



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

TATIANA CANTANHEDE TOLOSA

OTIMIZAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS
PRESENTES EM MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS (*Byrsonima*
***crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*)**

BELÉM
2011



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

TATIANA CANTANHEDE TOLOSA

OTIMIZAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS
PRESENTES EM MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS (*Byrsonima*
***crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*)**

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

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

BELÉM

2011

TATIANA CANTANHEDE TOLOSA

**OTIMIZAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS
PRESENTES EM MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS (*Byrsonima
crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*)**

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

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA:

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

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

Profª. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda
(PPGQ/ICEN/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Suplente)

Dedico este trabalho aos meus pais Elizabeth e Luiz Reginaldo que depois de mim foram as pessoas que mais se esforçaram para que esse sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter colocado em minha vida pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso.

A minha família, especialmente minha mãe por compreender minha ausência quase constante do convívio familiar e pela eterna torcida pelo êxito do meu trabalho.

À grande amiga Manuella Monteiro, obrigada pela inestimável amizade que há tantos anos cultivamos... Muito obrigada por tornar possível a realização deste trabalho...

Agradeço imensamente ao Professor Dr. Jesus Souza pela orientação, dedicação e infraestrutura concedidas à realização deste trabalho.

Professor Dr. Hervé Rogez a oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, concedida no ICC, possibilitou a mim “conhecer” e “fascinar-me” pelo “mundo” dos compostos fenólicos. Muito obrigada por isto.

Professor Dr. Evaldo Silva obrigada pelas conversas sempre estimulantes sobre o trabalho desenvolvido por mim junto à equipe...

Professor Dr. Emmerson da Costa e ao Msc. Luiz de Souza pelo auxílio nas análises térmicas realizadas no laboratório de Catálise e Oleoquímica da UFPA.

Professora Dra. Samira Carvalho e Mestrando João Monteiro pelo auxílio nas análises de turbidez realizadas no Laboratório de Processos ambientais.

Professor Dr. Oscar Romero pelo auxílio na compreensão do mecanismo de reação da clivagem.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado concedida durante a execução deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará pelo suporte financeiro concedido a este trabalho.

A todos os colegas da Usina de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à minhas queridas amigas Ana Caroline de Oliveira (obrigada pela imensa ajuda oferecida durante os últimos meses...pelas discussões científicas sempre tão enriquecedoras...), Caroline Santos (“mana” te agradeço imensamente pela amizade e apoio principalmente nos momentos em que cheguei a pensar que a conclusão deste

trabalho fosse algo impossível), Fernanda Damin (o que seria de mim sem você???) Muito obrigada pela ajuda constante na realização do trabalho experimental e pela paciência comigo nos momentos em que o cansaço físico e mental estiveram presentes...) e Lívia Miyagawa (minha "filha" obrigada por todo apoio e carinho). Não podia deixar de mencionar o meu profundo agradecimento ao querido amigo Rogério Vieira por sua inestimável amizade.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Os compostos fenólicos são procurados principalmente pelos setores cosmético (como fotoquimioprotetores), farmacêutico (na prevenção doenças crônico-degenerativas) e alimentício (como antioxidante e corante natural). As proantocianidinas, ou taninos condensados, são polímeros de compostos fenólicos do tipo C₆-C₃-C₆ presentes nos vegetais. Nos alimentos, são adstringentes, atuam como fator antinutricional e são pouco absorvidos pelos humanos. Este trabalho objetivou otimizar a clivagem ácida de proantocianidinas presentes em extratos hidroalcoólicos de plantas do bioma amazônico: *Byrsonima crassifolia* (BC), *Euterpe oleracea* (EO) e *Inga edulis* (IE) através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Utilizou-se planejamento compósito central rotacional, com 4 replicatas no ponto central, e foi avaliada a influência dos fatores concentração de ácido clorídrico (0,3 – 3,7N), tempo (39 – 291 min) e temperatura (56 – 98°C) sobre as variáveis de resposta: redução de proantocianidinas (%), redução da adstringência (%), relação capacidade antioxidante/polifenóis totais (TEAC/PT) e aumento da concentração de cianidina analisado por HPLC. O modelo polinomial de 2ª ordem se ajustou bem aos dados experimentais das variáveis de resposta. Para a redução de proantocianidinas os efeitos significativos foram: linear para as três variáveis (BC, EO e IE); quadrático para a concentração de ácido, temperatura (BC, EO e IE) e tempo (IE); e interação entre concentração de ácido clorídrico e temperatura (BC, EO e IE). Segundo os modelos propostos para as 3 plantas, a maximização das variáveis de resposta ocorre quando a clivagem é realizada com HCl 3N a 88°C por 165 min. Nestas condições, a redução média de proantocianidinas foi de 91% e a de adstringência foi de 75%. A proporção TEAC/PT dos extratos antes e após o tratamento não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) comprovando que a degradação dos compostos fenólicos não é impactante. Através da análise cromatográfica (HPLC) verificou-se a presença de cianidina liberada na clivagem das proantocianidinas e na hidrólise de antocianinas glicosiladas de EO. Estes resultados mostram que a clivagem ácida é um procedimento eficiente para ampliar o campo de aplicação dos extratos, possibilitando sua utilização nos setores alimentício e cosmético como antioxidante natural.

ABSTRACT

Phenolic compounds are particularly sought after by cosmetic industries (such as photo protector chemical), pharmaceutical (in preventing chronic diseases) and food (as an antioxidant and natural dye). Proanthocyanidins or condensed tannins, are polymers of phenolic compounds of the type C₆-C₃-C₆ present in vegetables. In foods, they are astringent, act as anti-nutritional factor and are poorly absorbed by humans. This study aimed to optimize the acid cleavage of proanthocyanidins present in hydroalcoholic extracts from plants of the Amazon biome: *Byrsonima crassifolia* (BC), *Euterpe oleracea* (EO) and *Inga edulis* (IE) by Response Surface Methodology (RSM). It was used the rotational central composite design with four replicates at the central point, and evaluated the influence of chloric acid concentration (0.3 to 3.7N), time (39-291 minutes) and temperature (56-98°C) on the response variables: reduction of proanthocyanidins (%), reduction of astringency (%), ratio of antioxidant capacity/total phenols (TEAC/PT) and the concentration of cyaniding by HPLC. The polynomial model of 2nd order fits well to the experimental data response variables. To reduction of proanthocyanidins, the significant effects were: linear for the three variables (BC, EO and IE), quadratic to the acid concentration, temperature (BC, EO and IE) and time (IE), and interaction between concentration of chloric acid and temperature (BC, EO and IE). According to the proposed models for the three plants, the maximization of the response variables occurs when the cleavage is performed with 3N at 88°C for 165minutes. In these conditions, the average reduction was 91% for proanthocyanidins and 75% for astringency. The ratio TEAC/PT of the extracts before and after treatment showed no statistically significant difference (p>0.05) confirming that the degradation of phenolic compounds is not relevant. Through chromatographic analysis (HPLC) it was verified the presence of the cyanidin released in the cleavage of proanthocyanidins and hydrolysis of glycosides cyanidins of EO. These results show that the acid cleavage is an efficient procedure to enlarge the scope of the extracts, allowing its use in the food and comestics as natural antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação das diferentes classes de compostos fenólicos a partir da fenilalanina (Fonte: SHAHIDI e NACZK, 2006).....	17
Figura 2 - Estrutura básica de uma molécula de flavonóide.....	18
Figura 3 - Principais subclasses de flavonóides e exemplo de composto dessa subclasse (Fonte: CROZIER, et al., 2009).....	19
Figura 4 - Estrutura química dos principais flavanóis (Fonte: CROZIER et al., 2009).	20
Figura 5 - Estrutura química das principais antocianidinas (Fonte: CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).....	21
Figura 6 - Estrutura química das proantocianidinas tipo A2 (epicatequina-2 β →7, 4 β →8-epicatequina) (A) e B1(epicatequina-4 β →8-catequina) (B) (Fonte: HAGERMAN, 2011).	23
Figura 7 - Esquema da interação entre polifenol e proteínas ricas em prolina (PRP). (Fonte: DINNELLA et al., 2009).....	24
Figura 8 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 1 (Fonte: Beart et al., 1985).....	27
Figura 9 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 2 (Fonte: Beart et al., 1985).....	27
Figura 10 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 3.	28
Figura 11 - Exemplo de gráfico de contorno e superfície de resposta.	30
Figura 12 - Folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i>	31
Figura 13 - Frutos e bebidas obtidas dos frutos de <i>Euterpe oleracea</i>	32
Figura 14 - Folhas de <i>Inga edulis</i>	33
Figura 15 - Superfície de resposta e curva de nível para a redução de proantocianidinas em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.	46
Figura 16 - Gráfico Pareto para a redução de proantocianidinas presente nos extratos.	47
Figura 17 - Superfície de resposta e curva de nível para a redução de adstringência em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.	50
Figura 18 - Gráfico Pareto para redução de adstringência dos extratos.	51
Figura 19 - Superfície de resposta e curva de nível para a relação TEAC/PT em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.	54
Figura 20 - Superfícies de resposta e curvas de níveis para a Cianidina (mg/gES) em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.	57
Figura 21 – Gráficos de desejabilidade para a redução de proantocianidinas dos três extratos vegetais.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado para análise dos flavonóides por HPLC.	38
Tabela 2 – Planejamento compósito central rotacional.	39
Tabela 3 - Efeito do tipo e quantidade de álcool para a clivagem ácida de proantocianidinas de extrato de folhas de <i>Inga edulis</i>	41
Tabela 4 - Condições experimentais e redução percentual de proantocianidinas obtida nos ensaios para os diferentes extratos vegetais.	43
Tabela 5 - Análise de variância para a redução das proantocianidinas para os diferentes extratos para o modelo polinomial de 2ª ordem.	44
Tabela 6 - Coeficientes de regressão para os parâmetros do modelo polinomial de 2ª ordem para a redução das proantocianidinas dos diferentes extratos.	45
Tabela 7 - Redução da adstringência obtida nos ensaios experimentais para os extratos vegetais.	48
Tabela 8 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a redução da adstringência.	48
Tabela 9 - Coeficiente de regressão do modelo de superfície de resposta para a redução da adstringência.	49
Tabela 10 - Relação TEAC/PT obtida nos ensaios experimentais para extratos vegetais.	52
Tabela 11 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a relação TEAC/PT ($\mu\text{MolET/gEAG}$).	53
Tabela 12 - Coeficiente de regressão para os parâmetros do modelo de superfície de resposta para a TEAC/PT ($\mu\text{MolET/gEAG}$).	54
Tabela 13 - Concentração de cianidina nos extratos vegetais após clivagem ácida.	55
Tabela 14 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a cianidina.	56
Tabela 15 - Coeficiente de regressão para os parâmetros do modelo de superfície de resposta para cianidina.	57
Tabela 16 - Resultados preditos e experimentais para o modelo de superfície de resposta nas condições ótimas.	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	16
3.1.1	Flavonóides	18
3.1.1.1	Flavanóis	19
3.1.1.2	Antocianidinas.....	20
3.1.2	Taninos	22
3.1.2.1	Taninos condensados (Proantocianidinas)	22
3.1.2.2	Efeito dos taninos sobre a adstringência	24
3.1.2.3	Fator antinutricional dos taninos	25
3.1.2.4	Absorção dos taninos	26
3.2	CLIVAGEM DAS PROANTOCIANIDINAS.....	26
3.2.1	Mecanismo geral da reação de clivagem	26
3.2.2	Efeito do catalisador	28
3.2.3	Efeito da temperatura	29
3.3	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	29
3.4	MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS	31
3.4.1	<i>Byrsonima crassifolia</i>	31
3.4.2	<i>Euterpe oleracea</i>	32
3.4.3	<i>Inga edulis</i>	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS	35
4.2	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	35
4.2.1	Determinação do teor de polifenóis totais	35
4.2.2	Dosagem do teor de proantocianidinas	35
4.2.3	Avaliação da capacidade antioxidante	36
4.2.4	Determinação da adstringência	37
4.2.5	Análise cromatográfica	38
4.3	CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS.....	38
4.3.1	Avaliação do álcool sobre a clivagem	38
4.3.2	Otimização da clivagem ácida (planificação experimental)	39
4.3.3	Análise estatística dos resultados	40

4.3.4	Determinação das condições ótimas e validação do modelo matemático	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	AVALIAÇÃO DO ÁLCOOL SOBRE A CLIVAGEM	41
5.2	OTIMIZAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	42
5.2.1	Influência do processo sobre o teor de proantocianidinas	43
5.2.2	Efeito da clivagem das proantocianidinas sobre a adstringência dos extratos	47
5.2.3	Efeito da clivagem sobre a relação entre a capacidade antioxidante e o teor de polifenóis totais (TEAC/PT)	52
5.2.4	Concentração de cianidina após a clivagem das proantocianidinas	55
5.3	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS E VALIDAÇÃO DO MODELO	57
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXO A - GRÁFICOS DE DESEJABILIDADE NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS	70

1 INTRODUÇÃO

Os taninos são polímeros de compostos fenólicos com peso molecular entre 500 e 3.000 Dalton, amplamente distribuídos na maioria dos alimentos e bebidas de origem vegetal. Conforme a estrutura química de suas unidades monoméricas divide-se em: proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e taninos complexos, dos quais as proantocianidinas constituem os de maior importância alimentar (ARON & KENNEDY, 2008; SERRANO et al., 2009).

As proantocianidinas são oligômeros ou polímeros formados a partir da condensação oxidativa de flavanóis. Sua presença nos alimentos afeta parâmetros de qualidade, tais como: características sensoriais, nutricionais e funcionais (ARON & KENNEDY, 2008). Devido a sua capacidade de ligar-se às proteínas da saliva são responsáveis pela adstringência dos vegetais (RASMUSSEN et al, 2005). Do ponto de vista nutricional são indesejáveis, porque impedem a digestão de carboidratos e aminoácidos essenciais (REHMAN & SHAH, 2005). Outro fator negativo com relação aos compostos fenólicos poliméricos é a baixa absorção a nível do tubo digestivo (RASMUNSSSEN et al, 2005).

A Amazônia, com sua enorme biodiversidade, possui um grande potencial a ser explorado de maneira sustentável como fornecedora de biocompostos com alta atividade antioxidante, em particular os compostos fenólicos. Estes são principalmente procurados pelos setores cosmético (como fotoquimioprotetores), farmacêutico (prevenção de várias doenças crônico-degenerativas) e alimentício (antioxidante e corante natural). Os frutos de açaí (*Euterpe oleracea*), por exemplo, tem alta capacidade antioxidante devido ao seu elevado conteúdo de antocianinas e tocoferóis (ROGEZ, 2000). Estudos têm destacado o potencial antioxidante, antiinflamatório e de regeneração da pele das folhas de *Inga edulis* e *Byrsonima crassifolia* (SILVA et al., 2007a; SOUZA et al., 2008).

Para possibilitar a utilização dos extratos vegetais como fonte de compostos fenólicos faz-se necessário a utilização de processos que ocasionem a despolimerização das proantocianidinas até suas unidades monoméricas, tal como, a clivagem ácida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a clivagem ácida das proantocianidinas presentes nos extratos vegetais hidroalcoólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Euterpe oleracea* e *Inga edulis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Otimizar a redução das proantocianidinas por meio da clivagem ácida;
- (2) Avaliar o efeito da clivagem sobre a redução da adstringência;
- (3) Verificar o impacto da clivagem sobre a capacidade antioxidante e o teor de polifenóis totais;
- (4) Quantificar cianidina produzida durante a clivagem por HPLC.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários nos vegetais. Eles exibem uma grande variedade de estruturas e são responsáveis por algumas características organolépticas dos alimentos de origem vegetal, além de contribuírem para a qualidade nutricional de frutas e legumes (TAPAS et al, 2008). Além disso, desempenham um importante papel no crescimento e reprodução dos vegetais, fornecendo proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e predadores (BRAVO, 1998).

Em termos de estrutura química possuem a característica comum de ter, pelo menos, um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas (LATTANZIO et al., 2008). Atualmente mais de 10.000 estruturas de compostos fenólicos são conhecidas, desde moléculas simples até as estruturas altamente polimerizadas, como os taninos e as ligninas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Embora sejam resultado de uma ampla diversidade estrutural os compostos fenólicos podem ser classificados dentro de várias classes, como mostrado no Quadro 1. Destes, os mais importantes são ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (BALASUNDRAM et al., 2006).

Quadro 1 - Classes de compostos fenólicos.

