



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CEBOLA E *CHLORELLA***

**VÂNIA MACHADO RECART**

**Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Eliana Badiale Furlong**

Orientadora

**RIO GRANDE, RS**

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CEBOLA E *CHLORELLA***

VÂNIA MACHADO RECART

Bacharel e Licenciada em Química

Dissertação apresentada  
para a obtenção do título  
de Mestre em Engenharia  
e Ciência de Alimentos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELIANA BADIALE-FURLONG  
ORIENTADORA

RIO GRANDE – RS

2008

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado os meus caminhos.

Aos meus amáveis pais, Sidnei e Nelimar pelo amor, carinho e dedicação durante toda minha vida. Eternamente grata.

Aos meus queridos irmãos Eliane e Wagner pelo carinho, apoio e incentivo ao longo da caminhada. Amo vocês!

À minha avó Neli, pelo seu carinho, força e otimismo.

Ao adorável Miguel, pelo carinho, apoio e compreensão.

À prof. Dra. Eliana Badiale Furlong pela confiança, dedicação, incentivo e amizade. Sem a sua ajuda certamente este trabalho não seria possível.

À prof. Dra. Leonor de Sousa Soares, pelo seu apoio, incentivo e amizade.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Michele, Paula, Melissa, Cristina, Gini, Vivian, Jaqueline, Jesus pelas ajudas prestadas, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e principalmente pela amizade de vocês. De coração muito obrigada.

À graduanda Eliane Cicolatti, pela sua participação incansável durante o desenvolvimento do trabalho, pelo seu esforço, dedicação e amizade. Obrigada.

As colegas de laboratório Larine, Sthefani, Helen, Meritane, pelas ajudas prestadas, dicas e incentivo para realização deste trabalho.

À Islanda e Gicelda, que estavam sempre prontas para ajudarem.

Aos colegas da Escola Estadual de Ensino Médio Presidente Castelo Branco, pelo apoio, incentivo e compreensão para que pudesse ser atingida mais uma etapa da minha formação profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento do Curso de mestrado.

A EMATER – Rio Grande/RS pela cedência das amostras e informações prestadas no decorrer do trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

<b>SUMÁRIO</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>CAPÍTULO I</b> .....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivo Específico.....	15
<b>CAPÍTULO II</b> .....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 PROCESSOS OXIDATIVOS.....	17
3.1.1 Caracterização dos Processos Oxidativos.....	17
3.1.2 Causas de Oxidação nos Alimentos .....	18
3.1.3 Mecanismos Naturais de Defesa contra Processos Oxidativos .....	20
3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
3.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	22
3.4 ANTIOXIDANTES .....	23
3.4.1 Compostos Fenólicos .....	25
3.4.2 Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante .....	27
3.5 CEBOLA .....	29
3.5.1 Características Biológicas e Químicas.....	29
3.5.2 Produção e Consumo.....	31
3.5.3 Propriedades Terapêuticas.....	32
3.6 MICROALGA <i>CHLORELLA</i> .....	33
3.6.1 Microalgas e Cianobactérias .....	33
3.6.2 Microalga <i>Chlorella</i> .....	34
<b>CAPÍTULO III</b> .....	36
ARTIGO 1 .....	37

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS NA CEBOLA ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
RESUMO .....	38
ABSTRACT.....	38
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 Procedimentos Experimentais Gerais.....	40
2.2 Amostras.....	41
2.3 Planejamento para estudo das condições de extração de fenóis .....	41
2.4 Preparação dos extratos nas condições otimizadas .....	41
2.5 Determinação de fenóis totais nos extratos .....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 Indicativos de Mérito para o Método de Folin-Ciocalteau .....	45
4 CONCLUSÃO .....	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ARTIGO 2.....	48
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DIFERENTES CLASSES DE CEBOLAS CULTIVADAS NA REGIÃO SUL DO R.S.....	49
RESUMO .....	49
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 PARTE EXPERIMENTAL .....	52
2.1 Procedimentos Experimentais Gerais.....	52
2.2 Amostras.....	52
2.3 Determinação da Composição Centesimal.....	52
2.4 Propriedades Eletroquímicas .....	52
2.5 Determinação dos Fenóis Totais.....	53
2.6 Determinação da Atividade Específica das Enzimas Oxirredutases.....	53
2.6.1 Catalase .....	53
2.6.2 Peroxidase e Polifenoloxidase .....	54
2.7 Análise Estatística.....	54

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	55
3.1 Composição Centesimal das Cebolas.....	55
3.2 Conteúdo de Fenóis Totais .....	56
3.3 Atividade Específica de Enzimas Oxirredutases.....	57
4 CONCLUSÃO .....	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ARTIGO 3 .....	63
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE CEBOLAS COMERCIAIS E DA MICROALGA <i>CHLORELLA</i> .....	64
RESUMO .....	64
ABSTRACT.....	64
1 INTRODUÇÃO.....	65
2 PARTE EXPERIMENTAL .....	67
2.1 Reagentes.....	67
2.2 Amostras.....	67
2.3 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	67
2.4 Determinação da Atividade Antioxidante .....	68
2.4.1 Atividade Seqüestradora do Radical Livre DPPH .....	68
2.4.2 Atividade de Inibição Enzimática Oxidativas.....	68
2.4.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	70
3.1 Determinação de Fenóis Totais nas Amostras de Cebola e Chlorella .....	70
3.2 Determinação da Atividade Antioxidante .....	72
3.2.1 Capacidade de Seqüestrar o Radical Livre DPPH .....	72
3.2.2 Estudo da Inibição de Enzimas Oxidativas pelos Extratos em Estudo.....	75
3.2.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica .....	78
4 CONCLUSÃO .....	80
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
ARTIGO 4 .....	83
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROALGA <i>CHLORELLA</i> .....	84
RESUMO .....	84

ABSTRACT.....	84
1 INTRODUÇÃO.....	84
2 PARTE EXPERIMENTAL .....	85
2.1 Reagentes.....	85
2.2 Amostras.....	85
2.3 Caracterização da Amostra.....	86
2.4 Propriedades Eletroquímicas .....	86
2.5 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	87
4 CONCLUSÃO .....	87
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	89
4 CONCLUSÃO GERAL .....	90
<b>CAPÍTULO V</b> .....	91
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	92
<b>ANEXOS</b> .....	100
ANEXO 1 - TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 1.....	101
ANEXO 2 - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E TABELAS ESTATÍSTICAS DO ARTIGO 2.....	107
ANEXO 3 - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E TABELAS ESTATÍSTICAS DO ARTIGO 3.....	122

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica**

Tabela 1: Composição química da cebola em base úmida ..... 30

Tabela 2: Classificação comercial da cebola quanto às dimensões do bulbo..... 31

### **CAPÍTULO III – Artigo 2**

Tabela 1: Composição centesimal e propriedades eletroquímicas das diferentes classes de cebolas cultivadas em São José do Norte, R.S..... 55

Tabela 2: Compostos fenólicos totais em diferentes classes de cebola ..... 56

Tabela 3: Atividade específica da catalase e da peroxidase nas diferentes classes de cebolas. .... 58

### **CAPÍTULO III – Artigo 3**

Tabela 1: Resultados dos fenóis totais presentes nos extratos estudados..... 71

Tabela 2: Capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH (% de inibição) utilizando-se diferentes níveis de compostos fenólicos..... 73

Tabela 3: Conteúdo de fenóis totais, valores de Km, velocidades máximas e % de inibição das reações de escurecimento enzimático na presença dos extratos analisados. .... 76

Tabela 4: Índice de peróxido e concentração de malonaldeído em diferentes condições pró-oxidantes ..... 78

Tabela 5: Índice de peróxido, concentração de malonaldeído e % de inibição com adição do extrato antes do processo oxidativo ..... 79

### **ANEXOS – Artigo 1**

Tabela 1: Valores de conteúdo de fenóis ( $\mu\text{g}$  fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial  $2^4$  e 6 pontos centrais ..... 101

Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico ..... 102

Tabela 3: Valores de conteúdo de fenóis ( $\mu\text{g}$  fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial  $2^3$  e 3 pontos centrais ..... 102

Tabela 4: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico ..... 103

Tabela 5: Coeficiente de regressão para as variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico .....	103
Tabela 6: Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando rotação, tempo e interação da rotação com o tempo.....	103
Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais em cebola nas diferentes classes.....	103
Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias dos fenóis extraídos com metanol nas diferentes classes de cebola.....	104

## **ANEXOS – Artigo 2**

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina .....	114
Tabela 2: Procedimento da curva padrão de tirosina .....	115
Tabela 3: Teste de Tukey para umidade nas diferentes classes de cebola.....	118
Tabela 4: Teste de Tukey para cinzas nas diferentes classes de cebola .....	118
Tabela 5: Teste de Tukey para proteínas nas diferentes classes de cebola.....	118
Tabela 6: Teste de Tukey para fibra-bruta nas diferentes classes de cebola .....	119
Tabela 7: Teste de Tukey para pH nas diferentes classes de cebola.....	119
Tabela 8: Teste de Tukey para acidez nas diferentes classes de cebola .....	119
Tabela 9: Teste de Tukey para lipídios nas diferentes classes de cebola .....	119
Tabela 10: Teste de Tukey para carboidratos nas diferentes classes de cebola.....	120
Tabela 11: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com metanol para as diferentes classes de cebola .....	120
Tabela 12: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com água para as diferentes classes de cebola .....	120
Tabela 13: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com acetato de etila para as diferentes classes de cebola.....	120
Tabela 14: Teste de Tukey para atividade específica da enzima catalase nas diferentes classes de cebola .....	121
Tabela 15: Teste de Tukey para atividade específica da enzima peroxidase nas diferentes classes de cebola .....	121

### **ANEXOS – Artigo 3**

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina .....	123
Tabela 2: Procedimento da curva padrão de tirosina .....	125
Tabela 3: Procedimento da curva padrão de TMP .....	128
Tabela 4: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 15 minutos.....	129
Tabela 5: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 30 minutos.....	129
Tabela 6: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 45 minutos.....	130
Tabela 7: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 60 minutos.....	130
Tabela 8: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 15 minutos.....	131
Tabela 9: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 30 minutos.....	131
Tabela 10: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 45 minutos.....	132
Tabela 11: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 60 minutos.....	132
Tabela 12: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500 µL de extrato em 15 minutos.....	133
Tabela 13: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500 µL de extrato em 30 minutos.....	133
Tabela 14: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500 µL de extrato em 45 minutos.....	134
Tabela 15: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500 µL de extrato em 60 minutos.....	134

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica**

Figura 1: Esquema geral da autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados.....	19
Figura 2: Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos .....	23
Figura 3: Estruturas químicas de compostos fenólicos de ocorrência natural .....	25

### **CAPÍTULO III – Artigo 3**

Figura 1: Avaliação da variável tempo em função do percentual de inibição dos extratos... 75	75
Figura 2: Inibição da reação de escurecimento enzimático pelos extratos fenólicos de cebola e <i>chlorella</i> .....	77

### **ANEXOS – Artigo 1**

Figura 1: Superfície de resposta (a) e curva de contorno para fenóis (b) .....	105
Figura 2: Cinética de rendimento de extração de fenóis por tempo.....	106

