínas, carboidratos e fibras (BETANCUR-ANCONA et al., 2004; JING e KITTS, 2002; AMAROWICZ e SHAHIDI, 1997). Dessa forma, a composição do óleo e da casca de noz-pecã de 2 safras consecutivas (2009 e 2010) e diferentes variedades (MV: mistura de variedades e B: variedade

Barton) foram determinadas. O objetivo desse estudo, além de avaliar os efeitos dos diferentes anos de colheita e variedades na composição das nozes, foi também verificar uma possível relação entre o teor geral de compostos antioxidantes presentes no óleo e na casca da noz-pecã, e a estabilidade oxidativa do óleo da amêndoa. Além disso, os possíveis efeitos ocasionados pelo emprego da tecnologia de secagem por atomização em Spray Dryer, também foram avaliados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

Nozes-pecã colhidas nas safras de 2009 e 2010 (6 kg de cada safra), provenientes de lavouras localizadas na região central do Estado do Rio Grande do Sul / Brasil. Foram estudadas amostras constituídas de uma mistura de variedades (Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw, Stuart e Cape Fear) disponíveis comercialmente denominadas “MV” e, amostras provenientes de lavouras constituídas apenas da variedade Barton (“B”).

2.2 Reagentes químicos

Padrões metil ésteres de ácidos graxos (Sulpeco 37 components FAMEx Mix, ref. 47885-U) obtidos da Sulpeco - Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA); Reagente Fenol Folin & Ciocalteu, Ácido gálico, Vanilina e (+)-catequina hidratada obtidos da Sigma-Aldrich (Germany); ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e Trolox ,obtidos da Fluka / Sigma-Aldrich (Germany). Todos os demais reagentes químicos e solventes utilizados no experimento foram de grau analítico (P.A.) adquiridos da Vetec Química Fina / Sigma-Aldrich.

2.3 Extração do óleo da noz-pecã

As nozes foram descascadas e o óleo extraído através de prensa hidráulica (modelo TE-098, marca Tecnal [®]). As amostras foram prensadas 2 vezes, e o óleo foi centrifugado a 3000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em frasco âmbar sob atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores. O percentual

de rendimento de extração foi calculado de acordo com a equação: R_E (%) = [(peso do óleo extraído)/(peso de amêndoas prensadas)]x100, onde R_E % = rendimento de extração.

2.4 Obtenção do pó e dos extratos da casca de noz-pecã

As cascas foram secas a 40°C em estufa com circulação de ar (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética®) para redução do teor de umidade e moídas em moinho analítico de laboratório (modelo A-11 da marca IKA Works®). O pó foi peneirado a 60 mesh. e armazenado em frasco âmbar, com atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores (PRADO et al., 2009a).

As amostras “MV” e “B” provenientes das safras 2009 e 2010, foram colocadas sob infusão em água destilada (20 g/L em base seca) e, os extratos obtidos foram armazenados de acordo com procedimento descrito por Prado et al. (2009a).

Paralelamente, foram preparadas infusões (Prado et al., 2009a), utilizando amostras constituídas de cascas somente da variedade Barton (“B”), safra 2010. Estes extratos foram secos através de atomização por Spray Dryer em equipamento BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Temperatura de entrada e saída de 150°C e 50 °C, respectivamente; fluxo de ar/gás de 35 m³.h⁻¹ - 100%; fluxo da solução a ser atomizada de 10 mL.min⁻¹ - bomba 25%) e armazenados a -24°C, para análises posteriores (SAHIN NADEEM, et al., 2011).

A determinação do extrato seco de todos os extratos foi realizada por gravimetria, tomando-se uma alíquota de 5 mL em cadinho de alumínio, previamente tarado, seguido de secagem em estufa (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética®) a 105,0 ± 0,5°C até peso constante (AOAC, 2005), para determinação do rendimento de extração.

2.5 Composição química e estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã

Composição em ácidos graxos

Após obtenção dos ésteres metílicos, realizada conforme Hartman e Lago (1973), a composição em ácidos graxos foi determinada de acordo com a metodologia Ce 1-91 da AOCS (2004). Aproximadamente 1 µL (*split* 1:50) da fase hexano foi injetado em

cromatógrafo gasoso marca Shimadzu 17^a, equipado com coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2um), fase normal e detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram de 260°C e 240°C respectivamente, utilizando H₂ (0,67mL min⁻¹) como gás de arraste. Após a injeção a temperatura da coluna manteve-se em 120°C por 5 minutos, sendo elevada gradativamente (4°C min⁻¹) até alcançar 240°C, e mantida por 10 min (tempo total da corrida = 45 minutos). Padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco 37 components FAMEs Mix, ref. 47885-U) foram injetados nas mesmas condições e seus tempos de retenção determinados. A composição foi determinada através da normalização das áreas e expressa em percentagem.

Tocoferóis

Os teores de tocoferóis foram determinados de acordo com metodologia oficial da AOCS - Ce 8-89 (2004), através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer SERIES 200 nas seguintes condições de análise: bomba Isocrática Perkin Elmer Series 200; detector de fluorescência Perkin Elmer Series 200a; comprimento de onda - Excitação 290 nm, Emissão 330 nm; Coluna: Hibar RT 250 x 4mm LiChrosorb® Si 60, 5mm (Merck); fase Móvel - Hexano / Isopropanol (99/1 - 1,0 mL.min⁻¹).

Fitosteróis totais

Os fitosteróis totais foram determinados de acordo com a metodologia colorimétrica baseada na reação enzimática do beta-sitosterol adaptado de Allain et al. (1974). Pesou-se cerca de 50 mg de óleo em um tubo seco e tarado, saponificando-se a amostra a 80°C durante uma hora, com 5mL de KOH 0,5 M em metanol. A fração não saponificada foi separada com a adição de 1 mL de água e 2 mL de hexano. Transferiu-se uma alíquota de 0,6 mL da fase com hexano para um tubo de ensaio sob fluxo de ar constante e temperatura de 45°C, para evaporação do solvente. O material insaponificado foi solubilizado em 40 µL de isopropanol e, após agitação em "vortex", foram adicionados 3 mL do reagente enzimático para colesterol (Colesterol PP - GOLD ANALISA) e a amostra incubada em estufa a 35°C durante 15 minutos. Após o tempo de incubação, a leitura da intensidade da cor foi realizada em espectrofotômetro (marca FEMTO, modelo 700S UV usando

cubetas de 1cm de caminho ótico) a 500 nm. Foi elaborada uma curva analítica a partir de um padrão comercial de fitosteróis (Marca ICN Biomedicals. Inc. USA - Cat. Nun. 102886, Lot No. 8312F.), repurificado e com a pureza de 99% comprovada através de análises prévias em cromatografia gasosa.

Estabilidade oxidativa e Índice de Peróxidos

A estabilidade oxidativa (Oil Stability Index – OSI) do óleo extraído das nozes foi determinada de acordo com metodologia oficial da AOCS (2004), método Cd 12b-92, utilizando equipamento *Oxidative Stability Instrument* (Omnion, Rockland, MA), a 110°C, fluxo de ar de 9 L/h e peso da amostra de 5g.

A determinação do índice de peróxidos do óleo de noz-pecã foi realizada conforme metodologia oficial (Cd 8-53) da AOCS (2004).

2.6 Composição centesimal, análise de cor e espectrofotométrica da casca de noz-pecã

Composição centesimal

A composição centesimal da casca de noz-pecã, das amostras “MV” e “B” das safras 2009 / 2010, e das amostras secas através de atomização por Spray Dryer (“B-SD”, safra 2010), foi determinada de acordo com metodologia oficial, através das seguintes análises: umidade (925.09 - AOAC, 2005); proteínas (920.87 - AOAC, 2005); lipídios totais (920.85 - AOAC, 2005); fibra bruta (Ba 6a -05 – AOCS, 1996) e minerais representados pelas cinzas (923.03 - AOAC, 2005); os carboidratos foram estimados por diferença.

Análise instrumental da cor

Para a análise instrumental da cor do pó da casca de noz-pecã foi utilizado colorímetro Minolta Chromo Meter CR 400 (Minolta, Osaka, Japão), acoplado a um processador DP-100, com iluminante D65 e ângulo de 10°. Foi utilizado o sistema de avaliação CIE Lab (Comission Internationale de Eclairage), escala de cor **L***, **a***, e **b***, onde **L*** corresponde à luminosidade (0 = preto e 100 = branco); **a*** corresponde à variação de cor de verde a vermelho [-80 até zero = verde (-a), de zero a +100 = vermelho (+a)]; **b*** corresponde à variação de cor

de azul a amarelo [-100 até zero = azul (**-b**), de zero a +70 = amarelo (**+b**)]. Também foram determinados o **C*** (chroma), que indica a saturação da cor (proporção que a cor está misturada com o branco, preto ou cinza) e, **H**, que corresponde a tonalidade ou matiz, expressa em ângulos (0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul, equivalentes ao **+a**, **+b**, **-a** e **-b** respectivamente).

Análise espectrofotométrica no infravermelho (FTIR)

Frações solúveis e insolúveis foram coletadas das amostras constituídas do pó das cascas de noz-pecã ("B" e "MV", safra 2010), sendo pesados 0,5 g de pó e pipetados 10 mL de água deionizada em tubos de centrífuga (50 mL) com tampa. O procedimento da coleta das frações solúveis e insolúveis não foi realizado para as amostras de cascas "B-SD" (safra 2010) submetidas ao processo de infusão seguido de atomização por Spray Dryer, já que esta amostra foi totalmente solúvel em água sob as condições aplicadas. Os tubos de centrífuga com as amostras foram sonicados a 55°C durante uma hora, e centrifugados a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. A fração solúvel foi decantada em placas de Petri de vidro grandes, pré-pesadas, e a fração solúvel seca durante a noite a 50°C. Procedimento semelhante foi realizado para as frações insolúveis. Os rendimentos das frações solúvel e insolúvel foram determinados através da pesagem das placas de Petri contendo as amostras, após a secagem completa.

A análise espectral na faixa do visível (400nm-800nm) foi realizada para as frações solúveis do pó das amostras "B" e "MV" (safra 2010) e para as amostras "B-SD" (safra 2010) submetidas ao processo de infusão seguido de atomização por Spray Dryer. Foram redissolvidos em 10 mL de água deionizada 25 mg do pó das amostras e preparada uma solução estoque (0,25 mg / mL) seguida das diluições: 0,025; 0,05; 0,0625; 0,0833 e 0,125 mg / mL solução. Os espectros foram obtidos através do uso de um espectrofotômetro de arranjo de diodos visíveis, Biochrom WPA S800 (Terra Universal, Fullerton, Califórnia, EUA) e, um gráfico foi obtido para todas as diluições com uma curva padrão gerada a 420 nm permitindo a quantificação da fração solúvel em solução ($r^2=0,9964$). As absorbâncias médias de três repetições foram utilizadas para a construção da curva padrão.

Espectros ATR-FTIR dos pós das amostras de cascas de noz-pecã ("B - 2010", "MV - 2010", "B - SD 2010: amostras submetidas ao

processo de infusão seguido de atomização por Spray Dryer” e, todas as frações solúveis e insolúveis), foram coletados em um espectrofotômetro FTIR Avatar 370 (Thermo Scientific - Nicolet, Ottawa, ON, Canadá) utilizando uma válvula acessória (ouro / diamante) de Reflectância Total Atenuada (ATR) com sulfato de triglicina deuterado (DTGS) na faixa de 4000-400 cm^{-1} na região espectral do infravermelho, em temperatura ambiente. Cada espectro coletado resultou de uma média de 32 varreduras na resolução de 4 cm^{-1} . A análise espectral foi realizada utilizando o software Omnic v. 7.3. Um mínimo de três espectros, com desvio padrão < 10%, foram utilizados para as estimativas qualitativas após a normalização das áreas.

2.7 Compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante dos extratos da casca de noz-pecã

Determinação do conteúdo de Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (PRADO et. al, 2009a; BUDINI, TONELLI, GIROTTI, 1980). Alíquotas (100 μL) de diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu, a reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75g/L) e, os volumes completados até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 horas no escuro, a temperatura ambiente, a absorbância da solução azul resultante foi medida em espectrofotômetro (modelo Hitachi UV spectrophotometer, U-1800) a 764 nm. A quantificação foi feita com base em curva analítica de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE.g^{-1} (equivalente de ácido gálico) em peso seco.

Determinação do conteúdo de Taninos Condensados

Para a determinação do teor de taninos condensados procedeu-se de acordo com Price, Vanscoyoc e Butter (1978) e adaptado por Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007). Foram coletadas alíquotas de 1 mL de diluições apropriadas dos extratos e colocadas em 2 tubos de ensaio separados (1 para a amostra e outro para o branco). Após foram adicionados 5 mL do reagente Vanilina (0,5g de

reagente e 200 mL de HCl 4%/metanol) para as amostras, e HCl 4%/metanol para o branco. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz por um período de 20 minutos e as medidas das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Hitachi UV spectrophotometer, U-1800) a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg CE.g⁻¹ (mg equivalente de catequina/g de amostra desengordurada).

Atividade antioxidante - Método ABTS

O método ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com algumas modificações. Após o preparo do radical ABTS (7mM - 0,03836g do reativo ABTS dissolvido em 10 mL de água deionizada), foi preparada uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM - 10 mL de ABTS e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e mantidos em frasco âmbar pelo mínimo 16 horas protegido da luz). Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200 µL do radical formado e diluído em 10 mL de etanol absoluto P.A. Medidas de absorvância em cubetas de 10 mm e em espectrofotômetro (modelo Hitachi UV spectrophotometer, U-1800) a 734 nm, foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de $0,700 \pm 0,05$. Uma alíquota de 980 µL do radical diluído foi pipetada e transferida para uma cubeta de 10 mm (1 mL) procedendo a medida da absorvância ($A_{754}=A_0$) adicionando imediatamente 20 µL da amostra e homogeneizando e agitando por alguns segundos. Trolox foi utilizado como padrão (15 µM = 0,13209g/500 mL). O cálculo da percentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical = $(1 - A_f/A_0) \times 100$, onde, "A₀" é a absorvância inicial e "A_f" é a absorvância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em µmol TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

Atividade antioxidante - Método DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), foi realizado de acordo com Brand-William, Cuvelier e Berset (1995) seguido de modificações conforme Prado et al. (2009a) e Mensor et al. (2001). Após o preparo do radical (0,1 mM - 0,03943g de DPPH dissolvido em

10 mL de etanol a 80%), foi pipetada uma alíquota de 2,9 mL do mesmo e colocados para reagir em tubos de ensaio adicionados de 0,1 mL do extrato da amostra. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz e, as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Hitachi UV spectrophotometer, U-1800) a 515 nm após 30 minutos. Trolox foi utilizado como padrão (150 mg/L). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical = $(1 - A_f/A_o) \times 100$, onde, “Ao” é a absorvância inicial e “Af” é a absorvância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em mg TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através dos programas SAS “for Windows” v6.11 e Statistica ® v7.0. Os dados foram submetidos à análise de variância de comparação de médias ANOVA / testes de Tukey ($p < 0,05$), regressão linear simples e análise de componentes principais (ACP). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química e estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã

O rendimento médio de extração, obtido no processo de prensagem das amêndoas de noz-pecã para a obtenção do óleo foi em média de 51% para ambos os tipos de amostras (MV e B). Oro et al. (2008), utilizando o mesmo processo empregado na obtenção de óleo de amêndoas de noz-pecã, encontrou rendimentos médios inferiores (45%) aos reportados no presente trabalho, o que pode ser justificado pelo uso de duas prensagem no presente trabalho comparado a uma única prensagem utilizada por Oro et al. (2008).

Na Tabela 01 podem ser observados os resultados obtidos para a composição em ácidos graxos, teor de tocoferóis, fitosteróis e estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã para as amostras das diferentes safras e variedades.

Tabela 01- Composição em ácidos graxos, teor de fitoquímicos e estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã de diferentes safras e variedades.

Análise	MV (2009)	B (2009)	MV (2010)	B (2010)
Ácido Palmítico (C16:0) (%)	4,7 ^{Aa} ± 0,2	5,0 ^{Aa} ± 0,1	5,4 ^{Aa} ± 0,1	5,3 ^{Aa} ± 0,2
Ácido Esteárico (C18:0) (%)	2,5 ^{Aa} ± 0,1	2,4 ^{Ba} ± 0,01	2,3 ^{Aa} ± 0,1	2,3 ^{Aa} ± 0,2
Ácido Oléico (C18:1n9c) (%)	74,9 ^{Aa} ± 0,6	75,9 ^{Aa} ± 0,2	69,6 ^{Ab} ± 0,6	69,2 ^{Ab} ± 0,1
Ácido Linoléico (C18:2n6c) (%)	17,8 ^{Aa} ± 0,4	16,7 ^{Ab} ± 0,3	22,6 ^{Aa} ± 0,6	23,1 ^{Aa} ± 0,1
Total de ácidos graxos saturados (%)	7,2 ^{Ab} ± 0,2	7,4 ^{Ab} ± 0,1	7,7 ^{Aa} ± 0,1	7,7 ^{Aa} ± 0,1
Total de ácidos graxos monoinsaturados (%)	74,9 ^{Aa} ± 0,6	75,9 ^{Aa} ± 0,2	69,6 ^{Ab} ± 0,6	69,2 ^{Ab} ± 0,1
Total de ácidos graxos poliinsaturados (%)	17,8 ^{Aa} ± 0,4	16,7 ^{Ab} ± 0,3	22,6 ^{Aa} ± 0,6	23,1 ^{Aa} ± 0,1
α-tocoferol (mg.100g ⁻¹)	1,1 ^{Aa} ± 0,1	1,1 ^{Aa} ± 0,1	1,1 ^{Ba} ± 0,1	1,3 ^{Aa} ± 0,1
γ-tocoferol (mg.100g ⁻¹)	38,1 ^{Aa} ± 0,4	33,4 ^{Aa} ± 4,1	23,8 ^{Bb} ± 0,5	26,0 ^{Aa} ± 0,1
Tocoferóis totais (mg.100 ⁻¹)	39,2 ^{Aa} ± 0,5	34,6 ^{Aa} ± 4,2	24,9 ^{Bb} ± 0,5	27,3 ^{Aa} ± 0,1
Fitosteróis totais (%)	0,22 ^{Aa} ± 0,01	0,21 ^{Aa} ± 0,01	0,19 ^{Ab} ± 0,01	0,19 ^{Ab} ± 0,01
Índice de Estabilidade Oxidativa -OSI (h)	7,4 ^{Ba} ± 0,1	10,3 ^{Aa} ± 2,9	10,6 ^{Aa} ± 1,3	11,2 ^{Aa} ± 0,7
Índice de Peróxidos (mEq.kg ⁻¹)*	0,91 ^{Aa} ± 0,01	0,38 ^{Ba} ± 0,02	0,82 ^{Aa} ± 0,08	0,44 ^{Ba} ± 0,03

MV= mistura de variedades; B= Barton

* mEq.kg⁻¹= miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo/gordura.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha para amostras da mesma safra e, letras minúsculas iguais na mesma linha para mesmo tipo de amostra e diferentes safras, não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, p < 0,05); média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados para a composição em ácidos graxos estão de acordo com Oro et al. (2008), que reportou teores próximos aos encontrados no presente trabalho para ácido oléico (62,5%), linoléico (27,5%), palmítico (5,6%) e esteárico (2,8%), em lavouras cultivadas no

sul do Brasil compostas por uma mistura de variedades (Barton, Shoshone, Choctaw e Cape Fear). Os mesmos autores reportaram teores de γ -tocoferol de 30 mg.100g⁻¹, estabilidade oxidativa (OSI) e índice de peróxidos de 9,8 horas e 0,55 mEq.kg⁻¹, respectivamente (ORO et al. 2009, ORO et al. 2008), não sendo observado entretanto, por esses autores, teores para o homólogo α -tocoferol. Os resultados encontrados no presente trabalho foram similares aos reportados por Firestone (1999), em nozes cultivadas na América do Norte, para a composição em ácidos graxos (90% de ácidos graxos insaturados) e fitosteróis totais (entre 0,1% e 0,29%). No entanto, o mesmo autor reportou teores significativamente superiores para α -tocoferol (5 a 37 mg.100g⁻¹), e inferiores para γ -tocoferol (2 a 12,5 mg.100g⁻¹), quando comparados às nozes cultivadas no sul do Brasil.

Shahidi e Miraliakbari (2005) reportaram para óleo de noz-pecã, cultivada na América do Norte, 55% de ácido graxo oléico, 33% de linoléico, 7% de palmítico, 2% de esteárico; 1,0 mg.100g⁻¹ de α -tocoferol, 17,6 mg.100g⁻¹ de γ -tocoferol e, 0,073% fitoesteróis totais. Wakeling et al. (2001), também reportaram em óleo de noz-pecã cultivada na Austrália, teores médios inferiores ao presente trabalho para ácido oléico (55,3%) e significativamente superiores para linoléico (33%), apresentando em sua composição além do ácido palmítico (6,6%) e esteárico (2,5%), teores de ácido linolênico (1,7%). Esses autores avaliaram diferentes variedades e anos de colheita e, atribuíram as diferenças observadas na composição em ácidos graxos aos diferentes locais de cultivo e variedades estudadas, além de fatores tais como solo e clima. Villarreal-Lozoya et al. (2007) e Malik et al. (2009), avaliando a composição em ácidos graxos da noz-pecã cultivada na América do Norte, também observaram diferenças significativas relacionadas à variedade cultivada e às condições de cultivo orgânico ou convencional, aplicado às lavouras, respectivamente. Venkatachalam et al. (2007) reportaram teores acima de 90% para ácidos graxos insaturados em noz-pecã cultivada no Texas. Esses autores observaram um predomínio de ácido oleico (52,52-74,09%) e ácido linoleico (17,69-37,52%) atingindo níveis superiores aos reportados em nozes cultivadas no Brasil, sendo que a localização de cultivo influenciou significativamente a composição lipídica da noz-pecã.

A análise estatística dos resultados indicou que o ano da colheita exerceu influência significativa ($p < 0,05$) no teor de ácidos graxos saturados (MV 2010 > MV 2009 e B 2010 > B 2009),

monoinsaturados (MV 2009 > MV 2010 e B 2009 > B 2010), poliinsaturados (B 2010 > B 2009), γ -tocoferol (MV 2009 > MV 2010) e fitoesteróis totais (MV 2009 > MV 2010 e B 2009 > B 2010). A variedade que compõe a lavoura também exerceu influência significativa ($p < 0,05$) em algumas características do óleo de noz-pecã, sendo que as lavouras constituídas exclusivamente pela variedade Barton apresentaram os menores teores de ácido esteárico na colheita de 2009. Teores significativamente superiores de γ -tocoferol e α -tocoferol também foram observados no óleo extraído da variedade Barton na colheita de 2010. O efeito da variedade também foi significativo na avaliação da estabilidade oxidativa (índice de peróxidos e OSI), sendo o óleo da variedade Barton mais estável que o da mistura de variedades cultivadas em 2009 e 2010. Estabilidade oxidativa superior e valores para o índice de peróxido inferiores foram observados no óleo de noz-pecã de lavouras cultivadas exclusivamente com a variedade Barton.

3.2 Composição centesimal, análise de cor e espectrofotométrica da casca de noz-pecã

Na Tabela 02 podem ser observados os resultados obtidos para a composição centesimal e para a análise de cor do pó da casca de noz-pecã obtido por moagem e, através da atomização da infusão do pó moído por Spray Dryer, para as diferentes safras e variedades.

Tabela 02- Composição centesimal e cor do pó da casca de noz-pecã obtido por moagem e através da atomização da infusão do pó moído atomizado por Spray Dryer, de diferentes safras e variedades.