<i>Classes</i>	<i>Estrutura</i>
Fenóis simples, bezoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácido fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Stilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: BALASUNDRAM et al., 2006

Os compostos fenólicos são derivados, em sua grande maioria, da fenilalanina e em menor grau da tirosina. A fenilalanina é formada a partir da rota metabólica do ácido chiquímico. A desaminação da fenilalanina, catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), resulta na formação do ácido cinâmico, conforme Figura 1 (SHAHIDI & NACZK, 2006). A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (pelo seu efeito no citocromo) e infecção por fungos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

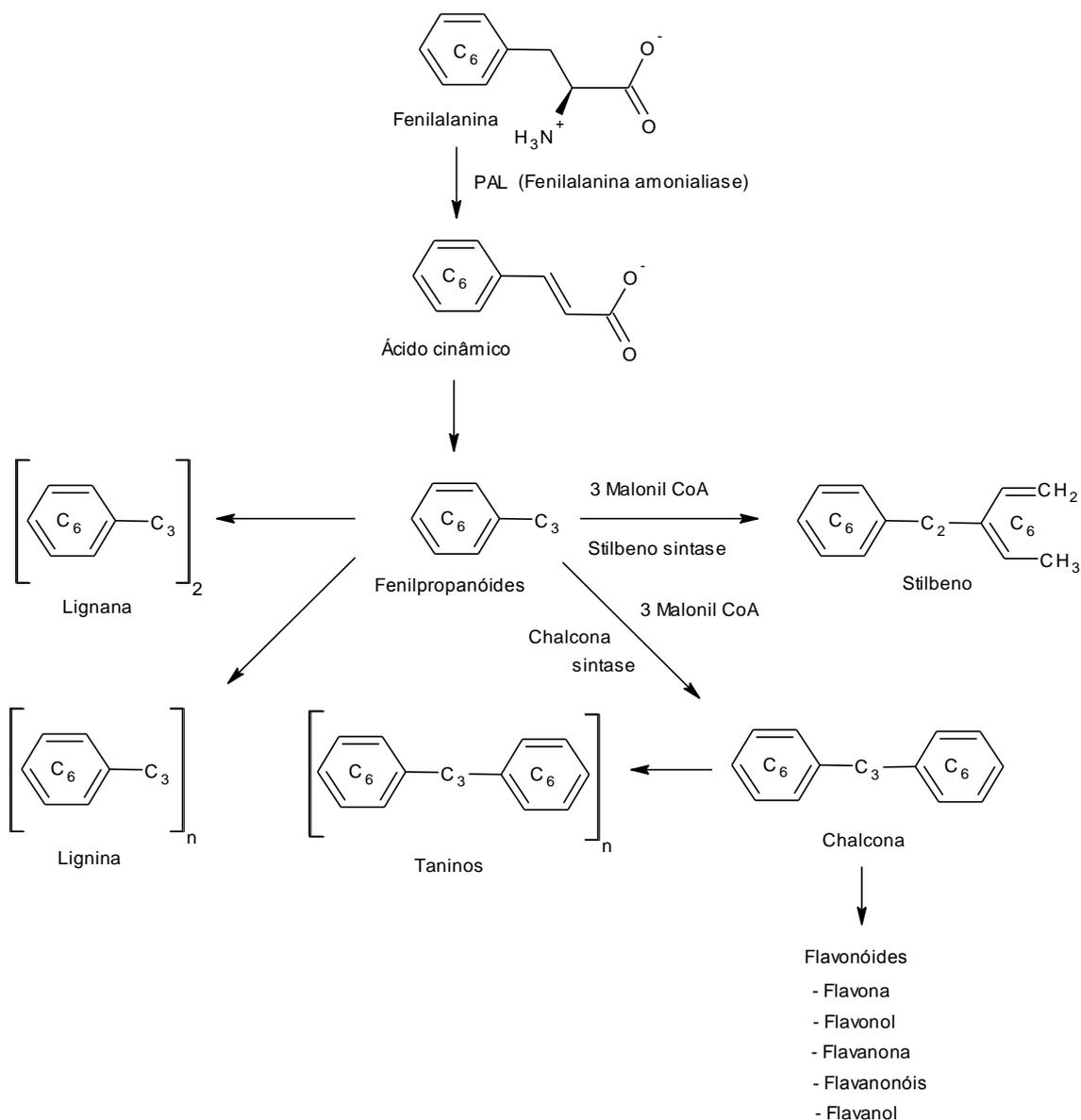


Figura 1 - Formação das diferentes classes de compostos fenólicos a partir da fenilalanina (Fonte: SHAHIDI & NACZK, 2006).

As reações subseqüentes àquelas catalisadas pela PAL dão origem as demais classes de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004). A condensação do fenilpropanóide com três moléculas de malonil-CoA origina a chalcona. Este composto

sofre uma série de reações de hidroxilação, metilação, dimerização e glicosilação que resultam nas diferentes classes de flavonóides (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006).

Nesta revisão optou-se por abordar somente as classes de compostos fenólicos de maior interesse neste estudo: flavonóides (flavanóis e antocianidinas) e taninos (apenas os condensados), em virtude, da grande diversidade de estruturas já identificadas e quantidade de classes e subclasses existentes de compostos fenólicos.

3.1.1 Flavonóides

Os flavonóides representam a maior classe de compostos fenólicos. Sua estrutura básica é formada por 15 átomos de carbono, que se encontram organizados numa estrutura de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$). Esta estrutura é formada por dois anéis aromáticos A e B, ligados através de um anel heterocíclico (C) (Figura 2) (BALASUNDRAM et al, 2006).

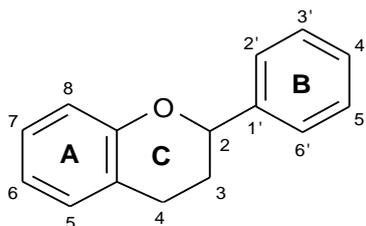


Figura 2 - Estrutura básica de uma molécula de flavonóide.

Os flavonóides estão divididos em 6 subclasses de acordo com o grau de oxidação e saturação do anel C: flavanóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanóis (Figura 3) (D'ARCHIVIO et al., 2007). A estrutura base dos flavonóides pode estar ligada a numerosos substituintes, grupos hidroxilas encontram-se normalmente nas posições 4'-, 5- e 7-. A maioria dos flavonóides está ligada a carboidratos (CROZIER et al., 2009). A glicosilação aumenta a polaridade dos flavonóides e, assim, sua solubilidade na água, necessária para estocagem no vacúolo das células vegetais (JUSTESEN et al., 1998).

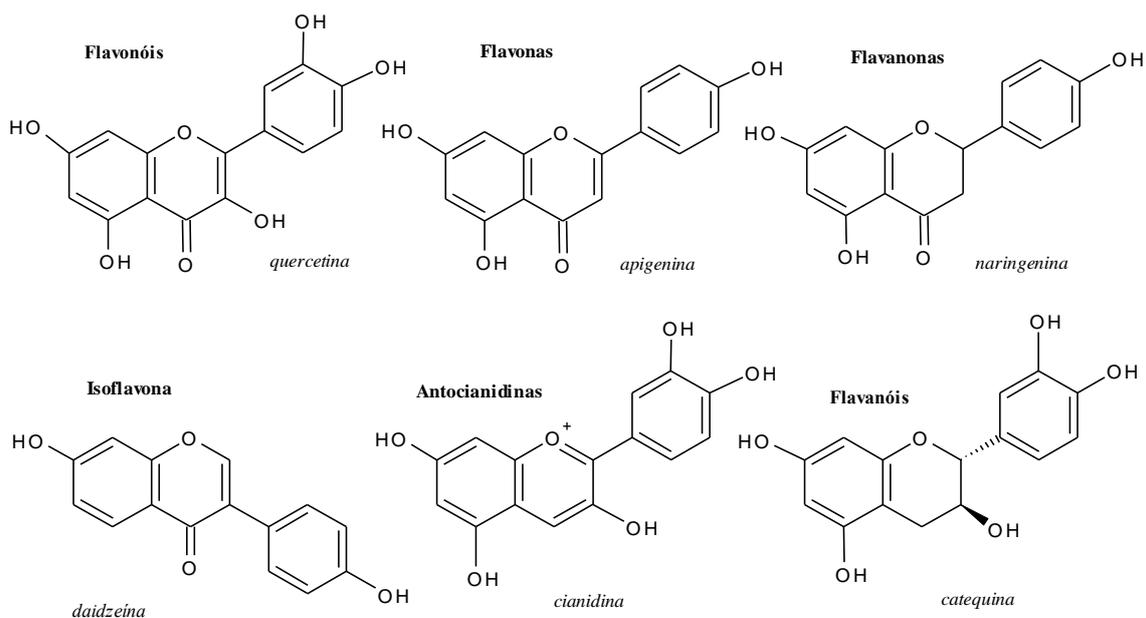


Figura 3 - Principais subclasses de flavonóides e exemplo de composto dessa subclasse (Fonte: CROZIER, et al., 2009).

3.1.1.1 Flavanóis

Os flavanóis representam a subclasse de flavonóides mais consumidos na dieta ocidental. São considerados ingredientes funcionais em várias bebidas, alimentos integrais e processados. Sua presença nos alimentos afeta os parâmetros de qualidade, tais como adstringência, amargor, acidez, doçura, viscosidade salivar, aroma, e cor (JAGANATH & CROZIER, 2010).

Estruturalmente os flavanóis são a subclasse mais complexa, a ausência de um grupo carbonila no C₄, de dupla ligação entre os C₂ e C₃ e a presença de uma hidroxila no C₃ são responsáveis pela falta de planaridade da molécula e ainda, pela formação de dois centros de assimetria (nas posições C₂ e C₃) (HOLLMAN & ARTS, 2000). Os dois centros quirais produzem quatro isômeros para cada nível de hidroxilação do anel B: (+)-catequina e (-)-epicatequina (Figura 4), amplamente encontrados na natureza; (-)-catequina e (+)-epicatequina comparativamente mais raros (CROZIER et al., 2009).

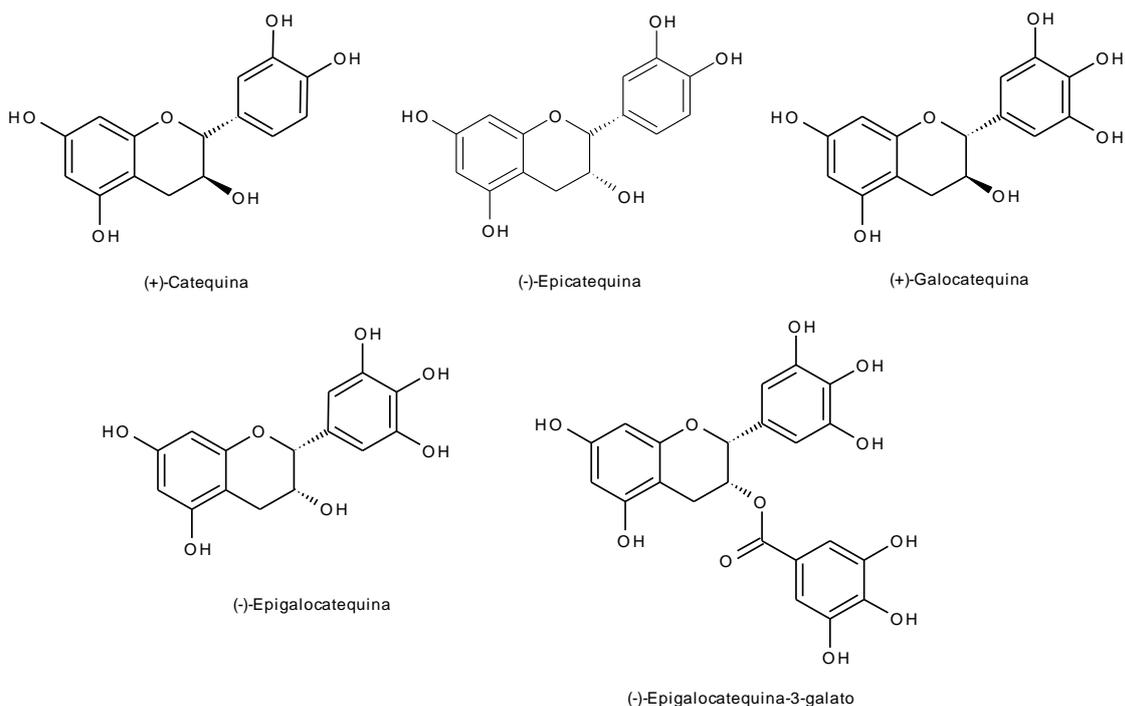


Figura 4 - Estrutura química dos principais flavanóis (Fonte: CROZIER et al., 2009).

Segundo Crozier et al (2009) os flavanóis podem atuar como antioxidante através de vários mecanismos, incluindo a eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição, assim como a mediação e inibição enzimática. Além disso, apresentam atividade anticarcinogênica, cardioprotetora, antimicrobiana, antiviral e neuroprotetora.

São considerados bons antioxidantes porque sua configuração eletrônica facilita a transferência dos elétrons para os radicais livres e ainda permitem a formação de radicais quimicamente mais estáveis. A atividade antioxidante está diretamente relacionada à estrutura química dos compostos fenólicos. No caso dos flavanóis, a adição de grupos galoil e hidroxila promovem o aumento da atividade (ARON & KENNEDY, 2008).

3.1.1.2 Antocianidinas

As antocianidinas são pigmentos solúveis em água, responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta, particularmente evidente nos tecidos da maioria das frutas e flores. Elas também são encontradas nas folhas, caules, sementes e raízes (JAGANATH & CROZIER, 2010). Na natureza, estes compostos encontram-se conjugados com moléculas de carboidratos ligados na posição C₃ ou nas posições C₅ e C₇, sendo

chamadas de antocianinas. As moléculas de carboidratos podem estar aciladas aos ácidos fenólicos ou orgânicos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Os compostos dessa subclasse variam entre si em função da: (i) quantidade e posição dos grupos hidroxila e metoxila; (ii) tipo, quantidade e posição do carboidrato ligado; (iii) quantidade e tipo de acilação ligados a estrutura base das antocianidinas (D'ARCHIVIO et al., 2007). As antocianidinas mais comumente encontradas nos alimentos são: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina. A estrutura química das mesmas é apresentada a Figura 5 (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

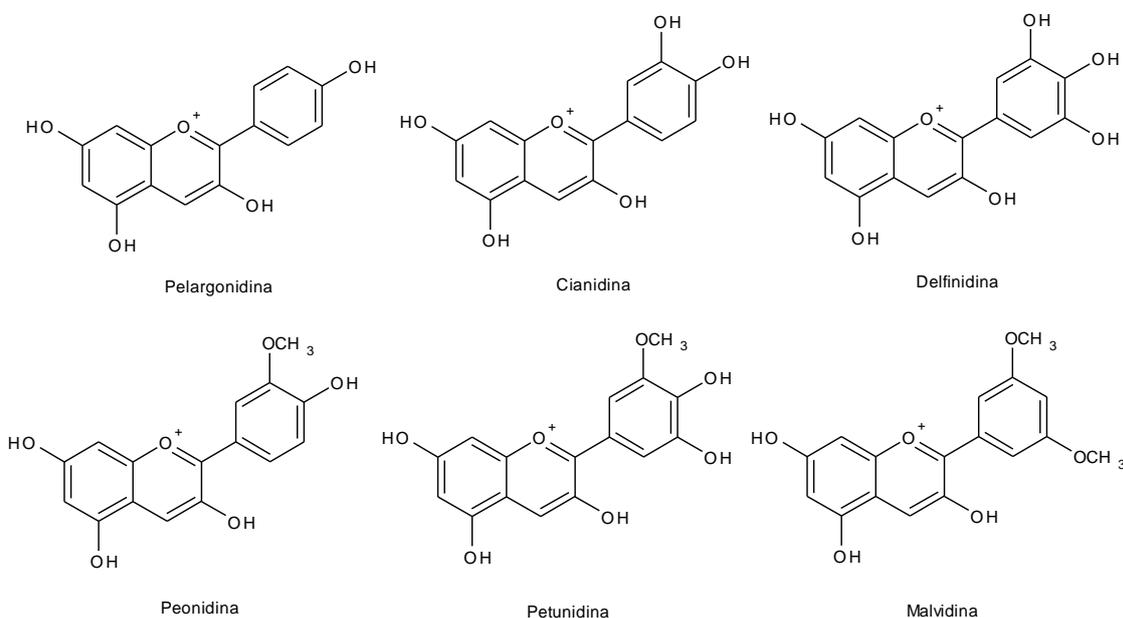


Figura 5 - Estrutura química das principais antocianidinas (Fonte: CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009)

Estes compostos estão amplamente distribuídas na alimentação humana. Eles podem ser encontrados no vinho tinto, em certas variedades de cereais, vegetais folhosos e raízes (berinjela, couve, feijão, cebola, rabanete), entretanto, são mais abundantes nas frutas. Suas principais fontes são: cerejas, framboesas, mirtilos, morangos, groselhas, uvas roxas e açaí (ROGEZ, 2000; MANACH et al., 2004).

Na busca por substitutos para os aditivos sintéticos, as antocianinas têm despertado interesse devido a sua extensa gama de cores, inocuidade e efeitos benéficos na promoção da saúde. Tais características lhes conferem grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica. Apesar de haverem problemas tecnológicos relacionados com a estabilidade e extração das antocianinas, estudos têm

viabilizado sua utilização como corante alimentar principalmente na indústria de bebidas (ANDERSEN & JORDHEIM, 2006; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; HE & GIUSTI, 2010).

São atribuídas as antocianinas as seguintes atividades biológicas: antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana (HE & GIUSTI, 2010). Dentre estas, destaca-se atividade antioxidante superior a da vitamina C e E, e de antioxidantes sintéticos como hidroxianisol de butila (BHA) e hidroxitolueno de butila (BHT) (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005; MAZZA, 2007).

3.1.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos poliméricos com peso molecular entre 500 e 3.000 Daltons que estão amplamente distribuídos em quase todos os alimentos de origem vegetal (SERRANO et al., 2009). De acordo com sua estrutura química podem ser classificados em três subgrupos: taninos condensados, taninos hidrolisáveis e taninos complexos (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006).

3.1.2.1 Taninos condensados (Proantocianidinas)

Os taninos condensados são dímeros, oligômeros e polímeros de flavanóis que estão unidos através da ligação C₄-C₆ ou C₄-C₈ (tipo B) ou duplamente ligados, com uma ligação adicional C₂-O-C₇ (tipo A). Normalmente são formados com unidades de catequinas e epicatequinas, conforme Figura 6 (HAGERMAN, 2002). O tamanho pode ser descrito pelo seu grau de polimerização. Este pode variar de dímeros até polímeros com 200 unidades monoméricas de flavanóis (SERRANO et al., 2009).