## RESUMO

O trabalho tem como objetivo determinar propriedades funcionais de tecidos vegetal e microbiano visando fornecer subsídios para uma dieta saudável. O tecido vegetal escolhido para este estudo foi a cebola cultivada na região sul do Rio Grande do Sul e a microalga *chlorella*, que será avaliada como padrão de funcionalidade. As amostras de cebolas foram fornecidas e separadas em classes comerciais, conforme o Regulamento Técnico de Qualidade de Cebola, aprovado em 1995 pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, pelos técnicos da EMATER - Rio Grande. A composição centesimal, pH e acidez (AOAC, 2000) e os compostos fenólicos da cebola que foram extraídos em três sistemas solventes sob condições padronizadas (etanólico, aquoso, acetato de etila) e quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. Na microalga *chlorella* os fenóis foram extraídos em sistema solvente metanólico. O teor de lipídios foi determinado pelo método de Bligh & Dyer para ambas as matrizes, os açúcares redutores foram determinados conforme método do 3,5-DNS (MILLER) para as amostras de cebola e na microalga *chlorella* foi estimado por diferença. Nas cebolas foi estimada a atividade específica de catalase, peroxidase e polifenoloxidase. A estimativa do potencial funcional dos compostos fenólicos foi indicada pela capacidade de seqüestrar o radical livre (DPPH), inibição da ação de enzimas oxirredutases e inibição de produção de peróxidos e compostos oxidados em sistemas lipídicos. Nos extratos de cebola a média dos teores de fenóis em solvente metanol, água e acetato de etila foram respectivamente 2,3; 3 e 0,08 mg/g de cebola. Os valores para umidade variaram entre 88,3 e 88,6%, lipídios entre 0,16 e 0,19%, proteínas entre 0,86 e 1,04%, cinzas entre 0,73 e 0,76%, fibras entre 0,6 e 0,7%, açúcares redutores entre 3,73 e 5,2%, o pH entre 5,08 e 5,23, a acidez entre 0,29 e 0,38%. A microalga *chlorella* apresentou 56,9% de proteína, 4,1% de umidade, 6,3% de cinzas, 22,3% de açúcares redutores, 2,8% de fibra-bruta, 7,6% de lipídios, 0,2% de acidez e pH 5,7. A atividade específica da catalase nas diferentes classes de cebola variou entre 0,014 e 0,025 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteínas, sendo os maiores valores encontrados nas classes 2 e 3. A polifenoloxidase não foi detectada nas diferentes classes enquanto que a atividade específica da peroxidase variou entre 0,003 e 0,031 abs/min/mg proteínas. Todos os extratos apresentaram atividade seqüestradora do radical livre DPPH, porém o extrato de cebola extraído com acetato de etila foi o que apresentou maior inibição específica (53%) em relação aos demais. As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuíram em presença dos extratos de cebola e *chlorella*, o que caracteriza o efeito de inibição da oxidação do guaiacol catalisado pela peroxidase. O extrato mais promissor para evitar a oxidação ocasionada pela catálise metálica em sistema lipídico foi o extrato de cebola extraído com acetato de etila com uma inibição percentual de 53% acompanhado pela menor formação de peróxido (até três vezes menor) e de malonaldeído (1,5 vezes menor) ao longo do tempo do experimento.

Palavras-chave: antioxidante, enzimas, fenóis.

## ABSTRACT

The work has as objective to determine functional properties in vegetal and microbial tissues aiming at to supply subsidies a healthful diet. The tissue vegetal chosen for this study was the onion cultivated in the southern region of the Rio Grande do Sul and the microalgae *chlorella*, that it will be evaluated as functionality standard. The samples of onions had been supplied and separate in commercial classrooms, as the Regulation Technician of Quality of Onion, approved in 1995 for the Ministry of Agriculture, the Supplying and the Agrarian Reformation, for the technician of the EMATER – Rio Grande. The centesimal composition, pH and acidity (AOAC, 2000) and the phenolic composites of the onion that had been extracted in three solvent systems under conditions standardized (ethanolic, watery, acetate of etila) and quantified colorimetrically with reagent of Folin-Ciocalteau. In the microalgae *chlorella* the phenols had been extracted in methanolic solvent system. The content of lipids was determined by the method of Bligh & Dyer for both the matrices, the reducing sugars had been determined in agreement method of 3,5-DNS (MILLER) for the samples of onion and in the microalgae *chlorella* was esteem by difference. In the onions the specific activity of catalase was esteem, peroxidase and poliphenoloxidase. The estimate of the functional potential of phenolic composites was indicated by the capacity to scavenging the radical (DPPH), inhibition of the enzyme action oxirredutases and inhibition of production of peroxides and composites oxidated in lipídicos systems free. In onion extracts the average of phenol texts in solvent methanol, water and acetate of etila had been respectively 2,3; 3 and 0,08 mg/g of onion. The values for humidity had varied between 88,3 and 88,6%, reducing lipids between 0,16 and 0,19%, proteins between 0,86 and 1,04%, leached ashes between 0,73 and 0,76%, staple fibers between 0,6 and 0,7%, sugars between 3,73 and 5,2%, pH between 5,08 and 5,23, the acidity between 0,29 and 0,38%. The microalgae *chlorella* presented 56.9% of protein, 4.1% of humidity, 6.3% of leached ashes, 22.3% of reducing sugars, 2.8% of fiber-rude, 7.6% of lipids, 0.2% of acidity and pH 5,7. The specific activity of catalase in the different classrooms of onion varied between 0,014 and 0,025 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteins, being the biggest values found in classrooms 2 and 3. Poliphenoloxidase w as not detected in the different classrooms while that the specific activity of peroxidase varied between 0,003 and 0,031 abs/min/mg proteins. All the extracts had presented scavenging activity of free radical DPPH, however the extract of onion extracted with acetate of etila was what it presented greater specific inhibition (53%) in relation to excessively. The maximum speeds of the reaction of enzymatic blackout had diminished in presence of extracts of onion and *chlorella*, what it characterizes the effect of inhibition of the oxidation of guaiacol catalyzed by peroxidase. The extract most promising to prevent the oxidation caused for the metallic catalysis in lipídico system was the extract of onion extracted with ethyl acetate with a percentile inhibition of 53% followed by the lesser peroxide formation (up to three times lesser) and of malonaldeído (1,5 lesser times) to the long one of the time of the experiment.

Keywords: antioxidants, enzymes, phenols.

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A literatura apresenta a partir dos anos 90 um aumento no número de estudos demonstrando a importância do uso de antioxidantes, principalmente aqueles obtidos de extratos vegetais, microbianos e outros. Eles se mostram capazes de remover os radicais livres ou modularem a geração destas espécies oxidantes nos organismos ou em sistemas reacionais geradores destas estruturas.

Os vários estudos com tecidos vegetais e microbianos, que vem sendo realizados para caracterizar substâncias que apresentem propriedades funcionais em suas estruturas, são norteados pelo fato que o potencial funcional está diretamente relacionado às propriedades físico-químicas. Está demonstrado que alimentos ou substâncias possuem componentes que afetam processos metabólicos, fisiológicos, resultando efeitos benéficos à saúde, prevenindo ou diminuindo os sintomas de doenças crônicas degenerativas, tais como, arteriosclerose, hipercolesterolemia, diabetes e outras. Assim a avaliação deste potencial requer a caracterização físico-química dos constituintes presentes nas matrizes estudadas, isolamento e elucidação das estruturas moleculares, bem como a avaliação “in vivo” ou “in vitro” de indicativos dos efeitos benéficos à saúde de humanos e de animais de criação.

Entre os compostos bioativos, de origem vegetal, são encontradas estruturas variadas, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, ligninas, taninos, flavonóides, alcalóides e terpenóides, sendo todos quimicamente capazes de atuarem como agentes redutores, seqüestrantes de radicais livres, inativando a reatividade deles por desativação de seus elétrons desemparelhados.

Considerando que muitos vegetais de consumo disseminado na dieta são ricos em alguns tipos de compostos funcionais e que variáveis bióticas e abióticas de cultivo, colheita, armazenamento e preparo influenciam na disponibilidade de funcionais foram escolhidos para estes estudo a cebola e a microalga *chlorella*. Entre a grande quantidade de metabólitos secundários sintetizados pelos tecidos vegetais, que estão ganhando importância pela suas aplicações biológicas, principalmente no sentido de contribuir para melhoria da saúde da população destacam-se os compostos fenólicos. Os fenóis são compostos orgânicos que contêm um grupo hidróxi (-OH) ligado diretamente num anel benzeno. Ao contrário dos álcoois normais, os fenóis são ácidos devido à influência dos anéis aromáticos. Os fenóis participam em grande número de processos metabólicos de plantas, sendo que 60% da produção em biomassa da planta são compostos fenólicos, entre os quais, os fenóis monoméricos (ácido cinâmico) e poliméricos (tanino e lignina). A prevenção de processos oxidativos por estes fitoquímicos decorrente da estrutura característica pode torná-los adequados para sistemas aquosos ou lipídicos.

A cebola cultivada na região sul do Rio Grande do Sul e em diferentes partes do mundo é considerada sob o aspecto nutricional como fonte de vitaminas e sais minerais, além de apresentar propriedades terapêuticas comprovadas, como a proteção contra algumas infecções do aparelho digestivo, diminuição do nível de glicose no sangue e proteção contra a arteriosclerose. Pesquisadores demonstraram que a adenosina, presente na cebola, impede a formação de coágulos, podendo prevenir ataques cardíacos. Estudos também indicam que a cebola pode proteger contra o entupimento de artérias pelo colesterol, uma vez que elevam os níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDLs) protetoras. Outras recomendações populares sugerem a ingestão de grandes quantidades de cebolas para prevenir a hipertensão. Compostos de enxofre responsáveis pelo aroma da cebola bloqueiam o potencial cancerígeno de alguns compostos químicos. Além disso, a cebola contém substâncias que possuem um leve efeito antibacteriano.

A cebola (*Allium Cepa L.*) é uma das plantas cultivadas de mais ampla difusão no mundo, sendo a segunda hortaliça em importância econômica, com valor da produção estimado em cerca de US\$ 6 bilhões anuais. A produção mundial apresentou aumento de cerca de 25% na última década, o que coloca a cebola como uma das três hortaliças mais importantes ao lado do tomate e da batata. Somado a isto, o valor social da cultura de cebola é inestimável, sendo consumida por quase todos os povos do planeta, independente da origem étnica e cultural, constituindo-se em um importante elemento de ocupação de mão-de-obra familiar. Especialmente este aspecto é fundamental para o sul do Rio Grande do Sul, que tem esta cultura como uma das mais importantes para os pequenos agricultores da região sul do estado. No entanto, nem sempre o esforço da produção é compensado comercialmente, pois as condições climáticas, o sistema de armazenamento e transporte nem sempre propiciam que a cebola in natura atinja colocação satisfatória na classificação do Ministério da Agricultura.

A microalga *chlorella*, encontrada espontaneamente em tanques e lagos, foi descoberta pelos japoneses, tradicionais consumidores de algas, que apreciam e utilizam normalmente como complemento alimentar. Este povo atribui ao consumo desta alga sensação de bem estar e aumento de energia após um curto período de uso, associado à sua alta concentração de vitamina B<sub>12</sub> que é rapidamente incorporada nos processos metabólicos.

Esta alga é rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, por isto recomendada como suplemento alimentar, além disto, apresenta algumas propriedades importantes, como por exemplo, estimulante do sistema imunitário, auxílio nos regimes de emagrecimento, no tratamento de obesidade, em distúrbios digestivos e cardiovasculares, na geriatria, e nos níveis de colesterol e triglicérides elevados. Atualmente a China e o

Japão são os maiores produtores de *chlorella* onde é cultivada em escala industrial com processos biotecnológicos bem definidos e eficientes. Estes também estão sendo estudados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, visando ampliar escala de cultivo sustentável como alternativa para os produtores da região, rica em recursos hídricos que poderiam ser empregados para cultivo de microalgas.