Determinação		MV (2009)	B (2009)	MV (2010)	B (2010)	B-SD (2010)
Componente (g.100g ⁻¹)	Proteína	2,58 ^{Ab} ± 0,11	2,21 ^{Bb} ± 0,12	2,84 ^{Aa} ± 0,11	2,79 ^{Aa} ± 0,03	0,43 ^{**} ± 0,02
	Umidade	7,95 ^{Bb} ± 0,04	10,09 ^{Ab} ± 0,07	11,30 ^{Aa} ± 0,04	11,83 ^{Aa} ± 0,20	2,77 ^{**} ± 0,12
	Lipídios totais	0,42 ^{Ba} ± 0,04	0,91 ^{Aa} ± 0,10	0,39 ^{Aa} ± 0,003	0,31 ^{Bb} ± 0,006	0,07 ^{**} ± 0,02
	Minerais	1,63 ^{Aa} ± 0,37	1,11 ^{Aa} ± 0,24	1,85 ^{Aa} ± 0,20	0,88 ^{Ba} ± 0,16	1,67 ^{**} ± 0,04
	Fibra bruta	46,11 ^{Ab} ± 0,21	44,77 ^{Bb} ± 0,21	48,47 ^{Ba} ± 0,43	49,77 ^{Aa} ± 0,28	nd
	Carboidratos	41,41 ^{Aa} ± 0,51	40,93 ^{Aa} ± 0,21	34,57 ^{Ab} ± 1,33	34,33 ^{Ab} ± 0,47	95,01 ^{**} ± 0,09
	Parâmetro de cor	L*	49,16 ^{Ab} ± 0,55	47,43 ^{Ab} ± 0,63	51,05 ^{Aa} ± 0,28	51,35 ^{Aa} ± 0,31
C*		18,29 ^{Aa} ± 0,21	18,27 ^{Ab} ± 0,08	18,60 ^{Aa} ± 0,29	19,59 ^{Aa} ± 0,18	22,73 ^{**} ± 0,13
a*		10,63 ^{Ba} ± 0,03	11,79 ^{Aa} ± 0,23	10,67 ^{Ba} ± 0,00	11,31 ^{Aa} ± 0,15	12,15 ^{**} ± 0,08
b*		14,88 ^{Aa} ± 0,28	13,95 ^{Bb} ± 0,08	15,12 ^{Ba} ± 0,18	16,00 ^{Aa} ± 0,11	19,19 ^{**} ± 0,09
H		54,46 ^{Aa} ± 0,57	49,79 ^{Bb} ± 0,71	54,79 ^{Aa} ± 0,33	54,73 ^{Aa} ± 0,18	57,67 ^{**} ± 0,06

MV = Mistura de Variedades; B = Barton; B-SD = Barton submetida ao processo de Spray Dryer.

L* = luminosidade, C* = saturação da cor, a* = Δ verde ao vermelho, b* = Δ azul ao amarelo, H = tonalidade ou matiz. Nd = níveis não detectados. Letras maiúsculas iguais na mesma linha para amostras da mesma safra e, letras minúsculas iguais na mesma linha para mesmo tipo de amostra e diferentes safras, não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, p < 0,05); média ± desvio padrão (n=3). B-SD (2010) = amostra atomizada por Spray Dryer, comparada apenas com as amostras B (2010), onde “**” indica diferença significativa (Teste de Tukey, p < 0,05) entre as amostras.

De acordo com os resultados obtidos para a composição centesimal do pó bruto da casca de noz-pecã das variedades MV e B, safras 2009 e 2010, o conteúdo de fibra bruta representou a fração principal da casca (44,77 a 49,77%), seguido do teor de carboidratos

(34,33 a 41,41%), umidade (7,95 a 11,83%), proteínas (2,21 a 2,84%), minerais (0,88 a 1,85%) e lipídios totais (0,31 a 0,91%). As amostras atomizadas por Spray Dryer apresentaram maior conteúdo de carboidratos (95,01%), reportando teores significativamente reduzidos de umidade (2,77%), minerais (1,68 %), proteína (0,43%) e lipídios totais (0,07%), não sendo detectada fibra bruta em sua composição. Este resultado pode ser explicado pelo fato do pó destas amostras ter sido obtido da atomização da infusão, a qual continha apenas material solúvel em água presente na amostra inicial do pó bruto da casca da noz-pecã.

Prado et al. (2009a), avaliou a composição centesimal de misturas de variedades de cascas de noz-pecã e reportou teores semelhantes aos obtidos no presente trabalho para o conteúdo de fibras (48,6%) e proteínas (2,2%). No entanto, os mesmos autores observaram teores significativamente inferiores para carboidratos (29,6%) e, conteúdo significativamente superior para umidade (16,8%) e lipídios totais (1,1%). De Carvalho (1975) e Wakeling et al. (2001) analisando diferentes variedades de noz-pecã, brasileiras e norte-americanas, respectivamente, reportaram diferenças significativas na composição nutricional de amêndoas de noz-pecã. As diferenças observadas na composição centesimal da casca de noz-pecã, podem estar relacionadas, segundo Singanusong et al. (2003), às diferentes variedades cultivadas, práticas culturais, época de colheita e localização geográfica. Além disso, fatores genéticos, composição do solo e estágio de maturação também podem influenciar significativamente a composição nutricional (MALIK et al., 2009; WAKELING et al., 2001).

Através da análise estatística dos resultados da composição centesimal da casca de noz-pecã, foi possível observar que o ano da colheita exerceu influência significativa ($p < 0,05$) nos teores de fibra, umidade, proteína (MV 2010 > MV 2009 e B 2010 > B 2009), carboidratos (MV 2009 > MV 2010 e B 2009 > B 2010) e lipídios totais (B 2009 > B 2010). A variedade Barton apresentou os menores teores de fibra e proteína e, as maiores médias para umidade e lipídios totais, na safra 2009; apresentando maiores teores de fibra na colheita 2010. A mistura de variedades (MV 2010) apresentou teores superiores para minerais e lipídios totais. Apenas para o conteúdo de minerais e carboidratos, não foram observados efeitos estatisticamente

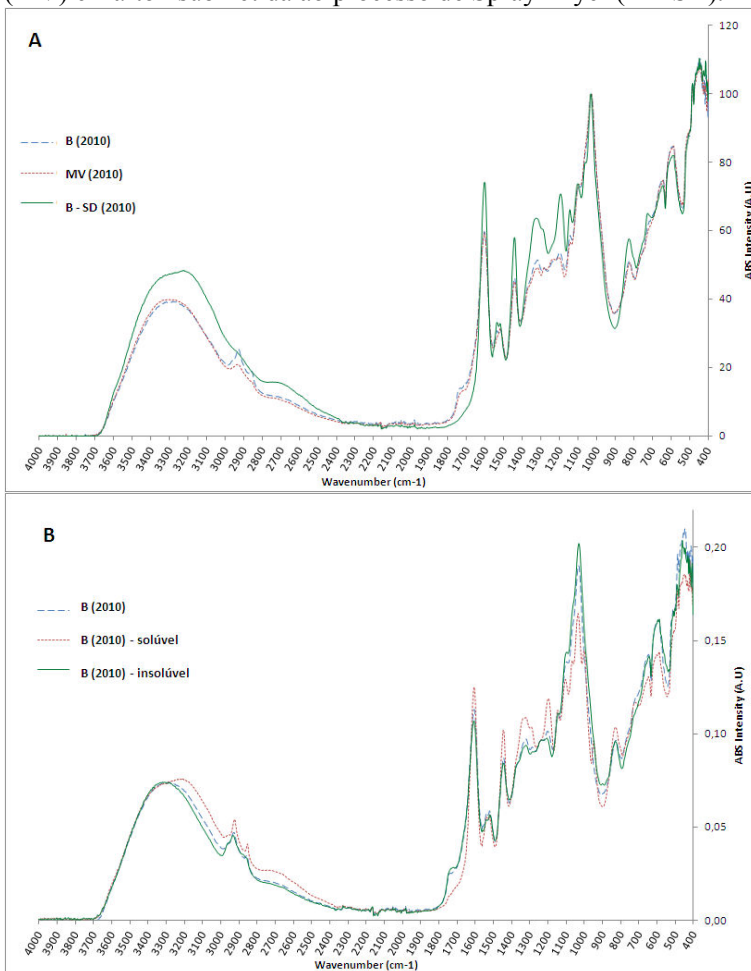
significativos referentes ao ano da colheita e variedade cultivada, respectivamente.

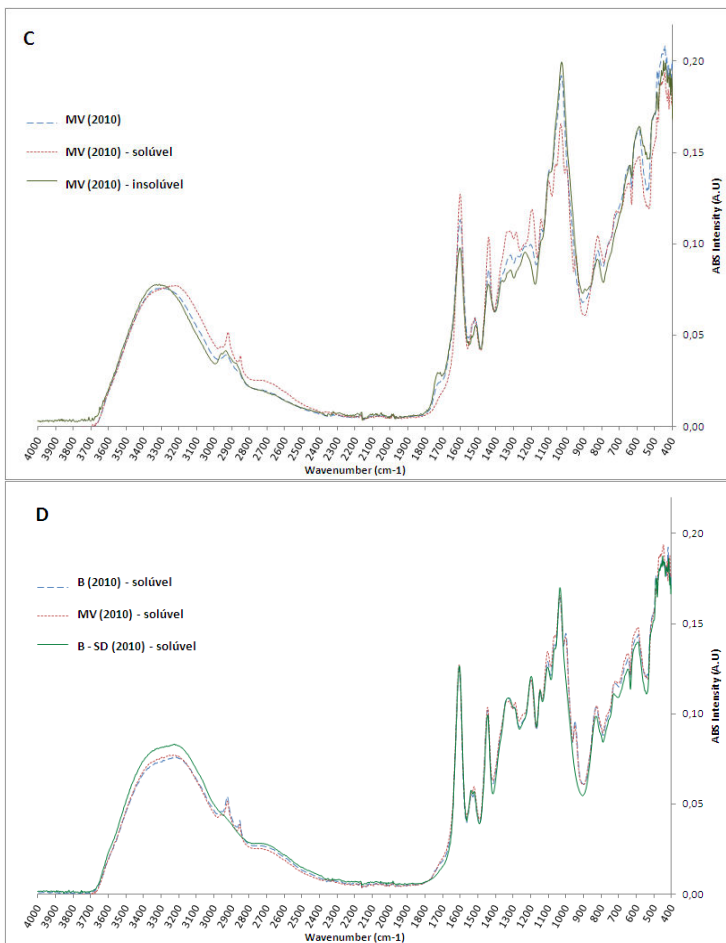
De acordo com os resultados obtidos na análise instrumental da cor para os pós da casca de noz-pecã, na amostra atomizada através de Spray Dryer (B-SD 2010) foram observadas médias significativamente superiores para L* (maior luminosidade), a* e b* (tendência em direção aos tons vermelhos). A mesma tendência foi observada através da análise dos ângulos de tonalidade ou matiz, mais próximos ao amarelo, além da coloração mais saturada (C*).

Através da análise estatística dos resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros de cor do pó bruto da casca de noz-pecã, observaram-se efeitos significativos ($p < 0,05$ - Tabela 02) exercidos pelo ano da colheita e variedade estudada. A influência da safra foi importante para os parâmetros de luminosidade (MV 2010 > MV 2009 e B 2010 > B 2009), saturação da cor, tendência do azul ao amarelo e tonalidade ou matiz (B 2010 > B 2009). As diferenças observadas entre variedades foram significativas para a variação da coloração vermelha (a*) (B 2009 > MV 2009 e B 2010 > MV 2010), e amarela (b*) (MV 2009 > B 2009 e B 2010 > MV 2010) e, para a tonalidade ou matiz (MV 2009 > B 2009).

Na Figura 19 (pag. 146 e 147) podem ser observados os espectros de FTIR para as amostras estudadas.

Figura 19. Espectro FTIR das amostras da safra de 2010. A: pó das cascas de noz-pecã das variedades Barton (B), Mistura de Variedades (MV) e variedade Barton atomizada por Spray Dryer (B – SD); B: pó das cascas de noz-pecã da variedade Barton (B) e suas frações solúvel e insolúvel; C: pó das cascas da Mistura de Variedades de noz-pecã (MV) e suas frações solúvel e insolúvel; D: frações solúveis do pó das cascas de noz-pecã das variedades Barton (B), Mistura de Variedades (MV) e Barton submetida ao processo de Spray Dryer (B – SD).





As amostras B e MV apresentaram espectros semelhantes entre si e, em concordância com os espectros de FTIR para casca de noz-pecã, reportados por outros pesquisadores (VAGHETTI et al., 2010; KLASSON et al., 2009; GUO e ROCKSTRAW, 2007). No entanto, pequenas diferenças foram observadas nas amostras MV e B, que apresentaram bandas mais pronunciadas na região espectral de 2800-3000 cm^{-1} , sendo atribuídos ao estiramento C-H em compostos alifáticos e grupos aldeídos (KLASSON et al., 2009), podendo estar

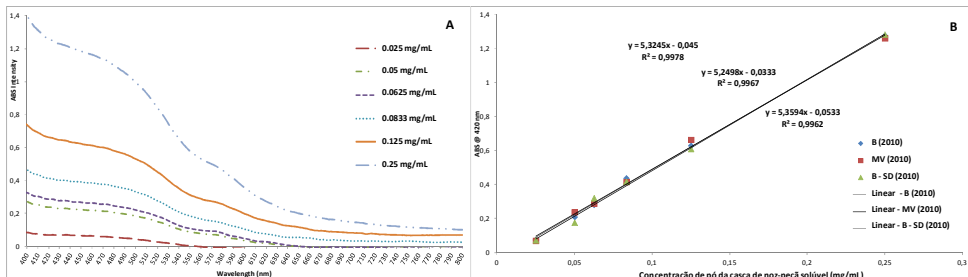
relacionados ao conteúdo de lipídios e determinados compostos da fração fibra dessas amostras. As amostras B-SD, quando comparadas às amostras B e MV, apresentaram diferenças drásticas em seu espectro de FTIR. A banda pronunciada na região de $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento OH que é frequentemente atribuído à água ligada na amostra, foi maior na amostra atomizada por Spray Dryer. A banda localizada na região de 1740 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=O de ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e cetonas, tendeu a desaparecer. As bandas detectadas em 1600 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo fenil (C = C), ligações de anéis aromáticos e, os diversos picos $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, frequentemente atribuídos às ligações C-O, características de carboidratos ou compostos fenólicos, foram drasticamente aumentadas na amostra atomizada através de Spray Dryer. Além disso, as bandas de estiramento alifáticos C-H na faixa de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ desapareceram na amostra B-SD.

Considerou-se que as diferenças observadas a partir dos espectros de FTIR das amostras da variedade Barton atomizadas através de Spray Dryer (B-SD), ocorreram devido à natureza mais solúvel dessa amostra, refletindo um possível procedimento de secagem incompleto e heterogêneo. Portanto, as frações solúveis foram extraídas através de uma infusão de todos os pós das cascas de nozes (B e MV) e, comparada com a fração insolúvel remanescente como sedimento. Os rendimentos das frações solúveis e insolúveis das amostras B e MV foram $30,2\% \pm 2,4\%$; $67,3\% \pm 1,6\%$; $33,2\% \pm 1,4\%$ e $63,2\% \pm 2,6\%$, respectivamente. O rendimento total para a amostra da variedade Barton (B) foi de $97,6\%$ e, para a mistura de variedades (MV) foi de $96,4\%$, sendo esta a amostra representante da maior fração solúvel. Na Figura 19 (B, C e D) podem ser observados os espectros de FTIR para as amostras B e MV, incluindo as frações solúveis e insolúveis. As frações insolúveis apresentaram espectros semelhantes ao pó bruto da casca, enquanto as frações solúveis resultaram espectros semelhantes ao pó obtido no processo de secagem através de Spray Dryer, nos quais apresentaram a mesma ausência da banda de 1740 cm^{-1} para o estiramento C=O do grupo carbonila, com relativo aumento para O-H, nas regiões de $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ e 1600 cm^{-1} referente a banda de compostos aromáticos. No entanto, é possível observar diferenças existentes no FTIR entre as amostras atomizadas através de Spray Dryer (B – SD) e as frações solúveis, demonstrando estas uma natureza mais

alifática, com bandas restantes na faixa de 2800-3000 cm^{-1} e, em geral, picos mais nítidos e altamente resolvidos, indicativo de espectros de FTIR típicos de moléculas de baixo peso molecular, como observado nas bandas 1153, 1113, 1051, 957 e 943 cm^{-1} , sugerindo uma maior incorporação de polímeros na amostra seca por Spray Dryer (B – SD).

Além de espectros FTIR, o espectro visível foi avaliado para as amostras B, MV e B–SP (safra 2010), bem como as frações solúveis das amostras B e MV em várias concentrações (Figura 20 – A e B – pag. 149).

Figura 20 – A: espectro visível das frações solúveis do pó das cascas de noz-pecã da Mistura de Variedades (MV); B: curvas padrão geradas a partir das frações solúveis do pó das cascas de noz-pecã B, MV e B – SD, em várias concentrações a 420 nm. *todas as amostras da safra 2010.



Os pós das três amostras, quando redissolvido em água, apresentaram coloração semelhante vermelho-alaranjado-marrom em solução. Na Figura 20 (A), são apresentados os espectros para a cor da solução das amostras MV em várias concentrações. Espectros similares foram observados nas mesmas concentrações para as amostras B e B – SD. A absorbância de 420 nm foi selecionada e aplicada a um modelo de coeficiente de extinção molar para a quantificação do teor de sólidos dissolvidos em solução. Este comprimento de onda demonstrou uma sensibilidade máxima, oferecendo alta absorbância e um platô relativamente plano na faixa de comprimento de onda selecionado, além de coeficientes de regressão excelentes para todas as amostras testadas. A Figura 20 (B) apresenta as curvas-padrão geradas a 420 nm com um caminho óptico de 1 cm. A inclinação angular da reta, para as três amostras, foram muito semelhantes, sugerindo o uso de um coeficiente

de extinção comum para as três amostras de pós da casca de noz-pecã, com uma inclinação média de $5,31 \pm 0,056$ unidades de absorvância por mg/mL de pó de casca, com um intercepto de $-0,044 \pm 0,01$ e coeficiente de regressão de $0,9969 \pm 0,0008$. Os resultados indicaram que a quantificação dos teores de sólidos dissolvidos em infusões da casca de noz-pecã, podem ser determinados com segurança, quando diluído para faixas de concentração entre 0,025 e 0,25 mg/mL.

3.3 Compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante dos extratos da casca de noz-pecã

Na Tabela 03 podem ser observados os resultados obtidos para o teor de extrato seco, compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante dos extratos (infusão e infusão atomizada por Spray Dryer e redissolvida em água), da casca de noz-pecã de diferentes safras e variedades.

Tabela 03 - Teor de extrato seco, compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante de extratos (infusão e infusão atomizada por Spray Dryer e ressuspensa em água), da casca de noz-pecã para as diferentes safras e variedades estudadas.

Determinação	MV (2009)	B (2009)	MV (2010)	B (2010)	B-SD (2010)
ES (g.100g ⁻¹)	36,09 ^{Aa} ± 0,41	32,39 ^{Ba} ± 0,13	26,61 ^{Bb} ± 0,52	32,12 ^{Aa} ± 0,43	46,36** ± 0,50
FT (mg GAE.g ⁻¹)	130,30 ^{Ab} ± 3,45	94,04 ^{Bb} ± 2,66	145,41 ^{Ba} ± 8,16	181,49 ^{Aa} ± 6,97	590,78** ± 4,41
TC (mg CE.g ⁻¹)	49,51 ^{Aa} ± 0,62	43,19 ^{Ba} ± 0,44	39,09 ^{Aa} ± 4,31	36,94 ^{Aa} ± 3,20	48,70** ± 1,50
CA _{ABTS} (µmol TEAC.g ⁻¹)	1467,90 ^{Aa} ± 19,81	1333,10 ^{Ab} ± 14,82	1723,60 ^{Aa} ± 12,15	1809,01 ^{Aa} ± 27,18	4124,83** ± 57,09
CA _{DPPH} (mg TEAC.g ⁻¹)	590,86 ^{Aa} ± 18,03	346,57 ^{Bb} ± 5,64	561,67 ^{Aa} ± 64,09	612,24 ^{Aa} ± 26,73	1210,97** ± 25,24

MV = Mistura de Variedades; B = Barton; B-SD = Barton submetida ao processo de Spray Dryer.

ES = Extrato seco – g.100⁻¹ (ensaio gravimétrico), FT = Fenólicos Totais – mg GAE.g⁻¹ (equivalentes em ácido gálico) em peso seco (ensaio Folin-Ciocalteu), TC = Taninos Condensados - mg CE.g⁻¹ (equivalentes de catequina) de peso seco (ensaio de Vanilina), CA = Capacidade Antioxidante - µmol TEAC.g⁻¹ (atividade antioxidante equivalente em Trolox) em peso seco (ABTS), CA = Capacidade

Antioxidante – mg TEAC.g⁻¹ (equivalentes em Trolox) em peso seco (DPPH – TEAC). Letras maiúsculas iguais na mesma linha para amostras da mesma safra e, letras minúsculas iguais na mesma linha para mesmo tipo de amostra e diferentes safras, não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$); média \pm desvio padrão ($n=3$). *B-SD (2010)* = amostra atomizada por Spray Dryer, comparada apenas com as amostras *B (2010)*, onde “***” indica diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$) entre as amostras.

O fato da amostra atomizada por Spray Dryer (*B-SD 2010*) apresentar teores superiores de compostos fenólicos totais e taninos condensados quando comparada a amostra original (*B 2010*), associado à tendência da coloração verde ao vermelho, observada nessa amostra, pode ser explicado, de acordo com Senter e Forbus (1978), em função de reações de oxidação, durante o processo de atomização. Nessas reações, compostos tais como a leucocianidina e leucodelfinidina, originam seus respectivos flobafenos (taninos condensados de cor vermelha), de graus variados de polimerização. Além disso, segundo os mesmos autores, em menor escala, as alterações de coloração observadas na amostra atomizada por Spray Dryer podem estar relacionadas à formação de cianidina e delfinidina. Prado et al. (2010) analisando a coloração de cascas de noz-pecã de diferentes lotes, observou que as amostras de tons mais vermelhos, também apresentaram teores superiores de taninos condensados, sugerindo uma relação com a concentração maior de flobafenos e a tendência a coloração vermelha das cascas. Além disso, os resultados superiores observados para atividade antioxidante na infusão atomizada em Spray Dryer estão diretamente relacionados à maior concentração de compostos fenólicos nesta amostra.

Através da análise estatística dos efeitos exercidos pela safra e variedade estudada sob a coloração do pó das cascas e os resultados obtidos para extrato seco, fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) dos extratos, observou-se que as amostras que apresentaram as maiores médias para luminosidade (L^*), também apresentaram efeito significativo do ano da colheita para o conteúdo de fenólicos totais. Os pós mais amarelados (maiores valores para b^*) demonstraram os mesmos efeitos exercidos pela safra, para atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e, o ano da colheita exerceu efeito significativo para o teor de extrato seco ($MV 2009 > MV 2010$).

As amostras que apresentaram diferenças significativas em

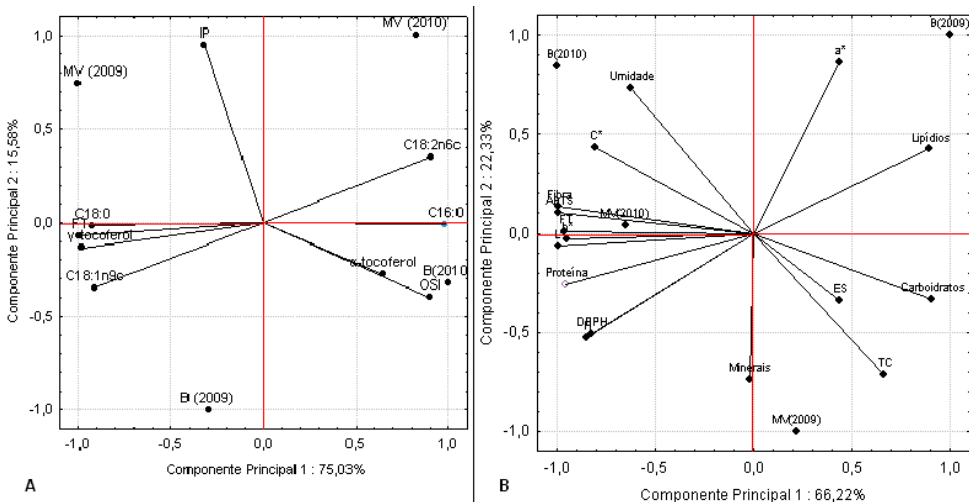
função da variedade, para a tendência à coloração amarela (maiores valores para b^*), também exibiram a mesma influência para o teor de extrato seco e conteúdo de fenólicos totais. O efeito exercido para a tonalidade ou matiz, na safra 2009, também foi observado para o teor de taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH), estabelecendo uma possível correlação entre as amostras com ângulos (H) tendendo a 90° (do vermelho ao amarelo) e, a atividade antioxidante (DPPH), estando esta última, relacionada com o conteúdo de taninos condensados.