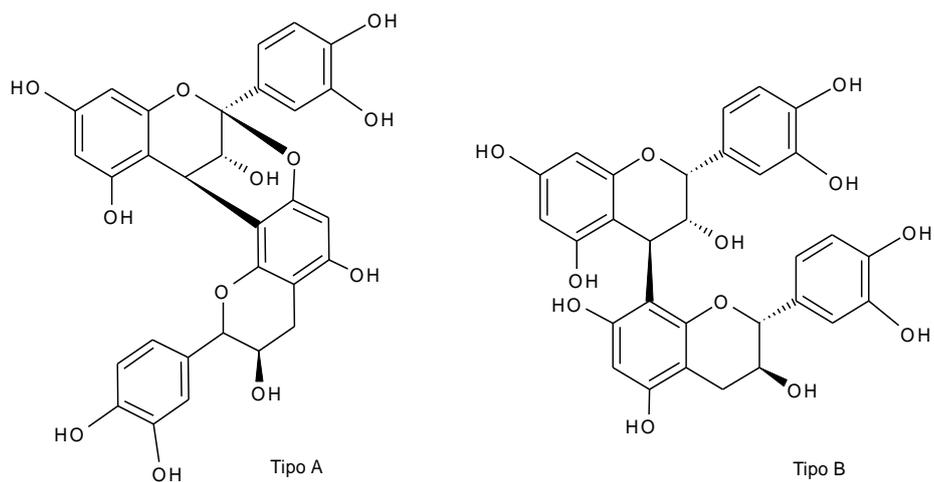
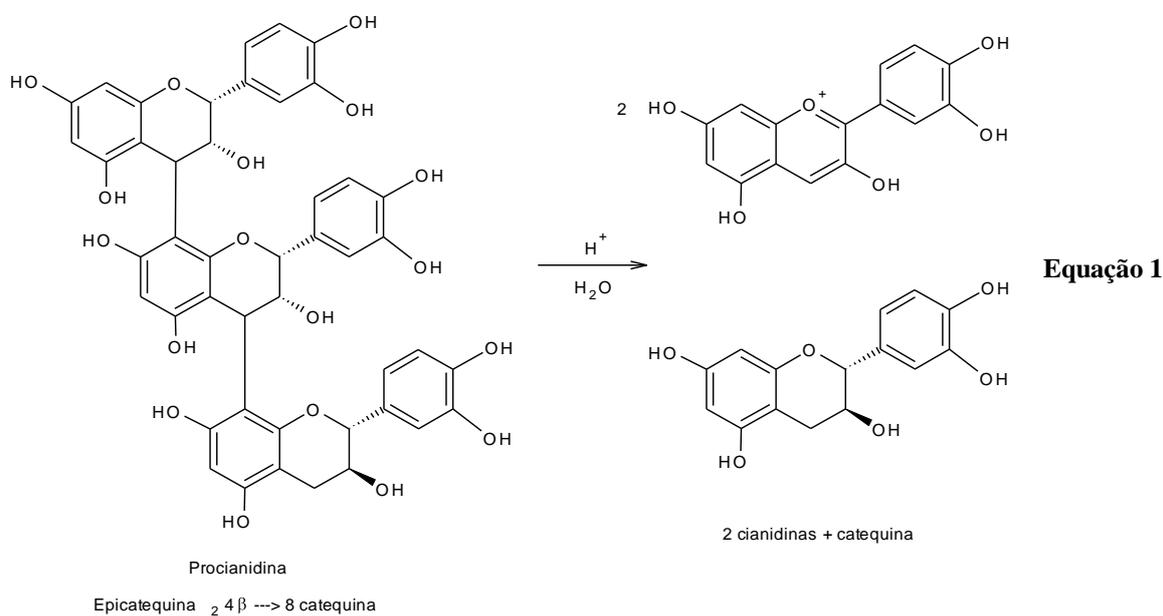


Figura 6 - Estrutura química das proantocianidinas tipo A2 (epicatequina-2β→7, 4β→8-epicatequina) (A) e B1(epicatequina-4β→8-catequina) (B) (Fonte: HAGERMAN, 2011).

Quimicamente o termo proantocianidinas é mais adequado para designar os taninos condensados, tendo em vista que estes compostos liberam antocianidinas após clivagem oxidativa em meio alcoólico acidificado sob aquecimento, conforme mostrado na equação da reação 1 (HAGERMAN, 2002).



3.1.2.2 Efeito dos taninos sobre a adstringência

As proantocianidinas são encontradas principalmente em frutas, grãos, feijão, nozes, chocolate e vinho (SERRANO et al., 2009). Atribui-se a sua presença o caráter adstringente das frutas (uvas, pêsegos, maçãs, peras, morangos, etc) e bebidas (vinho, sidra, chá, cerveja, etc), e ainda o amargor do chocolate (RASMUSSEN et al., 2005).

A adstringência é a sensação tátil de secura, aspereza e constrição da mucosa bucal (LESSCHAEVE & NOBLE, 2005). O mecanismo de percepção da adstringência é atribuído à formação e precipitação de complexos entre polifenóis e proteínas ricas em prolina (PRP) da saliva. O modelo proposto para a percepção da adstringência possui 3 etapas, conforme mostrado na Figura 7. Na primeira etapa os polifenóis ligam-se as PRP, originando complexos polifenol-PRP. Em seguida, os complexos interagem entre si, formando dímeros de polifenol-PRP. À medida que os complexos polifenol-PRP ligam-se formando agregados chegam a tamanho coloidal e sedimentam (DINNELLA, et al., 2009).

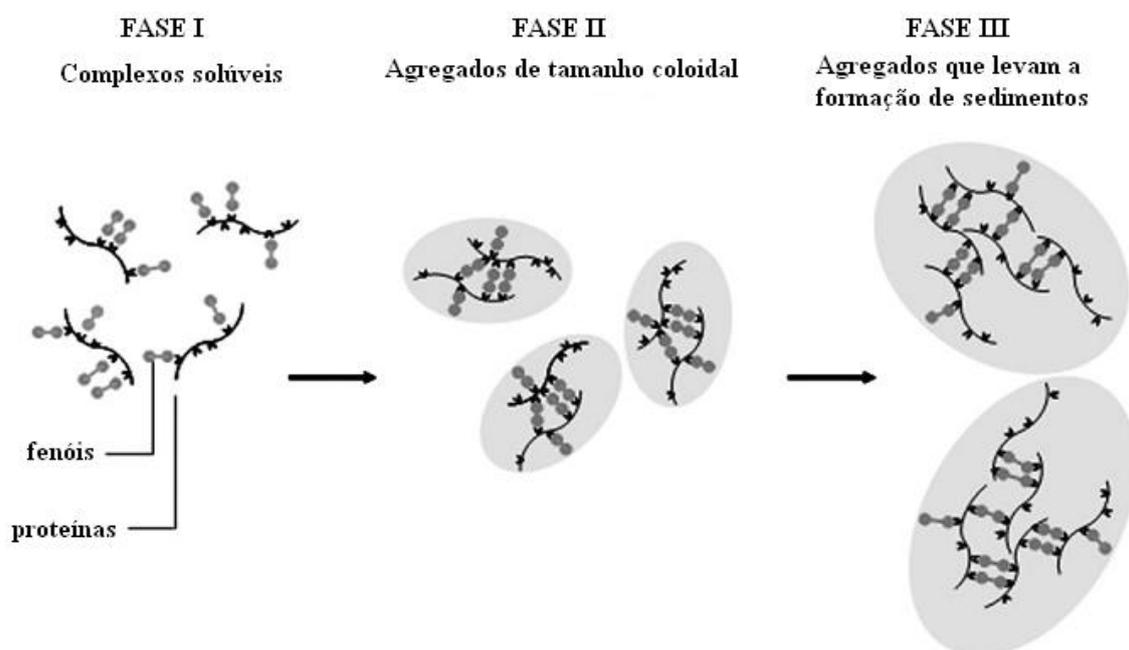


Figura 7 - Esquema da interação entre polifenol e proteínas ricas em prolina (PRP). (Fonte: DINNELLA et al., 2009).

Estes complexos provocam a redução das propriedades lubrificantes da saliva aumentando o atrito entre as superfícies da mucosa bucal (VIDAL et al, 2003). Segundo Dinnella et al.(2009) o complexo polifenol-PRP é formado através de pontes de

hidrogênio entre os grupos hidroxila do composto fenólico e os grupos carbonila das proteínas ou ainda por meio de interações hidrofóbicas.

A adstringência é maior à medida que o grau de polimerização dos compostos fenólicos aumenta. Por isso, os taninos, em particular proantocianidinas, são os principais responsáveis pela percepção da adstringência (BAJEC & PICKERING, 2008).

Alguns estudos revelam que a adstringência e o amargor são os motivos pelos quais alguns consumidores rejeitam produtos de origem vegetal, apesar de conhecerem seus benefícios a saúde. O efeito negativo da presença de taninos sobre as características sensoriais é um dos fatores que tem limitado a utilização de extratos vegetais em alimentos (AMAROWICZ et al., 2008). A intensidade da adstringência pode ser amenizada através de processos que modifiquem a concentração ou composição de compostos fenólicos (LESSCHAEVE & NOBLE, 2005).

3.1.2.3 Fator antinutricional dos taninos

As proantocianidinas também afetam negativamente o valor nutricional dos alimentos. A formação de complexos com amido, aminoácidos essenciais, carboidratos, enzimas digestivas e íons metálicos reduzem o valor nutricional dos alimentos e sua digestibilidade (ARON & KENNEDY, 2008).

Segundo Silva e Silva (1999) estudos sobre a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* relacionam a diminuição da digestão de alguns nutrientes com a formação de complexos com as proantocianidinas. O amido, por exemplo, tornou-se mais resistente ao ataque da α -amilase e para as proteínas observou-se taxa de excreção superior a 30%. De acordo com Serrano et al (2009) a diminuição do valor nutricional também está associada à complexação com enzimas digestivas, tais como: pectinase, amilase, lipase, protease e β -glicosidase.

Os taninos também formam complexos com os íons metálicos impedindo sua absorção podendo acarretar malefícios à saúde. O consumo de grande quantidade de chá ou de outros alimentos ricos em taninos é algumas vezes associado a doenças relacionadas com a deficiência de metais, como por exemplo, a anemia. (HARGERMAN, 2002).

3.1.2.4 Absorção dos taninos

Estudos *in vitro* atribuem às proantocianidinas efeitos biológicos benéficos à saúde, tais como: capacidade antioxidante, atividade antiviral, antibacteriana, anticarcinogênica, antialérgica, anti-inflamatória e ação vasodilatadora. No entanto, as propriedades biológicas das proantocianidinas dependem de sua absorção no intestino e biodisponibilidade no tecido alvo (SERRANO et al., 2009).

Apesar da abundância nos alimentos, as proantocianidinas são pouco absorvidas (RASMUSSEN et al., 2005). Estudos sobre a absorção *in vivo* mostram que as proantocianidinas não sofrem degradação nas condições ácidas do estômago (DONOVAN et al., 2002; RIOS et al., 2002; TSANG et al., 2005). Durante a digestão no intestino delgado, as proantocianidinas de elevado peso molecular podem formar complexos com proteínas, carboidratos e enzimas digestivas (pectinase, amilase, lipase, protease e β -galactosidase) resultando em complexos indigeríveis (SERRANO, et al, 2009). Estes complexos passam intactos através do intestino delgado, sendo degradadas à fenólicos simples (entre os quais ácidos acético, propiônico e valérico) pela microflora do intestino grosso. Entretanto, essa degradação é limitada pelo grau de polimerização do composto. Gonthier et al. (2003) verificou que a quantidade de metabólitos encontrados, após a ingestão de proantocianidinas, é menor a medida que o grau de polimerização aumenta. A conversão de catequina em metabólitos (derivados dos ácidos valérico, propiônico, acético e benzóico) foi de 11% para catequina monomérica, 6,5% para dimerica, 0,7% trimerica e 0,5%, polimerica.

3.2 CLIVAGEM DAS PROANTOCIANIDINAS

3.2.1 Mecanismo geral da reação de clivagem

A clivagem ácida da ligação interflavonóide das proantocianidinas é uma das reações mais importante da química dos taninos (HEMINGWAY & MCGRAW, 1983). Segundo o mecanismo proposto por Beart et al. (1985) a clivagem ácida se inicia com a protonação do carbono C₈ da proantocianidina B₂ (Figura 8) através do ataque eletrofílico do próton H⁺.

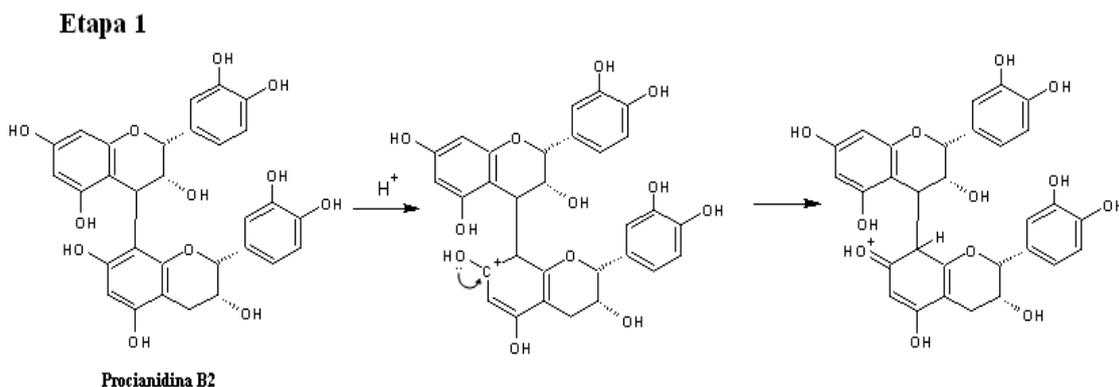


Figura 8 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 1 (Fonte: Beart et al., 1985)

Os elétrons π de uma ligação dupla estão mais expostos a um ataque eletrofílico do que os elétrons σ , por isso o ataque se dá necessariamente em ligações π (HART e SCHUETZ, 1983). O próton H^+ forma ligação σ com o C_8 , compartilhando os elétrons da ligação π e, deixando o C_7 carregado positivamente (carbocátion). O carbocátion C_7 , atraído pela densidade de elétrons, forma ligação π com $-OH$. Na etapa 2 (Figura 9), esta ligação é rapidamente desfeita com a liberação do H^+ para o meio reacional. Em consequência disso, há formação da ligação $C_7=C_8$, recuperando a aromaticidade do composto. A formação desta ligação promove a ruptura heterolítica da ligação interflavonóide $C_8 \rightarrow C_4$, resultando na formação do carbocátion e flavanol.

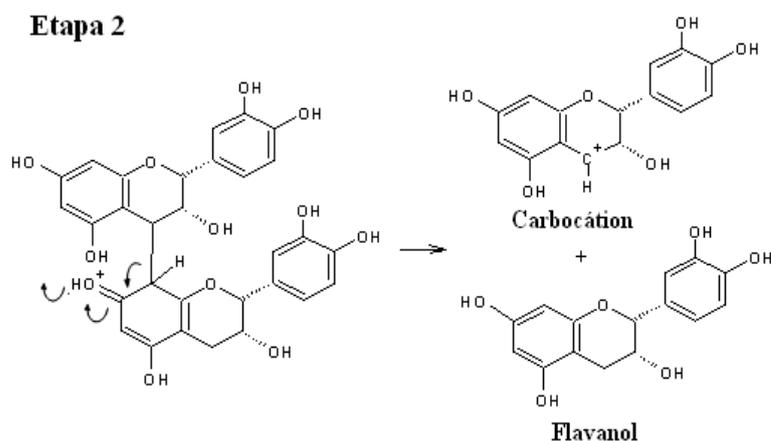


Figura 9 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 2 (Fonte: Beart et al., 1985)

Uma importante propriedade dos carbocátions é a capacidade de eliminar um próton do carbono adjacente ao carbono positivo para formar uma dupla ligação (HART & SCHUETZ, 1983). O carbocátion C_4 promove a eliminação do $-H$ (hidreto) do C_3 para a formação da ligação $C_4=C_3$ (Figura 10). Para tornar o anel central aromático e

assim mais estável, o heteroátomo na posição C₁ forma dupla ligação com o C₂, originando a antocianidina.

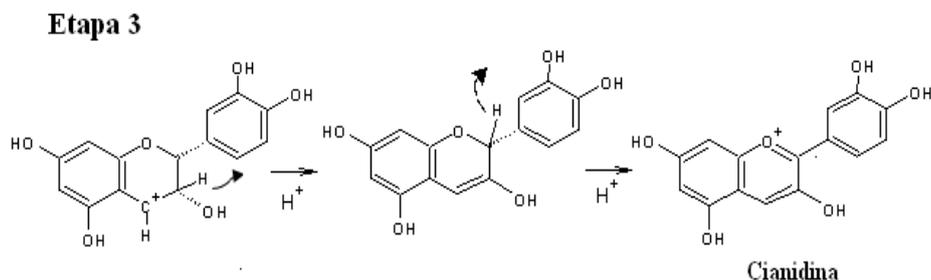


Figura 10 - Mecanismo da reação de clivagem ácida: etapa 3.

3.2.2 Efeito do catalisador

Os catalisadores são substâncias que aceleram a velocidade da reação sem serem consumidas. O catalisador pode se combinar com os reagentes, mas se regenera numa etapa posterior da reação (STEWART, 1966).

No caso de reações catalisadas por ácido observa-se o efeito do pH sobre a velocidade da reação. A constante de velocidade (k) da reação catalisada será proporcional à concentração dos íons hidrogênio (LATHAM, 1974):

$$k = k_{H^+} [H^+] \quad \text{Equação 2}$$

Onde k_{H^+} denomina-se coeficiente catalítico dos íons de hidrogênio. Os coeficientes catalíticos medem a eficácia dos catalisadores na reação na qual participam (LATHAM, 1974).

Na catálise ácida, a primeira etapa da reação consiste na protonização da molécula do substrato, o que permite esperar que a eficácia de um catalisador ácido dependa do poder protonizante e, portanto da força do ácido (DENISOV et al., 2003).

De acordo com Beart et al. (1985), a reação de clivagem das proantocianidinas é claramente dependente do pH. A velocidade da reação aumenta à medida que o pH diminui. A relação linear entre o log da taxa da reação *versus* o pH, indica que a reação obedece a uma cinética de 1^a ordem.

3.2.3 Efeito da temperatura

A *energia de ativação* representa a energia que as moléculas reagentes devem possuir para formarem o estado de transição (DENISOV et al., 2003). Utilizando o conceito de *energia de ativação* Arrhenius propôs uma expressão matemática para representar a variação da constante da velocidade (k) com a temperatura (LATHAM, 1974):

$$k = A \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde k é constante cinética (min.^{-1}); A corresponde a constante independente da temperatura chamada fator de frequência (min.^{-1}); Ea trata-se da energia de ativação (J/mol); R e T são respectivamente a constante dos gases ($8,314\text{J/mol.K}$) e temperatura absoluta (K).

Estudos cinéticos do efeito da temperatura sobre a taxa da reação demonstraram que a clivagem das proantocianidinas obedece a lei de Arrhenius. Assim, elevações na temperatura promovem aumento na taxa da reação (HEMINWAY & MCGRAW, 1983; BEART et al., 1985).

3.3 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi desenvolvida por Box nos anos 1950 e desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (NETO et al., 2007). A MSR é uma técnica de otimização baseada no tratamento matemático e estatístico de dados obtidos a partir de planejamentos experimentais (BEZERRA et al, 2008). Esta técnica tem como objetivo estabelecer a relação entre os fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) do sistema analisado (BAS & BOYACI, 2007).