No caso deste trabalho a escolha decorre da similaridade entre os efeitos benéficos à saúde a ela atribuídos serem similares aos das cebolas. Prevenir a oxidação ou envelhecimento das células é uma função importante, pois reduz os riscos de inúmeras doenças crônicas degenerativas e se isto fica demonstrado através dos alimentos pode se adotar interferências seguras na dieta da população, agregar conhecimento aos saberes populares, gerar alternativas para a produção de alimentos e emprego de seus resíduos. A consequência disto são benefícios em diferentes níveis tais como sociais, do agronegócio e saúde pública.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

Caracterizar compostos bioativos presentes em tecidos vegetais e microbianos, visando fornecer subsídios para uma dieta saudável.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ❖ Determinar a composição centesimal de cebolas de diferentes classes comerciais e da microalga *chlorella* empregada como suplemento alimentar.
- ❖ Determinar o conteúdo de fenóis totais em extratos de cebola e *chlorella* amostradas.
- ❖ Medir o potencial antioxidante dos compostos fenólicos das amostras em sistemas aquosos e lipídicos.
- ❖ Avaliar a atividade de enzimas óxido-redutases nas diferentes classes de cebola produzidas na região sul do Rio Grande do Sul.

## **CAPÍTULO II**

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. PROCESSOS OXIDATIVOS**

##### **3.1.1. Caracterização dos Processos Oxidativos**

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando manter um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbicos, contudo, espécies reativas formadas intracelularmente a partir do oxigênio ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, e podem comprometer processos biológicos importantes (RIBEIRO e et al., 2005).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares (JORDÃO et al., 1998). As espécies reativas de oxigênio (EROs) atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-álíco, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (SOUSA et al 2007; SINGH e RAJINI, 2004; RAMALHO e JORGE, 2006).

Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento, e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (GUTTERIDGE, 1993; KEHRER e SMITH, 1994; HALLIWELL, 2000). Os radicais livres são moléculas instáveis, pelo fato de seus átomos possuírem um número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, estas moléculas reagem com substâncias que apresentam elétrons desemparelhados (JORDÃO et al., 1998; HALLIWELL, GUTTERIDGE e CROSS, 1992). Estas estruturas podem ser formadas no ambiente ou nos seres vivos em presença de luz, temperatura, compostos metálicos ou como intermediários em reações metabólicas.

Para evitar os danos causados pelas EROs, os organismos desenvolveram vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que ao estarem presentes em pequenas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação do mesmo (BIANCHI e ANTUNES, 1999; HALLIWELL et al., 1995). Estes

antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, visto que a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação de radicais, necessitando estar presentes em quantidades suficientes para neutralização dos efeitos dos radicais livres normalmente produzidos. Quando esta equivalência não existe, pode-se dizer que está ocorrendo um estresse oxidativo.

### 3.1.2. Causas de Oxidação nos Alimentos

Após a colheita de frutas e hortaliças inicia-se uma série de processos degradativos que aceleram a senescência, causando perdas de grande parte da produção. Diversas dessas perdas podem ser atribuídas à ação de enzimas durante a pós-colheita (ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006). A peroxidase e a polifenoloxidase têm sido consideradas as principais enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade em muitas frutas e vegetais. Estas enzimas podem participar de um grande número de reações oxidativas e de biodegradação, tais como mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético, biossíntese da lignina, e muitos destes fatores também podem ser associados com *flavour*, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (VALDERRAMA, MARANGONI, CLEMENTE, 2001; ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006; CARNEIRO, ROLIM e FERNANDES, 2003).

Os óleos, gorduras e os alimentos que os contêm estão sujeitos a reações químicas que podem alterar as características do produto final de maneira indesejável, modificando as qualidades organolépticas, além de efeitos tóxicos causados pela ingestão contínua de produtos rancificados. Estas reações de degradação dos lipídios, também chamadas de rancidez ou rancificação, são os processos de deterioração mais importante nesses produtos e podem ocorrer durante o processamento, estocagem e utilização dos produtos (BOBBIO e BOBBIO, 1992; ZAMBIAZI, 1999).

Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos e usualmente o início são as reações hidrolíticas catalisadas pelas enzimas lípase ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres. A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas. O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando

hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos. A autoxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras. A autoxidação dos lipídios está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; RAMALHO e JORGE, 2005).

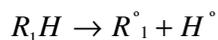
**Iniciação:** Ocorre a formação dos radicais livres devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor.

**Propagação:** Os radicais livres são susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, sendo convertidos em outros radicais, gerando produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

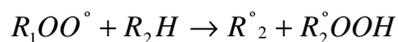
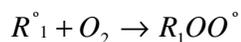
**Término:** dois radicais se combinam, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

O mecanismo da autoxidação dos lipídios, esquematizado na Figura 1, é tradicionalmente descrito como uma reação em cadeia:

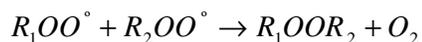
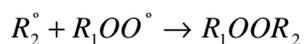
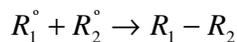
#### INICIAÇÃO



#### PROPAGAÇÃO



#### TERMINAÇÃO



**Figura 1: Esquema geral da autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados**

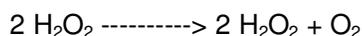
### 3.1.3. Mecanismos Naturais de Defesa contra Processos Oxidativos

Para se protegerem contra a oxidação, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos (YU, 1994). O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (RIBEIRO et al., 2005; YU, 1994).

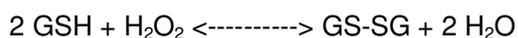
A superóxido dismutase (SOD) age transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, a qual é uma reação normal em pH fisiológico porém muito acelerada através desta enzima. Possui meia vida curta (menos de dez minutos) e não penetra nas células. A SOD pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado a mesma (cobre e zinco no citoplasma de eucariontes, manganês na matriz mitocondrial, ferro em bactérias) (RIBEIRO et al., 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; BATELLO, 2002; YU, 1994).

Outro antioxidante enzimático é a catalase, que possui a capacidade de transformar peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro que possuem pouco peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante desta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea, através da catalase eritrocitária (RIBEIRO et al., 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; BATELLO, 2002; YU, 1994).

#### Catalase



O peróxido de hidrogênio também pode ser transformado pela ação da enzima glutathione peroxidase (GPx), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre através da redução do peróxido de hidrogênio e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutathione (GSH), um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina que atua como co-substrato da glutathione peroxidase, com propriedade de doador de elétrons. A glutathione redutase (GR) regenera o glutathione com a transferência de hidrogênio do NADPH. Neste processo são transferidos dois hidrogênios dos grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, resultando em glutathione dissulfeto (GSSG). A glutathione peroxidase geralmente ocorre associada ao selênio, mas também pode ocorrer independente. Os principais locais de ação deste mecanismo são o fígado, os eritrócitos, o coração, os pulmões e músculos (RIBEIRO et al., 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; BATELLO, 2002; YU, 1994).

**GSH-Px (selênio)****Glutationa redutase**

Outro mecanismo de defesa do organismo é a não-enzimática. Alguns nutrientes essenciais podem neutralizar diretamente os radicais de oxigênio, como por exemplo, a vitamina E, vitamina A, carotenóides, ácido ascórbico e uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos, tais como, a ubiquinona, a ceruplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (HALLIWELL, 1990; CUTLER, 1991; SIES, 1991).

**3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS**

Os processos vitais de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos animais e vegetais. Muitas dessas substâncias, especialmente as de origem vegetal, encontram emprego utilitário em diversas áreas aplicadas à alimentação e à saúde (MATOS, 1997).

Os compostos resultantes desse metabolismo podem ser separados em produtos do metabolismo primário que são os glicídios, protídios e lipídios, e os do metabolismo secundário, que são os compostos terpênicos, alcalóides, glicosídios e vários outros. Os primeiros são estudados, principalmente, no âmbito da bioquímica e os últimos no âmbito do que se convencionou denominar química de produtos naturais. A fitoquímica tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através do seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (MATOS, 1997).

Desde os primórdios da história da humanidade há relatos mostrando que o homem sempre utilizou plantas na cura de doenças. Entretanto, foi apenas no início do século XIX que Sertürner isolou a morfina do ópio, sendo este considerado o primeiro composto bioativo (PARTINGTON, 1989). A partir deste fato, cresceu consideravelmente o interesse no isolamento de novos compostos naturais apresentando bioatividades e, nos últimos anos, com o advento e a sofisticação de técnicas analíticas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e outras, o isolamento e a elucidação estrutural de novas substâncias, mesmo complexas, tornou-se trivial (GIACOMINI et al., 2005).

Dentre as diversas classes de produtos naturais, os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas derivados da fenilamina e tirosina (NACZK e SHAHIDI, 2004), cujas estruturas químicas possuem potencial para atuarem como agentes redutores, seqüestramentos de radicais livres, inativando a reatividade deles por desativação de seus elétrons desemparelhados.

### **3.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS**

As propriedades funcionais são aquelas que conferem ao sistema em que se encontram efeitos físicos, químicos ou fisiológicos específicos. Com a evolução da instrumentação analítica e do conhecimento metabólico o efeito específico destes compostos passou a ser associado as suas estruturas químicas. A partir disto foram sendo elucidadas as participações destes compostos nas reações bioquímicas, a exemplo do já conhecido efeito tecnológico de alguns macronutrientes como as proteínas, carboidratos e lipídios na década de 70. Para distinguir o termo funcional de caráter tecnológico do funcional fisiológico alguns países, inclusive o Brasil passaram a legislar sobre as alegações de funcionalidade em alimentos.

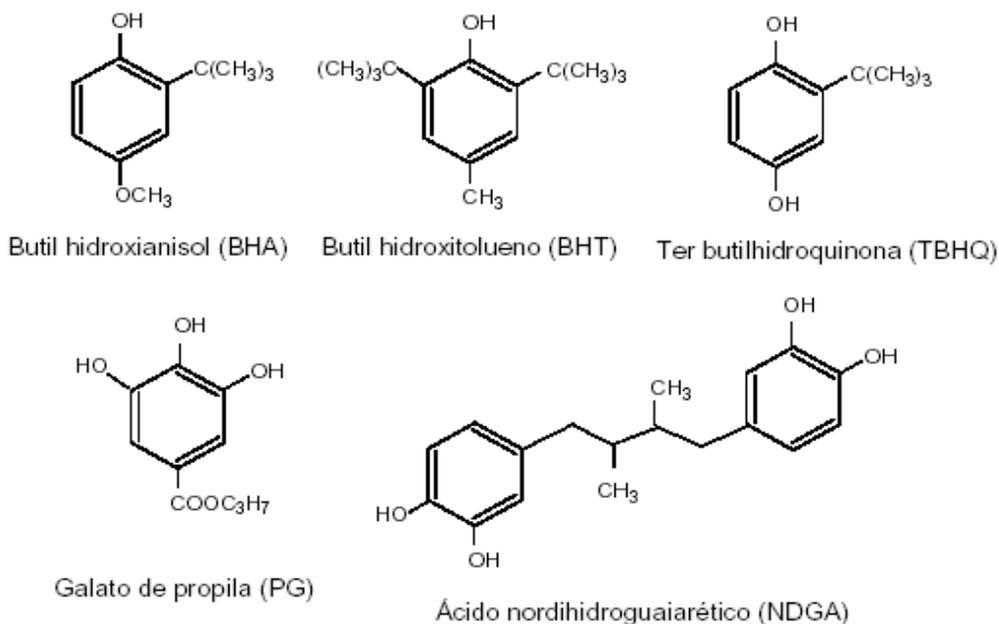
A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1999 definiu alguns termos visando facilitar o processo de alegação de funcionalidade de alguns alimentos. “Propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.” “Propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

Segundo PASTORE (2005) existe diversos grupos químicos aos quais se atribuem propriedades terapêuticas, ou redutoras de riscos à saúde, que confere esta característica especial aos alimentos que são denominados funcionais. Como exemplo pode ser citado os compostos fenólicos do tipo flavonóides, que são antioxidantes encontrados em vegetais de cores roxa, azul ou violeta (uva, cereja, berinjela). Possuem atividade antiinflamatória, evitam a aglomeração das plaquetas sanguíneas e a ação de radicais livres no organismo, protegendo desde o código genético (DNA) aos lipídios, desta forma abortando os processos carcinogênicos (POKORNY, 1991; WACH, PYRZYNSKA e BIESAGA, 2007). A quercetina e seus derivados têm recebido atenção especial entre os constituintes da dieta alimentar, em função de estudos epidemiológicos apontarem estes compostos como preventivos a doenças cardiovasculares e câncer, tal atividade deve-se a ação antioxidante exercida pelos mesmos (WACH, PYRZYNSKA e BIESAGA, 2007).