Prado et al. (2009a) avaliando a infusão de cascas de nozes de uma mistura de variedades comercial, reportou médias significativamente diferentes para o conteúdo de extrato seco ($23 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), compostos fenólicos totais ($138 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$), taninos condensados ($43 \text{ mg CE} \cdot \text{g}^{-1}$), e atividade antioxidante, através dos sistemas ABTS ($1404 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) e DPPH ($385 \text{ mg TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$). As diferenças observadas entre os resultados de Prado et al (2009a) e os encontrados no presente trabalho, além de estarem relacionadas com as condições de cultivo, solo e fatores ambientais entre outros também podem estar relacionadas aos diferentes anos de colheita (2006), e a composição da mistura de variedades das amostras analisadas (Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw e Cape Fear). Pesquisas anteriores avaliando a coloração de nozes, reportaram efeitos significativos da variedade cultivada (GRAUKE et al., 1998; SILVA et al., 1995) e ano de colheita (GRAUKE et al., 1998) para os ângulos referentes a tonalidade e matiz (H).

3.4 Relação entre as propriedades antioxidantes e a composição química do óleo e da casca de noz-pecã

Para melhor compreensão da relação entre as variáveis estudadas nos diferentes grupos de óleo da amêndoa e pó da casca de noz-pecã, uma ACP (Análise de Componentes Principais) foi aplicada aos resultados obtidos para “MV e B” das colheitas de 2009 e 2010 (Figura 21 – pag. 153).

Figura 21 – Representação gráfica da ACP realizada para as amostras estudadas das safras de 2009 e 2010. A: óleo de noz-pecã para a mistura de variedades (MV) e variedade Barton (B). B: pó da casca de noz-pecã das amostras MV (Mistura de Variedade) and Barton (B).



De acordo com os resultados obtidos a composição (ácidos graxos, tocoferóis e fitosteróis totais) e estabilidade oxidativa (IP e OSI) do óleo (Figura 21-A), explicaram conjuntamente 90,61% da variabilidade dos dados nas primeiras duas dimensões, sendo os componentes principais 1 e 2 (CP₁ e CP₂), responsáveis por 75,03% e 15,58% da variância total dos dados, respectivamente. O CP₁ demonstrou uma forte correlação entre C18:0 (ácido esteárico), FT (fitosteróis totais), C18:1n9c (ácido oléico), C18:2n6c (ácido linoléico), γ -tocoferol e C16:0 (ácido palmítico). Graficamente é possível observar uma alta correlação positiva entre C18:0, FT, γ -tocoferol e C18:1n9c e, uma relação inversa com o teor de C16:0. Dentro do primeiro componente, também foi possível observar uma forte relação inversa entre o conteúdo de ácido oléico e linoléico entre os grupos de nozes estudados. Os resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados por Toro-Vazquez e Pérez-Briceño (1998), que avaliaram o óleo de nozeiras nativas da região central do México e observaram uma correlação inversa, altamente significativa ($r=0,976$, $p < 0,0001$), entre os teores de ácido oléico e linoléico.

A ACP do óleo também indicou uma forte relação entre o teor de α -tocoferol e a estabilidade oxidativa (OSI e IP) do óleo, sendo que à medida que o teor de α -tocoferol aumentou, diminuiu o IP, melhorando o índice de estabilidade oxidativa (OSI). Através da ACP do óleo, também foi possível observar uma distribuição distinta entre os grupos de nozes estudados de acordo com sua composição química, e tendências foram evidenciadas para o ano de colheita e variedade estudada, sendo o ano de colheita o fator que mais influenciou no teor de diferentes ácidos graxos, enquanto a variedade foi mais influente na estabilidade oxidativa do óleo ($B > MV$).

Rudolph et al. (1992) reportaram a relação entre estabilidade oxidativa do óleo de noz-pecã ao decréscimo da concentração de ácido linoléico, em estudos de oxidação acelerada, encontrando melhores resultados para a variedade Barton, em relação às cultivares Apache, Caddo, Choctaw, Comanche, Mohawk, Shawnee, Sioux e Wichita. A relação entre o aumento do teor de ácido linoléico e o decréscimo da estabilidade oxidativa não foi evidenciada no presente estudo indicando que outros componentes presentes no óleo como a concentração de isômeros específicos de tocoferóis, a variedade da noz e a presença de compostos fenólicos podem exercer influência significativa na estabilidade do óleo.

Na análise de ACP (Figura 21-B) da composição centesimal, parâmetros de cor, fitoquímicos e atividade antioxidante, do pó da casca de noz-pecã das amostras MV e B (2009 e 2010), os componentes principais 1 e 2 (CP_1 e CP_2), explicaram 88,55% da variância total dos dados, sendo CP_1 e CP_2 responsáveis por 66,22% e 22,33% da variância respectivamente. O CP_1 demonstrou correlação positiva entre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, conteúdo de fenólicos totais, fibras, proteínas e parâmetros de cor L^* , b^* , C^* e H . Uma forte correlação inversa desses atributos, foi observada com os teores de lipídios totais e carboidratos, no mesmo componente (CP_1). No CP_2 , observou-se uma correlação positiva entre o teor de minerais, extrato seco e taninos condensados, sendo os teores de taninos condensados e minerais fortemente correlacionados negativamente com o teor de umidade e o parâmetro de cor a^* , respectivamente.

Através da ACP do pó das cascas de noz-pecã foi possível observar uma distribuição distinta entre os grupos de nozes analisados de acordo com sua composição e parâmetros de cor. A influência da safra e da variedade estudada foi notável nas amostras B e MV (2010).

Estas amostras apresentaram grupos com características mais homogêneas entre si, com destaque para a amostra B (2010), que apresentou valores superiores na maioria dos parâmetros avaliados, diferenciando-se significativamente das amostras B e MV (2009), que apresentaram os menores valores para fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS e DPPH).

Através da análise de componentes principais (ACP) e os resultados da análise instrumental da cor, foi possível esclarecer algumas interferências observadas nas análises colorimétricas para fenólicos totais e taninos condensados. O reagente de Folin Ciocalteu, além de sofrer redução por compostos fenólicos, também é sensível a presença de determinadas proteínas (Zaia, Zaia e Lichtig, 1998) superestimando o teor dos compostos de interesse. O método da Vanilina, amplamente utilizado para a determinação de taninos condensados, também pode sofrer interferência superestimando os resultados. De acordo com Schofield, Pell e Mbugua (2001), o método da Vanilina parece ser reativo com subunidades de polímeros de taninos, caracterizando falta de especificidade para taninos condensados. Além disso, a Vanilina também reage na presença de alguns grupos de proteínas de natureza fenólica, devido à redução instantânea da Vanilina livre por forças químicas (ligação de hidrogênio e de interação hidrofóbica), que é acentuada nos alimentos com menor teor de lipídios (Chobpattana et al., 2002; Chobpattana, Jeon e Smith, 2000).

Essas interferências podem ser melhor compreendidas com auxílio da análise instrumental da cor através do sistema CIELab onde $a^* > 0$ indica a direção da coloração para os tons vermelhos. Sabe-se que a coloração vermelha está fortemente relacionada ao teor de taninos condensados, especialmente para o grupo de flobafenos (Prado et al., 2010; Senter e Forbus, 1978).

Esse fato pode ser observado nas amostras MV da safra 2009 que apresentaram teores de proteínas significativamente superiores comparados aos obtidos para a amostra B colhida no mesmo ano, apresentando também teores significativamente reduzidos para lipídios totais, favorecendo a exposição das moléculas de proteínas que reagiram com os reagentes de Folin Ciocalteu e Vanilina resultando valores superestimados para fenólicos totais e taninos condensados. Esse resultado pode ser comprovado através da análise de cor do parâmetro a^* que reportou valores para tons mais avermelhados na

amostra B (2009) e da análise de componentes principais na qual se pode observar a relação fortemente negativa entre o teor de proteínas e de lipídios e fortemente positiva entre o parâmetro a^* e o teor de lipídios das amostras. A mesma magnitude da interferência nas análises não foi observada entre as demais amostras onde as diferenças entre o teor de taninos condensados não foi significativa. Nas amostras atomizadas com spray dryer, observou-se uma maior concentração do teor de taninos condensados, uma drástica redução do teor de lipídios causando uma exposição maior das moléculas de proteínas, apesar destas apresentarem uma concentração muito reduzida. Além disso, as amostras atomizadas em spray dryer sofreram uma acentuada concentração dos compostos fenólicos.

De acordo com Shahidi e Naczk (2004), algumas substâncias fenólicas presentes na casca podem ser lixiviadas para o interior da amêndoa durante o pré-condicionamento por imersão, antes das nozes serem quebradas no descascamento. Senter, Horvat e Forbus (1980), reportaram em seus estudos, que a quantidade e a qualidade de compostos fenólicos, estariam diretamente relacionadas à estabilidade oxidativa de nozes-pecã durante o armazenamento. Essas evidências justificariam o fato de que embora as amostras da safra 2010 tenham apresentado teores superiores de ácidos graxos polinsaturados, sendo quimicamente mais susceptíveis às reações de oxidação, também apresentaram valores superiores para estabilidade oxidativa do óleo.

Este fato sugere uma relação de que amostras mais sujeitas à oxidação do óleo apresentariam teores superiores de compostos antioxidantes na sua casca. Considerando a ligação entre ambas às partes da noz, através do tegumento interno que liga a casca à amêndoa, o tegumento exerceria, dessa forma, um efeito protetor em relação ao óleo presente na amêndoa, devido à oxidação preferencial dos compostos fenólicos presentes na casca (Jurd, 1956). Esse processo ocorreria como resposta natural de proteção da planta ao estresse oxidativo mais evidente devido a sua composição de natureza mais insaturada de seus ácidos graxos, apresentando estabilidade oxidativa e atividade antioxidante superior.

4 CONCLUSÕES

Através do presente observou-se um efeito significativo do ano de colheita e variedade da amostra estudada sob a qualidade nutricional

e fitoquímica do óleo e da casca das nozes. Além disso, as amêndoas de noz-pecã, colhidas na safra 2010, em que foram detectados teores superiores para ácidos graxos polinsaturados (ácido linoléico), também apresentaram níveis mais elevados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) na casca, em relação à colheita de 2009, para o mesmo grupo de amostra. Esse fato sugere que a quantidade de compostos fenólicos, estariam diretamente relacionadas à estabilidade oxidativa, evidenciando uma relação entre o teor de ácidos graxos insaturados presentes no óleo e a concentração de compostos antioxidantes na casca protetora externa.

Embora os compostos fenólicos sejam considerados termicamente instáveis, não foram observadas perdas significativas na análise espectrofotométrica no infravermelho (FTIR), nos teores totais (FT e TC), e na atividade antioxidante (ABTS e DPPH), após o processamento por atomização com Spray Dryer, sugerindo ser uma tecnologia adequada para a concentração desses compostos.

Agradecimentos

À empresa Divinut Ind. de Nozes Ltda (Cachoeira do Sul – RS), pelo fornecimento da matéria-prima. A *Gum Products International* (Ontario, Canada) pelo uso do FTIR. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. A Paula Cristina Engler, Rafael Luchtenberg, Priscila de Brito Policarpi, Priscilla dos Santos de Oliveira e Vanessa Martins Hissanaga, do Laboratório de Óleos e Gorduras (UFSC) pelo auxílio nas análises. Este estudo foi financiado pelo CNPq processo número 479069/2011-5.

5 REFERÊNCIAS

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n.4, p. 470-475, 1974.

AMAROVICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 58, p. 355 – 359, 1997.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, USA, AOCS, 2004.

AOCS. Approved method Ba 6a-05: Crude fiber analysis in feeds by filter bag technique. Official Methods and Recommended practices, 4th ed.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, 1996.

BETANCUR-ANCONA, D.; PERAZA-MERCADO, G.; MOGUEL-ORDOÑEZ, Y.; FUERTES-BLANCO, S. Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. **Food Chemistry**, v. 84, p. 287 – 295, 2004.

BRAMLEY, P. M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F. J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H. E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P. J. A.; WAGNER, K-H. Review Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 913 - 938, 2000.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER A.E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, v. 28, p. 25 - 30, 1995.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CHOBPATTANA, W; JEON, I.J.; SMITH, J.S. Kinetics of Interaction of Vanillin with Amino Acids and Peptides in Model Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3885–3889, 2000.

CHOBPATTANA, W.; JEON, I.J.; SMITH, J.S., LOUGHIN, T.M. Mechanisms of Interaction Between Vanillin with Milk Proteins in Model Systems. **Journal of Food Science**, v. 67(3), p. 973-977, 2002.

DE CARVALHO, V.D. Bromatological characteristics of pecan nuts (*Carya illinoensis* Koch) cultivated in Brazil. **Revista de Farmácia e Biquímica da Universidade de São Paulo**, v.13, n.2, p.293 – 301, 1975.

DIVINUT. Saúde, sabor e requinte. Disponível em www.divinut.com.br, acesso em 11/02/2011.

FIRESTONE, D. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes. USA, AOCS Press, 152 p. 1999.

GRAUKE, L.J.; THOMPSON, T.E.; YOUNG, Jr., E.F.; PETERSEN, H.D. The effect of year, cultivar, location, and storage regime on pecan kernel color. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 4, p. 681 – 686, 1998.

GUO, Y.; ROCKSTRAW, D.A. Physicochemical properties of carbons prepared from pecan shell by phosphoric acid activation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1513 – 1521, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A Rapid Preparation of Fatty Acids Methyl Esters From Lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 457-477, 1973.

HOUNSOME, N., HOUNSOME, B.; TOMOS, D.; EDWARD-JONES, G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 73, p. R48–R65, 2008.

JING, H.; KITTS, D.D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar maillard reaction products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1007 – 1015, 2002.

JURD, L. Plant Polyphenols. I. The Polyphenolic Constituents of the Pellicle of the Walnut (*Juglans regia*). **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 3445 – 3448, 1956.

KLASSON, K.T.; WARTELLE, L.H.; RODGERS III, J.E.; LIMA, I.M. Copper(II) adsorption by activated carbons from pecan shells: Effect of oxygen level during activation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, P. 72 – 77, 2009.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1486–1496, 2006.

LAVEDRINE, F.; RAVEL, A.; VILLET, A.; DUCROS, V.M.; ALARY, J. Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. **Food Chemistry**, v. 68, p. 347 - 351, 2000.

MALIK, N.S.A.; PEREZ, J.L.; LOMBARDINI, L.; CORNACCHIA, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BRAFORD, J. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2207 – 2213, 2009.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127 – 130, 2001.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72, n.2, p. 145 - 171, 2001.

MÜLLER, L.G.; PASE, C.S.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLEUR, N.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; PAVANATO, M.A.; BAUERMANN, L.; ROCHA, J.B.T.; Burger, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, In Press, 2012.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPSRT-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, p. 227 – 235, 2005.

ORO, T.; BOLINI, H.M.A.; BARRERA-ARELLANO, D. y BLOCK, J.M. Physicochemical and Sensory Quality of Crude Brazilian Pecan Nut Oil during Storage. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 86, p. 971 – 976, 2009.

ORO, T.; OGLIARI P.J.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRERA-ARELLANO, D. y BLOCK, J.M. Evaluación de la calidade durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, n.2, v. 59, p. 132-138, 2008.

ORTIZ, E. R. N. **Propriedades nutritivas e nutracêuticas das nozes.** Monografia – Especialização em Tecnologia de Alimentos, Universidade de Santa Cruz do Sul, RS, 2000.

POKORNÝ, J.; PARKÁNYIOVÁ, J. Lipids with antioxidant properties. **Healthful Lipids.** AOCS Press, 2005.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2010.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n.4, p. 330 – 335, 2009 (a).

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n.5, p. 458-467, 2009(b).

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214 - 1218, 1978.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n. 9/10, p.1231 -1 237, 1999.

RECKZIEGEL, P; BOUFIÉUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVENU', D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

RUDOLPH, C.J.; ODELL, G.V.; HINRICHS, H.A.; THOMSON, H.J.; KAYS, S.J. Chemical changes in pecan oils during oxidation. **Journal of Food Quality**, v. 15, p. 279 – 293, 1992.

SAHIN NADEEM, H.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 1626 – 1635, 2011.

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

SENER, S.D.; HORVAT, R.J.; FORBUS JR, W.R. Relation between phenolic acid content and stability of pecans in accelerated storage. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1380 - 1382, 1980.

SENER, S.D.; FORBUS, JR W.R. Leucoanthocyanidin oxidation in pecan kernels: relation to discoloration and kernel quality. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 128 - 134, 1978.

SHAHIDI, F.; MIRALIAKBARI, H. Tree Nut Oils. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Specialty Oils & Protects**. 6.ed., v.3, EUA, Wiley – interscience, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Cereals, Legumes and Nuts**. In: Phenolics in Food and Nutraceutical. Boca Raton, CRC Press LLC, cp. 4, pg. 45, 2004.

SILVA, J.L.; MARROQUIN, E.; MATTA, F.B.; HERRERA, E.A. Eating quality and other characteristics of New Mexico pecan cultivars harvested over three years. **Horticulture Technology**, v. 5, n. 3, p. 206 – 208, 1995.

SINGANUSONG, R.; MASON, R.L.; D'ARCY, B.R. Compositional changes of Australia-Grown Western Schley Pecans [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 406 – 412, 2003.

TORO-VAZQUEZ, J.F.; PÉREZ-BRICEÑO, F. Chemical and physicochemical characteristics of pecan (*Carya illinoensis*) oil native of the central region of Mexico. **Journal of Food Lipids**, v. 5, p. 211 – 231, 1998.

VAGHETTI, J.C.P.; LIMA, E.C.; ROYER, B.; CARDOSO, N.F.; MARTINS, B.; CALVETE, T. Pecan Nutshell as Biosorbent to Remove Toxic Metals from Aqueous Solution. **Separation Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 615 – 644, 2010.

VENKATACHALAM, M.; KSHIRSAGAR, H.H.; SEERAM, N.P.; HEBER, D.; THOMPSON, T.E.; ROUX, K.H.; SATHE, S.K. Biochemical composition and immunological comparison of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 9899 – 9907, 2007.

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p. 1241-1249, 2007.

WAKELING, L.T.; MASON, R.L.; D'ARCY, B.R.; CAFFIN, N.A. Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Caraya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] grown in Australia. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p. 1277 - 1281, 2001.

WANASUNDARA, P.K.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determination of total protein by spectrophotometry: Advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

CAPÍTULO 3

Efeito do processo de extração sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana e o perfil de compostos fenólicos em extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]

Efeito do processo de extração sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana e o perfil de compostos fenólicos em extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]

Resumo

No presente trabalho foi avaliado o efeito do processo de extração (infusão, infusão seguida de atomização em Spray Dryer, extração etanólica e extração supercrítica) sobre o teor de compostos fenólicos (totais e taninos condensados) e a atividade antioxidante (ABTS e DPPH) sobre a qualidade dos extratos da casca de noz-pecã. Foi determinado o perfil de compostos fenólicos por CLAE após o preparo das amostras através de diferentes metodologias (básico/ácida, hidrólise enzimática e separação através de resina Sephadex® LH-20). A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi determinada em meio sólido e através da CMI e CMB para diferentes cepas de fungos e bactérias. Dos três diferentes métodos de extração avaliados a infusão e a extração alcoólica apresentaram conteúdo de compostos fenólicos totais e taninos condensados e a atividade antioxidante (ABTS e DPPH) significativamente superior à extração supercrítica. O processo de atomização em Spray Dryer do extrato obtido através de infusão concentrou significativamente as amostras, acentuando a atividade antioxidante avaliada *in vitro*. Das metodologias testadas através de CLAE, o uso da resina Sephadex® LH-20 possibilitou a identificação dos ácidos gálico, clorogênico e *p*-hidroxibenzóico e de dois compostos da classe dos flavonoides (subclasse flavan-3-ol: epigalotequina e epicatequina galato). Os extratos obtidos através de infusão e extração alcoólica apresentaram capacidade bactericida para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicando que os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana e bactericida para estes microorganismos de interesse em alimentos.

Palavras-chave: antioxidante, antimicrobiano, casca de noz-pecã, compostos fenólicos, perfil fenólico.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos produz anualmente um volume significativo de resíduos que causam sérios problemas de descarte e eliminação. Muitos destes subprodutos industriais possuem elevado potencial químico e nutricional, sendo que nos últimos anos várias pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de novas alternativas de uso para esses subprodutos (ORZUA et al., 2009; GRAMINHA et al., 2008; RODRÍGUEZ COUTO, 2008).

No sul do Brasil as indústrias de processamento de amêndoas de noz-pecã, produzem aproximadamente 40 a 50%, do total da produção industrial na forma de casca, que é comercializada em pedaços para a preparação de chá (DIVINUT, 2011). A casca de noz-pecã é rica em compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas que têm sido extensivamente estudados em função de suas propriedades antioxidantes (MALIK et al., 2009; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; DIMITRIOS, 2006; SENTER, HORVAT e FORBUS, 1980). Estudos in vivo relataram que os compostos fenólicos presentes no chá da casca da noz-pecã minimizaram os danos hepáticos causados pelo estresse oxidativo provocados pela ingestão crônica de álcool em ratos, além de atuar como ansiolítico natural na prevenção da ansiedade causada pela abstinência do cigarro (MÜLLER et al., 2013; RECKZIEGEL et al., 2011). Além disso, compostos fenólicos têm sido relatados como agentes antimicrobianos contra vários micro-organismos (SERRANO et al., 2009; RAUHA et al., 2000).

Entre os compostos fenólicos naturais que exercem atividade antimicrobiana, estão os ácidos fenólicos (caféico, gálico, *p*-cumárico, protocatecuico e ferúlico) capazes de inibir o crescimento de várias bactérias (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli spp*, *Salmonella spp*) e, compostos flavonóides (catequinas, quercetinas, entre outros) reportados por apresentar atividade bacteriostática e/ou bactericida, dependente da concentração, para o crescimento de vários micro-organismos (*Bacillus*, *E. coli spp*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio*) (VAQUERO e NADRA, 2008; NAZ et al., 2007; PUUPPONEN-PIMIÁ et al., 2001; RAUHA et al., 2000; HERALD e DAVIDSON, 1983).

Dentre os métodos tradicionalmente utilizados para a obtenção de extratos vegetais, ricos em antioxidantes e antimicrobianos naturais, podem ser citadas as extrações convencionais, incluindo a técnica de infusão, extração com *soxhlet* e a extração com o uso de solventes orgânicos. As técnicas de infusão e extração com *soxhlet* vêm sendo questionadas por apresentar desvantagens relacionadas ao baixo rendimento e eventual perda de componentes termolábeis, devido às altas temperaturas envolvidas. A extração com solventes orgânicos de variadas polaridades apresenta como principais restrições a presença de resíduo de solvente no extrato, muitas vezes tóxico, e a obtenção de compostos indesejáveis no produto. Dessa forma, o uso de solventes considerados *GRAS* e o emprego de tecnologias alternativas como a utilização de fluido supercrítico (que empregam temperaturas moderadas, preservando a qualidade de compostos termosensíveis e possibilitam o uso de cosolventes com a finalidade de melhorar o rendimento de compostos de interesse), podem representar alternativas aos processos de extração convencionais para extração de compostos de interesse para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (MENDIOLA et al., 2007; DINÇER et al., 2005; ZANCAN et al., 2002; POKORNY e KORCZAK, 2001).