Geralmente o modelo utilizado para descrever a superfície de resposta é um modelo polinomial de segunda ordem (equação 4). A equação engloba os efeitos linear, quadrático e de interação entre as variáveis independentes:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Equação 4}$$

Onde X_1, X_2, \dots, X_k são as variáveis independentes que influenciam a resposta Y ; β_0, β_i ($i= 1, 2, \dots, k$), β_{ii} ($i= 1, 2, \dots, k$), e β_{ij} ($i= 1, 2, \dots, k; j= 1, 2, \dots, k$) são coeficientes de regressão para os termos do intercepto, linear, quadrático e de interações, respectivamente; k é o número de variáveis e ϵ é o erro randômico (RAISSI & FARSANI, 2009).

Segundo Toledo (2007) a representação gráfica de uma superfície de resposta pode ser feita de duas formas:

- 1) Em um gráfico de contorno, onde os valores dos dois fatores são representados nos eixos x e y , enquanto os valores da resposta são representados por regiões sombreadas, chamadas contornos. Um gráfico de contorno é como um mapa topográfico, ver Figura 11A.
- 2) Em um gráfico de superfície, os valores dos dois fatores são representados nos eixos x e y , enquanto os valores da resposta são representados no eixo z . Esse gráfico fornece uma visão tridimensional que pode exibir um desenho mais claro da superfície de resposta como pode ser observado na Figura 11B.

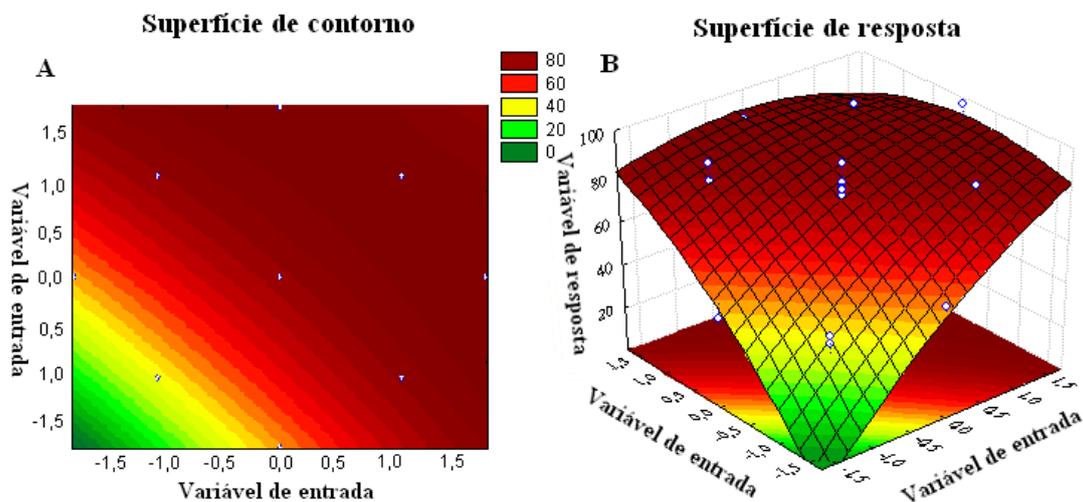


Figura 11 - Exemplo de gráfico de contorno e superfície de resposta.

3.4 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS

3.4.1 *Byrsonima crassifolia*

O gênero *Byrsonima* tem aproximadamente 150 espécies nativas da América tropical (SANNOMIYA et al., 2007). A *B. crassifolia* (L.) H. B. & K. (Figura 12) é uma árvore tropical da família das Malpighiaceae que pode ser encontrada no México, América Central e do Sul (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al, 1999).



Figura 12 –Folhas de *Byrsonima crassifolia*

As cascas de *Byrsonima crassifolia* têm sido utilizadas na medicina popular para tratar tosse, distúrbios gastrointestinais, inflamações ginecológicas e infecções da pele (LEONTI et al, 2001). Estudos experimentais relatam propriedades antioxidantes para os extratos hidroalcoólicos de sua casca e folha (SILVA et al, 2007), efeitos espasmogênicos (BEJAR et al, 1995) e atividade antimicrobiana de extratos orgânicos de raízes e caules (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al, 1999).

As propriedades terapêuticas desta planta tem sido associadas a presença de fitoquímicos, tais como: triterpenos, flavonóides, esteróis, ésteres aromáticos e aminoácidos não-protéicos (CORREA e VOZZO, 2002). Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *B. crassifolia* identificaram a presença de ácidos fenólicos (ácido gálico e protocatecuico), flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina-3-O- β -D-galactosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo e quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo-2''-galato) e proantocianidinas (B₁ e B₂) (BEJAR et al, 1995; SOUZA et al, 2008; HÉRENT et al, 2010).

3.4.2 *Euterpe oleracea*

A literatura menciona 30 espécies do gênero *Euterpe* na América Central e do Sul (ROGEZ, 2000). A *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae) está entre as espécies de palmeiras economicamente mais importantes da Amazônia brasileira (PACHECO-PALENCIA et al, 2008). A polpa de seus frutos (Figura 13), conhecidos como açaí, são um dos principais produtos de exportação do estuário amazônico para outras regiões do mundo, como Ásia, Europa e América do Norte (CHIN et al, 2008).



Figura 13 – Frutos e bebidas obtidas dos frutos de *Euterpe oleracea*.

O açaí tem sido alvo da atenção internacional por causa de sua composição nutricional, capacidade antioxidante e demais efeitos benéficos à saúde, que potencializam sua utilização como fonte de antocianinas e ingrediente funcional em produtos alimentícios (PACHECO-PALENCIA et al, 2008a).

As antocianinas são os compostos fenólicos predominantes no açaí, sendo responsáveis pela coloração violácea da fruta e ainda, por aproximadamente 90% de sua capacidade antioxidante (método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - TEAC) (PACHECO-PALENCIA et al., 2008b). Outros compostos fenólicos também foram identificados no açaí, tais como, flavonas (homorientina, orientina, taxifolina e isovitexina), vários derivados de flavanóis (incluindo (+)-catequina e a (-)-epicatequina), dímeros e trímeros de proantocianidinas e alguns ácidos fenólicos (PACHECO-PALENCIA et al, 2009).

Estudos com extrato de açaí têm comprovado que seus compostos fenólicos apresentam, dentre outras atividades, ação vasodilatadora (CHIN et al, 2008), antiproliferativa, pró-apoptótica em células humanas de leucemia HL-60 (DEL POZO-INSFRAN et al, 2006), antiinflamatória (SCHAUSS et al, 2006) e ainda inibem a produção de NO (MATHEUS et al, 2006).

3.4.3 *Inga edulis*

O *Inga* é um gênero extenso de árvore leguminosa nativa dos trópicos úmidos americanos. *Inga edulis* Mart. é uma entre as mais de 300 espécies de *Inga* da subfamília Mimosoideae das Leguminosas, Figura 14 (RICHARDSON *et al.*, 2001). Amplamente distribuída e cultivada, a espécie possui muitos nomes vulgares, mostrando a sua importância para a população interiorana: ingá, ingá-cipó, ingá-de-metro, ingá-doce, ingá-de-macaco, ingá-macarrão, rabo-de-mico (Brasil); guamo, guama (Colômbia, Venezuela, Costa Rica); paca, soga, paca silvestre (Peru) (FALCÃO & CLEMENT, 2000).



Figura 14 – Folhas de *Inga edulis*.

A faixa nativa do *Inga edulis* é o Brasil amazônico, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia. A espécie foi também introduzida na maior parte da América do Sul e Central. É tolerante a solos ácidos e tem sido bastante utilizada para prover sombra para culturas perenes, controle de plantas invasoras e para a cobertura do solo por meio da liteira acumulada (FALCÃO & CLEMENT, 2000).

Na medicina popular esta espécie é utilizada de diversas maneiras e com variadas finalidades. Infusões das folhas e da casca do caule são utilizadas na Colômbia no tratamento da diarreia, artrite e reumatismo. Na Amazônia brasileira, elas são utilizadas como anti-inflamatório (SILVA *et al.*, 2007a).

A quantidade de compostos fenólicos presentes nas folhas pode fornecer a explicação para suas propriedades medicinais. O extrato das folhas de *Inga edulis* apresenta elevada proteção contra a oxidação do LDL, atividade anti-hemólise, altos valores de capacidade antioxidante (Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC e Total Radical-trapping Antioxidant Potential - TRAP) (SOUZA *et al.*, 2008). Os seguintes compostos fenólicos já foram identificados: ácidos fenólicos (ácido gálico), flavanóis ((+) catequina e (-) epicatequina), flavonóis (miricetina-3-raminopiranosídeo,

quercetina-3-raminopiranosídeo e quercetina-3-glicosídeo) e proantocianidinas (B₁ e B₂). Isto sugere um elevado potencial desta espécie como fonte de antioxidantes naturais para uso medicinal e alimentício (SOUZA, et al.2007; DIAS, 2009).

As propriedades antioxidantes das folhas de *I. edulis* tem despertado interesse na valorização de seus compostos bioativos. Silva et al (2007b) otimizaram o processo de extração sólido-líquido maximizando a quantidade de fenólicos, flavanóis e flavonóis totais. Silva et al. (2007a) desenvolveram método para a concentração destes através da otimização do processo de adsorção com resinas sintéticas macroporosas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS

As fontes vegetais utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela empresa Amazon Dreams S/A, localizada em Belém – Pará. As amostras consistiram de extratos aquosos obtidos após a realização de técnicas adequadas para a extração, concentração e purificação (adsorção/desorção) dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *B. crassifolia*, *I. edulis* e dos frutos de *E. oleracea*, com 15,7%, 5,8% e 8,6% de matéria seca, respectivamente.

4.2 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais

Para a dosagem do teor de polifenóis totais foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al, 1999) adaptado por Silva et al. (2007a) para uso em microplacas.

A mistura reacional foi composta de 200 µL de amostra diluída em água ultrapura, 100 µL de solução de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma Chemicals Co. - St. Louis, USA) e 500 µL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 75 g/L. Esta mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, sendo transferido 200 µL para os poços de microplaca transparentes de 96 poços e a absorbância lida a 750 nm. Todas as análises foram feitas em triplicatas sendo refeitas aquelas que apresentaram um erro relativo maior ou igual a 12%.

O teor de polifenóis totais foi expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico (Sigma Chemicals Co. – St. Louis, USA) por grama de extrato seco (mgEAG/gES) determinado a partir da curva de calibração do padrão.

4.2.2 Dosagem do teor de proantocianidinas

O teor de proantocianidinas foi determinado pelo método proposto por Julkunen-Tiitto (1985), que consiste na dosagem das antocianidinas produzidas pela clivagem oxidativa ácida das proantocianidinas.

A reação consiste na mistura de 200 µL de amostra diluída com e 4 mL de solução de butanol:HCl (95:5, v/v) aquecida por 2 horas a 95°C em banho-maria. Após

resfriamento a mistura reacional foi lida a 550 nm e um branco de cada amostra foi medido sem aquecimento. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes em cianidina (Sigma Chemicals Co. – St. Louis, USA) por grama de extrato seco (mgECi/gES) a partir da curva de calibração.

4.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante

O método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), proposto por Re et al. (1999), adaptado por Silva et al. (2007a) para a realização em microplacas transparentes foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos. O mecanismo de reação desse método envolve a transferência de elétrons/prótons e mensura o seqüestro do radical $ABTS^{+\bullet}$ (SILVA et al., 2006).

A análise foi conduzida em espectrofotômetro de microplaca (modelo Biotrak Plate Reader II – Amersham Byoscience) a 750 nm. A solução de trabalho do $ABTS^{+\bullet}$ foi obtida diluindo-se em etanol a solução estoque de $ABTS^{+\bullet}$ (7 mM) até atingir absorvância entre 0,39-0,42. A solução estoque foi preparada dissolvendo $ABTS^{+\bullet}$ (Sigma Aldrich - St. Louis, USA) em uma solução de Persulfato de Potássio (2,54 mM), e mantida ao abrigo de luz por no mínimo 12 horas antes do início da análise, para a formação total dos radicais $ABTS^{+\bullet}$. O radical $ABTS^{+\bullet}$ é gerado via reação de oxidação do ABTS com o Persulfato de Potássio. O valor TEAC foi determinado pela comparação da capacidade de captura do antioxidante Trolox, a partir de uma curva de calibração.

A curva de calibração foi obtida pela diluição da solução estoque de Trolox (40 mM) (Sigma Aldrich - St. Louis, USA), tendo sido realizadas diluições para se obter a reta de calibração com 5 concentrações diferentes: 4 μ M, 8 μ M, 12 μ M, 16 μ M, 20 μ M. Uma alíquota de 10 μ L da amostra ou trolox foi transferida para a microplaca, a reação iniciou-se após a adição de 190 μ L da solução de trabalho do $ABTS^{+\bullet}$. O grau de descoloração que reflete a cinética de diminuição do radical foi acompanhado por 24 minutos.

O valor TEAC foi calculado pela medida da área sob a curva derivada da porcentagem de inibição da absorvância em função do tempo. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em micromoles de equivalentes trolox por grama de extrato seco (μ mol ET/gES), calculada pelas equações 5, 6 e 7.

$$TEAC (\mu mol ET) = (AUC_{AMOSTRA} / \alpha Trolox) * Diluição \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$AUC_{AMOSTRA}$ = a área sob a curva de inibição da amostra;

$\alpha Trolox$ = coeficiente angular obtido da curva de calibração e

$$AUC = \left(\% Inb_{(t=0)} \times 0.5 + \sum_{i=2}^{36} \% Inb_{(t=10 \times i)} \right) \times 10 \quad \text{Equação 6}$$

(4)

Sendo $\% Inb$ a porcentagem de inibição no tempo $t(s)$ e que é dada por:

$$\% Inb = \frac{A_{Branco} - A_{Amostra}}{A_{Branco}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

4.2.4 Determinação da adstringência

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

Saliva humana foi coletada e centrifugada a velocidade de 10.000g durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a $-18^{\circ}C$. As amostras a serem analisadas foram previamente submetidas à neutralização com solução de NaOH, em seguida, foram diluídas com tampão pH 4,5 (CH_3COONa 0,2M em 12% EtOH).

Em tubo de ensaio, 4500 μ L de amostra foram misturados a 4500 μ L de saliva. Em seguida, a mistura reacional foi transferida para uma cubeta de vidro afim de realizar a leitura de turbidez no turbidímetro TB1000 (TecnoPON – São Paulo, BRA). A calibração do equipamento foi realizada antes das leituras com padrões de formazina (TecnoPON – São Paulo, BRA) em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em Unidades Nefelométrica de Turbidez por grama de extrato seco (NTU/gES).

4.2.5 Análise cromatográfica

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizado neste trabalho foi um Shimadzu série LC-10Avp (Tóquio, Japão), composto por: degaseificador DGU 14A, Bomba quaternária LC 10AT, auto-injetor SIL-10AF, forno CTO-10AS, detector a arranjo de diodos SPD-M20A e software CLASS VP Chromathography data station. Uma coluna Gemini C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA) (150 x 4,6 mm com partículas de 3 µm de diâmetro médio), acoplada a uma pré-coluna de 3 x 4 mm (Phenomenex, Torrance, CA) mantida a 30°C foi acoplada ao sistema.

A metodologia de análise HPLC foi baseada em Souza et al (2007a). A fase móvel foi composta de água ultrapura acidificada com 1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico (solvente B). O fluxo da fase móvel foi mantido a 1mL/min e seguiu o gradiente apresentado na Tabela 1. O volume de amostra injetado foi de 20 µL. Para os extratos foram avaliados o perfil cromatográfico a 280, 370 e 515 nm. A quantificação da cianidina foi realizada através de equações obtidas a partir de curva de calibração (1 a 100 mg/L) medida a 515 nm.

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado para análise dos flavonóides por HPLC.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	93	7
26	65	35
32	93	7
35	93	7

4.3 CLIVAGEM ÁCIDA DAS PROANTOCIANIDINAS

4.3.1 Avaliação do álcool sobre a clivagem

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar o tipo e a quantidade de álcool adequado a ser utilizado no meio reacional durante a clivagem. Foram avaliados os alcoóis metanol e etanol, o primeiro por ser o álcool normalmente utilizado para as reações de hidrólise, e o segundo por não ser tóxico utilizado para fins alimentícios. Para determinar o tipo e quantidade de álcool foram realizados ensaios de clivagem do extrato de folhas de *I. edulis* sem álcool, com 30% e 60% de cada álcool, na presença de

HCl 0,1N, a 90°C por 240 min. Neste estudo foram avaliadas a percentagem de redução de proantocianidinas e a concentração de polifenóis totais (mgEAG/gES).

4.3.2 Otimização da clivagem ácida (planificação experimental)

A otimização do processo de clivagem ácida das proantocianidinas foi realizada através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Utilizou-se um plano compósito central rotacional (CCR), com 4 replicatas no ponto central e avaliada a influência dos fatores: concentração de HCl, tempo e temperatura da reação sob as variáveis de resposta: redução de proantocianidinas (%), redução adstringência (%), relação TEAC/PT ($\mu\text{Mol ET/g EAG}$) e a concentração de cianidina (mg/gES). A planificação experimental utilizada neste trabalho é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento compósito central rotacional.

Ensaio	Condições experimentais		
	HCl (N)	T (°C)	Tempo (min)
1	1,00 (-1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)
2	1,00 (-1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)
3	1,00 (-1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)
4	1,00 (-1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)
5	3,00 (1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)
6	3,00 (1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)
7	3,00 (1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)
8	3,00 (1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)
9	0,32 (-1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)
10	3,68 (+1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)
11	2,00 (0)	56,48 (-1,68)	165,00 (0)
12	2,00 (0)	98,52 (+1,68)	165,00 (0)
13	2,00 (0)	77,50 (0)	38,87 (-1,68)
14	2,00 (0)	77,50 (0)	291,13 (+1,68)
15	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)
16	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)
17	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)
18	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)

A planificação experimental descrita foi utilizada para os extratos dos frutos de *E. oleracea* e extratos das folhas de *I. edulis* e *B. crassifolia*. Os ensaios foram realizados em meio 60% EtOH e o aquecimento realizado em banho-maria (modelo: Q215M2

marca: Quimis). Todos os ensaios foram conduzidos em tubo de ensaio com tampa rosqueada e septo de teflon e imediatamente resfriados em banho de gelo.