### 3.4. ANTIOXIDANTES

Os mais abundantes antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila podendo ser sintéticos ou naturais. Entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos tem-se, o BHA (butil hidroxianisol) e o BHT (butil hidroxitolueno) apresentando boa resistência a processos de forneamento, embora inadequadas à fritura. TBHQ (terc-butil hidroquinona) é um sólido de cor bege, mais eficiente que o BHA e BHT, introduzido como antioxidante na década de 70 é por sua vez particularmente efetivo na estabilização de óleos altamente insaturados, apresentando-se bastante eficiente em produtos submetidos à fritura (BANNWART e TOLEDO, 1999). O BHA é uma mistura de isômeros 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol e 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol ( $C_{11}H_{16}O_2$ ), é um sólido de aspecto ceroso e cor branca ou amarelada e possui fraco odor aromático característico. O BHT, também, conhecido como 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxitolueno, sua fórmula molecular ( $C_{15}H_{24}O$ ) e se apresenta como um pó branco.

São usados ainda como antioxidantes sintéticos o galato de propila e o palmitato de ascorbila. O Galato de propila é um sólido cristalino, pouco solúvel em água, muito solúvel em compostos orgânicos e pouco solúvel em óleos. É produzido a partir do ácido gálico e exibe excelente atividade antioxidante em alimentos e óleos vegetais, especialmente em combinação com o palmitato de ascorbila. O Palmitato de ascorbila é um composto sintético obtido de dois produtos naturais, ácidos palmítico e ascórbico, é um sólido cristalino branco, pouco solúvel em água, solúvel em etanol e outros solventes polares. A figura 2 apresenta as estruturas químicas dos compostos BHA, BHT, TBHQ e Galato de Propila.



**Figura 2: Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos**

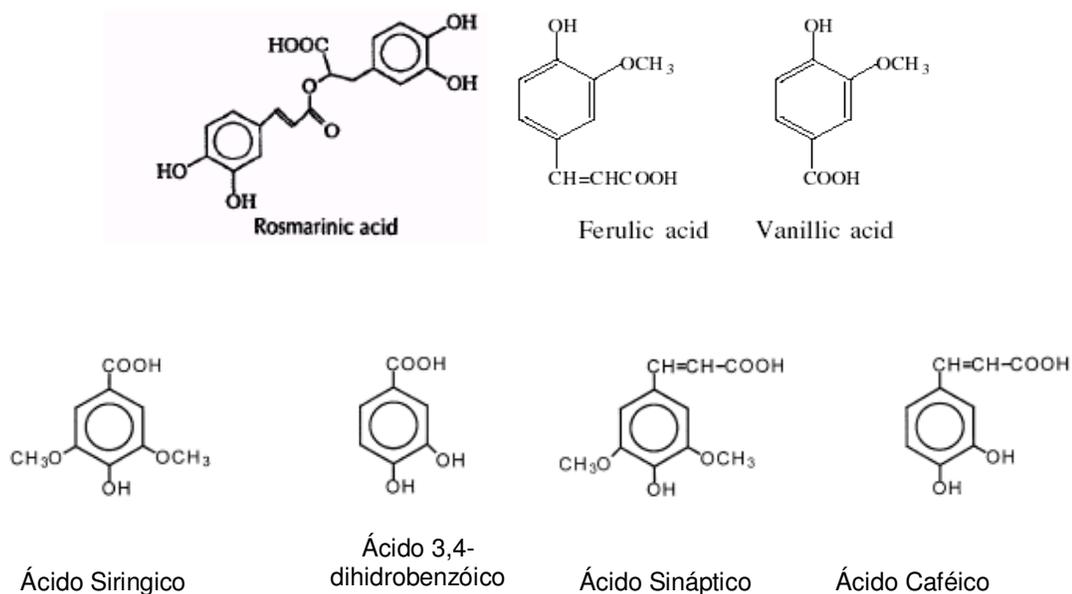
Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais. Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação não está clara (RAMALHO e JORGE, 2006). A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células foram atribuídas ao uso de TBHQ. Por estes motivos, o uso de antioxidantes em alimentos é limitado.

Tendo em vista dos indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir sua quantidade em alimentos. Entre os compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais temos os flavonóides, taninos, cumarinas, xantonas, terpenos, tocoferóis, ácidos fenólicos e outros (IQBAL, BHANGER e ANWAR, 2007). Eles podem ser encontrados em vários alimentos e plantas, tais como, frutas, vegetais, sementes, cereais, ervas, especiarias e óleos (IQBAL, BHANGER e ANWAR, 2007; PAZOS et al., 2007; DIMITRIOS, 2006).

Nos sistemas alimentícios, naturalmente ocorrem antioxidantes, como os tocoferóis e o ácido ascórbico, e protegem contra a oxidação lipídica pelas reações quelantes de radicais livres ou varrendo o oxigênio. No entanto, os antioxidantes naturais são freqüentemente perdidos durante o processo ou estocagem, necessitando da adição de antioxidantes endógenos que efetivamente retardem o início da oxidação lipídica (AARDT et al., 2004).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático apresentada por essas substâncias (RAMALHO e JORGE, 2006; PAZOS et al., 2007).

A figura 3 apresenta a estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados naturalmente em vegetais.



**Figura 3: Estruturas químicas de compostos fenólicos de ocorrência natural**

O fato de que uma substância ser natural e comumente encontrada em alimentos não garante que esta não é tóxica. Estes compostos podem possuir menor toxicidade, ou ser menos carcinogênicos ou mutagênicos. Os antioxidantes sintéticos são constantemente testados para estes efeitos, mas muitos compostos naturais não foram testados. A indústria dos alimentos procura a aceitação dos consumidores para os seus produtos, porém é importante primar pela utilização de aditivos reconhecidamente seguros, testados antes do uso.

### 3.4.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos orgânicos que contêm um grupo hidróxi (-OH) ligado diretamente num anel aromático. Ao contrário dos álcoois normais, os fenóis são ácidos devido à influência do anel aromático, que conferem a estrutura um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HALLIWELL et al., 1995). A distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos e células vegetais varia consideravelmente de acordo com espécie e tipo de função a exercer, situando-se no interior de células ou na parede celular (MARTINEZ-VALVERDE; PERIOGO; ROS, 2000).

Os maiores grupos dos agentes fenólicos com propriedades antioxidantes incluem os fenóis neutros, os ácidos fenólicos, flavonóides, isoflavonas, flavonas, antocianinas,

catequinas e outros fenólicos presentes naturalmente em frutas e vegetais (OLIVEIRA, 2005; DIMITRIOS, 2006).

Estes compostos são classificados em três categorias, aqueles pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza. Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002). Os polímeros são fenóis que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas. Os compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza podem se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING e YOUNG; 1999)

As estruturas fenólicas são encontradas em frutas cítricas, como o limão, laranja e tangerina, além de outras frutas a exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, usualmente em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (PIMENTEL, FRANCKI e GOLLÜCKE, 2005; DIMITRIOS, 2006).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (AGUIAR et al., 2007; KING e YOUNG; 1999)

A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica presentes nos alimentos. A solubilidade deles varia com os substituintes das cadeias carbonadas cíclicas, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes dos tecidos onde se encontram. Os solventes mais utilizados para a extração são: metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes (ANGELO e JORGE, 2007).

MALACRIDA e MOTTA (2005) quantificaram as concentrações de compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva reconstituídos e simples, de diferentes marcas, disponíveis no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (Minas Gerais). O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado espectrofotometricamente e os teores encontrados variaram entre 0,3 e 2,4 g/L e as concentrações de antocianinas de 1,2 a 67 mg/L.

Outro tipo de fonte de compostos fenólicos foi estudado por FUNARI e FERRO (2006) que realizaram determinações em própolis seguindo a recomendação do Ministério da Agricultura que recomenda a quantificação dos teores de flavonóides e fenóis totais além de exame organoléptico, perda por dessecação a 105°C, teores de cinza e de cera, resíduo insolúvel em metanol e resíduo seco. Os teores de fenóis totais foram quantificados tendo ácido gálico, tomado como substância de referência e o valor encontrado na amostra analisada foi de 7,4%, que atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, de 5%. Os resultados permitiram observar que, excetuando-se perda por dessecação a 105°C, todos os demais parâmetros estiveram dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

#### **3.4.2. Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante**

A quebra da cadeia reacional da oxidação lipídica pelos antioxidantes não ocorre segundo um mecanismo simples, e certos aspectos, relativos às interações entre constituintes de meios complexos, não estão completamente esclarecidos. O emprego de antioxidantes em formulações é muitas vezes empírico, de tal modo que a garantia da sua eficácia nem sempre existe. Tendo em vista uma rápida avaliação da capacidade e eficácia antioxidante de compostos químicos ou extratos vegetais, bem como o estudo dos mecanismos de ação antioxidante, estão descritos na literatura diversos trabalhos (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). Os diversos métodos propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais livres gerados ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para a sua detecção e quantificação.

Na maioria dos casos recorre-se à formação de radicais instáveis, pela decomposição térmica de azo iniciadores (*e.g.* ABAP, AMVN, AAPH), os quais reagem rapidamente com o oxigênio originando radicais peróxido. Estes atuam sobre um substrato lipídico (*e.g.* ácido linoléico ou um dos seus ésteres) desencadeando um processo de lipoperoxidação, em relação ao qual se escolhe um determinado indicador (como o consumo de oxigênio, desaparecimento do substrato lipídico ou aparecimento de produtos de oxidação) que é quantificado antes e após a adição de um composto antioxidante (avaliação da atividade *scavenger*). Alguns autores propõem outros tipos de testes que não recorrem à

oxidação de substratos lipídicos, mas à redução de radicais livres estáveis gerados *in vitro*, como resultado da atividade *scavenger* de compostos antioxidantes.

Existem diversas maneiras de avaliar a atividade antioxidante, entre elas, a oxidação forçada de um substrato lipídico, que consiste em colocar num sistema reacional apolar um ácido linoléico ou linoleato de metila sob aquecimento a 110°C e corrente de oxigênio. A diminuição da concentração do linoleato de metila é acompanhada por cromatografia gasosa e a atividade antioxidante é avaliada pelo aumento do tempo de semi-vida do substrato de oxidação na presença do antioxidante. A utilização deste teste encontra-se condicionada pela solubilidade e estabilidade térmica dos antioxidantes no meio reacional. A oxidação do ácido graxo insaturado (ácido linoléico ou linoleato de metila) pode ser acelerada utilizando um iniciador radicalar ou um pró-oxidante contendo íons  $Fe^{3+}$  (e.g.hemoglobina), evitando deste modo o aquecimento e oxigenação intensivos (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

A atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo (e.g. ácido linoléico). A determinação é efetuada a 470 nm, na presença e na ausência de um antioxidante (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; ALMEIDA et al., 2006).