O crescente interesse das indústrias de alimentos funcionais, nutracêuticos e fármacos pelos extratos vegetais, tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas avaliando a efetividade dos polifenóis e sua aplicação, já que esta depende entre outros fatores da preservação da estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos. Além disso, o sabor desagradável conferido por alguns compostos fenólicos também limita sua aplicação. Para isso vem sendo estudada a tecnologia de obtenção de micropartículas através da atomização por *spray dryer* para o emprego de polifenóis encapsulados, atenuando as deficiências da aplicação do extrato *in natura* (FANG e BHANDARI, 2010). Esse processo tem sido utilizado para obtenção de micropartículas de vários compostos bioativos de origem natural na produção de nutracêuticos, tais como fibras de frutas comestíveis, probióticos e extratos com propriedades antioxidantes (HOMAYOUNI et al., 2008; CHIOU e LANGRISH, 2007). No entanto, alguns estudos ainda são necessários no sentido de avaliar a influência do emprego da tecnologia de atomização em *spray dryer* na composição fenólica dos extratos, principalmente aqueles de

composição susceptível a degradação térmica, já que esta tecnologia utiliza altas temperaturas de secagem.

Para avaliação da composição fenólica de extratos vegetais, são empregadas usualmente análises cromatográficas, principalmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Porém, a análise do perfil fenólico de alguns extratos pode não ser tão simples, requerendo métodos adicionais de preparação de amostra, especialmente em matrizes complexas, como a de produtos naturais extraídos da casca dos vegetais, onde ocorre abundância de material lignocelulósico. Na tentativa de elucidar a composição fenólica da torta e da casca de noz-pecã, Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007) e De La Rosa et al. (2011) empregaram métodos de hidrólise básico / ácido (NaOH - 8 N / HCl - 6 M) e hidrólise ácido / básica (HCl - 2 M / NaOH - 10 M), respectivamente, sendo que ambos os tratamentos demonstraram ineficiência na detecção de flavonoides e taninos condensados, mostrando-se excessivamente drásticos para o tratamento da amostra. Metodologias menos agressivas, empregando o uso de enzimas específicas (β -glicosidase e Tannase) para a clivagem de ligações químicas específicas, evitando o uso de condições excessivamente ácidas e alcalinas, também tem sido utilizadas na elucidação do perfil fenólico de alguns extratos vegetais (MACEDO et al., 2011; LA TORRE et al., 2004). A dificuldade analítica de matrizes complexas, ricas em taninos condensados, também tem sido discutida por Malik et al. (2009). Esses autores reportaram teores traços de catequinas, monômeros de taninos condensados, em amostras de torta de noz-pecã, fazendo uso de uma coluna lipofílica (LH-20 resina Sephadex®).

Desta forma, o presente trabalho avaliou o efeito do processo de extração (infusão, extração etanólica e extração supercrítica) no teor de compostos fenólicos (totais e taninos condensados) com atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e, a influência do processo de secagem através de atomização por Spray Dryer sobre a qualidade dos extratos. Além disso, os melhores extratos foram submetidos à análise de CLAE para determinação do perfil fenólico, utilizando diferentes metodologias de preparo de amostra (básico/ácida, hidrólise enzimática e separação através de resina Sephadex® LH-20) e, avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido e através da determinação da CMI e CMB para diferentes cepas de fungos e

bactérias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

6 kg de cascas de noz-pecã da variedade Barton (safra de 2010), provenientes de lavouras localizadas na região central do Estado do Rio Grande do Sul / Brasil.

2.2 Reagentes químicos

Reagente Fenol Folin & Ciocalteau, Tannase (E.C.3.1.1.20 do *Aspergillus ficcum*), ácido gálico, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), Trolox, vanilina e (-)-galocatequina e ácido ferulico obtidos da Sigma-Aldrich (Germany); (+)-catequina hidratada e (-)-epicatequina galato obtidos da Sigma-Aldrich (China); ácido clorogênico e (-)-epigalocatequina obtidos da Sigma-Aldrich (Índia); (-)-epicatequina, 4-5 dicafeoilquínido, ácido *p*-hidróxi-benzóico, ácido protocatecuico obtidos da Sigma-Aldrich (USA); ácido caféico obtido da Sigma-Aldrich (Switzerland); Resina Sephadex Lipofílica (Sephadex® LH-20) obtida da Sigma-Aldrich (Sweden); Agar Müller Hilton, Agar batata dextrose, Agar triptose de soja e caldo triptose de soja obtidos da marca Acumedia – Sovereign (Brasil); cepas bacterianas e fúngicas obtidas da Fiocruz (Brasil). Todos os demais reagentes químicos e solventes utilizados no experimento foram de grau analítico (P.A.) adquiridos da Vetec Química Fina / Sigma-Aldrich.

2.3 Preparo das amostras

2.3.1 Obtenção do pó e dos extratos da casca de noz-pecã

As cascas foram secas a 40°C em estufa com circulação de ar (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética®) para redução do teor de umidade e moídas em moinho analítico de laboratório (modelo A-11 da marca IKA Works®). O pó foi peneirado em peneira de 60 mesh e armazenado em frasco âmbar, com atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores (PRADO et al., 2009).

Foram obtidos extratos convencionais através do procedimento de infusão em água destilada (20 g/L em base seca à 98° durante 10 min.) segundo Prado et al. (2009), e extratos alcoólicos de acordo com procedimento realizado por Prado et al. (2010), seguido de algumas modificações (20 g/L em base seca colocadas sob agitação constante em etanol absoluto durante 1 hora ao abrigo da luz e temperatura ambiente). Os extratos foram filtrados sob vácuo em papel filtro (Whatman 541, 125 mm) e, os volumes completados para 100 mL e armazenados em frasco âmbar, com atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores.

Para a obtenção dos extratos empregando a tecnologia de extração com fluido supercrítico utilizou-se as seguintes condições de ensaio: 15 g do pó da casca de noz-pecã foram extraídos durante 250 min. à 50°C nas pressões de 100 e 200 bar, utilizando vazão de CO₂ de 0,7 kg/h e 10% de cosolvente (etanol absoluto).

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos ocasionados pelo emprego da tecnologia de secagem por atomização em Spray Dryer, na atividade antioxidante e antimicrobiana, infusões foram preparadas (Prado et al., 2009) e secas através de atomização em equipamento BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Temperatura de entrada e saída de 150°C e 50 °C, respectivamente; fluxo de ar/gás de 35m³.h⁻¹ - 100%; fluxo da solução a ser atomizada de 10 mL.min⁻¹ - bomba 25%) e armazenados a -24°C, para análises posteriores (SAHIN NADEEM, et al., 2011). O pó obtido foi armazenado a -24°C, e reconstituído em água destilada na concentração de 20g/L no momento da análise.

A determinação do extrato seco de todos os extratos foi realizada por gravimetria, tomando-se uma alíquota de 5 mL em cadinho de alumínio, previamente tarado, seguido de secagem em estufa (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética[®]) a 105,0 ± 0,5°C até peso constante (AOAC, 2005), para determinação do rendimento de extração.

2.4 Compostos fenólicos totais, taninos condensados e perfil fenólico

2.4.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (PRADO et. al, 2009; BUDINI, TONELLI, GIROTTI, 1980). Alíquotas (100 µL) de diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, a reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75g/L) e, os volumes completados até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 horas no escuro, a temperatura ambiente, a absorbância da solução azul resultante foi medida em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 764 nm. A quantificação foi feita com base em curva analítica de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE.g⁻¹ (equivalente de ácido gálico) em peso seco.

2.4.2 Determinação do conteúdo de Taninos Condensados

Para a determinação do teor de taninos condensados procedeu-se de acordo com Price, Vanscoyoc e Butter (1978) e adaptado por Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007). Foram coletadas alíquotas de 1 mL de diluições apropriadas dos extratos e colocadas em 2 tubos de ensaio separados (1 para a amostra e outro para o branco). Após foram adicionados 5 mL do reagente Vanilina (0,5g de reagente e 200 mL de HCl 4%/metanol) para as amostras, e HCl 4%/metanol para o branco. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz por um período de 20 minutos e as medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg CE.g⁻¹ (mg equivalente de catequina/g de amostra desengordurada).

2.4.3 Determinação do perfil fenólico através de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparo da amostra para CLAE

O perfil fenólico foi determinado nos extratos que

apresentaram os teores de fenólicos totais e taninos condensados mais significativos (infusão, infusão seca em spray dryer e extrato etanólico) e as amostras foram submetidas a três métodos de preparação: extração básico/ácida conforme descrito por Abdel-Aal et al. (2001) e Gelinas e McKinnon (2006), hidrólise enzimática utilizando a enzima Tannase (E.C.3.1.1.20 de *Aspergillus ficcum*) realizada de acordo com Macedo et al. (2011), e separação através de resina Sephadex lipofílica (Sephadex® LH-20) conforme procedimento descrito por Malik et al. (2009) com as seguintes modificações. A resina Sephadex® LH-20 foi condicionada (0,750 g com 3 mL do solvente da extração) em coluna medindo 9 mm x 100 mm durante 24 h; após a coluna foi lavada com 10 mL do solvente da extração (0,5mL/min) sob vácuo. Uma alíquota de 300 µL do extrato filtrado (0,45 µm) foi eluído com 10 mL de etanol 80% (0,5mL/min) sob vácuo e coletadas 5 frações de 2 mL para análise.

Análise de CLAE

Alíquotas (10 µL por amostra) foram injetadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10, Tokyo, Japão) equipado com uma coluna em fase reversa (Shim-pack C18, 4,6 mm i.d. x 250 mm; Shimadzu), termostaticado a 40°C, e um detector UV-visível (Shimadzu SPD 10 A, $\lambda = 280$ nm). Uma fase móvel isocrática composta de uma mistura de água: ácido acético: butanol (350 : 1 : 10, v/v/v) foi utilizada com uma taxa de 0,8 mL por minuto. Para a análise quantitativa, curvas analíticas foram obtidas através da plotagem da área do pico x diferentes concentrações (1 a 100 µg/mL), para cada composto padrão. As injeções foram realizadas em triplicata, fazendo uso da média das três injeções para a quantificação dos compostos da amostra. A identificação dos compostos de interesse foi confirmada através de análise cromatográfica de compostos de referência (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido cafêico, epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina, 4-5 dicafeoilquínico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido protocatecuico) comparando os tempos de retenção destes compostos.

2.5 Atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

2.5.1 Atividade antioxidante *in vitro*

Método ABTS

O método ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)] foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com algumas modificações. Após o preparo do radical ABTS (7mM - 0,03836g do ABTS dissolvido em 10 mL de água deionizada), foi preparada uma solução de persulfato potássico (2,45 mM - 10 mL de ABTS e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e mantidos num frasco âmbar durante 16 horas protegido da luz). Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200 µL do radical formado e diluído em 10 mL de etanol absoluto P.A. Medidas de absorvância em cubetas de 10 mm e em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 734 nm, foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de $0,700 \pm 0,05$. Uma alíquota de 980 µL do radical diluído foi pipetada e transferida para uma cubeta de 10 mm (1 mL) procedendo a medida da absorvância ($A_{754}=A_0$) adicionando imediatamente 20 µL da amostra e homogeneizando e agitando por alguns segundos. Trolox foi utilizado como padrão (15 µM = 0,13209g/500 mL). O cálculo da percentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical = $(1 - A_f/A_0) \times 100$, onde, “ A_0 ” é a absorvância inicial e “ A_f ” é a absorvância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em µmol TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

Método DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), foi realizado de acordo com Brand-William, Cuvelier e Berset (1995) seguido de modificações conforme Prado et al. (2009) e Mensor et al. (2001). Após o preparo do radical (0,1 mM - 0,03943g do DPPH dissolvido em 10 mL de etanol a 80%), foi pipetada uma alíquota de 2,9 mL do mesmo e colocados para reagir em tubos de ensaio adicionados de 0,1 mL do extrato da amostra. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz e, as medidas de absorvância foram realizadas em

espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 515 nm após 30 minutos. Trolox foi utilizado como padrão (150 mg/L). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical = $(1 - A_f/A_o) \times 100$, onde, “Ao” é a absorbância inicial e “Af” é a absorbância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em mg TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

2.5.2 Atividade antimicrobiana

Extratos com melhores resultados para o teor de compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante *in vitro*, foram concentrados sob vácuo em rotaevaporador rotatório (40°C), até a concentração de 200 mg/mL e testada a atividade antibacteriana e antifúngica. Padrões de compostos fenólicos identificados através de CLAE nos extratos da casca de noz-pecã, também foram avaliados referente à atividade antimicrobiana de forma isolada.

As seguintes cepas de bactérias foram usadas como indicadoras: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Listeria monocytogenes sorotipo II* ATCC 19112, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Para reativação, todas as cepas foram cultivadas em caldo triptona de soja (TSB), incubadas a temperatura de 35-37°C durante 24 h.

Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizados como indicadores *Aspergillus niger* IOC 0206, *Aspergillus flavus* FC 1087, *Penicillium roquefortii* IOC 2242, *Rhizopus* sp. IOC 1109 e *Fusarium* sp. IOC 1200.

Ensaio de inibição em meio sólido

Os ensaios de inibição em meio sólido foram realizados através do Método de Difusão em Agar pela técnica de poços (PINTO, KANECO e OHARA, 2003), em placas de Petri 10x90 mm, contendo Agar Mueller-Hinton (MH) para os ensaios com cepas bacterianas e Agar batata dextrose (PDA) para os ensaios com cepas fúngicas. Para as bactérias foi aplicada a cultura indicadora, descrita no item 2.5.2,

com auxílio de um *swab* para a formação de um tapete bacteriano, sendo que para os ensaios com as cepas fúngicas foi preparada uma suspensão de esporos e o tapete da cultura obtido com auxílio de uma alça drigalski. Após a total absorção do inoculo, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro, onde foi inoculado 50 µL de cada extrato. O ensaio foi pré-incubado por 2 horas a temperatura ambiente para a difusão dos extratos e posteriormente incubado a 37°C por 24-48 horas para as bactérias e 25-26°C observados até o 5º dia para o crescimento fúngico. Após o período de incubação, procedeu-se a leitura e interpretação dos resultados, através da medida do diâmetro da zona sem crescimento da cepa indicadora (halo de inibição) de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988).

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os extratos foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI), através do método de microdiluição, com base no documento M7-A6 do CLSI (2009).

Foram testadas as seguintes espécies de bactérias: *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Listeria monocytogenes* sorotipo II ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802.

As culturas em Agar triptose de soja (TSA) foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35 °C por 12-18h, a fim de verificar-se a morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir destas placas, tomou-se de 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35 °C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente 10⁷ UFC/ml, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular os poços das placas de microdiluição. Todos os meios de cultura e diluentes utilizados para cultivo e diluição de *Vibrio parahaemolyticus* foram adicionados de 3% de NaCl.

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de

diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). As placas foram incubadas a 36°C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração dos extratos que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA), e para TSA adicionado de 3% de NaCl para *Vibrio parahaemolyticus*. As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada extrato que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através dos programas SAS “for Windows” versão 6.11 e Statistica ® versão 7.0. Os dados foram submetidos à análise de variância de comparação de médias ANOVA / testes de Tukey ($p < 0,05$) e Análise de Componentes Principais (ACP). Além disso, foram gerados no Statistica ® versão 7.0, gráficos tridimensionais utilizando metodologia de superfície de resposta para relacionar os resultados obtidos através de CLAE, a atividade antioxidante e o teor de

compostos fenólicos totais para cada uma das frações analisadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante *in vitro*

Na Tabela 04 podem ser observados os resultados obtidos para o teor de extrato seco, compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante *in vitro* dos diferentes extratos da casca de noz-pecã.

Tabela 04 - Teor de extrato seco, compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante *in vitro* de diferentes extratos da casca de noz-pecã.

Determinação	Método de extração convencional		Método de extração supercrítica		Infusão + Spray Dryer
	Infusão	Alcoólica	100 bar	200 bar	
ES (g.100g ⁻¹)	32,12 ^A ± 0,43	32,09 ^A ± 0,77	0,83 ^B ± 0,02	8,40 ^A ± 0,90	46,36* ± 0,50
FT (mg GAE.g ⁻¹)	181,49 ^A ± 6,97	167,85 ^B ± 3,89	0,34 ^B ± 0,01	9,30 ^A ± 0,10	590,78* ± 4,41
TC (mg CE.g ⁻¹)	36,94 ^B ± 3,20	412,1 ^A ± 9,46	0,48 ^B ± 0,01	29,00 ^A ± 2,00	48,70* ± 1,50
CA _{ABTS} (µmol TEAC.g ⁻¹)	1809,01 ^A ± 27,18	1562,51 ^B ± 33,15	4,95 ^B ± 0,04	100,00 ^A ± 5,00	4124,83* ± 57,09
CA _{DPPH} (mg TEAC.g ⁻¹)	612,24 ^A ± 26,73	524,77 ^B ± 40,72	1,91 ^B ± 0,03	79,20 ^A ± 0,80	1210,97* ± 25,24

^AES = Extrato seco – g.100⁻¹ (ensaio gravimétrico), FT = Fenólicos Totais – mg GAE.g⁻¹ (equivalentes em ácido gálico) em peso seco (ensaio Folin-Ciocalteu), TC = Taninos Condensados - mg CE.g⁻¹ (equivalentes de catequina) de peso seco (ensaio de Vanilina), CA = Capacidade Antioxidante - µmol TEAC.g⁻¹ (atividade antioxidante equivalente em Trolox) em peso seco (ABTS), CA = Capacidade Antioxidante – mg TEAC.g⁻¹ (equivalentes em Trolox) em peso seco (DPPH – TEAC). Letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, p < 0,05) entre os extratos dentro de um mesmo método de

extração empregado; “*” indica diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$) entre a amostra submetida ao processo de Spray Dryer e os demais métodos de extração; média \pm desvio padrão ($n=3$).

Entre as extrações convencionais, os teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante avaliada através dos sistemas ABTS e DPPH, foram significativamente ($p < 0,05$) superiores para a metodologia empregando extração através de infusão ($181,49 \pm 6,97$ mg GAE.g⁻¹, $1809,01 \pm 27,18$ μ mol TEAC.g⁻¹ e $612,24 \pm 26,73$ mg TEAC.g⁻¹ respectivamente) quando comparada às amostras extraídas com etanol absoluto ($167,85 \pm 3,89$ mg GAE.g⁻¹, $1562,51 \pm 33,15$ μ mol TEAC.g⁻¹ e $524,77 \pm 40,72$ mg TEAC.g⁻¹ respectivamente). No entanto, o conteúdo de taninos condensados foi significativamente superior nos extratos alcoólicos ($412,1 \pm 9,46$ mg CE.g⁻¹), comparado aos teores observados na infusão ($36,94$ mg CE.g⁻¹).

As diferenças observadas no teor de taninos condensados podem ser explicadas pelo fato de que a fração solúvel em água inclui principalmente os taninos hidrolisáveis, moléculas ligadas a açúcares, alguns pigmentos e proantocianidinas de baixo grau de polimerização as que constituem uma fração menos significativa de taninos condensados extraídos na infusão. Os compostos solúveis em solventes orgânicos, tais como etanol e acetona, incluem moléculas lignocelulósicas esterificadas, de estrutura molecular mais complexa de maior grau de polimerização, típica para taninos condensados (TRUGILHO et al., 2003).

Para os extratos obtidos através de fluido supercrítico, associado ao uso de etanol como cosolvente, os parâmetros avaliados foram muito inferiores quando comparados com os métodos convencionais de extração. O uso da pressão a 200 bar aumentou significativamente todos os parâmetros avaliados comparado com os resultados obtidos a 100 bar. O teor de extrato seco, compostos fenólicos totais e taninos condensados foram 10, 25 e 60 vezes superiores, respectivamente, quando a condição experimental foi alterada de 100 para 200 bar. Conseqüentemente, ocorreu um aumento significativo da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos a 200 bar, sendo 20 e 40 vezes superior nos métodos ABTS e DPPH, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado pela alteração da densidade do solvente com o aumento da pressão a temperatura constante, melhorando a extração de substancias

antioxidante de estrutura química fenólica (BRUNNER, 2005).

Para o extrato obtido através de infusão seguido de atomização em Spray Dryer foi observado um aumento significativo no teor de sólidos do extrato seco compostos fenólicos, taninos condensados e atividade antioxidante, em função da concentração do teor de sólidos após o processo de secagem.

Prado et al. (2009) reportou para a infusão de cascas de nozes de uma mistura de variedades comercial (Barton, Shoshone, Shawnee, Choctaw e Cape Fear), valores inferiores para o conteúdo de extrato seco ($23 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), compostos fenólicos totais ($138 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$), taninos condensados ($43 \text{ mg CE} \cdot \text{g}^{-1}$), e atividade antioxidante, através dos sistemas ABTS ($1404 \text{ } \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) e DPPH ($385 \text{ mg TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$). As diferenças observadas entre os trabalhos devem estar relacionadas as diferentes variedades e anos de colheita das amostras estudadas (PRADO et al., 2013).

Extrações sequenciais a temperatura ambiente com uso de solventes em polaridade crescente (éter, acetona, álcool e água), em amostras de cascas de noz-pecã, Prado et al. (2010) obtiveram na fração alcoólica valores para extrato seco, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (sistema DPPH) inferiores ($23 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$, $118 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ e $453 \text{ mg TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente) aos encontrados no presente estudo para etanol absoluto a temperatura ambiente. Os mesmos autores, entretanto, reportaram teores significativamente superiores para taninos condensados ($736 \text{ mg CE} \cdot \text{g}^{-1}$) e atividade antioxidante avaliada através do sistema ABTS ($2600 \text{ } \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$).

O processo de extração sequencial que realiza o esgotamento da amostra, utilizado por Prado et al. (2010) pode favorecer a extração de alguns compostos em detrimento de outros, o que pode explicar as diferenças nos resultados obtidos. Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) em estudos realizados com soluções de catequina e ácido gálico e diferentes constituintes de alimentos, reportaram diferenças significativas nos resultados para atividade antioxidante empregando o mesmo método em amostras solubilizadas com diferentes solventes. O método ABTS, apresentou uma influência maior pelo uso de solventes mais polares nos resultados obtidos, que o método DPPH. Além disso, os autores observaram que as mesmas metodologias quando testadas

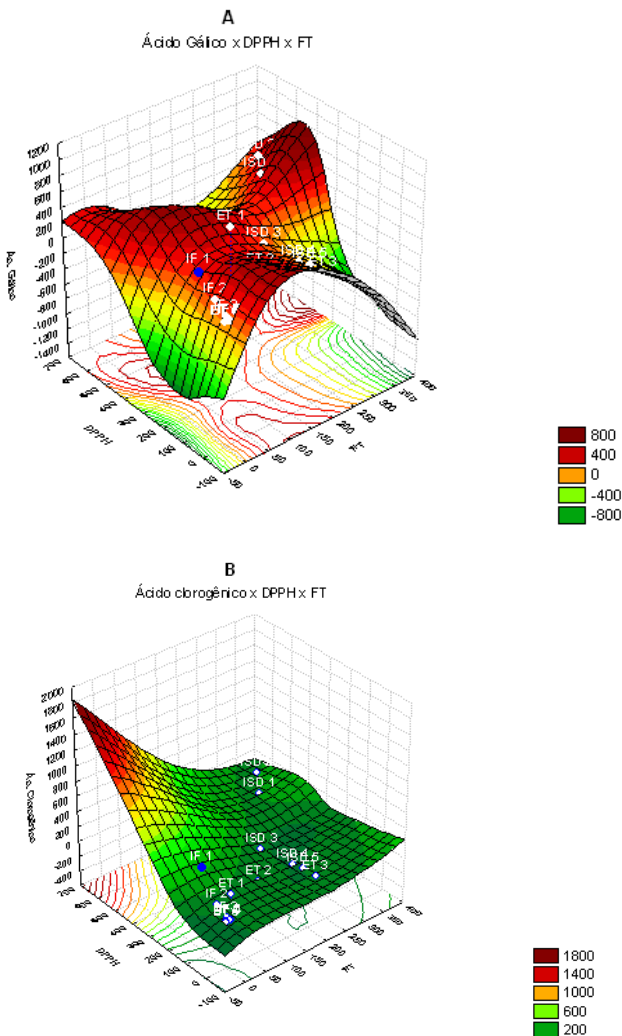
utilizando uma amostra contendo na sua matriz constituintes alimentares não-antioxidantes, como aminoácidos e ácidos urônicos, sofreram um efeito interferente nos ensaios, sugerindo que medidas de atividade antioxidante de uma amostra só podem ser comparadas com segurança, quando analisadas pela mesma metodologia e extraídas com o mesmo solvente.