4.3.3 Análise estatística dos resultados

As superfícies de resposta e a análise de regressão linear múltipla dos dados foram realizadas com o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK). A modelagem matemática dos dados foi feita com o modelo polinomial de segunda ordem, equação 8.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 8}$$

onde X_1, X_2, \dots, X_k são variáveis independentes que afetam a variável de resposta Y ; β_0 , β_i ($i = 1, 2, \dots, k$), β_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$) e β_{ij} ($i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, k$) são os coeficientes para os parâmetros de intercepto, linear, quadrático e interações, respectivamente; k é o número de variáveis.

No tratamento estatístico dos dados experimentais as variáveis de entrada (concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura) foram mantidas com seus valores normalizados. Assim, os níveis estudados para cada variável foram: -1,68; -1; 0; 1 e 1,68. Os valores -1 e 1 correspondem aos pontos mínimo e máximo do planejamento, o nível 0 corresponde ao valor da variável no ponto central, e os valores -1,68 e 1,68 são os níveis α do planejamento, responsáveis pela curvatura da superfície de resposta.

4.3.4 Determinação das condições ótimas e validação do modelo matemático

A escolha das condições ótimas de clivagem foi realizada de acordo com os valores de desejabilidade (**D**). O valor de **D** apresenta relação diretamente proporcional com a variável de resposta, podendo variar numa escala de 0 (resposta indesejável) a 1 (resposta desejável) (BEZERRA et al., 2008; RAISSI & FARSANI, 2009). Desta forma, as condições otimizadas para concentração de HCl, temperatura e tempo de reação seriam aquelas em que o valor de **D** correspondesse à maximização da redução de proantocianidinas, redução da adstringência, relação TEAC/PT e concentração de cianidina, ou seja, **D** igual ou próximo a 1.

Para validar a condição ótima escolhida, foram realizados ensaios com 5 replicatas. O extrato utilizado na validação foi o mesmo usado para a realização dos

ensaios experimentais do planejamento. Os valores das variáveis de resposta obtidos experimentalmente foram comparados com aqueles previstos pelos modelos para verificar se o mesmo é adequado para expressar o comportamento experimental dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a realização do trabalho experimental foram dispostos em três grupos. Inicialmente são apresentados os resultados do estudo preliminar do tipo e proporção de álcool utilizado no meio reacional para a clivagem. Em seguida, são apresentados os resultados do efeito das variáveis de entrada concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura sobre as variáveis de resposta redução de proantocianidinas, redução de adstringência, relação TEAC/PT e concentração de cianidina. Posteriormente, determinaram-se as condições ótimas para a clivagem ácida e realizou-se a validação do modelo.

5.1 AVALIAÇÃO DO ÁLCOOL SOBRE A CLIVAGEM

Um estudo preliminar fez-se necessário com o objetivo de diminuir o número de variáveis na planificação experimental do processo de clivagem ácida das proantocianidinas presentes em matrizes vegetais amazônicas. Para este estudo foi utilizado apenas o extrato de folhas de *I. edulis* e foi avaliado a proporção e o tipo de álcool (metanol ou etanol) necessários para a clivagem das proantocianidinas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito do tipo e proporção de álcool para a clivagem ácida de proantocianidinas de extrato de folhas de *Inga edulis*.

Álcool	Redução de Proantocianidinas (%)	Polifenóis totais (mgEAG/gES)
0%	26,0 ^a	241 ^a
30% MeOH	25,2 ^a	366 ^b
60 %MeOH	32,0 ^{b,c}	367 ^b
30% EtOH	27,2 ^{a,b}	405 ^{b,c}
60% EtOH	36,2 ^c	436 ^c

Valores com a mesma letra na mesma coluna são estatisticamente iguais em nível de significância de $p \geq 0,05$.

A partir dos resultados obtidos para a redução de proantocianidinas verificou-se que a adição de álcool (metanol ou etanol) favorece a ocorrência da reação de clivagem, desde que seja igual a 60%. As proantocianidinas são moléculas apolares e por isso encontram-se mais solúveis em meio hidroalcoólico do que aquoso. A solubilização destas moléculas favorece o ataque eletrofílico do íon H^+ , 1ª etapa da reação de clivagem. Dentre os tipos de álcool não houve diferença significativa sobre a redução de proantocianidinas.

Em relação a concentração de polifenóis totais no meio reacional, observa-se que conforme o aumento da concentração de álcool aumenta o teor de polifenóis, e verifica-se que a utilização de 60% etanol é superior aquela de metanol. Este comportamento ocorre devido à formação de compostos apolares no tratamento ácido que são mais solúveis em etanol (RAZMARA, et al., 2010) É importante ressaltar, que os compostos mais apolares (flavonóides agliconas monoméricos) são provenientes tanto da clivagem de proantocianidinas quanto da hidrólise de flavonóides glicosilados. Segundo Solomons & Fryle (2001), a polaridade de um solvente é indicada pela sua *constante dielétrica* (CD), que consiste na capacidade do solvente em isolar cargas opostas. Com base nos valores de CD verifica-se que o etanol (CD = 24) é mais apolar que o metanol (CD = 33). Desta forma, o uso de etanol no meio reacional favorece a solubilização dos compostos apolares provenientes da clivagem das proantocianidinas e da hidrólise dos flavonóides glicosilados. Portanto, para a otimização do processo de clivagem optou-se por utilizar o etanol a uma concentração de 60%.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA CLIVAGEM ÁCIDA DE PROANTOCIANIDINAS POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A influência das condições experimentais da clivagem sobre as variáveis de resposta são apresentados a seguir. É importante ressaltar que as variáveis concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura foram mantidos com seus valores normalizados durante o tratamento estatístico dos dados experimentais. Assim, os níveis para cada variável foram -1,68; -1; 0; 1; 1,68.

5.2.1 Influência do processo sobre o teor de proantocianidinas

O impacto do processo de clivagem ácida sobre o teor de proantocianidinas foi avaliado através da percentagem de redução de proantocianidinas (RP), dados da Tabela 4, obtidos para os extratos dos frutos de *E. oleracea* (EO), e das folhas de *B. crassifolia* (BC) e *I. edulis* (IE).

Tabela 4- Condições experimentais e redução percentual de proantocianidinas obtida nos ensaios para os diferentes extratos vegetais.

Ensaio	Condições experimentais			Redução de proantocianidinas (%)		
	HCl (N)	T (°C)	Tempo (min)	<i>B. crassifolia</i>	<i>E. oleracea</i>	<i>I. edulis</i>
1	1,00 (-1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	32,04	36,18	2,04
2	1,00 (-1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	33,24	39,89	9,47
3	1,00 (-1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	63,78	80,25	58,95
4	1,00 (-1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	76,28	87,73	79,34
5	3,00 (1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	65,21	73,50	43,95
6	3,00 (1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	69,72	82,66	60,13
7	3,00 (1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	87,75	89,44	84,34
8	3,00 (1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	89,55	91,85	91,38
9	0,32 (-1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	29,85	40,70	5,33
10	3,68 (+1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	94,98	97,23	85,26
11	2,00 (0)	56,48 (-1,68)	165,00 (0)	48,26	50,73	16,51
12	2,00 (0)	98,52 (+1,68)	165,00 (0)	80,08	87,11	83,75
13	2,00 (0)	77,50 (0)	38,87 (-1,68)	62,11	70,64	38,22
14	2,00 (0)	77,50 (0)	291,13 (+1,68)	79,81	89,97	40,66
15	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	80,54	81,79	77,50
16	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	77,22	78,94	79,01
17	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	76,92	75,66	72,04
18	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	73,82	78,38	83,36

Os valores apresentados na Tabela 4 demonstram que o planejamento experimental abrangeu uma ampla faixa de RP, apresentando valores que variaram de 2 a 91% para o extrato de IE, de 36 a 97% para os extratos de EO e de 29 a 95% para os de BC. Verifica-se que o efeito das variáveis de entrada (concentração de ácido, temperatura e tempo) foram similares para os 3 extratos, tendo em vista a semelhança dos valores de redução RP obtidos na maioria dos ensaios experimentais.

Os resultados da Tabela 4 foram submetidos a tratamento estatístico (Tabelas 5 e 6) sendo os valores das variáveis de entrada codificadas. A Tabela 5 apresenta a análise de Variância (ANOVA) do modelo polinomial de 2ª ordem. De acordo com a ANOVA

o modelo proposto apresentou coeficientes de determinação (R^2) de 0,9580, 0,9682 e 0,9464 para os extratos de BC, EO e IE, respectivamente. Os elevados R^2 e falta de ajuste não significativa ($p>0,05$) indicam que a variabilidade dos dados experimentais pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 5 - Análise de variância para a redução das proantocianidinas para os diferentes extratos para o modelo polinomial de 2ª ordem.

Fonte	GL ^a	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
		Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b
HCl	1	3429,9	454,5 ^{***}	2601,0	411,2 ^{***}	5120,1	234,6 ^{***}
HCl ²	1	355,6	47,1 ^{**}	143,7	22,7 [*]	1077	49,3 ^{**}
T	1	2132,9	282,6 ^{***}	2326,3	367,7 ^{***}	7105,0	325,5 ^{***}
T ²	1	277,3	36,7 ^{**}	145,0	22,9 [*]	714,9	32,8 ^{**}
Tempo	1	181,5	24,1 [*]	223,6	35,4 ^{**}	222,7	10,2 [*]
tempo ²	1	65,9	8,7 ^{NS}	5,2	0,8 ^{NS}	1614,5	74 ^{**}
HCl x T	1	131,2	17,4 [*]	557,7	88,2 ^{**}	379,9	17,4 [*]
HCl x tempo	1	6,8	0,9 ^{NS}	0	0 ^{NS}	2,7	0,1 ^{NS}
T x tempo	1	9,2	1,2 ^{NS}	1,1	0,2 ^{NS}	1,8	0,1 ^{NS}
Falta de ajuste	5	258,8	6,9 ^{NS}	177,4	4,1 ^{NS}	799,6	7,3 ^{NS}
Erro puro	3	22,6		19,0		65,48	
R ^{2c}		0,9580		0,9682		0,9464	

^a Graus de liberdade; ^b Teste de Fisher; ^c Coeficiente de determinação; *, ** e *** significativo a $p<0,05$, 0,01 e 0,001 respectivamente; ^{NS} Não significativo ($p>0,05$).

Os coeficientes de regressão para o modelo polinomial de 2ª ordem da RP dos extratos vegetais são apresentados na Tabela 6. Segundo o modelo proposto a RP dos 3 extratos depende dos termos lineares das variáveis HCl e T ($p<0,001$) e tempo ($p<0,05$), termo quadrático do HCl e T ($p<0,01$ para as folhas de BC e IE e $p<0,05$ para EO) e de interação entre as variáveis HCl e temperatura ($p<0,05$). Para o extrato de IE acrescenta-se o efeito quadrático do tempo ($p<0,01$).

Tabela 6 - Coeficientes de regressão para os parâmetros do modelo polinomial de 2ª ordem para a redução das proantocianidinas dos diferentes extratos.

Parâmetro do modelo	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Coeficiente de regressão	Erro padrão
Intercepto	77,14 ^{***}	1,3715	78,7 ^{***}	1,2557	77,6 ^{***}	2,3325
HCl	15,85 ^{***}	0,7434	13,80 ^{***}	0,6805	19,36 ^{***}	1,2642
HCl ²	-5,3 ^{**}	0,7724	-3,40 [*]	0,7071	-9,23 ^{**}	1,3136
T	12,50 ^{***}	0,7434	13,05 ^{***}	0,6805	22,81 ^{***}	1,2642
T ²	-4,68 ^{**}	0,7724	-3,4 [*]	0,7071	-7,5 [*]	1,3136
Tempo	3,65 [*]	0,7434	4,04 ^{**}	0,6805	4,04 [*]	1,2642
tempo ²	-2,28 ^{NS}	0,7724	0,64 ^{NS}	0,7071	-11,30 ^{**}	1,3136
HCl x T	-4,05 [*]	0,9712	-8,35 ^{**}	0,8892	-6,89 [*]	1,6518
HCl x tempo	-0,92 ^{NS}	0,9712	0 ^{NS}	0,8892	-0,57 ^{NS}	1,6518
T x tempo	1,07 ^{NS}	0,9712	-0,37 ^{NS}	0,8892	0,48 ^{NS}	1,6518

*, ** e *** significativo a $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$ respectivamente; ^{NS} Não significativo ($p > 0,05$).

O valor do intercepto representa a variável de resposta nas condições do ponto central do planejamento (HCl 2N, 77,5°C/165min). Na RP verifica-se que valor do intercepto para os 3 extratos é cerca de 78%. O efeito positivo dos termos lineares indica que a elevação do nível de qualquer variável ocasiona maior RP. Para o HCl esse comportamento explica-se através do papel exercido pelo ácido na reação. Segundo Hemingway e McGraw (1983) o ácido atua como catalisador da reação através da protonação do local de clivagem da ligação interflavanóide. No modelo proposto, verifica-se que com a elevação do HCl do nível 0 para 1, ou seja, de 2N para 3N HCl ocorre um aumento na RP de 15,8%, 13,8% e 19,4% para os extratos de BC, EO e IE, respectivamente. O efeito linear positivo da temperatura (T) é similar ao do ácido e de acordo com Beart, Lilley & Haslam (1985) pode ser justificado pela lei de Arrhenius. A RP aumenta cerca de 13% no extrato de BC e EO, e 23% para IE quando há elevação em 12,5°C na temperatura.

Em geral, o efeito quadrático negativo das variáveis de entrada significa que a partir do ponto máximo a elevação de seus valores ocasiona diminuição na variável de resposta, enquanto que, o efeito negativo da interação significa que o aumento simultâneo no nível das duas variáveis de entrada ocasiona menor valor da variável de resposta. Tais considerações são válidas quando os efeitos apresentados pelo modelo teórico são observados dentro do domínio experimental.

A Figura 15 mostra que a elevação no nível das variáveis é acompanhada do aumento de RP até um valor máximo, que se mantém constante mesmo que haja incrementos nas variáveis de entrada. Portanto, o efeito quadrático negativo indica que

RP alcança um valor máximo a partir do qual aumento no nível das variáveis tempo para extrato de IE, HCl e temperatura para extrato BC, EO e IE não promovem o aumento na RP. O mesmo se aplica para o efeito negativo da interação HCl x temperatura.

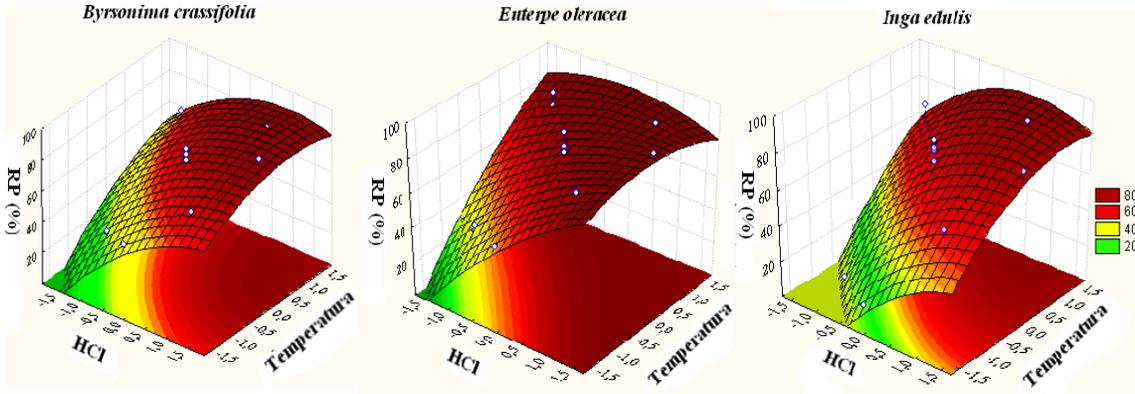
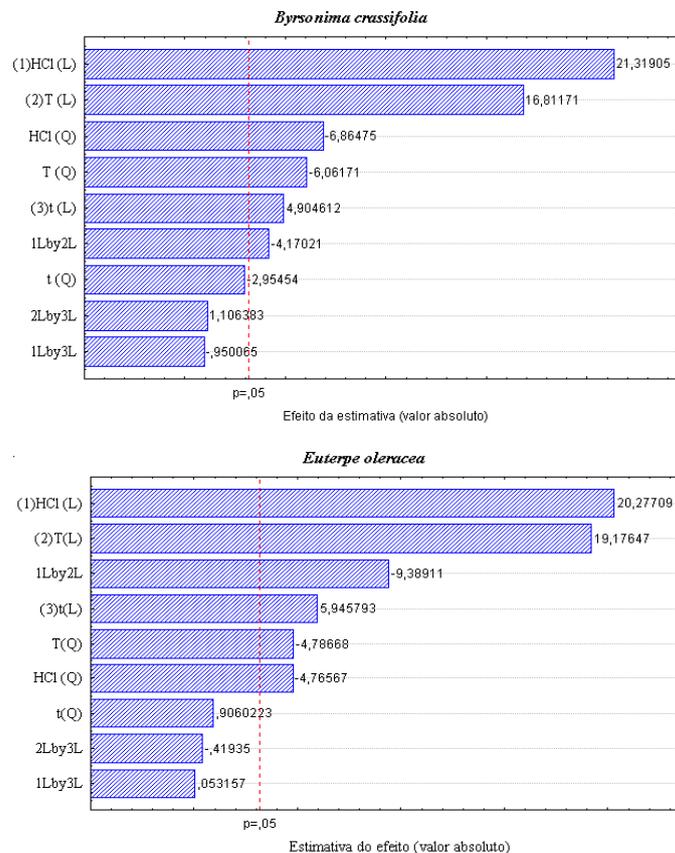


Figura 15 - Superfície de resposta e curva de nível para a redução de proantocianidinas em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.

O gráfico de Pareto (Figura 16) mostra que o parâmetro linear para as 3 variáveis tem maior influência sobre a RP do que os termos quadrático das variáveis concentração de ácido, temperatura (BC, EO e IE) e tempo (IE).