Um dos métodos mais utilizados para determinar capacidade de um antioxidante de seqüestrar um radical livre trata-se do método de seqüestro do radical DPPH, que consiste na redução do radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH•), que apresenta um máximo de absorção a 517-520 nm. Ao fixar um  $H^{\bullet}$ , abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorvência, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH•. Trata-se de um teste rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SOUSA et al., 2007; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; ALMEIDA et al., 2006).

PASSOTTO, PENTEADO e FILHO (1998) avaliaram a atividade antioxidante da vitamina A na forma de acetato de retinol e de seu principal precursor, o  $\beta$ -caroteno, adicionados a um sistema de óleo de soja previamente sensibilizado à oxidação. Os parâmetros utilizados como grau de atividade oxidativas foram: índice de peróxidos, teores de malonaldeído durante os intervalos de 24 a 72 horas, e perfil dos ácidos linoléico e linolênico após 144 horas de oxidação. Os resultados mostraram que o retinol apresentou atividade antioxidante superior ao  $\beta$ -caroteno. As atividades antioxidantes foram comparáveis às do butilhidroxitolueno (BHT).

SOUSA et al (2007) determinaram os fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteu e avaliaram a atividade antioxidante, pelo ensaio do DPPH, do extrato de cinco plantas

medicinais: *Terminalia brasiliensis*, *Terminalia fagifolia*, *Cenostigma macrophyllum*, *Qualea grandiflora* e *Copernicia prunifera*. Os resultados mostraram que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, mas o extrato etanólico de cascas de *T. brasiliensis*, com maior atividade antioxidante ( $CE_{50}= 27,6$ ) mostrou-se comparável aos controles positivos, rutina ( $CE_{50}= 27,8$ ) e ácido gálico ( $CE_{50}= 24,3$ ). CE significa a quantidade de extrato das plantas testadas para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

### **3.5. CEBOLA**

#### **3.5.1. Características Biológicas e Químicas**

A cebola (*Allium cepa L.*) é um bulbo de caule cônico pouco desenvolvido, maciço, envolto por folhas modificadas, as quais se apresentam como túnicas superpostas. É uma planta subterrânea, cujas raízes partem da porção inferior deste caule. As folhas, tipo túnicas ou escamadas, representam à porção comestível que têm como função o armazenamento de nutrientes para outras porções do vegetal durante o ciclo de vida (GEMTCHÚJNICOV, 1976; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1996).

As variedades de cebola existentes no mercado são inúmeras e os modos de classificar seus cultivares são: quanto ao fotoperíodo (de dias curtos, longos ou intermediários); quanto ao formato do bulbo (periforme, chato, redondo, bojudo, outros); quanto à coloração das escamas (amarelas, roxas, brancas, verdes); quanto ao sistema de plantio (sistema de mudas ou semeadura direta); quanto à finalidade (para mesa, conservas, molhos, outros) (MINAMI, ANDRADE e LIMA, 1980).

Dentre os constituintes da cebola, destaca-se o seu grande conteúdo de água, em média 90%, sendo o restante constituído basicamente por carboidratos. Observa-se também, em quantidades menores, a presença de proteínas, de vitamina C e ácidos orgânicos como são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1: Composição química da cebola em base úmida**

<b>Composição bulbo maduro <i>in natura</i></b>	
<b>(100 g de porção comestível)</b>	
Valor energético (Kcal)	45
Umidade (%)	85 – 90,5
Carboidratos (%)	6,5 – 11,5
Lipídios (%)	0,1 – 0,2
Compostos nitrogenados (g)	1,5 – 2,0
Fibras (g)	0,5 – 0,6
Cinzas (g)	0,4 – 0,6
Ca (mg)	30
P (mg)	40
Fe (mg)	1,0
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,03
Niacina (mg)	0,3
Ac. Ascórbico (mg)	10
Ac. Málico (mg)	170
Ac. Cítrico (mg)	20

**Fonte: MARTINS (2003)**

A cebola apresenta ainda compostos orgânicos sulfurados que conjuntamente com os carboidratos, conferem gosto acre açucarado. As essências voláteis da cebola são várias, porém as mais importantes são as sulfuradas. A composição química e as características sensoriais de cor, aroma e sabor, dependem do cultivar, das condições de cultivo e do solo. (RANDLE, 1997; HAMILTON, 1998).

### 3.5.2. Produção e Consumo

A cebola é uma das plantas cultivadas de mais ampla difusão no mundo, sendo a segunda hortaliça em importância econômica. A produção mundial apresentou aumento de cerca de 25% na última década, o que coloca a cebola como uma das três hortaliças mais importantes ao lado do tomate e da batata (EMATER, 2007). Somado a isto, o valor social da cultura de cebola é inestimável, sendo consumida por quase todos os povos do planeta, independente da origem étnica e cultural, constituindo-se em um importante elemento de ocupação de mão-de-obra familiar.

A portaria n° 529, o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária aprovou em 1995 o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade da Cebola, o qual apresentou as seguintes normas para o comércio da cebola “in natura”. A cebola é bulbo pertencente à espécie *Allium cepa L.*, cujos defeitos graves apresentados neste são o talo grosso, brotado, podridão, mancha negra e mofado. Os defeitos leves são o colo mal formado ou deformado do bulbo, a falta de revestimento externo, falta de turgência e os danos mecânicos (EMATER, 2007)

A cebola é classificada de acordo com as dimensões e a qualidade do bulbo. A Tabela 2 apresenta a classificação comercial dos bulbos em relação ao seu diâmetro transversal, composta por quatro classes de tamanho.

**Tabela 2: Classificação comercial da cebola quanto às dimensões do bulbo**

Classes ou calibres	Maior diâmetro transversal do bulbo (mm)
2	Maior que 35 até 50
3	Maior que 50 até 70
4	Maior que 70 até 90
5	Maior que 90

**Fonte: EMATER (2007)**

A cebola que não atender aos requisitos da norma é classificada como “fora do padrão” e comercializada somente com tal designação na embalagem de comercialização, no que diz respeito ao comércio em território nacional. São desclassificadas e proibidas para comercialização toda a cebola que apresentar resíduos de substâncias nocivas a saúde (acima dos níveis admitidos no âmbito do MERCOSUL) e que apresentar mau estado de conservação, sabor e odor estranho (EMATER, 2007).

Na FURG já foram realizados alguns estudos com cebola, mas todos voltados para o estudo do processo de secagem, especialmente no aspecto físico do fenômeno de transporte.

MARTINS e PINTO (2003) realizaram ensaios de secagem de cebola, visando estudar as influências da forma (rodeadas e picadas), do sentido de escoamento de ar (baixo/cima e cima/baixo) e da carga do material (4 e 6Kg/m<sup>2</sup>) na caracterização da secagem. Entre os fatores estudados, a forma foi o que apresentou maior significância estatística, tanto para primeira como para segunda etapa de secagem. Os maiores valores para as constantes de secagem da primeira e da segunda etapas foram alcançados com a carga 4 Kg/m<sup>2</sup> e direção de escoamento do ar de cima para baixo.

MARTINS, PORTO e PINTO (2004) estudaram a cinética de secagem da cebola em camada delgada, comparando os valores da difusividade efetiva média baseados nas espessuras inicial e média das amostras. Analisaram também as propriedades físicas e de transporte das amostras em função da umidade ao longo da operação. A redução de espessura do material foi de 80% em relação a da amostra inicial. Os resultados da difusividade efetiva média de umidade, baseados na espessura média das amostras, foram semelhantes aos valores médios da difusividade efetiva variável de umidade para a primeira etapa de secagem.

### **3.5.3. Propriedades Terapêuticas**

A proteção que frutas e outras partes de vegetais conferem contra vários tipos de doenças, como câncer tem sido atribuída à presença de vários antioxidantes, vitamina C, vitamina E,  $\alpha$  – tocoferol,  $\beta$  – caroteno e compostos fenólicos (MARTINS, 2003).

As plantas do gênero *Allium*, como cebola e alho, são consumidas freqüentemente como uma fonte de combinações que inibem atividade de decomposição de gordura nas artérias do organismo humano, com a meta de diminuir a incidência de doença cardiovascular. Outras atividades têm sido relatadas: antimutagênica, anticarcinogênica, antiviral, antifungos, antibacteriológica e antialérgica, inibidor de agregação plaquetária, inibidor do acréscimo da pressão sangüínea, além de atividades antiúlcera (GOLDMAN, et al., 1996).

Tal atividade fisiológica destas plantas é em parte determinada por suas concentrações de compostos bioativos pouco estudados em combinações de substâncias organossulfuradas. (GOLDMAN, et al., 1996). A cebola tem atividade antioxidante, fato comprovado pela presença de um flavonóide, a quercetina. Flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Esses

metabólitos secundários são de grande importância na manutenção da saúde de muitos animais herbívoros, incluindo o homem, pois desempenham uma função muito importante, que é a remoção dos radicais livres, exercendo um papel citoprotetor em situações de dano celular.

### **3.6. MICROALGA CHLORELLA**

#### **3.6.1. Microalgas e Cianobactérias**

O crescente interesse no estudo de microorganismos como microalgas, alguns fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentar, química e farmacêutica, dentre outras (DERNER et al., 2006). As microalgas formam um grupo heterogêneo de organismos que engloba todos os microrganismos fotossintetizantes, sejam eucarióticos ou procarióticos. São geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003).

As microalgas procarióticas recebem o nome de cianobactérias, antigamente chamadas algas azul-esverdeadas. As estruturas celulares e o mecanismo para a fotossíntese nestes organismos são semelhantes aqueles dos vegetais (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995). Acredita-se que as cianobactérias surgiram há 3500 milhões de anos e foram os primeiros organismos fotossintetizantes capazes de produzir oxigênio, formando a atmosfera terrestre e possibilitando o surgimento de outras formas de vida no planeta (LEHNINGER, NELSON e COX., 1995; HENRIKSON, 1994).

As culturas comerciais de microalgas em grande escala iniciaram por volta de 1960 no Japão, com a *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* e 1970 no México, ambas para suplemento alimentar; *Dunaliella salina* para produção de  $\beta$ -caroteno na Austrália em 1986, *Haematococcus pluvialis* para produção de caroteno e várias outras espécies para a aquicultura. Após, o cultivo de microalgas se espalhou pelo mundo, em países como Israel, EUA e Índia (BOROWITZKA, 1999). Atualmente as microalgas são utilizadas na alimentação humana como fontes de suplemento alimentar de alto valor nutricional ou biocorantes (CHEN e ZHANG, 1997), e na alimentação animal, principalmente de frangos e animais marinhos (VONSHAK, 1997). Além disso, os cultivos têm sido empregados como fonte de biocombustíveis e como forma de absorver CO<sub>2</sub> originado na atividade industrial e na geração térmica de energia elétrica (ANDRADE, 2005).

### 3.6.2. Microalga *Chlorella*

A *Chlorella* é uma microalga eucariótica unicelular esférica e seu diâmetro varia de 5-10 µm, dependendo da espécie (ILLMAN, SCRAGG e SHALES, 2000). É encontrada espontaneamente em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar a fotossíntese. Esta microalga possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Foi descoberta pelos japoneses, tradicionais consumidores de algas, que a apreciam e utilizam normalmente como complemento alimentar (RICHMOND, 1990). Relatam uma sensação de bem estar e aumento de energia após um curto período de uso, atribuído à elevada concentração de vitamina B<sub>12</sub>, que tem ação rápida em processos metabólicos de síntese de hemácias.