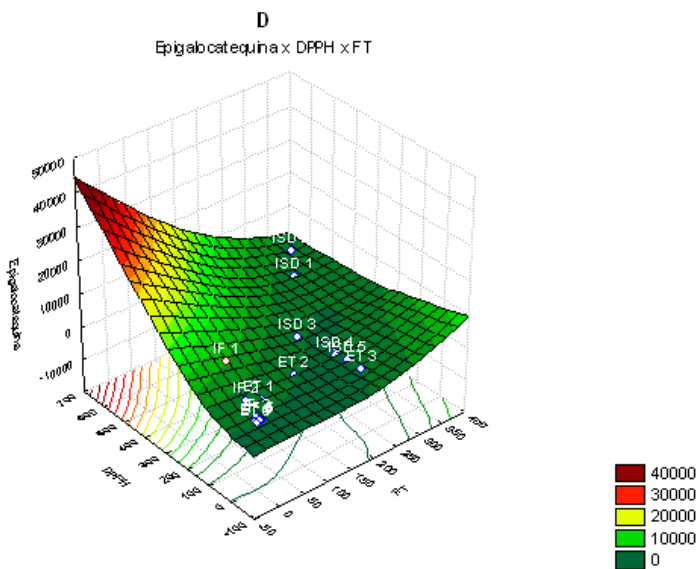
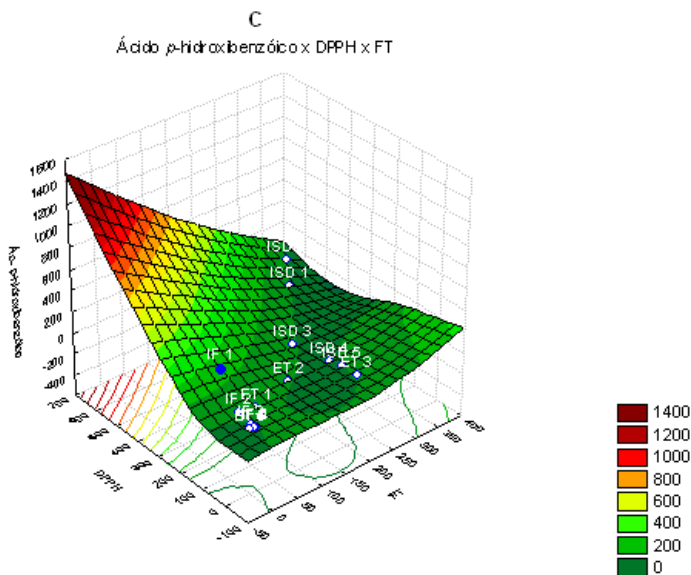
3.2 Perfil Fenólico determinado por CLAE

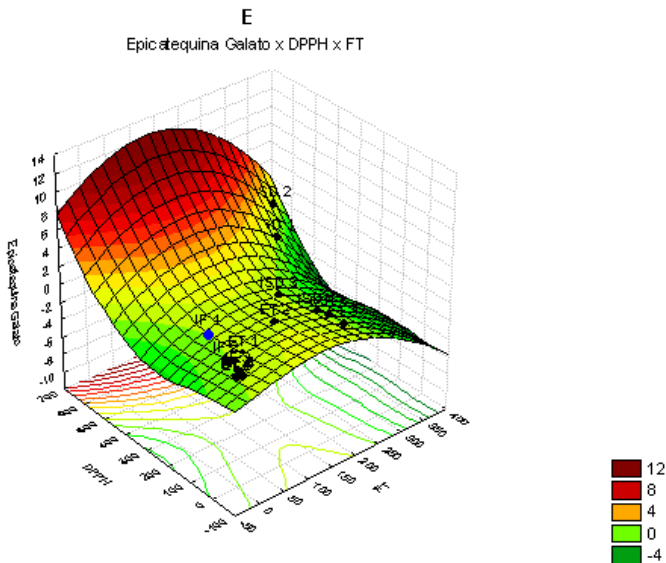
Ao testar diferentes métodos de preparação das amostras para a injeção em CLAE na determinação do perfil de compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos (infusão, infusão seca em spray dryer e extrato etanólico) da casca de noz-pecã, a extração básico/ácida e a hidrólise enzimática utilizando Tannase (E.C.3.1.1.20 de *Aspergillus ficcum*) mostraram-se ineficientes na separação dos compostos fenólicos. No entanto, o uso da resina Sephadex® LH-20 proporcionou uma limpeza do material interferente nos cromatogramas, sendo possível a identificação de três ácidos fenólicos (gálico, clorogênico e *p*-hidroxibenzóico) e dois compostos da classe dos flavonoides (subclasse flavan-3-ol: epigallocatequina e epicatequina galato) nos extratos avaliados.

De acordo com a Figura 22 (pag. 183, 184 e 185), pode-se observar através da análise dos gráficos tridimensionais para superfície de resposta das diferentes frações obtidas (5 frações para cada extrato testado) no processo de separação em resina Sephadex® LH-20, que para a infusão, a primeira fração (IF1) forneceu as melhores respostas para o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH) e concentração de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzóico e epigalocatequina. Nos extratos obtidos através de infusão seguida de spray dryer, as melhores respostas para os mesmos parâmetros foram observadas na segunda fração (ISD2), exceto para o ácido clorogênico que foi equivalente ao encontrado na primeira fração. Para as frações coletadas do extrato etanólico, pode-se observar uma variação entre as melhores respostas: a primeira fração (ET1) apresentou resultados superiores que as demais frações, para ácido gálico, ácido clorogênico e epigalocatequina; a segunda fração (ET2) resultou em melhores respostas para atividade antioxidante (DPPH) e epicatequina galato.

Figura 22 – Superfície de resposta para atividade antioxidante (DPPH) e FT (compostos fenólicos totais) e dos compostos fenólicos (A: ácido gálico, B: ácido clorogênico, C: ácido p-hidroxibenzóico, D: epigalocatequina, E: epicatequina galato) das 5 frações obtidas através de resina Sephadex® LH-20 e identificados através de CLAE.

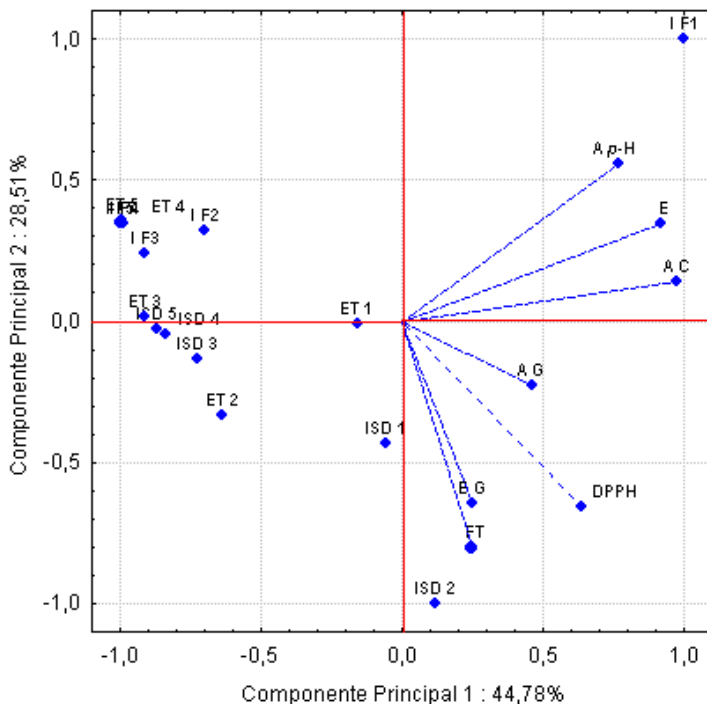






Para melhor compreensão da relação entre as propriedades antioxidantes dos diferentes extratos (infusão, infusão seca em spray dryer e extrato etanólico), uma ACP (Análise de Componentes Principais) foi aplicada aos resultados de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH) e os compostos fenólicos identificados nas cinco frações obtidas através da resina Sephadex® LH-20. Sete componentes foram obtidos na matriz de correlação das variáveis, sendo que as duas primeiras dimensões explicaram conjuntamente 73,29% da variabilidade dos dados e, os componentes principais 1 e 2 (CP₁ e CP₂), responsáveis por 44,78% e 28,51% da variância total dos dados, respectivamente (Figura 23 – pag. 186).

Figura 23 – Representação gráfica da ACP realizada para as propriedades antioxidantes (compostos fenólicos totais e atividade antioxidante) dos diferentes extratos (infusão, infusão seguida de spray dryer e extrato etanólico), e os compostos fenólicos identificados nas cinco frações obtidas através da resina Sephadex® LH-20.



O CP₁ demonstrou forte correlação positiva para os teores de ácido clorogênico ($r=0,9774$), epigalocatequina ($r=0,9214$), sendo menos pronunciada para as variáveis ácido *p*-hidroxibenzoico ($r=0,7673$) e atividade antioxidante através do sistema DPPH ($r=0,6358$) e pouco significativa para os teores de ácido gálico ($r=0,4621$) e epicatequina galato ($r=0,2477$). No CP₂, observou-se uma correlação negativa para a concentração de compostos fenólicos totais ($r = -0,8016$), diminuindo para as variáveis atividade antioxidante avaliada através do método DPPH ($r=-0,6583$), epicatequina galato ($r=-0,6438$) e ácido gálico ($r=-0,2283$), crescendo positivamente para

as variáveis ácido clorogênico ($r=0,1382$), epigalocatequina ($r=0,3455$) e ácido *p*-hidróxibenzóico ($r=0,5605$) (Figura 23, pag. 186). Isso indica que quanto maior for o teor dos compostos fenólicos totais, principalmente do ácido gálico e da epigalocatequina galato nos extratos maior será a atividade antioxidante dos mesmos, estando essa tendência de comportamento em concordância com estudo realizado por Prudêncio (2011) avaliando o extrato aquoso da casca dos ramos residuais da colheita de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) concentrado por nanofiltração.


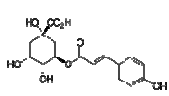

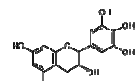
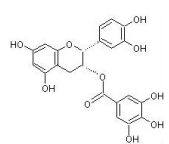
As concentrações de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzoico, epigalocatequina e epicatequina galato nos diferentes extratos em ordem decrescente foram as seguintes: ET1 > ISD2 > IF1; IF1 > ET1 > ISD2; IF1 > ISD2 = ET1; IF1 > ISD2 > ET1 e ISD2 > ET1 > IF1, respectivamente. Esse comportamento associado ao fato da segunda fração da infusão atomizada em spray dryer apresentar teores superiores para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante comparado às demais frações de todos os três extratos avaliados, sugere a presença de outros compostos fenólicos na fração ISD2 além dos identificados através de CLAE. Além disso, o alto grau de relacionamento entre as variáveis FT (compostos fenólicos totais), DPPH (atividade antioxidante) e EG (epicatequina galato) (Figura 24) é um possível indicativo deste flavonóide, seguido do ácido gálico (AG) serem parte dos compostos de maior contribuição pela atividade antioxidante exercida por este extrato.

Através da ACP na distribuição fatorial das variáveis estudadas [compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH) e compostos fenólicos identificados para as 5 frações obtidas através da separação em resina Sephadex LH-20® dos diferentes extratos analisados] foi possível observar uma distribuição distinta entre as 5 frações obtidas para cada um dos extratos. A influência do processo de separação na resina foi notável nas frações IF1 do extrato obtido através de infusão e ISD2 da infusão atomizada em Spray Dryer, que apresentaram valores superiores na maioria dos parâmetros avaliados, diferenciando-se significativamente das demais frações para os mesmos extratos analisados. Na fração do extrato etanólico ET1 observaram-se valores próximos da média do grupo das 5 frações das variáveis consideradas.

Na Tabela 05 podem ser observadas a fórmula estrutural e as

concentrações dos principais compostos fenólicos determinados nos extratos da casca de noz-pecã.

Tabela 05 – Principais compostos fenólicos presentes em extratos da casca de noz-pecã determinados através de CLAE a partir das frações obtidas com uso de coluna de separação Sephadex® LH-20.

	Fórmula estrutural	Infusão (IF1)	Infusão + Spray dryer (ISD2)	Extrato etanólico (ET1)
Ácido gálico (µg/mL)		124,26 ^B ± 14	238,83 ^B ± 23	828,68 ^A ± 32
Ácido Clorogênico (µg/mL)		233,36 ^A ± 44	93,14 ^A ± 7,33	137,91 ^A ± 6,44
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (µg/mL)		148,86 ± 8,06	n.d	n.d.
Epigallocatequina (µg/mL)		5184,34 ^A ± 100	1325,95 ^B ± 116,54	120,21 ^C ± 29,72
Epicatequina galato (µg/mL)		n.d.	0,97 ^A ± 0,02	0,34 ^B ± 0,01

n.d. = níveis não detectados; letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$); média ± desvio padrão (n=3).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 05 é possível observar que quando utilizada a tecnologia de secagem com spray dryer (ISD2), a concentração inicial presente na infusão (IF1) para ácido gálico foi praticamente duplicada e a concentração da

epicatequina galato elevada até níveis detectáveis em CLAE. No entanto, o mesmo processo de secagem da infusão ocasionou uma redução drástica nos teores do ácido *p*-hidroxibenzóico, e uma diminuição significativa na concentração do ácido clorogênico ($\approx \frac{1}{2}$) e da epigalocatequina ($\approx \frac{1}{4}$). Este comportamento pode ser explicado pela influência maior da temperatura de secagem do spray dryer sob alguns compostos fenólicos diminuindo sua concentração em relação a outros compostos considerados menos instáveis à temperatura (MOURE et al., 2001).

O extrato etanólico (ET1) apresentou uma concentração de ácido gálico aproximadamente 7 vezes superior a detectada na infusão (IF1), e concentrações significativamente reduzidas para o ácido clorogênico ($\approx \frac{1}{2}$), epigalocatequina ($\approx \frac{1}{43}$) e epicatequina galato ($\approx \frac{1}{3}$) em relação à infusão (IF1). A alta concentração de ácido gálico, a natureza orgânica do solvente etanol, e a elevada concentração de taninos condensados nesse extrato, aponta para a possibilidade da presença de monômeros e dímeros de taninos complexos tais como catequinas, galocatequinas e moléculas de maior grau de polimerização, para as quais o método de preparação parece não ter sido eficiente na detecção ou, devido à alta foto-sensibilidade desses compostos, os mesmos podem ter degradado durante o processo de separação (SERRANO et al., 2009; TRUGILHO et al., 2003).

Em todos os extratos, a atividade antioxidante esteve em concordância com as concentrações dos compostos fenólicos determinados através de CLAE e de acordo com estudo realizado por Soobrattee et al. (2005). Esses autores avaliaram a capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) para os compostos fenólicos estudados e reportaram que a mesma decresce na seguinte ordem: epicatequina galato > epigalocatequina > ácido gálico > ácido clorogênico > ácido *p*-hidroxibenzóico, sendo significativamente superior para o grupo das procianidinas oligoméricas (B₁ e B₂).

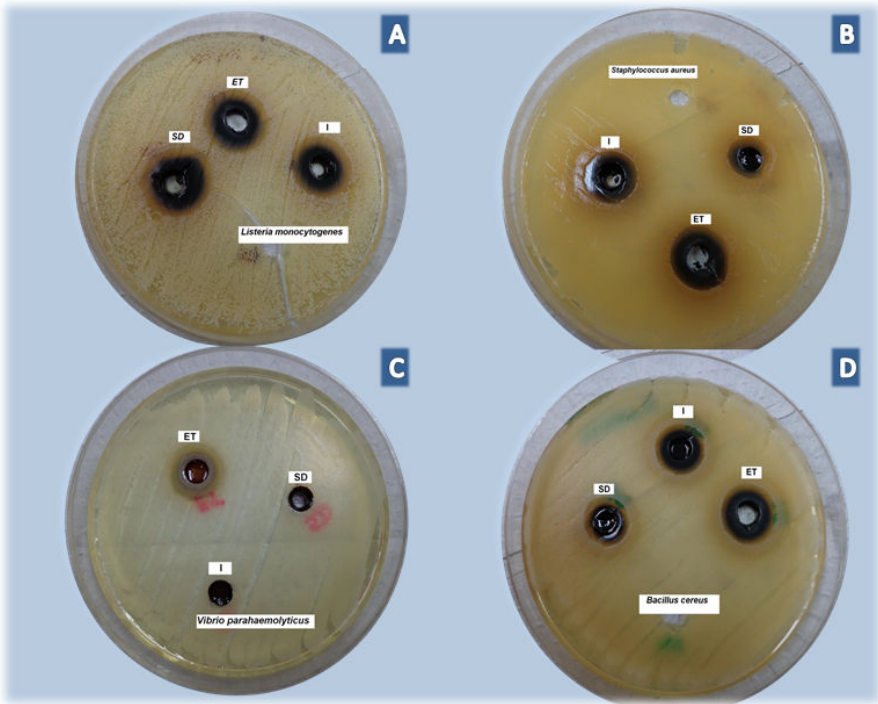
Entre os compostos fenólicos presentes na amêndoa da noz-pecã, alguns autores reportaram a presença principalmente de ácidos hidroxibenzóicos, elágico e gálico, além de flavonóides como a catequina e epicatequina. Em menores quantidades, foram detectados os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, *p*-cumárico e quantidades traços de ácido siríngico (DE LA ROSA et al., 2011;

MALIK et al., 2009; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; SENTER, HORVAT e FORBUS, 1980). No entanto, devido às dificuldades analíticas, poucos estudos da composição fenólica da casca de noz-pecã são encontrados. De La Rosa et al. (2011), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrômetro de massas, detectou apenas a presença dos ácidos gálico e elágico.

3.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos extratos podem ser observados na Figura 24 (pag. 190).

Figura 24 – Antibiógramas para *Listeria monocytogenes* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Vibrio parahaemolyticus* (C) e *Bacillus cereus* (D), avaliados nos extratos de infusão (I), infusão seguida de spray dryer (SD) e extrato etanólico (ET).



De todas as culturas indicadoras testadas, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus* apresentaram crescimento inibido pelos extratos da casca de noz-pecã em meio sólido.

Estudos referenciando a atividade antimicrobiana exercida por extratos obtidos da casca de noz-pecã são escassos. No entanto, a propriedade antimicrobiana de compostos fenólicos tais como os taninos, presentes na casca da noz têm sido reportados por alguns autores (SERRANO, et al., 2009; SCALBERT, 1991). Em termos gerais, os taninos afetam o crescimento bacteriano através de vários mecanismos tais como inibindo a ação das enzimas microbianas extracelulares, complexando substratos necessários para o crescimento e íons metálicos e ação direta no metabolismo microbiano através da fosforilação oxidativa. No entanto, de acordo com Scalbert (1991) alguns micro-organismos, como *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* e *Escherichia Coli* podem crescer na presença de taninos e seus monômeros e dímeros, utilizando esses compostos como fonte de carbono. Algumas espécies de *Penicillium* apresentam a habilidade de utilizar inclusive fenóis de estrutura molecular mais simples como o ácido gálico e catequinas como substrato metabólico. Isso acontece, porque embora muitas enzimas microbianas sejam inibidas pela presença de compostos fenólicos, algumas tais como as tanases são conhecidas por manter alta atividade mesmo na presença de taninos, sendo ativa principalmente em resíduos de ésteres galoil de elagitaninos. Isso explica principalmente o comportamento das cepas fúngicas testadas neste estudo, apresentando capacidade de crescimento mesmo em altas concentrações dos extratos da casca de noz-pecã.

Na Tabela 06 são apresentados os halos de inibição e a classificação da capacidade inibitória para os diferentes extratos e principais compostos fenólicos detectados.

Tabela 06 – Atividade antimicrobiana de extratos obtidos através de diferentes processos de extração e dos principais compostos fenólicos presentes na casca de noz-pecã contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*.

	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Infusão	++	+	-	+
Infusão + Spray dryer	++	-	-	+
Extrato etanólico	++	+	+	+
Ácido gálico	-	-	-	-
Ácido clorogênico	-	-	-	-
Epigallocatequina	-	+	-	-
Epicatequina galato	+	-	+	+

Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) já subtraído o valor do diâmetro interno do poço: + = 7-11 mm, ++ = 12-16 mm, - = ausência de halo de inibição.

Através da análise do tamanho dos halos de inibição (Tabela 06) foi possível observar a capacidade de inibição do crescimento microbiano para todos os extratos testados nas placas contendo *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) apenas a infusão e o extrato alcoólico foram capazes de inibir o crescimento, sendo que para a cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) foram observados halos de inibição apenas quando utilizado o extrato alcoólico. Em todos os ensaios, observou-se uma maior intensidade de inibição através de halos mais pronunciados para *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117). Quando avaliados os antibiogramas das substâncias fenólicas isoladas, observou-se atividade antimicrobiana apenas para a epicatequina galato (*Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*) e epigallocatequina (*Staphylococcus aureus*). Estes resultados indicam que os extratos possuem atividade antimicrobiana superior, quando comparados aos compostos fenólicos na sua forma isolada, principalmente em relação à inibição do crescimento da cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117).

Na Tabela 07 podem ser observados os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos (mg/mL) da casca de noz-pecã para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*.

Tabela 07 – Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos (mg/mL) da casca de noz-pecã para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*.

	Infusão (mg/mL)		Infusão + Spray dryer (mg/mL)		Extrato etanólico (mg/mL)	
	CMI*	CMB**	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	2,5 ^A	2,5 ^a	0,93 ^B	0,93 ^b	1,87 ^A	1,87 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i> sorotipo II ATCC 19112	1,25 ^A	1,25 ^a	0,62 ^B	0,93 ^a	1,25 ^A	1,25 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,15 ^A	0,63 ^a	0,15 ^A	0,63 ^a	0,15 ^A	0,47 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,46 ^A	1,25 ^a	0,23 ^A	0,31 ^b	0,62 ^A	1,25 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,46 ^A	1,25 ^a	0,23 ^A	0,31 ^b	0,62 ^A	1,25 ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0,15 ^B	0,15 ^b	0,31 ^A	0,31 ^a	0,31 ^A	0,31 ^a
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,11 ^A	0,23 ^a	0,075 ^B	0,31 ^a	0,15 ^A	0,15 ^a

*CMI: concentração mínima inibitória; **CMB: concentração mínima bactericida; letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas

para CMI; letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas para CMB; (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Todos os extratos testados apresentaram atividade bactericida e apesar dos halos de inibição terem apresentado diâmetros maiores para *Listeria monocytogenes*, as CMI e CMB mais efetivas foram observadas para *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*. Nos testes com *Listeria monocytogenes*, quando comparada a cepa ATCC 19112 com a cepa ATCC 19177, observou-se que os extratos em sua maioria foram mais efetivos em menores concentrações para a primeira. O mesmo comportamento foi observado ao testar diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* que apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), a cepa ATCC 25923 apresentou concentrações para CMI e CMB inferiores à ATCC 29213 e ATCC 6538.

Ao avaliar a CMI e a CMB, observou-se que o extrato concentrado obtido após solubilização da infusão seca em spray dryer, demonstrou ser mais efetivo em concentrações inferiores às observadas para infusão e extrato etanólico em todas as cepas de *Listeria monocytogenes* testadas. A infusão seca em spray dryer também foi a mais efetiva para *Staphylococcus aureus* quanto a CMB, porém não foram observadas diferenças significativas na CMI nos diferentes extratos testados para este micro-organismo. Para o *Vibrio parahaemolyticus* a infusão foi o extrato que demonstrou melhor efetividade tanto para a CMI e a CMB, sendo que para a cepa de *Bacillus cereus*, a infusão seca em spray dryer apresentou concentrações menores para a CMI, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para a CMB.