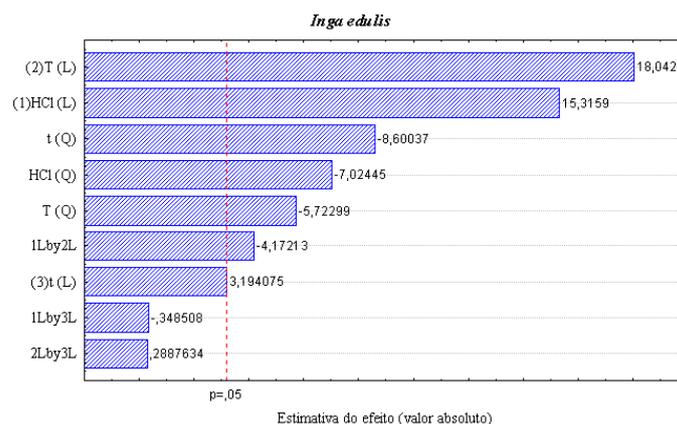


Figura 16 - Gráfico Pareto para a redução de proantocianidinas presente nos extratos.

5.2.2 Efeito da clivagem das proantocianidinas sobre a adstringência dos extratos

A adstringência é a sensação tátil causada pela diminuição da capacidade lubrificante da saliva. A formação e/ou precipitação de complexos entre proteínas ricas em prolina da saliva e os compostos fenólicos são responsáveis pela adstringência dos vegetais (McRAE & KENNEDY, 2011). Em geral, quanto maior o grau de polimerização e o peso molecular do composto fenólico maior é a intensidade da adstringência (BAJEC & PICKERING, 2008). Desta forma, torna-se importante avaliar o efeito da redução de proantocianidinas sobre a adstringência dos extratos. Na Tabela 7 os resultados foram expressos em percentual de redução da adstringência (RA) encontrada em cada ensaio experimental.

Tabela 7 - Redução da adstringência obtida nos ensaios experimentais para os extratos vegetais.

Ensaio	Condições experimentais			Redução da adstringência (%)		
	HCl (N)	T (°C)	Tempo (min)	<i>B. crassifolia</i>	<i>E. oleracea</i>	<i>I. edulis</i>
1	1,00 (-1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	81,70	33,68	10,50
2	1,00 (-1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	84,31	33,96	22,95
3	1,00 (-1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	81,51	22,04	25,45
4	1,00 (-1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	84,02	39,78	25,16
5	3,00 (1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	82,79	68,72	59,54
6	3,00 (1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	84,17	54,13	62,29
7	3,00 (1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	85,37	82,14	76,01
8	3,00 (1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	91,78	60,67	84,64
9	0,32 (-1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	84,75	0,14	2,85
10	3,68 (+1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	87,88	91,25	77,32
11	2,00 (0)	56,48 (-1,68)	165,00 (0)	85,59	3,24	43,59
12	2,00 (0)	98,52 (+1,68)	165,00 (0)	86,13	76,07	49,02
13	2,00 (0)	77,50 (0)	38,87 (-1,68)	83,89	39,31	44,05
14	2,00 (0)	77,50 (0)	291,13 (+1,68)	86,43	76,89	49,35
15	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	83,54	50,51	46,93
16	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	83,35	62,18	50,13
17	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	83,33	65,57	49,87
18	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	84,70	52,03	45,97

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que os tratamentos empregados para a clivagem ácida das proantocianidinas contribuíram positivamente para a redução da adstringência dos extratos. Para o extrato de BC a RA máxima de 91,8% foi atingida quando o extrato foi submetido a tratamento com HCl 3N a 90°C por 240min (ensaio 8). Observa-se que os compostos responsáveis pela adstringência desta planta são sensíveis aos tratamentos empregados, pois o valor mínimo de redução (~ 82%) foi atingido pelos tratamentos mais brandos. Para o extrato de IE a RA máxima (84,6%) foi alcançada quando o mesmo foi submetido a tratamento com HCl 3,00N a 90,0°C por 240min (ensaio 8), entretanto para o ensaio 9 com HCl a 0,32N a redução da adstringência foi de apenas 2,85%, nestas mesma condição o extrato de EO praticamente não apresentou RA (0,14%), enquanto o máximo foi atingido com HCl 3,68N a 77,5°C por 165min (ensaio 10). A adequação do modelo de superfície de resposta aos dados experimentais de RA foi avaliada através da Análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a redução da adstringência.

Fonte	GL ^a	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
		Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b
HCl	1	23,3	54,7**	6133,8	111,0**	7670,7	1758,6***
HCl ²	1	4,5	10,7*	176,2	3,2 ^{NS}	79,8	18,3*
T	1	8,3	19,4*	1366,4	24,7*	310,4	71,2**
T ²	1	2,6	5,7 ^{NS}	435,2	7,9 ^{NS}	1,2	0,3 ^{NS}
tempo	1	21,7	50,9**	149,3	2,7 ^{NS}	77,1	17,7*
tempo ²	1	0,5	1,1 ^{NS}	5,4	0,1 ^{NS}	0,4	0,9 ^{NS}
HCl x T	1	14,3	33,5*	83,2	1,5 ^{NS}	58,6	13,4*
HCl x tempo	1	0,9	2,1 ^{NS}	365,7	6,6 ^{NS}	0,1	0 ^{NS}
T x tempo	1	3,0	7,1 ^{NS}	14,0	0,3 ^{NS}	5,9	1,3 ^{NS}
Falta de ajuste	5	17,5	6,3 ^{NS}	2332,6	8,4 ^{NS}	178,3	8,2 ^{NS}
Erro puro	3	1,3		165,8		4,4	
R ^{2c}		0,8046		0,7770		0,9772	

^a Graus de liberdade; ^b Teste de Fisher; ^c Coeficiente de determinação; *, ** e *** significativo a p<0,05, 0,01 e 0,001 respectivamente; ^{NS} Não significativo (p>0,05).

A falta de ajuste não foi estatisticamente significativa (p>0,05) para a ANOVA, indicando que o modelo ajustou-se bem os dados experimentais da RA, o que se confirma com os valores de R² > 0,77 para os 3 extratos. Os termos lineares de HCl e temperatura apresentam efeito positivo para os 3 extratos. O efeito linear do tempo foi significativo para os extratos de BC e IE. O efeito quadrático da temperatura foi significativo para os 3 extratos. O efeito quadrático de HCl e a interação entre HCl e temperatura mostrou-se significativo apenas para BC e IE. A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão para cada parâmetro do modelo.

Tabela 9 - Coeficiente de regressão do modelo de superfície de resposta para a redução da adstringência.

Parâmetro do modelo	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Coeficiente deregressão	Erro padrão	Coeficiente deregressão	Erro padrão
Intercepto	84***	0,3257	58,17***	3,7112	48,1***	1,0427
HCl	1,31**	0,1766	21,19**	2,0114	23,70***	0,5651
HCl ²	0,60*	0,1835	-3,86 ^{NS}	2,0900	-2,51*	0,5872
T	0,78*	0,1766	10,0*	2,0114	4,77**	0,5651
T ²	0,40	0,1835	-6,0 ^{NS}	2,0900	-0,31 ^{NS}	0,5872
tempo	1,26**	0,1766	3,31 ^{NS}	2,0114	2,38*	0,5651
tempo ²	0,2 ^{NS}	0,1835	0,65 ^{NS}	2,0900	-0,17 ^{NS}	0,5872
HCl x T	1,33**	0,2307	3,22 ^{NS}	2,6281	2,71*	0,7384
HCl x tempo	0,33 ^{NS}	0,2307	-6,76 ^{NS}	2,6281	-0,01 ^{NS}	0,7384
T x tempo	0,62 ^{NS}	0,2307	1,32 ^{NS}	2,6281	-0,86 ^{NS}	0,7384

*, ** e *** significativo a p<0,05, 0,01 e 0,001 respectivamente; ^{NS} Não significativo (p>0,05).

Verifica-se através dos valores de coeficiente de regressão que os extratos apresentam comportamento diferente para a redução da adstringência, os valores do intercepto evidenciam bem essa diferença. Observa-se que nas mesmas condições experimentais (HCl 2N, 77,5°C/165 min) a RA apresenta valores bastante distintos para os 3 extratos: 84%, 58, 2% e 48% para BC, EO e IE, respectivamente. A influência do tratamento fica evidente quando os resultados são apresentados na forma de superfície de resposta (Figura 17), nestes gráficos verifica-se que o extrato de BC apresenta comportamento diferente dos extratos de EO e IE. Na superfície de resposta do BC percebe-se que o efeito da temperatura e do HCl mesmo sendo significativos não influenciam grandemente a RA. Este fato se confirma pelos baixos coeficientes de regressão destas variáveis (Tabela 9) e pela pequena variação de RA encontrada nos ensaios do planejamento (81,7 a 91,8%). No gráfico Pareto (Figura 18) do EO e IE é evidente o forte efeito linear das variáveis HCl e temperatura na RA. Dessa forma, pode-se dizer que a RA é favorecida pelo aumento do nível de HCl e da temperatura.

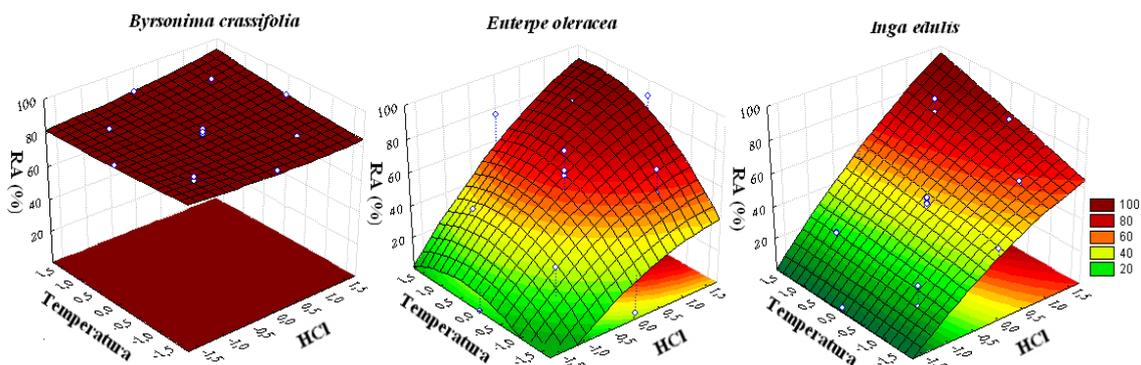


Figura 17 - Superfície de resposta e curva de nível para a redução de adstringência em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.

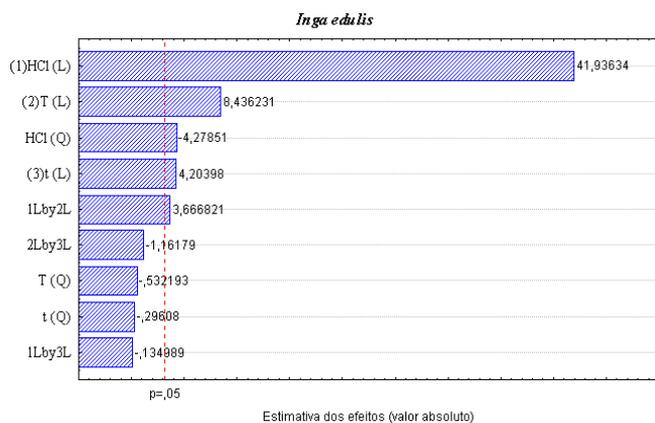
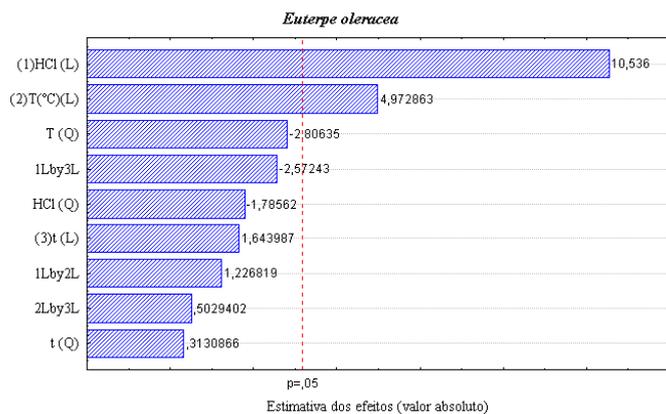
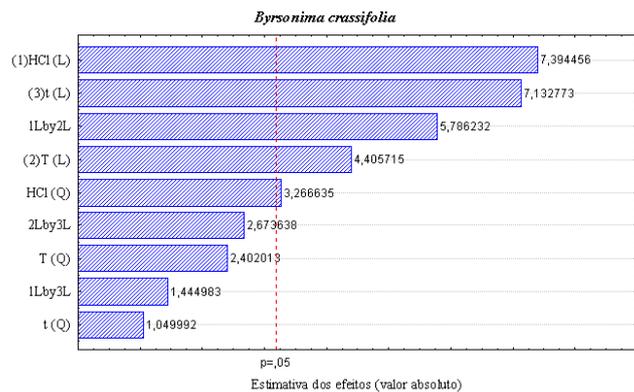


Figura 18 - Gráfico Pareto para redução de adstringência dos extratos.

A singularidade de comportamento pode ser atribuída as diferenças no perfil de compostos fenólicos dos extratos (três espécies diferentes). Segundo Lesschaeve & Nobel (2005) diferenças na estrutura química, além do grau de polimerização, influenciam a adstringência. A diferença na configuração espacial dos flavanóis modifica significativamente a intensidade da adstringência, que é maior na epicatequina do que na catequina. Com relação às proantocianidinas, o tipo de monômero e o local de ligação entre suas unidades afeta a adstringência, por exemplo, o dímero B6 (catequina-4,6-catequina) é mais adstringente que o dímero B3 (catequina-4,8-catequina) e o B4 (catequina-4,8-epicatequina). Outro fator que contribui para o aumento da adstringência

dos compostos fenólicos é a esterificação com ácido gálico. De uma maneira geral, qualquer estrutura química que promova o aumento do número de ligações entre as hidroxilas do polifenol e a carbonila das proteínas salivares intensifica a percepção da adstringência.

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

O impacto do tratamento ácido sobre a capacidade antioxidante dos extratos foi avaliado através da relação entre valor de capacidade antioxidante (TEAC) e a concentração de polifenóis totais (PT), mencionados no decorrer do trabalho como relação TEAC/PT. A relação TEAC/PT permite avaliar a qualidade dos compostos fenólicos, em termos de capacidade antioxidante, formados durante a clivagem. Os valores encontrados para a relação TEAC/PT nos extratos de BC, EO e IE são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Relação TEAC/PT obtida nos ensaios experimentais para extratos vegetais.

Ensaio	Condições experimentais			Relação TEAC/PT ($\mu\text{MolET/gEAG}$)		
	HCl (N)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	<i>B. crassifolia</i>	<i>E. oleracea</i>	<i>I. edulis</i>
1	1,00 (-1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	2415	3207	3303
2	1,00 (-1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	2767	3778	3088
3	1,00 (-1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	1617	3759	3234
4	1,00 (-1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	1679	2923	2571
5	3,00 (1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	1300	3379	3436
6	3,00 (1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	1143	4163	2681
7	3,00 (1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	1461	4212	3643
8	3,00 (1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	1444	4143	4462
9	0,32 (-1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	2821	3602	3078
10	3,68 (+1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	2866	4901	2720
11	2,00 (0)	56,48 (-1,68)	165,00 (0)	2351	4711	2607
12	2,00 (0)	98,52 (+1,68)	165,00 (0)	2344	6076	2349
13	2,00 (0)	77,50 (0)	38,87 (-1,68)	2543	5480	2644
14	2,00 (0)	77,50 (0)	291,13 (+1,68)	2946	5536	2508
15	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	3412	3611	2600
16	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	2584	5087	2460
17	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	3412	4689	2604
18	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	3801	5172	2571

A literatura reporta que o grau de polimerização contribui para o aumento da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (ROSS & KASSUM, 2002; SERRANO et al, 2009). Assim, esperava-se que a relação TEAC/PT decrescesse à medida que a redução das proantocianidinas ocorresse. Entretanto, os dados apresentados na Tabela 10 sugerem que a relação TEAC/PT não sofreu grandes alterações ocasionadas pela clivagem ácida das proantocianidinas.

A Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11 mostra que o modelo não foi estatisticamente significativo para o extrato de EO. O comportamento do extrato de EO indica que a perda de TEAC/PT decorrente da redução das proantocianidinas foi compensada pelo valor TEAC/PT dos compostos formados durante o tratamento ácido. De fato, os tratamentos utilizados para a clivagem ácida das proantocianidinas também promovem a hidrólise dos flavonóides glicosilados. Estudos revelam que os flavonóides agliconas têm capacidade antioxidante maior do que seus correspondentes glicosilados (ROSS & KASUM, 2002). Para os demais extratos, somente o efeito quadrático da temperatura (BC) e HCl (IE) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os coeficientes de regressão para o modelo polinomial são apresentados na Tabela 12.

Tabela 11 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a relação TEAC/PT ($\mu\text{MolET/gEAG}$).

Fonte	GL ^a	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
		Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b
HCl	1	682539	2,6 ^{NS}	1427444	2,8 ^{NS}	148733	1,8 ^{NS}
HCl ²	1	1567686	6,0 ^{NS}	2406544	4,7 ^{NS}	1030679	12,4 [*]
T	1	150708	0,6 ^{NS}	576129	1,1 ^{NS}	68658	0,8 ^{NS}
T ²	1	3517502	13,4 [*]	13253	0 ^{NS}	237061	2,9 ^{NS}
tempo	1	611787	0,2 ^{NS}	21613	0 ^{NS}	79504	1,0 ^{NS}
tempo ²	1	1895247	7,2 ^{NS}	826	0 ^{NS}	371977	4,5 ^{NS}
HCl x T	1	688641	2,6 ^{NS}	155566	0,3 ^{NS}	828059	10,0 ^{NS}
HCl x tempo	1	43079	0,2 ^{NS}	120168	0,2 ^{NS}	111064	1,3 ^{NS}
T x tempo	1	2813	0 ^{NS}	638597	1,2 ^{NS}	158090	1,9 ^{NS}
Falta de ajuste	5	3149084	2,4 ^{NS}	6550309	2,5 ^{NS}	2475097	6,0 ^{NS}
Erro puro	3	788657		1545272		248910	
R ^{2c}		0,6288		0,4045		0,4917	

^a Graus de liberdade; ^b Teste de Fisher; ^c Coeficiente de determinação; *, ** e *** significativo a $p < 0,05$, 0,01 e 0,001 respectivamente; ^{NS} Não significativo ($p > 0,05$).