É uma alga rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais. As culturas de *Chlorella* podem apresentar alto conteúdo de lipídios, podendo chegar a mais de 50%, em base seca, quando cultivada em meio com baixos níveis de nitrogênio (PIORRECK, BAASCH e POHL, 1984). Em sua composição estão ainda presentes 18 aminoácidos essenciais importantes na biossíntese das proteínas. A *chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B<sub>12</sub>, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que, juntamente com o ferro, fazem desta alga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia.

Segundo BOROWITZKA (1999) o primeiro cultivo unialgal foi realizado por Beijerinck em 1890 com *Chlorella vulgaris*. De 1948 a 1950, o cultivo em massa de microalgas realmente começou a ser um foco de pesquisas em Stanford, na Califórnia, com a finalidade de utilização da técnica laboratorial para cultivo em escala (RICHMOND, 1990; BOROWITZKA, 1999). A *Chlorella* também foi investigada por cientistas alemães durante a Segunda Guerra Mundial pelo seu potencial em duplicar a biomassa algumas vezes por dia em culturas iluminadas em laboratório, com fins de estocagem de fontes de alimentos, principalmente fontes de proteínas. Em 1951 a primeira planta piloto de produção de *Chlorella* foi construída e operada em Cambridge, nos Estados Unidos. Outra série de estudos ocorreu no Japão (RICHMOND, 1990) onde se iniciou o cultivo de microalgas com fins comerciais nos anos 60 com a cianófitica *Chlorella*, seguido pelo cultivo de *Spirulina* nos anos 70. Nos anos 80 cerca de 46 fábricas na Ásia produziam mais de 1000 Kg de microalgas por mês e em 1996 cerca de 2000 toneladas de *Chlorella* foram produzidas comercialmente somente no Japão (BOROWITZKA, 1999).

A microalga *Chlorella*, assim como a *Spirulina*, é de grande interesse comercial, pois além de rápida velocidade de crescimento, pode ser cultivada em tanques ao ar livre, como os tanques localizados na estação de Cultivo de *Chlorella* da Ilha de Ishigaki, Okinawa. Ilha

de recifes de corais de clima subtropical, propício ao cultivo de *Chlorella* de qualidade superior. A radiação solar durante o ano também estimula os níveis de clorofila.

No laboratório da Engenharia Bioquímica da FURG existem estudos sobre o cultivo de microalgas, como por exemplo:

COLLA, FURLONG e COSTA (2007) avaliaram o efeito da temperatura de cultivo e da concentração de nitrogênio no meio de cultivo, sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*. E concluíram que quando a microalga foi cultivada a 35°C e concentração de nitrato de 1,8 g L<sup>-1</sup> ou 2,5g.L<sup>-1</sup> o potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir da biomassa, sobre o escurecimento enzimático causado pela peroxidase, foi de 29% e 35%, respectivamente, sendo a redução no escurecimento relacionada com as quantidades de compostos fenólicos presentes nos extratos.

## **CAPÍTULO III**

## **ARTIGO 1**

## OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NA CEBOLA ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Michele Moraes de Souza; Vânia Machado Recart; Meritaine da Rocha;  
Eliana Badiale Furlong

Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos - Departamento de Química  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Caixa Postal 474  
CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil – Tel. (53)3233 8663

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi usar a técnica de planejamento experimental para estabelecer as melhores condições de extração de compostos fenólicos em cebola (*Allium cepa L.*). As variáveis estudadas foram: natureza do solvente, agitação, tempo de extração e tempo com e sem interrupções de processo. A melhor combinação, que resultou um modelo preditivo, foi o uso de metanol, agitação de 120 minutos e com rotação de 3,13 G. O maior conteúdo fenólico em diferentes classes foi 2274,8 µg fenóis/g de cebola, a recuperação foi de 88% e o limite de quantificação foi 30,7 µg fenóis/g de cebola.

Palavras-chave: cebola, compostos fenólicos, metodologia.

### ABSTRACT

The objective of this work was using the experimental planning technique to establish great phenolic extraction conditions on onions (*Allium cepa L.*). The studied variables were; solvent nature, agitation, extraction time and process time with and without interruption. The best combination, allowed a predicated model, was employing methanol agitated for 120 minutes in a roll with 3,13 G. The average phenolic content in different classes was 2274,8 µg phenolic/ g de onion, the recovery was 88% and the detection quantification limit was 30.7 µg phenolic/ g de onion.

Key words: methodology, phenolic compounds, onion.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse em identificar compostos químicos que desempenham atividades funcionais, tem disponibilizado uma série de metodologias para extrair e quantificar diferentes estruturas químicas em tecidos vegetais. Entre os compostos que poderiam prevenir danos à saúde destacam-se os fenólicos, tais como os ácidos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, e os flavonóides, que mesmo presentes em pequenas quantidades no alimento, poderiam ter efeitos preventivos e/ou curativos de sintomas patológicos causados por situações oxidativas (ANTOLOVICH, PRENZLER, RYAN, 2000; JORGE et al., 1998). A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade, avaliação biológica e estímulo ao consumo, visando à prevenção de doenças crônico-degenerativas (TORRES et al., 1987).

As substâncias fenólicas podem ocorrer livres ou na forma de glicosídeos. A posição do açúcar na estrutura fenólica influencia na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas. Esta diferença química pode ser usada para separação, quantificação e para desenvolver estudos sobre suas atividades fisiológicas (ANTOLOVICH, PRENZLER, RYAN, 2000; BADIALE-FURLONG et al., 2003; CHEN et al., 1998).

Para a extração dos compostos fenólicos vêm sendo mencionados sistemas aquosos, alcoólicos e aceto-etílicos sob diferentes condições de interação, aplicados a raízes, tubérculos e frutas, tais como feijão mungo; gêneros de *Acácia*, *Terminália*, *Copernicia*, maçãs, ameixas, peras e outros (IMEH e KHOKBAR, 2002; LIMA et al., 2004; SOUSA et al., 2007). A quantificação dos compostos fenólicos nos diferentes extratos, em geral, é feita empregando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este consiste numa mistura de ácidos fosfotungstíco e molíbdico, nos quais o molibdênio e o tungstênio no estado de oxidação 6+, e em presença de redutores, tais como fenóis, passam ao estado de oxidação variando entre 5 e 6 (forma azul) permitindo a quantificação de substâncias redutoras que não necessariamente os fenóis (SOUSA et al., 2007). Poucos são os trabalhos que descrevem adaptações do procedimento básico para matrizes específicas e/ou condições críticas de preparo de amostra e extração dos compostos fenólicos para a quantificação. Cabe ressaltar que o processo de extração sob diferentes condições para distintas matrizes e analitos é fundamental para a estimativa mais exata do potencial de redução decorrente de compostos fenólicos.

Os estudos sistematizados de alimentos com alegações funcionais vêm sendo norteados pela cultura popular que atribui efeitos benéficos a estes em diversas regiões do país. Entre estes esta a cebola (*Allium cepa L.*), empregada pelo seu papel de conferir características organolépticas a alimentos, além do seu poder preventivo e curativo de

diversas doenças crônico-degenerativas (CHEN et al., 1998; JORGE et al., 1998). Apesar do conhecimento milenar dos benefícios deste vegetal e de diversos estudos sobre seus efeitos bioativos, algumas regiões produtoras têm dificuldades em comercializar suas safras em condições satisfatórias para consumo “in natura” ou em formulações industriais, resultando em descarte de material e desestímulo aos produtores.

Diante desta inconsistência entre a importância sócio-econômica do vegetal e o estímulo a sua produção é interessante estudar condições que permitam valorizar esta matéria-prima buscando formas de aproveitar o seu potencial funcional de forma eficiente, partindo da determinação de seus compostos bioativos como subsídio para sua cultura, conservação e preparo doméstico e industrial preservando suas qualidades funcionais.

A otimização de metodologia de extração de um analito em especial é fundamental, visto que pequenos detalhes podem resultar em efeitos que comprometem a confiabilidade dos resultados. Para atingir esta meta com o mínimo de experimentos, podem ser empregados planejamentos fatoriais completos. Estes permitem otimizar metodologias considerando variáveis críticas para alguns tipos de matrizes avaliando seus efeitos e possíveis interações com outros fatores nas repostas desejadas (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUE e IEMMA, 2005).

Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou usar a técnica de planejamento experimental para otimizar uma metodologia de extração para a determinação de compostos fenólicos totais na cebola (*Allium cepa L.*).

Para tal, foram avaliadas diferentes variáveis na etapa de extração e os extratos foram quantificados quanto ao conteúdo fenólico empregando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC). As condições otimizadas também foram avaliadas quanto a sua performance analítica e aplicabilidade.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Procedimentos experimentais gerais**

Todos os solventes e reagentes utilizados durante os testes foram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Polipur (Pró-análise Química e Diagnostico Ltda) e a quercetina da Sigma Chemical Company (EUA). As medidas de absorção foram realizadas em espectrofotômetro VARIAN CARY/100 UV-VISIBLE (EL 98033579).

## **2.2. Amostras**

As cebolas foram coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2007 e foram cedidas pela EMATER – RS, classificadas segundo Regulamento Técnico de qualidade da cebola (1995) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## **2.3. Planejamento para estudo das condições de extração de fenóis**

A partir de condições estudadas por Lima et al (2004), Baptista et al (1999), Andrade et al (2007), Premzler et al (2001) e Velioglu et al (1998) foram avaliados os efeitos das variáveis: solvente (metanol e acetato de etila), tempo de extração (120, 150 e 180 minutos), rotação (0,78, 1,76 e 3,13 G) e tempo com e sem interrupções do processo de extração (0, 15 e 30 minutos), através de planejamento fatorial  $2^4$ , ou seja, quatro variáveis ou fatores testados em dois níveis (-1 e +1) e 6 pontos centrais (0) resultando em 22 experimentos (Tabela 1 - ANEXO 1).

Obtido o solvente que possibilitou a extração mais precisa (Tabela 2 - ANEXO 1), foram estudados os efeitos do tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, utilizando planejamento fatorial completo  $2^3$ , com três variáveis em dois níveis (-1 e +1) e 3 pontos centrais (0) resultando em 11 experimentos (Tabela 3 - ANEXO 1).

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Statistica 6.0, considerando o conteúdo de fenóis totais ( $\mu\text{g}$  de fenóis/g de cebola) como resposta das variáveis em estudo.

## **2.4. Preparação dos extratos nas condições otimizadas**

As cebolas foram secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60 °C, até atingirem valores de umidade de 13%. Foram pesadas 10g de cebola e adicionados 50 mL de solvente (metanol ou acetato de etila) e agitados em temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE - 141 da marca TECNAL, o extrato foi filtrado com papel de filtro Wathman nº1 e clarificado com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%, a solução foi filtrada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume final completado com o solvente utilizado na extração.

## 2.5. Determinação de fenóis totais nos extratos

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos metanólicos e de acetato de etila da cebola foi realizada por espectrometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500 µL do extrato agitar com 500 µL de água destilada e 4,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% por 1 minuto, colocada em banho-maria a 40 °C por 15 minutos. A mistura foi agitada por 30 segundos em banho ultra som com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 minutos, foi medida a absorvância das soluções a 660 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com uma solução padrão de Quercetina contendo 100 µg/mL a partir da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 16 µg/mL. Os resultados dos conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como µg de fenóis totais/ g de cebola.