Ho et al. (2010) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos vegetais obtidos de *Orthosiphon stamineus* (25, 50, 75% de metanol). Através da medida do halo de inibição do crescimento, os autores observaram uma fraca atividade antimicrobiana para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e, uma atividade moderada frente ao crescimento do *Vibrio parahaemolyticus*, para o qual foram observadas CMI e CMB variando entre 1,56 a 3,13 mg/mL dependendo da concentração metanólica do extrato. Hayrapetyan, Hazeleger e Beumer (2012) avaliando a atividade antimicrobiana de extratos obtidos da casca de romã (metanol:etanol:água 2:2:1) relataram que o crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152

e 23074) foi satisfatoriamente inibido em carnes refrigeradas (CMB 24,5 mg/mL), porém não observaram o mesmo efeito quando testados isoladamente os compostos fenólicos ácido gálico e ácido elágico.

4 CONCLUSÕES

Dos três diferentes métodos de extração avaliados, apenas a infusão e extração alcoólica apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais e taninos condensados e maior atividade antioxidante (ABTS e DPPH). O processo de atomização em Spray Dryer do extrato obtido através de infusão concentrou significativamente o conteúdo de sólidos, observando-se um aumento no teor de extrato seco, compostos fenólicos totais e taninos condensados e, conseqüentemente na atividade antioxidante dessas amostras.

O uso da resina Sephadex® LH-20 na preparação da amostra para análise por CLAE possibilitou a identificação dos ácidos gálico, clorogênico e *p*-hidroxibenzóico e de dois compostos da classe dos flavonoides, subclasse flavan-3-ol (epigalotequina e epicatequina galato). No entanto, os resultados obtidos sugerem a provável presença de outros compostos além dos reportados neste trabalho.

Os extratos obtidos através de infusão, infusão seguida de atomização em Spray Dryer e extração alcoólica apresentaram capacidade bactericida para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicando que a casca apresenta atividade antimicrobiana e bactericida para estes micro-organismos de interesse em alimentos.

Agradecimentos

À empresa Divinut Ind. de Nozes Ltda (Cachoeira do Sul – RS), pelo fornecimento da matéria-prima. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Às alunas Helen Silvestre da Silva, Sheila Mello da Silveira do Laboratório de Microbiologia (UFSC), à Fernanda Ramlov do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC), Simone Mazzutti, Patrícia Beneli e Kátia Andrade do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (UFSC) e Priscila de Brito Policarpi e Priscilla dos Santos de Oliveira do Laboratório de Óleos e Gorduras (UFSC) pelo auxílio nas análises.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq - processo número 479069/2011-5.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E-S.M.; HUCL, P.J.; SOSULSKI, F.W.; GRAF, R.J.; GILLOTT, C.; PIETRZAK, L.N. Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3559-3566, 2001.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER A.E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v. 28, p. 25 - 30, 1995.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21–33, 2005.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CELIKTAS, O. Y.; HAMES KOCABAS, E.E.; BEDIR, E.; VARDAR SUKAN, F.; OZEK T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHIOU, D.; LANGRISH, T.A.G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p.84-91, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009.

DE LA ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of

Mexican pecan (*Carya illinoensis*). **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.152-162, 2011.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p.505 - 512, 2006.

DINÇER, S.; AKGUN, N.; AKGUN, M.; AKGERMAN, B. Aspectos generales acerca de la extracción por fluido supercrítico. **Aceites & Grasas**, v. 4, n. 61, p. 652 – 661, 2005.

DIVINUT. Saúde, sabor e requinte. Disponível em www.divinut.com.br, acesso em 11/02/2011.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510 – 523, 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. cap. v. 4.2.6.

GELINAS, P.; MCKINNON, C.M. Effect of wheat variety, farming site, and bread-baking on total phenolics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 329-332, 2006.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1 – 22, 2008.

HAYRAPETYAN, H.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. **Food Control**, v. 23, p. 66 – 72, 2012.

HERALD, P.J.; DAVIDSON, P.M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1378-1379, 1983.

HO, C-H.; NORAYATI, I.; SULAIMAN, S-F; AHMAD, R. In vitro antibacterial and antioxidant activities of *Orthosiphon stamineus* Benth. extracts against food-borne bacteria. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1168–1172, 2010.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, N.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on

the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

LA TORRE, G. L.; LAGANÀ, G.; BELLOCCO, E.; VILASI, F.; SALVO, F.; DUGO, G. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. **Food Chemistry**, v. 85, p.259–266, 2004.

MALICK, N.S.A.; PEREZ, J.L.; LOMBARDINI, L.; CORNACCHIA, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BRAFORD, J. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2207 – 2213, 2009.

MACEDO, J.A.; BATESTIN, V.; RIBEIRO, M.L.; MACEDO, G.A. Increasing the antioxidant Power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p. 491-497, 2011.

MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 234 – 246, 2007.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127 – 130, 2001.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v.72, n.2, p. 145 - 171, 2001.

MÜLLER, L.G.; PASE, C.S.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLEUR, N.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; PAVANATO, M.A.; BAUERMANN, L.; ROCHA, J.B.T.; Burger, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 165 – 171, 2013.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S.A.; SAYEED, S.A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M341 - M344, 2007.

ORZUA, M.C.; MUSSATTO, S.I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; RODRÍGUEZ, R.; GARZA, H.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization Carrier for solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 24 – 27, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791 - 800, 2006.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlates e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p. 2003.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHHELIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. New York: CRC Press, 2001. P. 311 – 330.

PRADO, A.C.P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; DESCHAMPS, F.C.; BARRERA ARELLANO, D.; BLOCK, J.M.. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64-73, 2013.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2010.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n.4, p. 330 – 335, 2009.

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214 - 1218, 1978.

PRUDÊNCIO, Ana Paula Aguiar. **Perfil de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**

concentrado por nanofiltração. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.C.; MEIRE, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, P. 494 – 507, 2001.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEIMONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJAL, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extrats containing flavonoids and outthers phenolic compounds. **Internatnional Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3- 12, 2000.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n. 9/10, p.1231 -1 237, 1999.

RECKZIEGEL, P; BOUFIEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVENU', D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 859 – 870, 2008.

SAHIN NADEEM, H.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 1626 – 1635, 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875 – 3883, 1991.

SENER, S.D.; HORVAT, R.J.; FORBUS JR, W.R. Relation between phenolic acid content and stability of pecans in accelerated storage. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1380 - 1382, 1980.

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

SMÂNIA JR. A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, E.F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177–181, 1995.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I. ; BAHORUN, T. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, **Molecular Research**, v. 579, p. 200 - 213, 2005.

TRUGILHO, P.F.; MORI, F.A.; LIMA, J.T.; CARDOSO, D.P. Tannin content determination in the bark of *Eucalyptus spp*. **Technical Note Cerne**, v. 9, n. 2. p. 246-254, 2003.

VAQUERO, M.J.R.; NADRA, M.C.M. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 342 – 352, 2008.

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p. 1241-1249, 2007.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57 – 76, 2002.

CAPÍTULO 4

**Micropartículas obtidas em spray dryer contendo extratos da
casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**

Micropartículas obtidas em Spray Dryer contendo extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]

Resumo

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar micropartículas contendo extrato da casca de noz-pecã, maltodextrina, goma arábica e L- α -fosfatidilcolina através de atomização em Spray Dryer e, avaliar a atividade antioxidante em óleo de soja, comparado ao extrato alcoólico da casca da noz e ao TBHQ. As micropartículas obtidas em Spray Dryer que apresentaram resultados superiores para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (Extrato A > F4 > F2 > F1 > F3), também demonstraram através da análise dos parâmetros de cor a* e b* uma maior tendência ao vermelho e ao amarelo respectivamente, exceto para a formulação F4 que apresentou valores com tendência para a cor verde, provavelmente relacionada à adição de L- α -fosfatidilcolina. A presença do agente emulsificante além de influenciar na análise dos espectros de FTIR das amostras, também favoreceu a formação de uma emulsão mais estável, melhorando a solubilização de todos os componentes da fórmula, refletindo um procedimento de secagem mais homogêneo. Na análise microscópica de fluorescência observou-se emissão de fluorescência natural amarela, em todas as amostras, caracterizando a presença de compostos fenólicos no interior e exterior da partícula e, na microscopia eletrônica de varredura observou-se que todas as formulações testadas apresentaram uma tendência significativa à aglomeração. Considerando os dados obtidos nas análises de DSC, TGA e a perda de água por dessecação, F4 foi a formulação de escolha para a avaliação da liberação do antioxidante presente na micropartícula para o óleo de soja. O *Schaal Oven Test* destacou-se como a metodologia mais adequada para o acompanhamento da oxidação do óleo quando comparada ao OSI (*Oil Stability Index* – OSI), sendo possível observar através da primeira que os polímeros (maltodextrina e goma arábica) proporcionaram uma melhor estabilidade para os antioxidantes contidos na micropartícula.

Palavras chave: antioxidante, casca de noz-pecã, micropartícula,

oxidação, Spray Dryer.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação em alimentos são responsáveis pela redução da vida de prateleira das matérias-primas e dos produtos industrializados levando a importante perda econômica (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). As transformações moleculares sofridas pelos lipídios durante a oxidação geram uma grande variedade de produtos pela ruptura de sua cadeia carbonada insaturada. Eles podem ser álcoois, aldeídos, cetonas, hidroperóxidos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, geralmente voláteis e de baixo peso molecular, responsáveis pelo sabor e o odor desagradável dos produtos oxidados (GORDON, 2001).

Com o objetivo de retardar os processos oxidativos a indústria de alimentos tem utilizado aditivos com ação antioxidante aos seus produtos durante o processamento de alimentos ricos em óleos e gorduras. Antioxidantes são compostos que, quando presentes em baixas concentrações comparados a do substrato oxidável (ácidos graxos polinsaturados, proteínas, carboidratos ou DNA), podem retardar a oxidação, atuando nas etapas de iniciação ou propagação das reações em cadeia do processo oxidativo (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010; ZHENG e WANG, 2001). Eles podem ser de origem sintética ou natural. Existe uma grande quantidade de compostos sintéticos com ação antioxidante, porém somente alguns são incorporados em alimentos devido às regulamentações das legislações que restringem seu uso em vários países. Essa preocupação na restrição da utilização de alguns aditivos sintéticos se deve em grande parte a estudos de toxicidade, sendo que algumas pesquisas têm demonstrado uma relação entre o uso de certos antioxidantes sintéticos e o surgimento de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; BIRCH et al., 2001). Entre os antioxidantes sintéticos amplamente empregados em óleos vegetais encontra-se a terc-butilidroxiquinona (TBHQ) que age como antioxidante primário

sequestrando os radicais livres e também, o ácido cítrico que atua como sinergista (SHAHIDI e ZHONG, 2005).

Na busca de alternativas ao uso de antioxidantes sintéticos, várias pesquisas têm sido realizadas com extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, capazes de interagir com os radicais livres. Prado et al. (2010) reportaram em extratos alcoólicos obtidos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] teores para compostos fenólicos totais e taninos condensados de 118 mg/g de equivalentes em ácido gálico e 736 mg/g de equivalentes em catequina, respectivamente, resultando em uma atividade antioxidante *in vitro* de 90% de inibição do processo oxidativo através do sistema modelo β -caroteno e ácido linoleico. Além disso, Prado et al. (2009) analisando o chá da casca de noz-pecã encontraram teores para compostos fenólicos totais (138 mg/g de equivalentes em ácido gálico), e inibição do processo oxidativo através do sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico (93%), próximos aos valores encontrados no extrato alcoólico das cascas da noz-pecã.

No entanto, extratos vegetais ricos em compostos fenólicos apresentam considerável instabilidade oxidativa limitando sua utilização, além do sabor adstringente e desagradável conferido por alguns polifenóis. Na tentativa de preservar a efetividade da ação antioxidante dos polifenóis e melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dos compostos ativos presentes em extratos vegetais, tem sido estudada a possibilidade de encapsulação e desenvolvimento de micropartículas desses compostos utilizando diferentes metodologias (FANG e BHANDARI, 2010).

Uma das tecnologias utilizadas pela indústria de alimentos na obtenção de micropartículas com compostos ativos para adição em alimentos é a tecnologia de atomização por Spray Dryer. Esse processo tem sido utilizado para obtenção de micropartículas de vários compostos bioativos de origem natural para produção de nutracêuticos, tais como extratos com propriedades antioxidantes, fibras de frutas comestíveis e probióticos (HOMAYOUNI et al., 2008; CHIOU e LANGRISH, 2007).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de micropartículas contendo extratos da casca de noz-pecã obtidos por infusão, maltodextrina, goma arábica e L- α -fosfatidilcolina, através de atomização em Spray Dryer e avaliar a eficiência de incorporação através da determinação do teor de compostos fenólicos totais (método colorimétrico Folin-Ciocalteu), da atividade antioxidante (método DPPH), análise instrumental da cor, espectrofotometria no infravermelho e análise microscópica de fluorescência, além da caracterização das micropartículas obtidas (teor de umidade, atividade de água, densidade, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica). Além disso, este trabalho se propôs a avaliar a liberação dos antioxidantes presentes nas micropartículas em óleo vegetal, comparando com a atividade antioxidante do extrato alcoólico da casca de noz-pecã e a de um antioxidante comercial indicado para óleos (TBHQ – terc-butilidroquinona), através de teste em estufa sob condições de oxidação acelerada (Índice de Peróxidos) e avaliação do Índice de Estabilidade Oxidativa (OSI - Oil Stability Index).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

Cascas de noz-pecã (safra 2010 - 6 kg) provenientes de lavouras localizadas na região central do Estado do Rio Grande do Sul / Brasil, constituídas da variedade Barton.

Óleo de soja refinado (6 L) isento da adição de antioxidantes durante o processo de fabricação.

2.2 Reagentes químicos

Reagente Fenol Folin & Ciocalteu, Ácido gálico, L- α -fosfatidilcolina (da gema de ovo, ~ 60% - TLC) obtidos da Sigma-Aldrich (Germany); DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e Trolox, obtidos da Fluka / Sigma-Aldrich (Germany); Maltodextrina (dextrose equivalente 16.5-19.5) e tert-butilidroquinona obtidas da Sigma-Aldrich (USA). Todos os demais reagentes químicos e

solventes utilizados no experimento foram de grau analítico (P.A.) adquiridos da Vetec Química Fina / Sigma-Aldrich.

2.3 Obtenção do pó e dos extratos da casca de noz-pecã

As cascas foram secas a 40°C em estufa com circulação de ar (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética[®]) para redução do teor de umidade e moídas em moinho analítico de laboratório (modelo A-11 da marca IKA Works[®]). O pó foi peneirado a 60 mesh. e armazenado em frasco âmbar, com atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores (PRADO et al., 2009).

Foram obtidos extratos convencionais através do procedimento de infusão em água destilada (20 g.L⁻¹ em base seca à 98° durante 10 min.) segundo Prado et al. (2009), e extratos alcoólicos de acordo com procedimento realizado por Prado et al. (2010), seguido de algumas modificações (20 g.L⁻¹ em base seca colocadas sob agitação constante em etanol absoluto durante 1 hora ao abrigo da luz e temperatura ambiente). Os extratos foram filtrados sob vácuo em papel filtro (Whatman 541, 125 mm) e, os volumes completados para 100 mL e armazenados em frasco âmbar, com atmosfera de nitrogênio a -24°C, para análises posteriores.

A determinação do extrato seco de todos os extratos foi realizada por gravimetria, tomando-se uma alíquota de 5 mL em cadinho de alumínio, previamente tarado, seguido de secagem em estufa (modelo 400/D 200°C da marca Nova Ética[®]) a 105,0 ± 0,5°C até peso constante (AOAC, 2005), para determinação do rendimento de extração.

2.4 Obtenção das micropartículas através de atomização em Spray Dryer

Após experimentos prévios, foram testadas 4 formulações de acordo com a Tabela 08.

Tabela 08 – Formulações testes para obtenção de micropartículas contendo extratos aquosos da casca de noz-pecã através de atomização em Spray Dryer.

Formulação	Maltodextrina (%)	Goma arábica (%)	Água (%)	Extrato (%)	L- α -fosfatidilcolina (%)
Extrato A*	0	0	98	2	0
F1	35	15	47	2	0
F2	42,5	7,5	47	2	0
F3	50	0	47	2	0
F4	42,5	7,5	47	2	0,35

*Infusão (20g/L) preparada de acordo com Prado et al. (2009).

Para o preparo das formulações, os polímeros foram hidratados utilizando agitador mecânico (modelo TE-139, da marca Tecnal®) até a solubilização na fase aquosa, submetendo a dispersão obtida em homogeneizador Ultra-Turrax (modelo IKA® T25 digital) durante 2 minutos a 10000 rpm.

As formulações foram submetidas ao processo de atomização em equipamento BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Temperatura de entrada e saída de 150°C e 50 °C, respectivamente; fluxo de ar/gás de 35m³.h⁻¹ - 100%; fluxo da solução a ser atomizada de 10 mL.min⁻¹ - bomba 25%) e armazenados a -24°C, para análises posteriores (SAHIN NADEEM, et al., 2011).

2.5 Eficiência de incorporação dos compostos fenólicos

Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Para verificar a eficiência da incorporação do extrato aquoso (infusão) da casca de noz-pecã às micropartículas obtidas através de

atomização em Spray Dryer, as partículas foram abertas para liberação do extrato retido na matriz do polímero. Para abertura da micropartícula, foram pesados em tubos de ensaio 100 mg de material atomizado em Spray Dryer, adicionado 1mL de água destilada agitando em Agitador de tubos (modelo AP56 marca Phoenix®) até completa solubilização seguida da adição de 1 mL de etanol absoluto a fim de precipitar o polímero. Após, foram coletados em ependorfes 500 μL da fração aquosa de cada formulação e diluídos em 500 μL de etanol 80% para precipitação do polímero residual. Aliquotas necessárias para as reações de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram utilizadas após centrifugação durante 30 minutos a 11000 rpm em centrífuga para ependorfes (modelo NT 800, marca Novatecnica).

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (PRADO et. al, 2009; BUDINI, TONELLI, GIROTTI, 1980). Aliquotas (100 μL) de diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu, a reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75g.L^{-1}) e, os volumes completados até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 horas no escuro a temperatura ambiente, a absorbância da solução azul resultante foi medida em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 764 nm. A quantificação foi feita com base em curva analítica de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE.g^{-1} (equivalente de ácido gálico) em peso seco.

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), foi realizado de acordo com Brand-William, Cuvelier e Berset (1995) seguido de modificações conforme Prado et al. (2009) e Mensor et al. (2001). Após o preparo do radical (0,1 mM - 0,03943g do DPPH dissolvido em 10 mL de etanol a 80%), foi pipetada uma alíquota de 2,9 mL do mesmo e colocados para reagir em tubos de ensaio adicionados de 0,1 mL do extrato da amostra. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz e, as medidas de absorbância foram realizadas em

espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics ®) a 515 nm após 30 minutos. Trolox foi utilizado como padrão (150 mg.L⁻¹). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical = $(1 - A_f/A_o) \times 100$, onde, “A_o” é a absorvância inicial e “A_f” é a absorvância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em mg TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

Análise Instrumental da cor

Para a análise instrumental da cor do pó da casca de noz-pecã foi utilizado colorímetro Minolta Chromo Meter CR 400 (Minolta, Osaka, Japão), acoplado a um processador DP-100, com iluminante D65 e ângulo de 10°. Foi utilizado o sistema de avaliação CIE Lab (Comission Internationale de Eclairage), escala de cor **L***, **a***, e **b***, onde **L*** corresponde à luminosidade (0 = preto e 100 = branco); **a*** corresponde à variação de cor de verde a vermelho [-80 até zero = verde (-a), de zero a +100 = vermelho (+a)]; **b*** corresponde à variação de cor de azul a amarelo [-100 até zero = azul (-b), de zero a +70 = amarelo (+b)].

Análise espectrofotométrica no infravermelho (FT-IR / NIR)

Espectros ATR-FTIR dos pós das amostras foram coletados em um espectrofotômetro FT-IR / NIR “Spectrometer Frontier” (PerkinElmer®) na faixa de 4000-650 cm⁻¹ na região espectral do infravermelho, em temperatura ambiente.

Microscopia de Fluorescência

O pó da casca e as diferentes formulações submetidas ao processo de atomização em Spray Dryer foram analisadas em microscópio de fluorescência (marca ZEISS, modelo Axiostar plus), sob incidência de luz azul.

2.6 Caracterização das micropartículas

Conteúdo de umidade

O conteúdo estimado de umidade das micropartículas atomizadas em Spray Dryer foi determinado de acordo com metodologia oficial da AOAC (925.09; 2005).

Atividade de água (aa)

A atividade de água (aa) das micropartículas foi determinada em equipamento Aqua Lab 4TE[®] com temperatura monitorada de $24,96 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$.

Densidade

A densidade das micropartículas foi determinada através de Picnometria por gás Hélio em equipamento Micromeritics Accu Pyc II 1340 Gas Picnometer[®] com uso do Software 1340 Accu Pyc[®]. Foram pesados entre 3 - 5 g de amostra previamente seca em estufa a 105°C até peso constante, preenchendo 2/3 da cápsula de alumínio e compactando a amostra com auxílio de um bastão de vidro.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras e o tamanho das micropartículas foram avaliados através de um microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro antes da obtenção das micrografias. A voltagem utilizada variou de 5 a 15 kV.

Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC-60 “*Differential Scanning Calorimeter*” (Shimadzu[®]) seguindo procedimento utilizado por Hansen et al. (2004). Foram pesados entre 2 – 3 mg de amostra em cápsulas de platina e submetidas a uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, num intervalo de temperatura de 25°C até 260°C e taxa de fluxo de Nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas em termobalança modelo DTG-60 (Shimadzu - Kyoto, Japan) e equipamento TGA “*Termogravimetric Analyser*” (Shimadzu®), utilizando cadinho de platina contendo aproximadamente 5 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ na razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹ nas faixas de temperatura de 25 a 300°C e 25 a 800°C, respectivamente. A termobalança foi previamente calibrada com padrão de oxalato de cálcio.

2.7 Liberação dos compostos bioativos em óleo de soja

Composição em ácidos graxos do óleo de soja

Após obtenção dos ésteres metílicos, realizada conforme Hartman e Lago (1973), a composição em ácidos graxos foi determinada de acordo com a metodologia Ce 1-91 da AOCS (2004). Aproximadamente 1 µL (*split* 1:50) da fase de hexano foi injetado em cromatógrafo gasoso marca Shimadzu 2010, equipado com coluna capilar HP88 (100 m x 0,25mm x 0,2µm) fase normal e detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 260°C respectivamente, utilizando H₂ (1,2 mL.s⁻¹) como gás de arraste. Após a injeção a temperatura da coluna manteve-se em 120°C por 5 minutos, sendo elevada gradativamente (5 °C.min⁻¹) até alcançar 180°C, e mantida por 10 min, elevando 4 °C.min⁻¹ a mesma até 240°C mantendo durante 16 min. Padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U) foram injetados nas mesmas condições e seus tempos de retenção determinados. A composição foi determinada através da normalização das áreas e expressa em porcentagem.

Avaliação da liberação através de “Schaal Oven Test”

Testes de oxidação acelerada foram realizados de acordo com Wanasundara, Shahidi e Amarowicz (1998). O procedimento experimental consistiu em adicionar 200, 500, 1000 e 1500 ppm / 100 g de óleo, do extrato alcoólico das cascas das nozes e das micropartículas obtidas através de Spray Dryer em bécker de vidro

contendo óleo de soja refinado (250 g) e, manter em estufa com circulação de ar a 65°C. Paralelamente foi conduzido um ensaio controle sem adição de antioxidantes e um tratamento contendo TBHQ (terc-butilidroquinona), um antioxidante sintético de uso comercial em óleos, na concentração permitida (200 ppm / 100 g de óleo) na legislação brasileira (BRASIL, 2005). As análises de acompanhamento da evolução do índice de peróxidos (Cd 8-53) foram realizadas de acordo com a AOCS (2004), nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias.

Avaliação da liberação através do índice de estabilidade oxidativa (OSI)

A estabilidade oxidativa do óleo de soja foi determinada de acordo com metodologia oficial da AOCS (2004), método Cd 12b-92, utilizando equipamento *Oxidative Stability Instrument* (Omnion, Rockland, MA), a 110°C, fluxo de ar de 9 L.h⁻¹ e peso da amostra de 5g.