Tabela 12 - Coeficiente de regressão para os parâmetros do modelo de superfície de resposta para a TEAC/PT ($\mu\text{MolET/gEAG}$).

Parâmetro do modelo	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Coefficiente de regressão	Erro padrão
Intercepto	3344,58 ^{***}	255,98	4706,51 ^{***}	358,32	2452,81 ^{***}	143,81
HCl	-223,56 ^{NS}	138,74	323,30 ^{NS}	194,21	104,36 ^{NS}	77,94
HCl ²	-352,05 ^{NS}	144,16	-436,18 ^{NS}	201,80	285,45 [*]	80,98
T	-105,05 ^{NS}	138,74	205,40 ^{NS}	194,21	70,90 ^{NS}	77,94
T ²	-527,34 [*]	144,16	-32,37 ^{NS}	201,80	136,90 ^{NS}	80,98
tempo	67,26 ^{NS}	138,74	39,78 ^{NS}	194,21	-76,30 ^{NS}	77,94
tempo ²	-387,08 ^{NS}	144,16	8,08 ^{NS}	201,80	171,49 ^{NS}	80,98
HCl x T	293,39 ^{NS}	181,27	139,45 ^{NS}	253,74	321,73 ^{NS}	101,84
HCl x tempo	-73,38 ^{NS}	181,27	122,56 ^{NS}	253,74	117,83 ^{NS}	101,84
T x tempo	-18,75 ^{NS}	181,27	-282,53 ^{NS}	253,74	140,56 ^{NS}	101,84

*, ** e *** significativo a $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$ respectivamente; ^{NS} Não significativo ($p > 0,05$).

O efeito quadrático negativo da temperatura no extrato de BC significa que a superfície de resposta (Figura 19) apresenta ponto de máximo e de mínima em função da temperatura. Em outras palavras, o aumento da temperatura é benéfico até certo ponto (valor máximo de TEAC/PT) a partir do qual aumentos sucessivos ocasionam a redução na relação TEAC/PT. Isso se deve provavelmente a degradação térmica dos compostos fenólicos presentes no extrato.

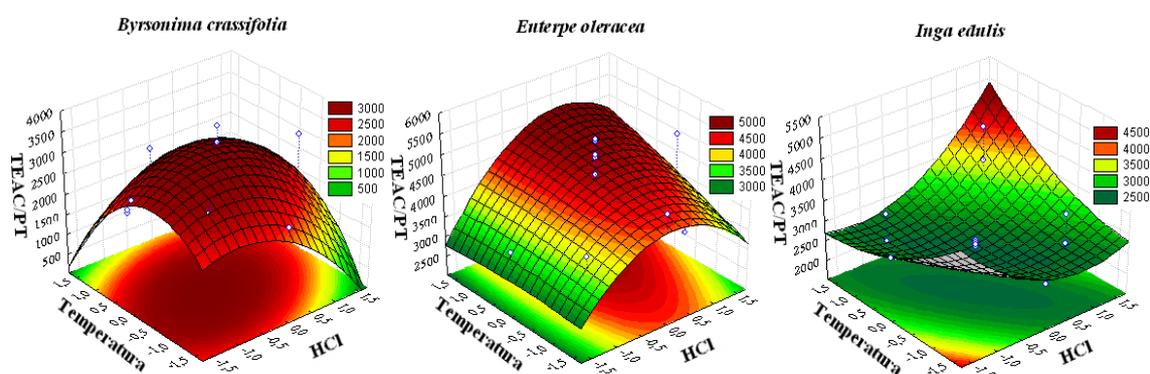


Figura 19- Superfície de resposta e curva de nível para a relação TEAC/PT em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.

Para o extrato de IE o efeito quadrático positivo indica que à medida que a concentração de HCl aumenta os valores de TEAC/PT passam por pontos de máximo → mínima → máximo, conforme visualizado na Figura 19. O ponto de máxima inicial, quando o nível de HCl ainda é baixo, pode ser atribuído aos baixos valores de redução das proantocianidinas acrescido a isso a ocorrência de hidrólise dos flavonóis glicosilados presentes no extrato. O ponto de mínima provavelmente é decorrente da

degradação parcial das agliconas formadas a partir da hidrólise dos flavonóis glicosilados. E o ponto de máxima de TEAC/PT posterior, se deve a contribuição dos compostos formados durante a efetiva despolimerização das proantocianidinas acrescido dos compostos agliconas.

5.2.4 Concentração de cianidina após a clivagem das proantocianidinas

A Tabela 13 mostra as concentrações de cianidina quantificados por HPLC após a clivagem ácida dos extratos de BC, EO e IE. A presença desta antocianidina nos extratos após a clivagem confirma a presença das proantocianidinas. O extrato de EO apresenta naturalmente a presença de cianidinas glicosiladas (3-rutinosídeo e 3-glicosídeo) (PACHECO-PALENCIA et al., 2009), desta forma a presença de cianidina é proveniente tanto da clivagem das proantocianidinas quanto da hidrólise das cianidinas glicosiladas presente no extrato. Com base na análise de variância (Tabela 14), verifica-se que o modelo polinomial de 2ª ordem adaptou-se aos dados experimentais de concentração de cianidina para todos os extratos. A falta de ajuste não foi significativa e os modelos apresentaram $R^2 > 0,9$.

Tabela 13 - Concentração de cianidina nos extratos vegetais após clivagem ácida.

Ensaio	Condições experimentais	Condições experimentais	Condições experimentais	Cianidina (mg/gES)		
	HCl (N)	T (°C)	Tempo (min)	<i>B. crassifolia</i>	<i>E. oleracea</i>	<i>I. edulis</i>
1	1,00 (-1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	1,75	5,80	1,17
2	1,00 (-1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	5,15	13,44	1,74
3	1,00 (-1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	13,58	68,37	6,52
4	1,00 (-1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	11,70	71,86	5,65
5	3,00 (1)	65,00 (-1)	90,00 (-1)	9,65	31,80	3,84
6	3,00 (1)	65,00 (-1)	240,00 (+1)	10,32	87,84	2,47
7	3,00 (1)	90,00 (+1)	90,00 (-1)	12,93	115,98	5,42
8	3,00 (1)	90,00 (+1)	240,00 (+1)	13,46	104,33	5,24
9	0,32 (-1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	3,73	16,90	1,11
10	3,68 (+1,68)	77,50 (0)	165,00 (0)	10,92	108,50	2,84
11	2,00 (0)	56,48 (-1,68)	165,00 (0)	5,09	15,34	1,15
12	2,00 (0)	98,52 (+1,68)	165,00 (0)	15,53	104,68	8,91
13	2,00 (0)	77,50 (0)	38,87 (-1,68)	10,11	49,29	3,96
14	2,00 (0)	77,50 (0)	291,13 (+1,68)	11,81	95,03	4,38
15	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	13,54	94,08	4,81
16	2,00 (0)	77,50 (0)	165,00 (0)	13,88	95,86	5,50
17	2,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	16,95	101,72	4,74
18	2,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	12,68	89,89	6,50

Tabela 14 - Análise de variância e coeficiente de determinação para a cianidina.

Fonte	GL ^a	<i>B. crassifolia</i>		<i>E. oleracea</i>		<i>I. edulis</i>	
		Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b	Soma dos quadrados	F ^b
HCl	1	50,5	14,6*	8193,6	340,3***	1,7	2,5 ^{NS}
HCl ²	1	68,6	19,8*	1732,8	72,0**	16	23,9*
T	1	131,4	37,9**	10127,8	420,7***	52	77,7**
T ²	1	20,5	5,9 ^{NS}	2026,2	84,2**	0	0 ^{NS}
tempo	1	2,3	0,7 ^{NS}	1284,5	53,4**	0,1	0,1 ^{NS}
tempo ²	1	13,8	4,0 ^{NS}	883,8	36,7**	1,5	2,3 ^{NS}
HCl x T	1	17,9	5,2 ^{NS}	51,7	2,1 ^{NS}	3,0	4,5 ^{NS}
HCl x tempo	1	0	0 ^{NS}	138,3	5,7 ^{NS}	0,2	0,3 ^{NS}
T x tempo	1	3,7	1,1 ^{NS}	645,3	26,8*	0	0 ^{NS}
Falta de ajuste	5	4,9	0,3 ^{NS}	730,0	6,1 ^{NS}	3,2	1 ^{NS}
Erro puro	3	10,4		72,2		2	
R ^{2c}		0,9490		0,9674		0,9341	

^a Graus de liberdade; ^b Teste de Fisher; ^c Coeficiente de determinação; *, ** e *** significativo a p<0,05, 0,01 e 0,001 respectivamente; ^{NS} Não significativo (p>0,05).

Com base nos valores de intercepto apresentados na Tabela 15, verifica-se que o teor de cianidina formada nos 3 extratos difere entre si. Nas mesmas condições experimentais (HCl 2N, 77,5°C/165min) são obtidos 14,2 mg/gES, 95,4 mg/gES e 5,37 mg/gES para BC, EO e IE, respectivamente. O elevado teor apresentado pelo EO se deve a formação de cianidina tanto na hidrólise das antocianinas glicosiladas quanto da clivagem das proantocianidinas. A diferença entre o teor de cianidina dos extratos de BC e IE se deve ao grau de polimerização dos compostos, tendo em vista que, a concentração de proantocianidinas não apresenta diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) entre os extratos de BC e IE. Um trímero, por exemplo, submetido a clivagem produz 2 moléculas de antocianidinas e 1 flavanol (HAGERMAN, 2011), enquanto que num dímero essa proporção é de 1:1, ou seja, são produzidos 1 molécula de antocianidina e 1 flavanol (BEART et al., 1985).

Os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 15, mostram que o efeito linear foi significativo para as variáveis HCl (BC e EO), temperatura (BC, EO e IE) e tempo (IE). Este comportamento indica que o aumento no nível de qualquer destas variáveis favorece a redução das proantocianidinas através da clivagem e conseqüente formação da cianidina. O efeito quadrático negativo do HCl para os três extratos, da temperatura para o EO e tempo para o IE indica que aumentos sucessivos no nível destas variáveis, a partir do ponto de curvatura da superfície, promovem a degradação da cianidina. Esse comportamento pode ser visualizado na Figura 20.

Tabela 15- Coeficiente de regressão para os parâmetros do modelo de superfície de resposta para cianidina.

Parâmetro do modelo	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Euterpe oleracea</i>		<i>Inga edulis</i>	
	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	Coefficiente de regressão	Erro padrão
Intercepto	14,24 ^{***}	0,9296	95,41 ^{***}	2,4498	5,37 ^{***}	0,4086
HCl	1,92 [*]	0,5038	24,44 ^{***}	1,3277	0,35 ^{NS}	0,2215
HCl ²	-2,33 [*]	0,5235	-11,68 ^{**}	1,3796	-1,12 [*]	0,2301
T	3,10 ^{**}	0,5038	27,27 ^{***}	1,3277	1,95 ^{**}	0,2215
T ²	-1,27 ^{NS}	0,5235	-12,64 ^{**}	1,3796	-0,04 ^{NS}	0,2301
Tempo	0,41 ^{NS}	0,5038	9,66 ^{**}	1,3277	-0,08 ^{NS}	0,2215
tempo ²	-1 ^{NS}	0,5235	-8,34 ^{**}	1,3796	-0,35 ^{NS}	0,2301
HCl x T	-1,50 ^{NS}	0,6583	-2,60 ^{NS}	1,7348	-0,61 ^{NS}	0,2894
HCl x tempo	0 ^{NS}	0,6583	4,22 ^{NS}	1,7348	-0,16 ^{NS}	0,2894
T x tempo	0 ^{NS}	0,6583	-9 [*]	1,7348	-0,03 ^{NS}	0,2894

*, ** e *** significativo a $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$ respectivamente; ^{NS} Não significativo ($p > 0,05$).

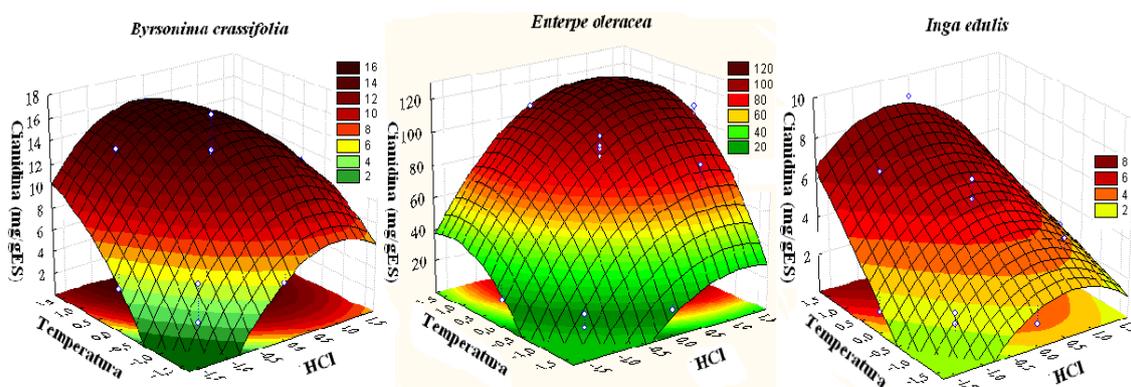


Figura 20- Superfícies de resposta e curvas de níveis para a Cianidina (mg/gES) em função da interação entre concentração de HCl e a temperatura do meio reacional.

5.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS E VALIDAÇÃO DO MODELO

Após a análise estatística dos dados e a confirmação de que o modelo proposto está adequado aos resultados torna-se necessário a determinação das condições ótimas e a validação do modelo proposto. As melhores condições foram determinadas através da avaliação da desejabilidade máxima (D) para todas as variáveis de resposta. Na Figura 19 são apresentados os gráficos de desejabilidade da redução de proantocianidinas (RP) para os extratos (os demais gráficos estão no anexo A). Estes gráficos confirmam a semelhança no comportamento da RP diante de modificações nas variáveis de entrada independente do tipo de extrato. Isso sugere que as proantocianidinas presentes nos três extratos possuem o mesmo tipo de ligação interflavonóide. De acordo com Hemingway & McGraw (1983) a velocidade de clivagem depende do tipo de ligação

interflavonóide, os compostos com ligação do tipo C₄-C₈, por exemplo, são mais rapidamente clivados do que os compostos com ligação C₄-C₆.

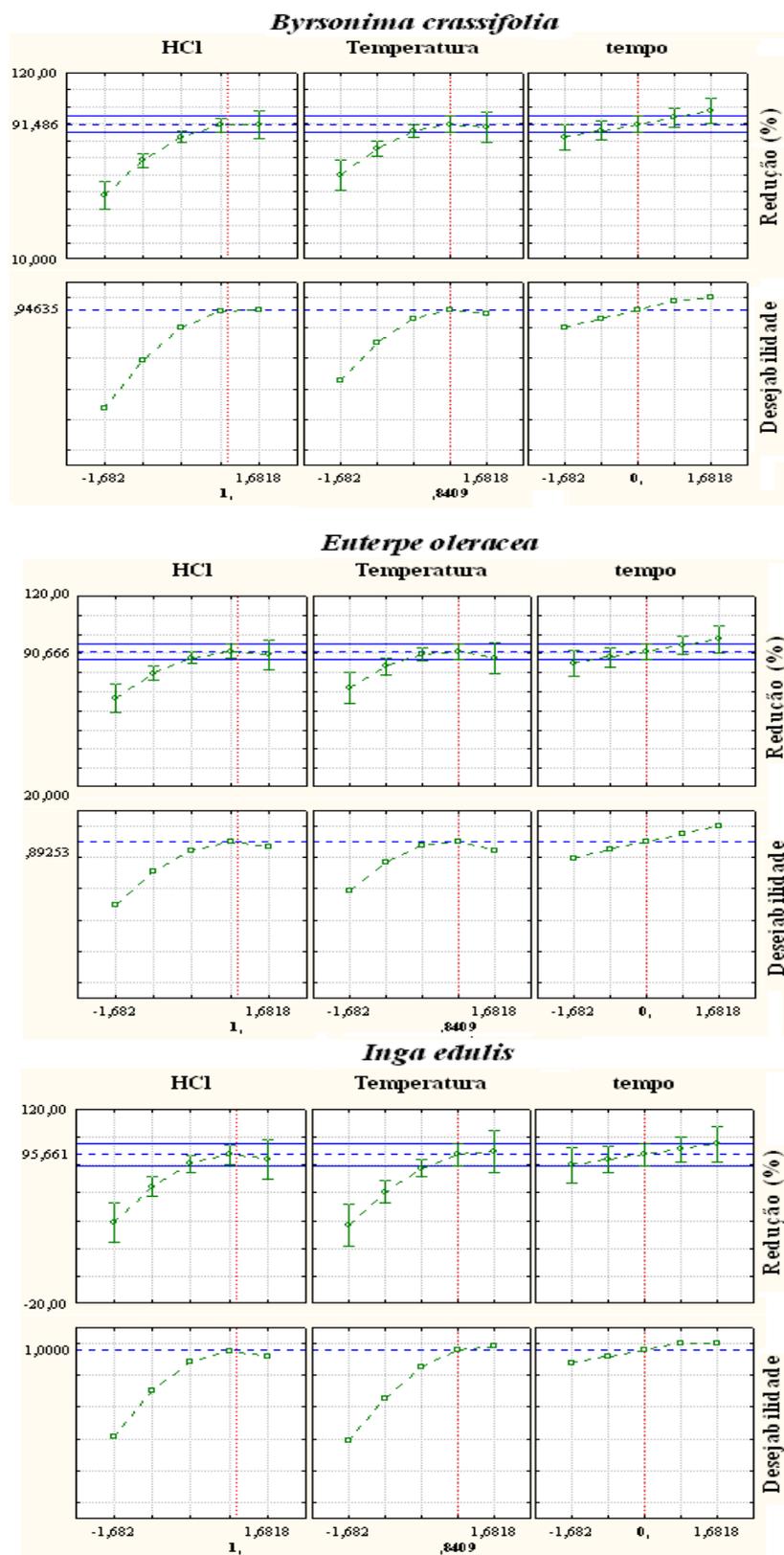


Figura 21 - Gráficos de desejabilidade para a redução de proantocianidinas dos três extratos vegetais.