Para estudar a performance do método foram determinados o limite de quantificação e a recuperação de quercetina nas condições otimizadas de extração. O limite de quantificação foi estimado pela menor concentração absorvida pela curva padrão de quercetina. A recuperação foi testada em amostras de cebola seca as quais tinham sido previamente adicionadas soluções metanólicas de quercetina em níveis 1,0; 1,2 e 1,5 mg/ g de cebola.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de cebola foram secas para concentrar os sólidos e facilitar o processo de extração mantendo a proporção de massa seca/solvente, mas sem a necessidade de grande volume destes. A temperatura de 60°C minimizou o escurecimento dos tecidos por ação enzimática ou por caramelização.

Apesar dos inúmeros trabalhos que determinam fenóis em raízes, tubérculos, cereais, porções distintas de plantas medicinais e frutos, mencionando variação de fenóis que vão desde 40 µg fenóis/ g de amostra no arroz a 5500 µg fenóis/ g de amostra nas cascas de limão (IMEH e KHOKBAR, 2002; LIMA et al., 2004; OLIVEIRA, 2005; SOUSA et al., 2007), quando se trata de cebola estes valores não estão disponíveis. As referências são unânimes em informar que o principal componente fenólico das diferentes espécies de cebola é a quercetina que apresentou maior capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino, bem como indicadora de compostos fenólicos em cebola. Este composto foi escolhido para indicar os fenóis totais em cebolas neste trabalho.

O planejamento experimental foi utilizado para possibilitar a inferência estatística e fornecer informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis das variáveis

em estudo, evidenciando a qualidade da repetibilidade, minimizando custos e tempo ao não se repetir todos os experimentos, demanda e desgaste de equipamento, menor exposição do analista e menor volume de descarte (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

As variáveis testadas foram aquelas que são mais diversas nos relatos da literatura, para determinação dos teores de fenóis totais ou para posterior separação das diferentes famílias de redutores fenólicos presentes em matrizes vegetais. Cabe considerar também que para a escolha do solvente pode ser levado em consideração a sua toxicidade. A primeira etapa do estudo do efeito das variáveis solvente de extração, tempo, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, tem seus resultados apresentados na Tabela 1 como conteúdo de fenóis totais expressos em  $\mu\text{g}$  de fenóis totais/ g de cebola.

A análise estatística mostrou que os solventes utilizados na extração dos fenóis apresentaram efeito significativo nos níveis determinados ( $p = 0,015$ ), como pode ser observado nos resultados da Tabela 2. O solvente que propiciou a extração de maiores teores de fenóis foi o metanol, esta resposta pode ser atribuída ao fato de que os compostos fenólicos solúveis em metanol são mais abundantes em cebola, o que é promissor considerando-se que os flavonóides podem estar neste conjunto em função da solubilidade. Nos extratos obtidos com acetato de etila os valores detectados estavam próximos do limite de quantificação, o que sugere baixas concentrações de fenóis polimerizados, sendo necessário evaporar o solvente antes da quantificação dos fenóis.

As variáveis tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, foram estudadas em um planejamento completo  $2^3$  com três pontos centrais para obtenção do ponto ótimo de extração dos compostos fenólicos (Tabela 3). O comportamento verificado permitiu otimizar e construir modelo preditivo dentro da faixa ótima para extração dos fenóis em função das variáveis estudadas.

A Tabela 4 (ANEXO 1) apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos estudados no planejamento  $2^3$ , tendo como resposta o rendimento em fenóis totais na cebola. A observação dos resultados da Tabela 3 e da Tabela 4, confirmam que ocorrem diferentes conteúdos de fenóis na cebola em função das associações de condições avaliadas demonstrada pelos conteúdos obtidos em fenóis totais nos diferentes experimentos. Lima et al., (2004) também mencionaram estas variações e atribuíram a formas químicas distintas de fenóis presentes na matriz.

A Tabela 4 mostra que entre as três variáveis estudadas, rotação, tempo de agitação e a interação da rotação com o tempo de agitação foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%, quando a resposta foi o conteúdo de fenóis totais ( $\mu\text{g}$  fenóis/ g de cebola). A rotação (G) apresentou efeito positivo ao passar do menor valor para a maior,

assim como indicou o aumento na média desta resposta. A variável tempo de agitação teve efeito contrário, ou seja, o menor tempo resulta em maior conteúdo de fenóis totais. A interação da variável rotação com o tempo de agitação apresentou efeito negativo diminuindo a média do conteúdo de fenóis totais em 362 µg fenóis /g de cebola. Os efeitos das demais variáveis não foram significativos.

Através dos resultados obtidos, foi possível obter os coeficientes de regressão (Tabela 5 ANEXO 1) de um modelo de terceira ordem para as variáveis e desta maneira analisar a validade do modelo de conteúdo de fenóis em função das variáveis estudadas por meio da análise de variância. Estes foram significativos e preditivos para a ação combinada dos parâmetros tempo de agitação, rotação e a interação da rotação com o tempo de agitação, no conteúdo de fenóis totais (Tabela 5) originando a Equação 1 e a Figura 1 (ANEXO 1).

$$\text{Conteúdo de fenóis (µg fenóis/g de cebola)} = 2109,9 + 171,9R + 86,6T - 181R \cdot T \quad (1)$$

Onde: R = rotação (G), T = tempo (minutos)

O teste F, mostrou um F calculado de 31,1, que foi 7 vezes maior do que o F tabelado, 4,35 (Tabela 6 – ANEXO 1), permitindo que o modelo expresso na Equação 1 fosse utilizado para gerar a superfície de resposta para o rendimento de fenóis (Figura 1).

A Figura 1 mostrou que o rendimento dos fenóis foi maior utilizando rotação de aproximadamente 3,13G e tempo de agitação de 120 minutos, atingindo valores de 2372,4 µg fenóis/ g de cebola quando a extração e quantificação são realizadas nestas condições de rotação e tempo de agitação. O que indica que o aumento no tempo de agitação pode ocasionar uma diminuição no conteúdo de extração dos compostos fenólicos presentes na cebola. Isto pode ser atribuído à degradação dos fenóis por ação de enzimas óxido redutases do tecido ou reversão do equilíbrio dos compostos entre as frações sólido-líquido do sistema.

Em vista deste resultado, menor tempo de extração resultando em maior conteúdo de fenóis totais, foi avaliada a cinética do processo (Figura 2 - ANEXO 1), diminuindo o tempo de extração até que este não fosse mais significativo ao nível de confiança de 95%. A diminuição a partir de 120 minutos não foi significativa no intervalo de confiança estabelecido, comprovando a adequacidade do tempo estabelecido para a extração dos compostos.

### 3.1 Indicativos de Mérito para o Método de Folin Ciocalteu

O procedimento de extração otimizado foi executado para determinar os indicativos de performance limite de quantificação e recuperação, cujas avaliações foram realizadas em triplicata.

A Equação da curva de calibração da quercetina foi  $C = 0,0352A$  onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 660nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,999$  demonstrando a linearidade da relação nas concentrações da curva analítica.

O limite de quantificação determinado foi de 30,7  $\mu\text{g}$  fenóis. O teor médio de recuperação para o método completo usando a extração otimizada foi de 88% e variou entre 84 e 92 % da menor para a maior concentração testada. As condições de extração resultam em valores que estão fora dos valores dos pontos críticos para a confiabilidade de resultados analíticos e neste caso os teores obtidos para limites de quantificação e recuperação sugerem que o método adaptado é promissor para determinar fenóis em cebolas, expressando como  $\mu\text{g}$  de fenóis (quercetina)/ g de cebola.

O procedimento foi testado quanto à sua aplicabilidade adotando-o para quantificar fenóis em cebolas cultivadas na região de São José do Norte, na safra de 2007 e classificadas conforme a legislação do MAPA. A classificação comercial dos bulbos de cebola adota como critério o diâmetro transversal distribuindo em quatro classes, cujos tamanhos variam entre 35 a 90 mm. Nesta classificação não estão considerados nenhum outro aspecto que possa refletir a qualidade do conteúdo do tecido.

Nas cebolas analisadas o teor de fenóis extraídos com metanol variou entre 2244,3 e 2306,4  $\mu\text{g}$  de fenóis totais/ g de cebola (Tabela 7 – ANEXO 1) e o teor de umidade entre 86,8 e 87,4% para as diferentes classes, que ao nível de significância de 95% apresentou diferença significativa entre as classes no aporte de fenóis na dieta do consumidor (Tabela 8 – ANEXO 1). Considerando o total obtido com o metanol, a classe 4 apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos. Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 310  $\mu\text{g}$  fenóis/ g amostra, maçã 1000  $\mu\text{g}$  fenóis/ g amostra e batata 990  $\mu\text{g}$  fenóis/ g amostra (equivalente de tirosina) (OLIVEIRA, 2005), a cebola parece ser bem promissora quando se investiga vegetais com maior conteúdo fenólico.

#### 4. CONCLUSÃO

O planejamento experimental é uma ferramenta que melhorou a qualidade da informação através dos resultados, permitindo otimizar e construir o modelo preditivo dentro da faixa ótima para a extração de fenóis, representado pela equação obtida para o conteúdo fenólico.

Empregando duas etapas de planejamento experimental para o rendimento de fenóis totais, foi possível determinar as condições ótimas de extração de cebola para emprego das variáveis, tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções do processo de extração, com resultados preditivos e significativos para o conteúdo de fenóis. As condições otimizadas ocorriam quando foi utilizado o tempo de extração de 120 minutos e a rotação de 3,13 G em mesa agitadora orbital. Sendo que a classe 4 foi a melhor para incorporar fenol na dieta com um conteúdo de 2387,6 µg fenóis/ g de cebola.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A.; COSTAL, C. K.; BORAL, K.; MIGUELL, M. D.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João pessoa, v. 17, n. 2, abri/jun, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds en fruits. **Analyst**, n. 125, p. 989-1009, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Veter**, n. 13, p. 105-114, 2003.

BAPTISTA, M. J.; GLORIA, B. A.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, 1999.

CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemey extract. **Journal Analytical Official Chemistry Society**, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.

IMEH, U.; KHOKBAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, 2002.

JORGE, P, A, R.; NEYRA, R, M, O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídios plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.

LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vignaradiata*L.). **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, jan/mar, 2004.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2° ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

OLIVEIRA, M. S. **Inibição do crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos**. Rio Grande: FURG, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

PRENZLER, M, S.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, n. 73, p. 73, 84, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed, Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SOUSA, C. M.; ROCHA e SILVA, M. H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

TORRES, A, M.; MAU LASTOVICKA, T.; REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 19, n. 46, p. 4113-4117, 1998.

## **ARTIGO 2**

## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DIFERENTES CLASSES DE CEBOLAS CULTIVADAS NA REGIÃO SUL DO R.S.

Vânia Machado Recart; Michele Moraes de Souza, Eliane Cipolatti, Eliana Badiale Furlong  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande  
Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos  
Departamento de Química  
Rua: Eng. Alfredo Huch, 475, caixa postal 474 – Centro  
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

### RESUMO

A cebola comum (*Allium Cepa L.*) compreende diversos cultivares que produzem este tipo de bulbo, estando disponível no mercado diferentes variedades. Visando estimar o aporte de nutrientes e compostos funcionais destes bulbos o objetivo deste trabalho foi determinar as características físico-química e a atividade das enzimas oxirredutases em quatro classes de cebolas comerciais. Foram determinadas a composição centesimal, pH e acidez (AOAC, 2000), compostos fenólicos totais em extratos aquosos, metanólicos e aceto etílicos e atividade enzimática de catalase, peroxidase e polifenoloxidase. As frações umidade e cinzas não apresentaram diferença significativa, enquanto as demais frações apresentaram diferença significativa entre as classes. O extrato que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o extrato aquoso, valor médio de 2,83 mg de fenóis/g de cebola, não sendo observada diferença entre as classes. A classe 2 apresentou maior atividade específica para catalase e peroxidase, 0,025 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposta / min / mg de proteína e 0,031 abs / min / mg de proteínas respectivamente. A enzima polifenoloxidase não foi detectada nas amostras de cebola.