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SAS “for Windows” v 6.11. Os dados foram submetidos à análise de variância de comparação de médias ANOVA / testes de Tukey ($p < 0,05$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência de incorporação dos compostos fenólicos

Na Tabela 09 podem ser observados os dados obtidos para compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante avaliada através do sistema DPPH e análise instrumental da cor das micropartículas obtidas em Spray Dryer.

Tabela 09 – Teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH) e análise instrumental da cor das micropartículas obtidas em Spray Dryer.

Formulação	FT (mg GAE.g ⁻¹)	CA _{DPPH} (mg TEAC.g ⁻¹)	L*	a*	b*
Extrato A ⁽¹⁾	590,78** ± 4,41	1210,97** ± 25,24	64,71** ± 0,06	12,15** ± 0,08	19,19** ± 0,09
F1	2,89 ^{BC} ± 0,14	2,03 ^D ± 0,18	91,66 ^A ± 0,21	2,20 ^B ± 0,03	7,34 ^C ± 0,06
F2	3,05 ^B ± 0,35	3,06 ^B ± 0,03	89,53 ^B ± 0,73	2,56 ^A ± 0,08	8,57 ^A ± 0,06
F3	2,13 ^C ± 0,02	2,50 ^C ± 0,02	91,37 ^A ± 0,18	2,22 ^B ± 0,02	8,09 ^B ± 0,05
F4	5,32 ^A ± 0,05	6,54 ^A ± 0,06	90,04 ^B ± 0,41	1,74 ^C ± 0,06	8,61 ^A ± 0,11

(1) Infusão atomizada em Spray Dryer; F1 = 35% de maltodextrina + 15% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato; F2 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato; F3 = 50% de maltodextrina + 47% água + 2% de extrato; F4 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina; FT = Fenólicos Totais – mg GAE.g⁻¹ (equivalentes em ácido gálico) em peso seco (ensaio Folin-Ciocalteu); CA = Capacidade Antioxidante – mg TEAC.g⁻¹ (equivalentes em Trolox) em peso seco (DPPH – TEAC); L* = luminosidade, a* = Δ verde ao vermelho; b* = Δ azul ao amarelo. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferenças significativas entre as formulações F1, F2, F3 e F4 (Teste de Tukey, p < 0,05); “***” indica diferenças significativas (Teste de Tukey, p < 0,05) entre o Extrato A e todas as demais formulações; média \pm desvio padrão (n=3).

As micropartículas contendo apenas o extrato aquoso da casca de noz-pecã, obtidas através de atomização em Spray Dryer (extrato A), apresentaram valores significativamente (p > 0,05) superiores para todos os parâmetros analisados, exceto para luminosidade (L*), com coloração próxima dos tons vermelhos e marrons, semelhante à casca da noz (Tabela 09). Esse fato é justificado pela maior concentração dos compostos fenólicos presentes no extrato atomizado que proporcionam a obtenção de

partículas com valores superiores para o parâmetro a^* indicando a tendência a tons vermelhos, característicos para esses compostos como evidenciado em trabalhos anteriores realizados por Prado et al. (2013) e Prado et al. (2010).

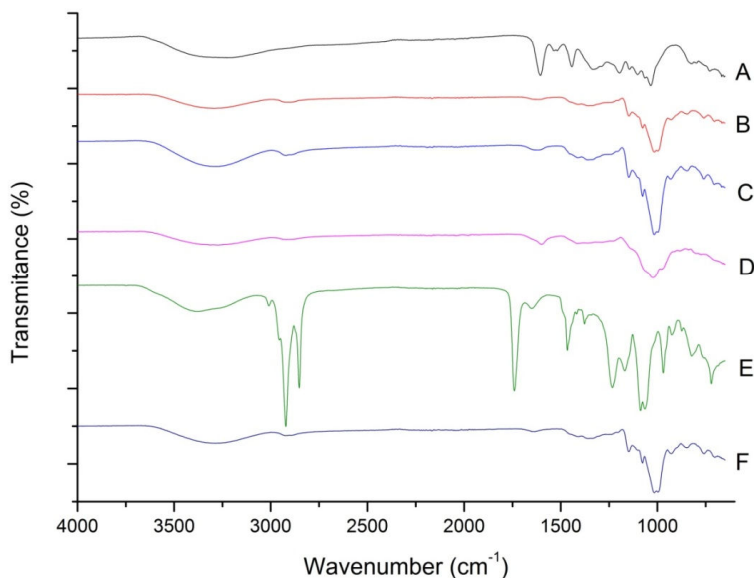
Além disso, a tendência aos tons vermelhos pode estar relacionada à atividade das enzimas fenolases. Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam reações envolvendo oxigênio. Atuam promovendo a hidroxilação de monofenóis (*p*-cresol, tirosina, ácido *p*-cumárico) formando *o*-difenóis e a oxidação de *o*-difenóis (catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico) formando *o*-quinonas. A oxidação dos substratos fenólicos provoca o escurecimento de frutas, vegetais, cereais e leguminosas, e ocorrem no alimento durante o processamento e armazenamento (UDAYASEKHARA RAO e DEOSTHALE, 1987; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Essas reações podem ter ocorrido de forma mais pronunciado no extrato puro (infusão) atomizado no Spray Dryer, enquanto nas formulações a presença dos polímeros de encapsulação exerceu uma determinada proteção dos compostos fenólicos frente às reações de oxidação.

A formulação F2 quando comparada a F1 e F3 (Tabela 09) apresentou os melhores resultados para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante sendo essa também a formulação com valores mais elevados para o parâmetro a^* (tons vermelhos), indicando além de teores superiores para os compostos fenólicos, a presença de taninos do grupo dos flobafenos (PRADO et al., 2010; SENTER e FORBUS, 1978). No entanto, quando incorporado o agente emulsificante (L- α -fosfatidilcolina), a formulação F4 (utilizando maltodextrina e goma arábica na mesma proporção adicionada em F2) apresentou valores significativamente ($p < 0,05$) superiores para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante avaliada através do método DPPH (Tabela 09). Esse fato pode ser um indicativo de que o uso do agente emulsificante favorece a estabilização das partículas (HORWITZ, KRUT e KAMINSKY, 1971) melhorando a eficiência de incorporação do extrato aquoso aos polímeros utilizados. A interferência da L- α -fosfatidilcolina na formulação F4

também foi observada através da análise do parâmetro a^* , em que ocorreu um deslocamento dos valores obtidos no sistema CIE Lab para os tons verdes, mascarando a tendência anterior para a cor vermelha observada na amostra F2 sem adição do agente emulsificante, já reportada em estudos anteriores para amostras de outra natureza (PARISENTI, 2011; SANTOS, 2006). As formulações que apresentaram resultados superiores para atividade antioxidante, também demonstraram através da análise do parâmetro de cor b^* uma maior tendência ao amarelo, estando de acordo com estudos reportados por Prado et al. (2013) para o pó da casca de noz-pecã.

Na Figura 25 (pag. 219) podem ser observados os espectros de FTIR para a infusão atomizada em Spray Dryer (Extrato A), para as formulações das micropartículas obtidas com teores superiores de compostos fenólicos totais (F2 e F4), e para os diferentes materiais de parede utilizados.

Figura 25 - Espectro FTIR. A: Extrato A (infusão atomizada em Spray Dryer); B: F2 (42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato); C: F4 (42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina); D: goma arábica; E: L- α -fosfatidilcolina; F: maltodextrina.



Através da análise de FTIR observou-se que as formulações F2 e F4 apresentaram de forma geral espectros semelhantes entre si. No entanto, pequenas diferenças foram observadas nessas amostras, onde F4 apresentou uma banda mais pronunciada na região espectral de 2800-3000 cm^{-1} , sendo atribuída ao estiramento C-H em compostos alifáticos (KLASSON et al., 2009), também relacionada ao conteúdo de lipídios da amostra, ocorrendo provavelmente devido a adição de L- α -fosfatidilcolina à formulação. Também foram

observadas diferenças na região espectral de 3000-3600 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento OH que está frequentemente relacionado à água ligada na amostra e pequenas moléculas de álcool. Além disso, as bandas de largura pronunciada nessa região espectral também denotam a presença de pontes de hidrogênio devido a umidade presente na amostra e ligações dos compostos fenólicos entre si. Ao analisar as amostras F2 e F4, para a banda detectada na região espectral de 1600 cm^{-1} (que pode ser atribuída ao grupo fenil: C = C e ligações de anéis aromáticos) e para as diversas bandas na região de 1000-1400 cm^{-1} (atribuídas às ligações C-O características de carboidratos ou compostos fenólicos) observou-se que as mesmas foram drasticamente diminuídas quando comparadas à infusão atomizada separadamente no Spray Dryer. Esse fato pode ter ocorrido devido a reduzida concentração do extrato presente nas formulações F2 e F4, sendo porém visivelmente mais pronunciados na formulação F4 quando observada a mesma região espectral na formulação F2. Além disso, as regiões de 1200-1000, usualmente indicativos da presença de carboidratos (ligações C-O) foram semelhantes entre as formulações F2 e F4, estando provavelmente relacionado a presença dos polímeros goma arábica e maltodextrina. No entanto, a mesma região espectral foi significativamente diferente para a infusão seca em Spray Dryer, sendo justificado pelo baixo teor de carboidratos nesse tipo de amostra (PRADO et al., 2013).

Através da análise dos resultados obtidos, pode-se inferir que as diferenças observadas a partir dos espectros de FTIR das amostras F2 e F4, ocorreram devido à presença da L- α -fosfatidilcolina. O agente emulsificante favoreceu a formação de uma emulsão mais estável, melhorando a solubilização de todos os componentes da fórmula, refletindo também um procedimento de secagem no Spray Dryer mais homogêneo.

Na análise microscópica de fluorescência, sob incidência de luz azul, todas as amostras analisadas (pó da casca moído a 60 mesh, infusão atomizada em Spray Dryer, F1, F2, F3 e F4) emitiram autofluorescência de coloração amarela intensa. Essa característica é comum para amostras contendo compostos fenólicos, especialmente

compostos da classe dos flavonóides (LIGRONE et al., 2008; KODNER e GRAHAM, 2001; HUTZLER et al. 1998). De acordo com Vehring (2008), a emissão de fluorescência em todas as amostras indica que os compostos fenólicos não ficaram retidos em formato reservatório nas micropartículas, dentro de uma espécie de envoltório, característico para cápsulas verdadeiras. Os resultados observados confirmam a hipótese de Fang e Bhandari (2010) que a tentativa de encapsulação de compostos polifenólicos através do uso de atomização em Spray Dryer proporciona a formação de microcápsulas em sistema matricial, para os quais o termo micropartícula é mais apropriado.

3.2 Caracterização das micropartículas

Na Tabela 10 podem ser observados os dados obtidos para teor de umidade, atividade de água e densidade para as micropartículas obtidas em Spray Dryer.

Tabela 10 - Teor de umidade, atividade de água e densidade para as diferentes formulações de micropartículas obtidas em Spray Dryer.

Formulação	Umidade (%)	Atividade de água (aa)	Densidade (g/cm ³)
F1	2,74 ^A ± 0,21	0,25 ^A ± 0,01	1,34 ^B ± 0,01
F2	1,62 ^{AB} ± 0,26	0,15 ^B ± 0,01	2,96 ^A ± 0,01
F3	2,68 ^A ± 0,36	0,15 ^B ± 0,01	1,15 ^D ± 0,01
F4	1,18 ^B ± 0,53	0,16 ^B ± 0,01	1,26 ^C ± 0,01

F1 = 35% de maltodextrina + 15% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato; F2 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato; F3 = 50% de maltodextrina + 47% água + 2% de extrato; F4 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$); média \pm desvio padrão (n=3).

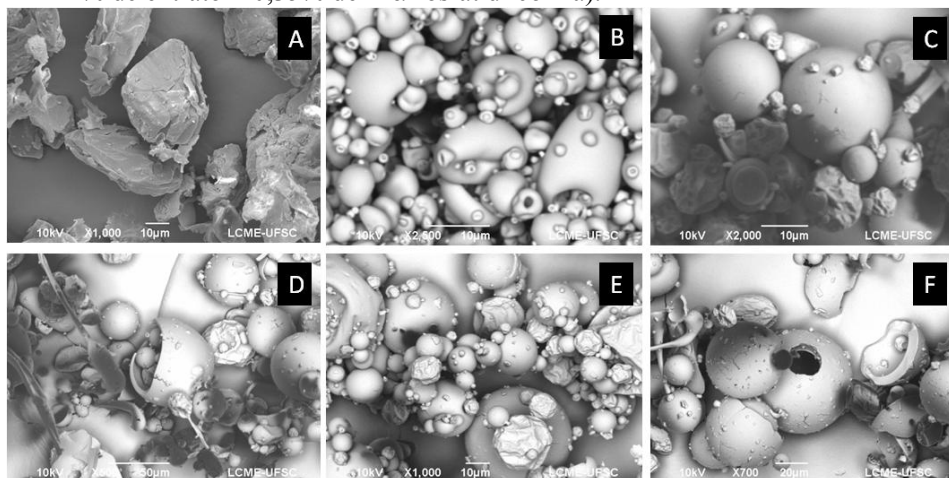
De acordo com a Tabela 10, a formulação F1 contendo maior proporção de goma arábica, apresentou valores significativamente ($p < 0,05$) superiores para teor de umidade e

atividade de água (aa). A formulação F3, contendo apenas maltodextrina e teores de umidade considerados estatisticamente ($p < 0,05$) iguais à formulação F1, apresentou atividade de água e densidade reduzida quando comparada à formulação F1. Essa variação nos conteúdos de umidade pode ser atribuída ao fato da goma arábica, ausente na formulação F3, apresentar maior densidade que o polímero maltodextrina e estrutura química com um grande número de ramificações com grupos hidrofílicos, podendo se ligar, portanto mais facilmente a moléculas de água, retendo um maior teor de umidade residual durante o processo de secagem.

Na formulação F4, contendo proporções iguais a F2 para os polímeros goma arábica e maltodextrina, observou-se uma redução drástica no teor de umidade e na densidade das micropartículas quando adicionada a L- α -fosfatidilcolina à formulação. A presença do agente emulsificante na formulação F4 permitiu a formação de uma emulsão mais fina e homogênea (GHARSALLAOUI et al., 2007), proporcionando um processo de secagem mais eficiente reduzindo conseqüentemente a densidade das micropartículas.

Na Figura 26 (pag. 223) podem ser observadas as micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o pó da casca de noz-pecã (moído e peneirado até 60 mesh.), a infusão atomizada em Spray Dryer, e as formulações F1, F2, F3 e F4.

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: Pó da casca de noz-pecã moído e peneirado a 60 mesh.; B: Extrato A (infusão atomizada em Spray Dryer); C: F1(35% de maltodextrina + 15% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato) ; D: F2 (42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato); E: F3 (50% de maltodextrina + 47% água + 2% de extrato); F: F4 (42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina).



De acordo com a análise morfológica através de MEV observou-se que o pó da casca finamente moído a 60 mesh (Figura 26-A), apresentou partículas com formas irregulares e tamanhos variados. Para a infusão atomizada em Spray Dryer (Figura 26-B), observou-se um padrão de formas tendendo ao formato de esferas, porém de diâmetros variando entre 2,5 a 15 μm . Nas formulações utilizando os polímeros maltodextrina e goma arábica, ocorreram variações significativas para as formas e os tamanhos das micropartículas, sendo que na formulação F3 (Figura 26-E), contendo apenas maltodextrina como polímero de encapsulação, as micropartículas variaram entre 3 e 50 μm de diâmetro apresentando além de formas esféricas bem definidas, micropartículas com

superfície rugosa. Essa característica é comum em processos de secagem heterogêneos e incompletos devido à contração das partículas durante a rápida secagem e o resfriamento no secador (ROSENBERG, TALMON e KOPELMAN, 1990), e pode ser justificado pelo alto conteúdo de umidade da formulação F3. Além disso, de acordo com Thies (2001), a extensão das depressões que aparecem nas superfícies de partículas produzidas por Spray Dryer ocorre em função da natureza do agente encapsulante utilizado, sendo significativa naquelas que possuem cobertura com polissacarídeos.

Ao utilizar simultaneamente maltodextrina e goma arábica nas formulações (Figura 26 - C, D e F), as micropartículas apresentaram diâmetros de até 60 μm , sendo que ao modificar a formulação F2 adicionando o emulsificante L- α -fosfatidilcolina (formulação F4), observou-se uma tendência para a formação de esferas mais uniformes.

Em todas as formulações testadas observou-se uma tendência significativa à aglomeração das micropartículas. Essa característica é atribuída por alguns autores, principalmente devido à presença da goma arábica que favorece a ocorrência de pequenas partículas posicionadas na superfície das partículas maiores. De acordo com Bhandari et al. (1993), o aglomerado pode conter o material de recheio em seus interstícios, favorecendo a sua estabilidade.

Na Tabela 11 podem ser observados os pontos de cristalização determinados através de Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a infusão atomizada em Spray Dryer (Extrato A), formulações F2 e F4 e os diferentes materiais de parede utilizados (goma arábica e maltodextrina).

Tabela 11 - Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a infusão atomizada em Spray Dryer (Extrato A), formulações F2 e F4 e os diferentes materiais de parede utilizados (goma arábica e maltodextrina).

Amostra	Temperatura de Cristalização (°C)	ΔH (variação de entalpia em $J.g^{-1}$)
Extrato A	150,82	-173,46
Goma arábica	181,19	-106,59
Maltodextrina	194,83	-64,26
F2	187,01	-98,55
F4	164,01	-97,94

Ao analisar os resultados obtidos para DSC do extrato da casca de noz-pecã (Tabela 11), para as formulações F2 e F4 e para os polímeros de microencapsulação, observou-se um deslocamento dos eventos exotérmicos relacionados ao ponto de cristalização do extrato e dos polímeros isolados em relação às formulações. Além disso, também foi notável a influência do agente emulsificante que provocou um deslocamento do ponto de cristalização da formulação F4 comparada a F2.

Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos na Análise termogravimétrica (TGA) e percentual de perda de massa por dessecação (35 a 105°C) para a infusão atomizada em Spray Dryer (Extrato A) e formulações F2 e F4, através do uso de diferentes curvas de aquecimento.

Tabela 12 - Análise termogravimétrica (TGA) e percentual de perda de massa por dessecação (35 a 105°C) para a infusão atomizada em Spray Dryer (Extrato A) e formulações F2 e F4, através do uso de diferentes curvas de aquecimento.

	TGA – curva de 25 a 300°C (°C / % perda de massa)		TGA – curva de 25 a 800°C (°C / % perda de massa)		% perda de massa por dessecação (35 a 105°C)
	t ₀	t _f	t ₀	t _f	
Extrato A*	100 / 10,57	300 / 32,87	69,80 / 8,44	454,59 / 58,52	10,57
F2**	100 / 3,90	300 / 66,72	78,12 / 3,83	318,76 / 83,16	3,15
F4***	100 / 3,01	300 / 57,65	71,25 / 4,69	319,73 / 88,59	3,01

*Infusão atomizada em Spray Dryer; F2 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato; F4 = 42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina.

Através da análise de TGA (Tabela 12) foi possível observar a presença de dois eventos (t₀ e t_f), típicos em estudos para perda de biomassa termogravimétrica. De acordo com estudos publicados anteriormente, o primeiro evento é característico para a perda de água de cristalização, e o segundo evento, característico para a degradação do material (FASINA e LITTLEFIELD, 2012). Através das duas curvas de aquecimento na Análise Termogravimétrica (TGA), observou-se uma coerência dos resultados para as diferentes temperaturas utilizadas. O primeiro evento (t_{g0}) esteve fortemente relacionado à perda de água de dessecação, sendo estes resultados, apesar de superiores ao teor de umidade determinado através do método de secagem em estufa nas mesmas amostras, considerados coerentes, pois as amostras que apresentaram menor teor de umidade, também perderam o menor percentual em massa por dessecação.

De acordo com Fasina e Littlefield, 2012; Idris et al. (2010) e Tsamba, Yang e Blasiak (2006) reportando análises de TGA, foi verificado que temperaturas mais brandas são responsáveis pela decomposição das hemiceluloses enquanto temperaturas mais

elevadas representam a decomposição da celulose e lignina, sendo que esta última ocorre tipicamente numa ampla faixa de temperatura. Embora não seja possível extrair a lignina sem degradá-la, esse composto pode ser extraído parcialmente com uso de água quente, proporcionando aos seus extratos uma cor escura, sendo facilmente oxidado devido ao seu alto teor de compostos aromáticos e fenólicos. Considerando a presença de resíduos desses compostos no extrato aquoso da casca de noz-pecã, esse fato pode justificativar as altas temperaturas para a degradação do extrato observado no segundo evento (tg_2). Além disso, através da observação das temperaturas de decomposição relacionadas ao segundo evento (tg_2), foi possível a incorporação dos polímeros ao extrato, apesar de deslocar o ponto de cristalização nas análises de DSC (Tabela 11) para temperaturas superiores, aceleraram o processo de degradação das formulações.

Fasina e Littlefield (2012) analisando amostras do pó da casca bruta de noz-pecã aquecidas sob uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, reportaram uma perda de 15% da massa inicial na faixa de temperatura de 30 a 175°C , sendo atribuída a perda de umidade, iniciando a partir disso a decomposição térmica, que foi máxima na temperatura aproximada de 400°C finalizando na faixa de 550°C . Os mesmos autores relataram que as hemiceluloses apresentaram picos de decomposição térmica nas temperaturas de 275°C a 315°C quando aquecidas utilizando taxas de 5 e $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente, sendo os carboidratos, a partir de determinadas faixas de temperatura e taxas de aquecimento, degradados mais facilmente e em temperaturas inferiores àquelas necessárias para a degradação de polímeros constituintes da parede celular, tais como as ligninas.

Características referentes à viscosidade e ao conteúdo de umidade apresentam importante relação com as condições de operação e armazenamento da produção de partículas em pó. A viscosidade está diretamente relacionada à temperatura de secagem das micropartículas em processos envolvendo atomização com uso de Spray Dryer, produzindo uma grande quantidade de produtos amorfos (BHANDARI, DATTA e HOWES, 1997). Quando os produtos amorfos são aquecidos acima da temperatura de transição vítrea (aproximadamente 20°C), eles passam a apresentar

características de produtos “emborrachados” e excessivamente viscosos. Além disso, a umidade atua como um agente plastificante nos materiais e conforme seu conteúdo aumenta, reduz a temperatura de transição vítrea. Sendo assim, é desejável reduzir o conteúdo de umidade, aumentando dessa forma, a temperatura de transição vítrea (CHIOU e LANGRISH, 2007). Considerando os dados obtidos nas análises de DSC, TGA e a perda de água por dessecação, a formulação F4 apresentou melhores características em relação a F2 e proporcionou melhor estabilidade ao uso da micropartícula incorporada dos polímeros de encapsulação.

3.3 Liberação dos compostos fenólicos em óleo de soja

O estudo da liberação dos compostos fenólicos das micropartículas foi realizado em óleo de soja isento da adição de antioxidantes e de composição típica e predominantemente insaturada (Tabela 13). O conteúdo significativo de ácido linoleico ($52,87 \pm 0,21$) torna o óleo de soja mais suscetível às reações de oxidação (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005; SHERWIN, 1978), sendo dessa forma a matéria prima de escolha para avaliação do índice de peróxidos e do tempo de indução em horas (OSI) do processo oxidativo.

Tabela 13 – Caracterização do óleo de soja utilizado para liberação dos compostos fenólicos das micropartículas obtidas em Spray Dryer.