Para verificar a adequação do modelo na predição das variáveis de resposta, uma condição ótima foi determinada através da desejabilidade máxima (D) para redução de proantocianidinas, redução de adstringência e concentração de cianidina. A escolha priorizou condições experimentais nas quais a redução de proantocianidinas e redução de adstringência fosse superior a 90% e 70%, respectivamente. A otimização das variáveis de resposta prevê o uso de HCl com concentração de 3N sob aquecimento a 88°C durante 165 minutos, para os três extratos vegetais. A Tabela 16 apresenta os valores preditos e obtidos experimentalmente para as variáveis de resposta.

Tabela 16 - Resultados preditos e experimentais para o modelo de superfície de resposta nas condições ótimas.

Variável de resposta	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Euterpe oleracea</i>		<i>Inga edulis</i>	
	Vpred ¹	Vexp ²	Vpred ¹	Vexp ²	Vpred ¹	Vexp ²
Redução de Proantocianidinas (%)	91,5±11,2	90,2±2,1	90,7±9,3	94,4±1	95,67±19,5	91,78±3,2
Redução da Adstringência (%)	87,8±3	79,3±6,7	81,91±33,2	77,2±5,3	75,4±9,2	77,85±7,8
Cianidina (mg/gES)	14,3±2,6	11,1±1,4	120±18,8	110±6,3	5,7±1,5	8,4±1,8

¹ Valor predito pelo modelo ± Intervalo de confiança 99% ² Valor experimental ± Intervalo de confiança 99%.

Os valores experimentais para redução de proantocianidinas, redução de adstringência e concentração de cianidina para os três extratos encontram-se dentro do intervalo de confiança de seus respectivos valores preditos. Isto mostra que o modelo proposto é adequado para explicar a influência das variáveis concentração de HCl, temperatura e tempos sobre o comportamento das variáveis de resposta.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos experimentalmente verifica-se que:

- A reação de clivagem ácida deve ser realizada em solução com 60% etanol;
- O modelo polinomial de 2ª ordem adaptou-se bem aos dados experimentais para todas as variáveis de resposta;
- A otimização da clivagem das proantocianidinas ocorre quando a mesma é realizada com HCl a uma concentração de 3N sob aquecimento a 88°C durante 165 minutos;
- Os modelos foram validados com sucesso, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos experimentalmente.

Nas condições propostas pelo modelo observou-se que o tratamento ácido ocasionou:

- Despolimerização da proantocianidinas e hidrólise dos flavonóides glicosilados resultando na diminuição da polaridade do extrato;
- Redução da adstringência, um dos fatores que limitam a utilização de extratos vegetais em alimentos;
- Formação de antocianidina durante a clivagem ácida;
- Conservação da capacidade antioxidante dos extratos.

Tais alterações ampliam o campo de aplicação dos extratos, possibilitando sua utilização no setor alimentício como antioxidante natural, inclusive na área de óleos e alimentos ricos em gordura, devido à formação de compostos apolares durante a clivagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAROWICZ, R.; TROSZYNSKA, A.; KOSINSKA, A.; LAMPARSKI, G.; SHAHIDI, F. **Relation between sensory astringency of extracts from selected tannin-rich foods and their antioxidant activity.** Journal of Food Lipids 15: 28–4, 2008.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The Anthocyanins. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.** Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

ARON, P.M.; KENNEDY, J.A. **Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity.** Molecular Nutritional Food Research, 52: 79 – 104, 2008.

BAJEC, M. R.; PICKERING, G. R. **Astringency: Mechanisms and Perception.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48: 1–18, 2008.

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

BAKOWSKA-BARCZAK, A. **Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – A review.** Polish Journal of Food And Nutrition Sciences, 14/55 (2): 107–116, 2005.

BAS, D.; BOYACI, I. H. **Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology.** Journal of Food Engineering, 78: 836–845, 2007.

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

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** *Talanta*, 76: 965–977, 2007.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. **Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their Spasmogenic Activity.** *Pharmaceutical Biology*, 33 (1): 25-32, 1995.

BRAVO, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.** *Nutrition Reviews*, 56: 317–333, 1998.

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

CHIN, Y. W.; CHAI, H.B.; KELLER, W. J. ; KINGHORN, D. **Lignans and Other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with antioxidant and cytoprotective activities.** *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56: 7759–7764, 2008.

CORREA A, M. D.; VOZZO, J. A. ***Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth** (Vol. 721). United States Department of Agriculture Forest Service, 2002.

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

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

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S.S.; TALCOTT, S. T. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells.** *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54 (4): 1222-1229, 2006.

DENISOV, E.T.; SARKISOV. O.M.; LIKHTENSHEIN, G.I. **Chemical kinetics: Fundamentals and new developments**. Moscow: Elsevier Inc., 2003.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. **Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante**. Química Nova, 15: 1-5, 2009.

DINNELA, C.; RECCHIA, A.; FIA, G.; BERTUCCIOLI, M.; MONTELEONE, E. **Saliva Characteristics and Individual Sensitivity to Phenolic Astringent Stimuli**. Chemical Senses 34: 295–304, 2009.

DONOVAN, J. L.; MANACH, C., RIOS, L.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. **Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3**. British Journal of Nutrition, 87:299–306, 2002.

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

GONTHIER, M. P.; DONOVAN, J. L.; TEXIER, O.; FELGINES, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. **Metabolism of dietary procyanidins in rats**. Free Radical Biological Medicine, 35: 837–844, 2003.

HAGERMAN, A. E. **The Tannin Handbook**. Internet. Disponível em: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>, 2002.

HART, H.; SCHUETZ, R. D. **Química orgânica**. Rio de Janeiro – RJ. Campus, 1983.

HE, J.; GIUSTI, M. **Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties**. Annual Review Food Science Technology, 1:163–87, 2010.

HEMINGWAY, R. W.; MCGRAW, G.W. **Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins**. Journal of Wood chemistry and technology 3(4): 421-435, 1983.

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

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

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

JAGANATH, I. B.; CROZIER, A. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. In: Fraga, C. G. **Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

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

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

LATTANZIO, V.; KROON, P. A.; QUIDEAU, S.; TREUTTER, D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. In: DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent advances in polyphenols research.** 1^a vol. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

LATHAM, J. L. **Cinética elementar da Reação.** São Paulo: Edgard Blücher, 1974.

LEONTI, M.; VIBRANS, H.; STICHER, O.; HEINRICH, M. **Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation.** Journal Pharmacy Pharmacology, 53(12):1653-69, 2001.

LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A. C. **Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences.** Americal Journal Clinical Nutrition, 81: 330S–5S, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** The American Journal of Clinical Nutrition 79(5),727-47. 2004.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAZARES LUNA, L.; MORENO GUTIÉRREZ, M.N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. **Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.** Journal of Ethnopharmacology, 66: 79–82, 1999.

MATHEUS, M. E.; FERNANDES, S. B. O.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. S.; FERNANDES, P. D. **Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression.** Journal Ethnopharmacology, 107:291-296, 2006.

MAZZA, G. J. **Anthocyanins and heart health.** Annali dell’Istituto Superiore Di Sanita, 43 (4): 369–374, 2007.

McRAE, J. M.; KENNEDY, J. A. **Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research .** Molecules, 16: 2348-2364, 2011

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Campinas – SP.3ªed. Unicamp, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. **Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro.** Journal Agricultural Food Chemistry. 56: 3593–3600, 2008a.

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

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

PRIOR, R. L.; GU, L. W. **Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet,** Phytochemistry, 66: 2264–2280, 2005.

RAISSI, S.; FARSAANI, R. E. **Statistical process optimization through multi-response surface methodology.** World Academy of Science, Engineering and Technology, 51, 2009.

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

RAZMARA, R. S.; DANESHFAR, A.; SAHRAEI, R. **Solubility of Quercetin in Water Methanol and Water Ethanol from (292.8 to 333.8) K.** Journal Chemistry Engineer Data, 55: 3934–3936, 2010.

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 and Medicine 26 : 1231–1237, 1999.

REHMAN, Z.; SHAH, W. H.; **Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes.** Food Chemistry, 9: 327–331,2005.

RICHARDSON, J. E.; PENNINGTON, R. T.; PENNINGTON, T. D.; HOLLINGWORTH, P. M. **Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees.** Science, 293: 2242-2245, 2001.

RIOS, L. Y.; BENNETT, R. N.; LAZARUS, S. A.; REMESY, C. **Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans.** American Journal Clinical Nutrition, 76: 1106–1110, 2002.

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

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

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

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A.; SHANBROM, E. **Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai).** Journal Agricultural Food Chemistry, 54: 8604-8610, 2006.

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

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

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. **Aspectos nutricionais de fitatos e taninos.** Revista de Nutrição, Campinas, 12(1): 5-19, jan./abr., 1999.

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

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. **Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region.** Journal Food chemistry, 101, 1012-1018, 2007a.

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

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

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica.** Vol.1. Rio de Janeiro-RJ. 7ª edição : LTC, 2001.

SOUZA, J. N. S.; SILVA. E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. **Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves.** Journal Brazilian Chemical Society, 18 (6): 1276-1280, 2007.

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

STEWART, R. **A investigação das reações orgânicas.** São Paulo-SP:Edgard Blücher, 1969.

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

TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. **Flavonoids as Nutraceuticals: A Review**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 7 (3): 1089-1099, 2008.

TOLEDO, M.L. **Experimentos de superfície de resposta (Response surface designs)** Internet, 2007. Disponível em: www.minitabbrasil.com.br/novidades/artigos/DOE

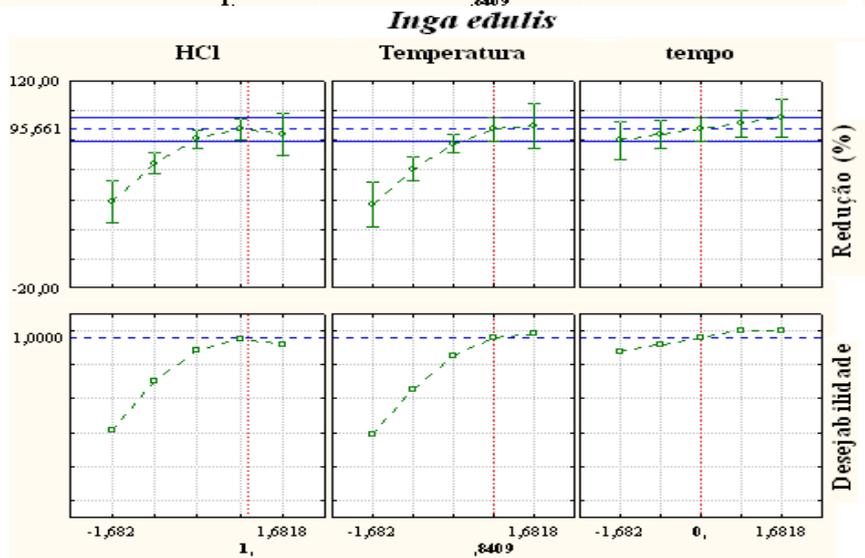
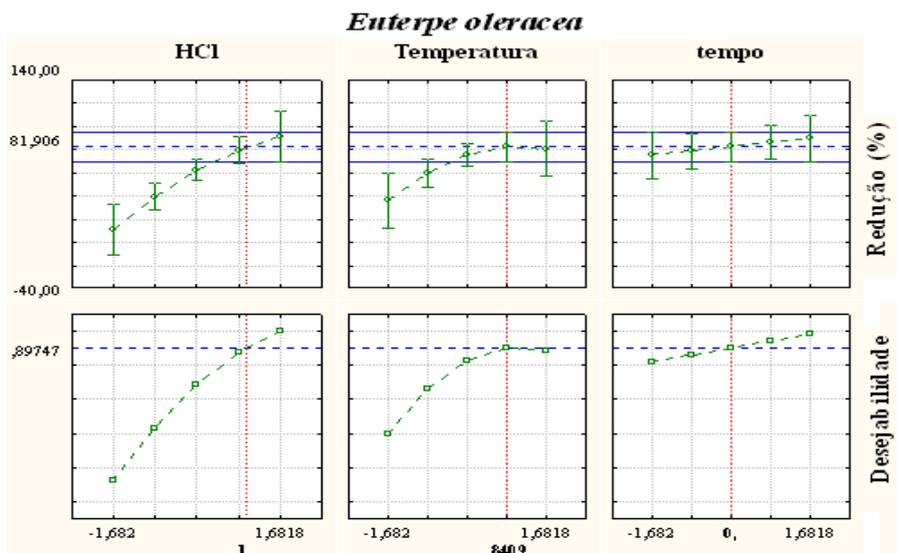
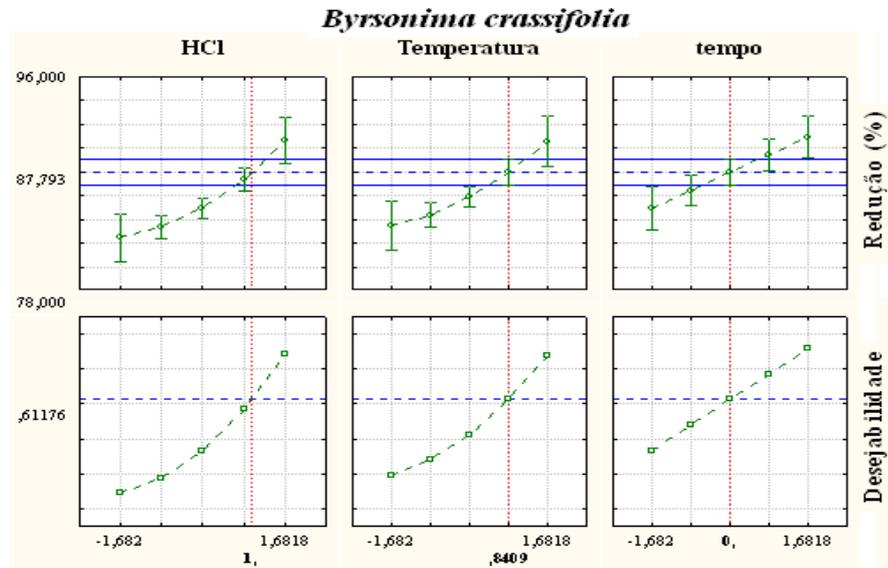
TSANG, C.; AUGER, C.; MULLEN, W.; BORNET, A. **The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of grape seed extract by rats**. British Journal Nutrition, 94: 170–181, 2005.

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

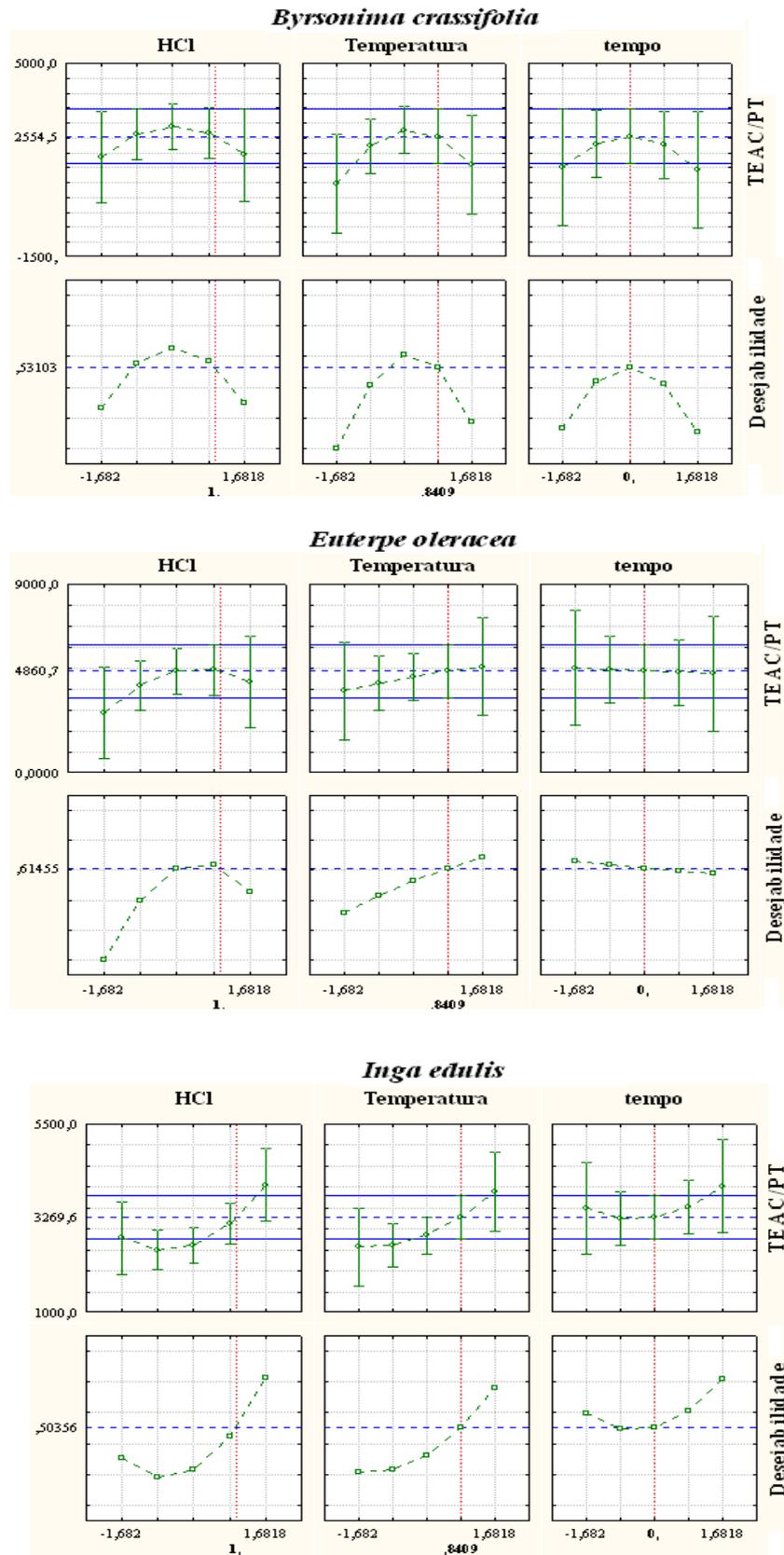
VIDAL,S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, N.; GAWEL,R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. **The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium**. Journal of the Science of Food and Agriculture 83:564–573, 2003.

ANEXO A - GRÁFICOS DE DESEJABILIDADE NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS

A) REDUÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA (%)



B) RELAÇÃO TEAC/PT



C) CONCENTRAÇÃO DE CIANIDINA (mg/gES)