Parâmetro	Amostra	MAPA* (2006)	CODEX ALIMENTARIUS ** (1999)
Ácido mirístico (C14:0)	0,07 ± 0,01	≤ 0,2	0,0 a 0,2
Ácido palmítico (C16:0)	11,04 ± 0,03	8,0 a 13,5	8,0 a 13,3
Ácido esteárico (C18:0)	3,70 ± 0,16	2,0 a 5,4	2,4 a 5,4
Ácido oleico (C18:1n9c)	27,00 ± 0,13	17,0 a 30,0	17,7 a 26,1
Ácido linoleico (C18:2n6c)	52,87 ± 0,21	48,0 a 59,0	49,8 a 57,1
Ácido linolênico (C18:3n3)	4,74 ± 0,36	3,5 a 8,0	5,5 a 9,5
Ácido cis-11-eicosaenóico (C20:1)	0,31 ± 0,01	≤ 0,5	0,1 a 0,6
Ácido behênico (C22:0)	0,15 ± 0,01	0,1 a 0,6	0,3 a 0,7
Índice de Peróxidos (mEq.kg ⁻¹)***	0,16 ± 0,09	≤ 0,25	≤ 10,0

*MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento): regulamentação brasileira; **CODEX ALIMENTARIUS: regulamentação internacional; ***mEq.kg⁻¹= miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo/gordura; Média ± desvio padrão (n=3).

De acordo com a Tabela 13, é possível observar que a caracterização do óleo de soja para os ensaios de oxidação acelerada e liberação dos compostos bioativos da casca de noz-pecã, esteve de acordo com os dois órgãos reguladores brasileiros (MAPA, 2006: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e ANVISA, 2005: Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para essa matéria prima. De acordo com o Códex Alimentarius (1999), órgão regulador internacional, os teores de ácido oleico, linolênico e behênico apresentaram pequenas variações para os limites estabelecidos, porém não comprometendo a estabilidade oxidativa do mesmo (Índice de Peróxidos).

Para o acompanhamento da liberação dos compostos fenólicos da superfície e interior das micropartículas para o óleo, a formulação de escolha foi a F4, de composição equivalente a da formulação F2, que apresentou entre outras características

importantes, resultados superiores para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e menor teor de umidade.

Na Tabela 14 podem ser observados os resultados obtidos para a determinação do índice de peróxidos dos diferentes tratamentos testados, ao longo de 14 dias em *Schaal Oven Test*, para avaliação da liberação dos compostos fenólicos presentes no extrato alcoólico e micropartículas contendo extrato aquoso da casca de noz-pecã.

Tabela 14 - Determinação do índice de peróxidos dos diferentes tratamentos testados, ao longo de 14 dias, na avaliação da liberação dos compostos bioativos presentes nas micropartículas com extrato da casca de noz-pecã.

Tratamentos (ppm*)	Índice de Peróxidos (mEq.kg ⁻¹)***** ao longo do tempo (dias)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Controle**	0,18 ^{AI} ±0,09	0,46 ^{AI} ±0,01	2,72 ^{Ae} ±0,39	4,97 ^{Ad} ±0,01	4,40 ^{Ade} ±0,80	10,50 ^{Ac} ±0,36	19,86 ^{Ab} ±0,30	25,35 ^{Aa} ±0,81
TBHQ*** 200	0,17 ^{Ad} ±0,08	0,39 ^{Ad} ±0,08	2,88 ^{Ac} ±0,17	3,18 ^{Bc} ±0,16	4,30 ^{Ac} ±0,15	6,77 ^{Bb} ±0,28	7,99 ^{BCDb} ±1,19	12,29 ^{CDa} ±0,84
Extrato**** 200	0,18 ^{Ae} ±0,07	0,22 ^{Ae} ±0,01	2,77 ^{Ad} ±0,16	2,54 ^{Cd} ±0,25	4,41 ^{Ac} ±0,02	5,13 ^{Cc} ±0,67	8,62 ^{BCDb} ±1,20	11,77 ^{CDa} ±0,81
Extrato 500	0,16 ^{Ae} ±0,09	0,28 ^{Ae} ±0,08	2,03 ^{Bd} ±0,08	2,09 ^{CDd} ±0,23	4,46 ^{Ac} ±0,10	4,35 ^{CDc} ±0,04	8,26 ^{BCDb} ±0,52	11,78 ^{CDa} ±0,79
Extrato 1000	0,18 ^{Ae} ±0,09	0,17 ^{Ae} ±0,08	1,64 ^{BCd} ±0,16	1,47 ^{Ed} ±0,16	4,23 ^{Ac} ±0,08	3,77 ^{DEc} ±0,08	6,68 ^{BCDb} ±0,09	14,00 ^{BCa} ±0,86
Extrato 1500	0,17 ^{Ad} ±0,08	0,27 ^{Ad} ±0,22	1,07 ^{CDd} ±0,16	1,13 ^{Ed} ±0,17	3,60 ^{Ac} ±0,46	3,12 ^{EFc} ±0,11	5,49 ^{Db} ±0,82	14,02 ^{BCa} ±0,80
F4***** 200	0,18 ^{Ad} ±0,09	0,11 ^{Ad} ±0,01	0,73 ^{bd} ±0,01	1,35 ^{Ed} ±0,01	1,75 ^{Bd} ±0,08	4,44 ^{CDc} ±0,27	9,65 ^{Bb} ±0,32	16,90 ^{Ba} ±1,56
F4 500	0,18 ^{Ad} ±0,07	0,23 ^{Ad} ±0,16	1,18 ^{CDcd} ±0,16	1,58 ^{DEcd} ±0,01	1,64 ^{BCd} ±0,08	2,73 ^{EFGc} ±0,10	8,88 ^{BCb} ±1,64	13,45 ^{Ca} ±0,10
F41000	0,16 ^{AI} ±0,09	0,22 ^{AI} ±0,01	1,07 ^{CDe} ±0,01	1,35 ^{Ede} ±0,16	1,47 ^{Bd} ±0,01	2,04 ^{FGc} ±0,01	7,77 ^{BCDb} ±0,01	11,29 ^{CDa} ±0,12
F4 1500	0,18 ^{AI} ±0,09	0,17 ^{AI} ±0,08	0,67 ^{DeI} ±0,08	1,13 ^{Ede} ±0,01	1,58 ^{BCd} ±0,01	1,69 ^{Gc} ±0,01	6,38 ^{CDb} ±0,33	9,11 ^{Da} ±0,12

*parte por milhão, **óleo sem adição de antioxidantes, ***terc-butilidroquinona, ****extrato alcoólico da casca de noz-pecã, *****42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina, ***** mEq.kg⁻¹= miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo/gordura; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, p < 0,05); média \pm desvio padrão (n=3).

Analisando os diferentes tratamentos observou-se que em todos os momentos de coleta do óleo para análise, as micropartículas na concentração de 1500 ppm representaram valores significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$) menores para índice de peróxidos comparado aos demais tratamentos, protegendo o óleo da oxidação de forma muito mais eficaz que o TBHQ e o extrato alcoólico. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, após os 14 dias sob condições de oxidação acelerada, os valores para o índice de peróxido do óleo de soja, sem antioxidante (controle) e a amostra adicionada a 200 ppm de TBHQ foram de 25,35 e 12,29 mEq.kg^{-1} , respectivamente. Para o extrato alcoólico os melhores resultados foram observados nas concentrações de 200 e 500 ppm (11,7 mEq.kg^{-1} para ambas as concentrações). As amostras de óleo adicionado com micropartículas obtidas por atomização em Spray Dryer na concentração de 1500 ppm apresentaram o menor valor de peróxido (9,11 mEq.kg^{-1}) após 14 dias.

Através do *Schaal Oven Test* também foi possível observar que os polímeros (maltodextrina e goma arábica) proporcionaram uma melhor estabilidade para os antioxidantes contidos na micropartícula que aqueles compostos presentes no extrato alcoólico, expostos diretamente às condições de oxidação. Esse fato pode ser explicado por Gharsallaoui et al. (2007) ao observar que as maltodextrinas podem prover uma boa estabilidade oxidativa à micropartícula, compensando a limitada capacidade de barreira à permeabilidade do oxigênio da goma arábica, que por sua vez tem seu uso justificado por apresentar melhor atividade emulsificante em relação ao polímero maltodextrina.

De acordo com Prado et al. (2013 – *in press*), apesar do extrato alcoólico apresentar em sua composição fenólica um teor significativamente superior de ácido gálico (828,68 $\mu\text{g/mL}$) em relação à infusão seca em Spray Dryer (238,83 $\mu\text{g/mL}$); o extrato aquoso atomizado em Spray Dryer possui um teor muito mais elevado de epigalocatequina (1325,95 $\mu\text{g/mL}$), comparado ao extrato alcoólico (120,21 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, é conhecido que a epigalocatequina apresenta atividade antioxidante significativamente superior ao ácido gálico (PRADO et al., 2013 – *in press*; SOOBRAATTEE et al., 2005), justificando também dessa forma, a melhor eficácia antioxidante

observada para a micropartícula em relação ao extrato alcoólico, nos ensaios de oxidação acelerada.

Na Tabela 15 podem ser observados os resultados obtidos para a avaliação do índice da estabilidade oxidativa (OSI), tempo de indução da oxidação em horas, para o óleo de soja adicionado do antioxidante comercial (TBHQ), extrato alcoólico da casca de noz-pecã e das micropartículas (F4) em diferentes concentrações.

Tabela 15 – Avaliação do índice de estabilidade oxidativa (OSI) do óleo de soja adicionado do antioxidante comercial (TBHQ), extrato alcoólico da casca de noz-pecã e das micropartículas (F4) em diferentes concentrações.

Tratamentos (ppm*)	Índice de Estabilidade Oxidativa (tempo em h)
Controle**	6,30 ^B ± 0,03
TBHQ*** 200	16,30 ^A ± 0,47
Extrato**** 200	6,64 ^B ± 0,25
Extrato 500	6,59 ^B ± 0,26
Extrato 1000	6,27 ^B ± 0,08
Extrato 1500	6,37 ^B ± 0,08
F4***** 200	6,35 ^B ± 0,01
F4 500	6,26 ^B ± 0,07
F41000	6,19 ^B ± 0,12
F4 1500	6,52 ^B ± 0,01

*parte por milhão, **óleo sem adição de antioxidantes, ***terc-butildioquinona, ****extrato alcoólico da casca de noz-pecã, *****42,5% de maltodextrina + 7,5% de goma arábica + 47% água + 2% de extrato + 0,35% de L- α -fosfatidilcolina. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$); média \pm desvio padrão ($n=3$).

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 15) para a análise do Índice de Estabilidade Oxidativa (OSI), apenas o óleo de soja contendo antioxidante de uso comercial (TBHQ) apresentou um valor para estabilidade oxidativa ($16,30 \pm 0,47$) significativamente ($p < 0,05$) superior aos demais tratamentos. A divergência de resultados entre o *Schaal Oven Test* e o OSI, podem ter ocorrido devido às condições experimentais envolvendo diferentes temperaturas, entre os

métodos empregados. De acordo com Wanasundara e Shahidi (2005) resultados obtidos através de *Schaal Oven Test* são geralmente melhor correlacionados com experimentos para avaliação da estabilidade de antioxidantes em óleos, devido às temperaturas mais brandas utilizadas experimentalmente. Por outro lado, Hill e Perkins (1995) avaliando a estabilidade de óleo de soja utilizando equipamento OSI reportaram em seus estudos que alguns erros podem ocorrer ao utilizar temperaturas próximas de 100°C, já que alguns ácidos orgânicos podem ficar concentrados devido à evaporação da água nessa temperatura, alterando o resultado do teste.

Além disso, segundo Wanasundara e Shahidi (2005) o antioxidante comercial TBHQ, utilizado como padrão neste estudo, é conhecido por apresentar melhor capacidade de resistência a temperaturas elevadas quando comparado aos extratos naturais, podendo atingir a estabilidade de até 28 horas em equipamento OSI a 98°C. Os efeitos da temperatura dos ensaios de oxidação sob a estabilidade de óleos vegetais adicionados de antioxidantes sintéticos e naturais têm sido estudados por diversos autores. Kishk e Al-Sayed (2007) observaram que elevando a temperatura, utilizada no teste de oxidação acelerada, as diferenças entre a estabilidade do extrato de raízes de polissacarídeos e a TBHQ diminuíam, no sentido que em altas temperaturas a TBHQ melhorava a estabilidade enquanto a do extrato diminuía. Essa considerável estabilidade da TBHQ às temperaturas próximas de 100°C no equipamento OSI também foi observada por Kiritsakis et al. (2010) em óleo de oliva e por Frankel et al. (1994) em óleo de soja.

4 CONCLUSÕES

As micropartículas obtidas em Spray Dryer apresentaram diferenças significativas entre as formulações testadas, sendo que os resultados considerados satisfatórios para teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, características apresentadas nas análises de DSC, TGA, umidade e perda de água por dessecação foram observados na formulação F4 contendo emulsificante L- α -fosfatidilcolina. A presença do agente emulsificante também favoreceu a formação de uma emulsão mais estável, melhorando a solubilização dos componentes da fórmula, refletindo um procedimento de secagem

mais homogêneo, apesar da formação de aglomerados observados na microscopia eletrônica de varredura.

Na análise microscópica de fluorescência observou-se emissão de fluorescência natural amarela, em todas as amostras, indicando a presença de compostos fenólicos no interior e exterior da partícula, característico para micropartículas obtidas em Spray Dryer, sendo dessa forma, impróprio o emprego do termo microcápsula.

Outros estudos objetivando diminuir e uniformizar o tamanho das micropartículas devem ser realizados, considerando que os compostos fenólicos presentes na infusão da casca da noz-pecã adicionada dos polímeros maltodextrina e goma arábica e do emulsificante (*L-α*-fosfatidilcolina) reduziram de forma significativa a oxidação do óleo de soja em *Schaal Oven Test*.

Agradecimentos

Às empresas Divinut Ind. de Nozes Ltda (Cachoeira do Sul – RS) e Siol Alimentos Ltda (Barueri - SP), pelo fornecimento da matéria-prima. Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pela estrutura cedida para análise. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Aos alunos Sabrina de Matos Carvalho, Gabriela e Mateus do laboratório de Reologia (UFSC), Amarilis e Rafael do laboratório de Controle de Qualidade (UFSC), à Patrícia Benelli do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (UFSC), ao Fábio Murakami do Laboratório de Controle de Qualidade II (UFPR) e às alunos Rafael Luchtenberg, Priscila de Brito Policarpi, Josiani Hilbig e Daiane Martins Schmeling do Laboratório de Óleos e Gorduras (UFSC) pelo auxílio nas análises. Este trabalho foi financiado pelo CNPq - processo número 479069/2011-5.

5 REFERÊNCIAS

ANVISA - Brasil (2005) National Health Surveillance Agency (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde). Resolução RDC nº 270, de 22 de Setembro de 2005.Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Brasília: Diário Oficial da União.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, USA, AOCS, 2004.

BHANDARI, B.R.; DATTA, H.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n.2, p. 671-684, 1997.

BHANDARI, B.R.; SENOUSI, A.; DUMOULIN, E.D.; LEBERT, A. Spray drying of concentrated fruit juices. **Drying Technology**, v.11, n. 5, p. 1081-1092, 1993.

BIRCH, A.E. et al. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4502 - 4507, 2001.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER A.E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v. 28, p. 25 - 30, 1995.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria - Ministerio da Saude. Resolucao RDC no 23, de 15 de fevereiro de 2005. **Regulamento Tecnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funcoes e seus limites maximos para a categoria de alimentos oleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas**. Brasilia: Diario Oficial da Uniao, 2005.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CHIOU, D.; LANGRISH, T.A.G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. **Journal of Food Engineering**, vol. 82, p.84-91, 2007.

Codex Alimentarius Commission. Food Standards Programme. Codex Alimentarius for Edible Fats and Oils. CODEX – STAN 210. Rome: FAO/WHO 11:1–13; 1999.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p. 33-40, 2004.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510 – 523, 2010.

FASINA, O.; LITTLEFIELD, B. TG-FTIR analysis of pecan shells thermal decomposition. **Fuel Processing Technology**, v.102, p. 61–66, 2012.

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

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of Spray-drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GORDON, M.H. Measuring antioxidant activity. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M.H. **Antioxidants in food: Practical applications**. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England, CRC Press, 2001.

HANSEN, T.; HOLM, P.; SCHUTZ, K. Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 287, p. 55 – 66, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A Rapid Preparation of Fatty Acids Methyl Esters From Lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 457-477, 1973.

HILL, S.E.; PERKINS, E.G. Determination of oxidation stability of soybean oil with the Oxidative Stability Instrument: Operation Parameter Effects. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 72, n°6, p. 741 – 743, 1995.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, N.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

HORWITZ, C.; KRUT, L.; KAMINSKY, L.S. The emulsifying properties of egg yolk phosphatidylcholine. **Lipids**, v. 7, n. 4, p. 234 – 239, 1971.

HUTZLER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T.P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; VEIT, M.; WEISSEMBÖCK, G.; SCHNITZLER, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 953 – 965, 1998.

IDRIS, S.S.; RAHMAN, N.A.; ISMAIL, K.; ALIAS, A.B.; RASHID, Z.A.; ARIS, M.J. Investigation on thermochemical behavior of low rank Malaysian coal, oil palm biomass and their blends during pyrolysis via thermogravimetric analysis (TGA). **Bioresource Technology**, v.101, p. 4584–4592, 2010.

KIRITSAKIS, K.; KONTOMINAS, M.G.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MOUSTAKAS, A.; KIRITSAKIS, A. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 87, p. 369 – 376, 2010.

KISHK, Y.F.M.; AL-SAYED, H.M.A. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v.40, p. 270- 277, 2007.

KLASSON, K.T.; WARTELLE, L.H.; RODGERS III, J.E.; LIMA, I.M. Copper(II) adsorption by activated carbons from pecan shells: Effect of oxygen level during activation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 72 – 77, 2009.

KODNER, R.B.; GRAHAN, L.E. High-temperature acid-hydrolyzed remains of *Polytrichum* (Musci, Polytrichaceae) resemble enigmatic silurian- devonian tubular microfossils. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 462 – 466, 2001.

LIGRONE, R.; CARAFA, A.; DUCKETT, J.G.; RENZAGLIA, K.S.; RUEL, K. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in

cell walls in bryophytes and the charalean alga *Nitella*. **Plant Systematics and Evolution**, v.270, p. 257 – 272, 2008.

MAPA - Brasil (2006) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 49, de 22 de dezembro de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados. Brasília: Diário Oficial da União.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127 – 130, 2001.

PARISENTI, J. **Efeitos da suplementação da ração com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja na pigmentação do camarão**, 2011. 125p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2011].

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2010.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites (Sevilla)**, v. 60, n.4, p. 330 – 335, 2009.

PRADO, A.C.P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; DESCHAMPS, F.C.; BARRERA ARELLANO, D.; BLOCK, J.M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64-73, 2013.

PRADO, A.C.P.; SILVA, H.S.; SILVEIRA, S.M.; BARRETO, P.L.M.; VIEIRA, C.R.W.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S.R.S.; BLOCK, J.M. Efeito do processo de extração sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana e o perfil de compostos fenólicos em extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C.

Koch]. Artigo equivalente ao capítulo 3 da tese, submetido para a revista Trends in Food Science & Technology.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 1288-1294, 1990.

SANTOS, E. **Avaliação das propriedades tecnológicas de tripas naturais submetidas ao tratamento com soluções emulsificantes**, 2006. 89p. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2006].

SENER, S.D.; FORBUS, JR W.R. Leucoanthocyanidin oxidation in pecan kernels: relation to discoloration and kernel quality. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 128 - 134, 1978.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In: SHAHIDI, F. **BAILEY'S Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ED., V.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SAHIN NADEEM, H.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT - Food Science and Technology**, V. 44(7), p. 1626 – 1635, 2011.

SHERWIN, E.R. Antioxidants for vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.53, n.6, p.430 - 436, 1978.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I. ; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, **Molecular Research**, v. 579, p. 200 - 213, 2005.

THIES, C. Microencapsulation: what it is and purpose. In: VILSTRUP, P. **Microencapsulation of food ingredients**. Surrey: Leatherhead Publishing, 2001, p.1-30.

TSAMBA, A.; YANG, W.; BLASIAK, W. Pyrolysis characteristics and global kinetics of coconut and cashew nut shells. **Fuel Processing Technology**, v.87, p. 523–530, 2006.

UDAYASEKHARA RAO, P.; DEOSTHALE, Y. G. Polyphenoloxidase activity in germinated legumes seeds. **Journal of Food Science**, v.52, p. 1549-1551, 1987.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v.25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

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

WANASUNDARA, P.K.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F.; AMAROWICZ, R. Effect of processing on constituents and oxidative stability of marine oils. **Journal of Food Lipids**, v.5, p. 29-41, 1998.

CONCLUSÖES

- Foi observado um efeito significativo do ano de colheita e variedade da amostra estudada sob a qualidade nutricional e fitoquímica do óleo e da casca das nozes.

- O óleo da noz-pecã apresentou um predomínio do ácido graxo oléico (69,2 a 75,9%) seguido do ácido linoléico (16,7 a 23,1%), possuindo teores reduzidos para ácido palmítico e esteárico. Foram obtidos teores superiores para γ -tocoferol (entre 23,8 a 38,1 mg.100g⁻¹) e quantidades inferiores do isômero α -tocoferol (1,1 a 1,3 mg.100g⁻¹) bem como para fitosteróis totais (0,19 a 0,22%). O óleo também apresentou uma boa estabilidade oxidativa (7,4 a 11,2 horas em equipamento OSI).

- Amêndoas com teores de ácidos graxos polinsaturados (ácido linoléico) superiores também apresentaram conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) mais elevada na sua casca, evidenciando uma relação entre o teor de ácidos graxos insaturados presentes no óleo e a concentração de compostos antioxidantes na casca, até então pouco investigada em estudos anteriores.

- Os resultados obtidos através da análise espectrofotométrica no infravermelho (FTIR), dos teores totais de compostos fenólicos (FT e TC), e da atividade antioxidante (ABTS e DPPH), após o processamento por atomização com Spray Dryer, indicaram que não houve perda pronunciada destes compostos e da atividade antioxidante. Estes resultados sugerem que a tecnologia de atomização através de Spray Dryer pode ser adequada na obtenção de micropartículas de compostos fenólicos da casca de noz-pecã para emprego na indústria de alimentos e melhor aproveitamento desse resíduo industrial.

- Embora a extração com fluido supercrítico seja reconhecida por oferecer vantagens em relação aos processos convencionais de extração devido a possibilidade de emprego de temperaturas mais brandas, nas condições experimentais empregadas, a infusão e o uso de etanol a temperatura ambiente, foram mais eficientes na extração dos compostos fenólicos presentes na casca de noz-pecã.

- Das metodologias testadas através de CLAE, o uso da resina Sephadex® LH-20 possibilitou a identificação dos ácidos gálico,

clorogênico e *p*-hidroxibenzóico e de dois compostos da classe dos flavonoides, subclasse flavan-3-ol (epigalotequina e epicatequina galato). No entanto, os resultados obtidos sugerem a provável presença de outros compostos além dos reportados neste trabalho.

- Todos os extratos obtidos através de extração convencional apresentaram capacidade bactericida para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicando que a casca apresenta atividade antimicrobiana e bactericida para estes micro-organismos de interesse em alimentos.

- As micropartículas obtidas em Spray Dryer apresentaram diferenças significativas entre as formulações testadas, sendo que os melhores resultados para teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e análise espectrofotométrica no infravermelho (FTIR) foram observados para a formulação F4.

- Na análise microscópica de fluorescência observou-se emissão de fluorescência natural amarela, em todas as amostras, indicando a presença de compostos fenólicos no interior e exterior das partículas, característico para micropartículas obtidas em Spray Dryer, sendo dessa forma, impróprio o emprego do termo microcápsula nestas formulações.

- Nas análises referentes à caracterização das micropartículas (umidade, atividade de água, densidade, MEV, DSC, TGA e perda de água por dessecação) observou-se que a formulação F4, contendo emulsificante L- α -fosfatidilcolina, apresentou os melhores resultados. A presença do agente emulsificante também favoreceu a formação de uma emulsão mais estável, melhorando a solubilização dos componentes da fórmula, refletindo num procedimento de secagem mais homogêneo, apesar da formação de aglomerados observados na microscopia eletrônica de varredura.

- Estudos com o objetivo de diminuir e uniformizar o tamanho das micropartículas devem ser realizados, considerando que os compostos fenólicos presentes na infusão da casca da noz-pecã adicionada dos polímeros maltodextrina e goma arábica e do emulsificante (L- α -fosfatidilcolina) reduziram de forma significativa a oxidação do óleo de soja em testes de oxidação acelerada.