Palavras chave: cebola, enzimas, fenóis.

### ABSTRACT

The common onion (*Allium Cepa L.*) includes various growing systems which produce this type of bulb, being available on the market in different varieties. Aiming to estimate the nutrients and functional composts of such bulbs, the purpose of this study was to characterize, physically and chemically, and determine the activity of enzymes oxidoreductases in four classes of commercial onions. It was determinated proximal composition, pH and acidity, phenolic componends in aquous, methanolic and aceto ethylic extracts and activity of enzymes of catalase, peroxidase and poliphenoloxidase. The fractions of humidity and ash did not show any significant difference, while the others showed significant difference among classes. The extract that showed the greater content of phenolic composts was the watery extract (average value of 2,83 mg of phenols/g of onion), there was

no occurrence of difference among the classes. Class 2 showed greater specific activity for catalase and peroxidase enzymes, 0,025 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposed/ min / mg of protein and 0,031 abs / min / mg of proteins respectively. The polyphenoloxidase enzyme was not detected in the samples of onions.

**Keywords:** onion, enzymes, phenols

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos vitais de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos animais e vegetais. Muitas dessas substâncias, especialmente as de origem vegetal, encontram emprego utilitário em diversas áreas aplicadas à alimentação e à saúde. Os compostos resultantes desse metabolismo podem ser separados em produtos do metabolismo primário que são os glicídios, protídios e lipídios, e os do metabolismo secundário, que são os compostos terpênicos, alcalóides, glicosídios e vários outros (MATOS, 1997).

Entre os metabólitos secundários produzidos pelas células, destacam-se os compostos fenólicos, que são compostos orgânicos que contêm um grupo hidróxi (-OH) ligado diretamente num anel aromático (HALLIWELL et al, 1995), estes têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007). Várias fontes de compostos fenólicos têm sido estudadas, visando fornecer subsídios para elaboração de uma dieta saudável à população

A cebola (*allium cepa*) é uma das plantas cultivadas de mais ampla difusão no mundo, sendo a segunda hortaliça em importância econômica. A produção mundial apresentou aumento de cerca de 25% na última década, o que coloca as diferentes variedades de cebola como uma das três hortaliças mais importantes ao lado do tomate e da batata (EMATER, 2007). Em função disto o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária aprovou o Regulamento Técnico de Qualidade de Cebola (1995) portaria n° 529, que descreve o critério de classificação das cebolas baseados nas dimensões e nas características visuais como indicativo de qualidade, dividindo em quatro classes variando de 35 a 90 mm de diâmetro transversal (EMATER, 2007). A cebola que não atender aos requisitos da norma é classificada como “fora do padrão” e comercializada somente com tal designação na embalagem de comercialização, no que diz respeito ao comércio em território nacional, a preços pouco atrativos. No entanto, informações

disponíveis sobre as propriedades físico-químicas da cebola não são específicas quanto à região de cultivo ou a classe e variedade.

A composição de cebola é influenciada pelas condições de cultivo (sistema de produção, tipo de solo, clima) e por fatores genéticos. Bulbos de cebola para consumo fresco são pouco calóricos (em torno de 40-50 calorias) e contém de 89 a 95% de água, além de mono e dissacarídeos (açúcares totais em torno de 6%), proteínas (1,6%), gordura (0,3%) e sais minerais (0,7%). Possuem também alguns compostos fenólicos, bem como ácidos málico, cítrico, succínico, fumárico, quínico, biotínicos, nicotínicos, fólicos, pantotênicos e ascórbico (EMBRAPA, 2007).

Estudos têm demonstrado que após a colheita de frutas e hortaliças iniciam-se uma série de processos degradativos que aceleram a senescência, causando perdas de grande parte da produção. Diversas dessas perdas podem ser atribuídas à ação de enzimas durante a pós-colheita (ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006). A peroxidase e a polifenoloxidase têm sido consideradas as principais enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade em muitas frutas e vegetais. Estas enzimas podem participar de um grande número de reações oxidativas, tais como mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético, biossíntese da lignina, e muitos destes fatores também podem ser associados com *flavour*, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (VALDERRAMA, MARANGONI, CLEMENTE, 2001; ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006; CARNEIRO, ROLIM e FERNANDES, 2003).

Neste estudo a matriz escolhida foi a cebola cultivada na região sul do Rio Grande do Sul, por se tratar de um vegetal ao qual se atribuí propriedades funcionais diversas, determinadas pelos diversos componentes presentes nos seus tecidos. Porém, o retorno econômico para os produtores não é satisfatório, pois em função de variáveis abióticas na região as cebolas não atingem as características de classificação para comercialização compensatória como produto *in natura*.

Visando estimar o aporte de nutrientes e compostos funcionais destes bulbos o objetivo deste trabalho foi determinar a composição centesimal, o pH, a acidez, o teor de compostos fenólicos totais extraídos em três sistemas solventes e a atividade específica das enzimas catalase, peroxidase e polifenoloxidase em quatro classes de cebolas cultivadas na região sul do Rio Grande do Sul. Os resultados podem servir para estabelecer processos industriais ou artesanais que possibilitem a comercialização das cebolas de baixo valor agregado para a distribuição *in natura*. Além disso poderão subsidiar os órgãos legisladores com dados mais consistentes sobre a classificação das cebolas considerando seu aporte nutricional e funcional.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Procedimentos Experimentais Gerais**

Os solventes e reagentes empregados foram analiticamente puros (P.A). O reagente de Folin-Ciocalteu pertencia a marca Polipur, a Quercetina a Sigma, e os substratos guaiacol e catecol utilizados foram das marcas Merck e Sigma respectivamente.

### **2.2. Amostras**

As cebolas foram coletadas no município de São José do Norte no Rio Grande do Sul em março de 2007, cedidas pela EMATER – RS, classificadas segundo Regulamento Técnico de Qualidade da cebola (1995) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As cebolas foram descascadas, lavadas, picadas e secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60 °C, até atingirem valores médios de umidade de 13%.

### **2.3. Determinação da Composição Centesimal**

Os teores de umidade das diferentes classes de cebolas foram determinados em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS sob temperatura de 60 °C. Os percentuais de cinzas das diferentes classes de cebolas foram determinados pelo método gravimétrico em mufla 550 °C. Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-Kjeldahl, empregando como fator de conversão de nitrogênio o valor de 6,25. Todos os procedimentos seguiram a metodologia da AOAC (2000) com exceção das fibras brutas que foram determinadas conforme método do INTERLAB VI (CIEN TEC, 1991).

A determinação de lipídios foi realizada pelo método de Bligh & Dyer (1959) adaptando-se as relações solventes extratores ao teor de umidade das amostras. Os açúcares redutores foram determinados conforme método do 3,5-DNS (MILLER, 1959). Os métodos estão descritos em detalhes no ANEXO 2.

### **2.4. Propriedades Eletroquímicas**

O pH das diferentes classes de cebolas foi determinado conforme AOAC (2000). O vegetal foi homogeneizado em água previamente fervida na proporção de 1:9, sob agitação por 30 minutos. No sobrenadante foi determinado o pH potenciométricamente, utilizando um pHmetro marca Hanna modelo 200, calibrado com tampão fosfato neutro (pH 7,0).

A acidez foi determinada por titulometria de neutralização com NaOH 0,01N e expressa como porcentagem de ácido pirúvico. Os métodos estão descritos em detalhes no ANEXO 2.

## 2.5. Determinação dos Fenóis Totais

A extração dos compostos fenólicos das cebolas foi realizado a frio com água, acetato de etila e metanol na proporção de 1:5 de massa seca:solvente, em agitador horizontal a temperatura ambiente, seguida da partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5% e filtração. Os extratos provenientes dos três sistemas solventes foram armazenados em frascos de vidro a 18°C até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais, das diferentes classes, foi determinado por espectrometria de UV/visível após a reação com Folin-Ciocalteu. A estimativa de concentração de fenóis foi realizada com uma curva de calibração da quercetina, cuja faixa de concentração variou entre 2 e 16 µg/mL, com linearidade demonstrada pelo R<sup>2</sup> de 0,99 (BADIALE-FURLONG et al., 2003). O método está descrito em detalhes no ANEXO 2.

## 2.6. Determinação da Atividade Específica das Enzimas Oxirredutases

### 2.6.1. Catalase

O extrato enzimático foi preparado pesando 10g de amostra *in natura*, seguida de homogeneização por 20 minutos em blender com 100 mL água destilada e deionizada. Após homogeneização as amostras foram filtradas com algodão. Os filtrados foram utilizados para a determinação da atividade enzimática.

A reação enzimática foi realizada a 40°C e pH 7 durante 20 minutos utilizando como substrato peróxido de hidrogênio 0,005M. O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual foi titulado com permanganato de potássio padrão (0,004M). Os resultados foram expressos como atividade específica (AE) conforme a equação 1.

$$AE_{catalase} = \frac{mgH_2O_2\ decomposta}{min \times mg\ prote\tilde{a}na} \quad (1)$$

### 2.6.2. Peroxidase e Polifenoloxidase

Foram pesadas cerca de 20g de cebola, homogeneizadas em blender com 100 mL de solução tampão fosfato pH 5,2 por 2 minutos, seguida de filtração. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi adicionada a 25 mL de acetona para precipitação das proteínas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com solução tampão fosfato pH 5,2.

A reação para medida da atividade enzimática da peroxidase foi realizada a 40°C e pH 5,5 utilizando o guaiacol como substrato. A reação foi realizada misturando 1,5 mL solução tampão fosfato de sódio pH 5,5; 1 mL de extrato enzimático; 1,5 mL de água destilada; 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% e 1 mL de solução de guaiacol 0,5%. A absorbância foi medida a 470 nm após 10 minutos de reação. Os resultados foram expressos em atividade específica definida conforme a equação 2, para as quatro classes de cebolas comerciais.

$$AE_{\text{peroxidase}} = \frac{\text{variação}_{\text{absorbância}}}{\text{min} \times \text{mg}_{\text{proteína}}} \quad (2)$$

A medida da atividade enzimática da polifenoloxidase foi realizada a 30°C e pH 6,0 utilizando o catecol como substrato. A reação foi realizada misturando 1 mL de extrato enzimático; 1,5 mL da solução tampão fosfato de sódio pH 6,0; 2,5 mL de água destilada e 1 mL de solução de catecol 0,05M. A absorbância foi determinada a 425 nm após 10 minutos de reação. Os resultados foram expressos em atividade específica conforme a Equação 3, para as quatro classes de cebolas comerciais.

$$AE_{\text{polifenoloxidase}} = \frac{\text{variação}_{\text{absorbância}}}{\text{min} \times \text{mg}_{\text{proteína}}} \quad (3)$$

### 2.7. Análise Estatística

Os resultados das determinações das frações centesimais, dos conteúdos de compostos fenólicos e da atividade enzimática para as classes de cebola foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de significância de 95% entre as diferentes classes de cebola em estudo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Composição Centesimal das Cebolas

A classificação comercial dos bulbos de cebola adota como critério o diâmetro transversal distribuindo em quatro classes, cujos tamanhos variam entre 35 a 90 mm. Nesta classificação não estão considerados outros aspectos que possam refletir a qualidade do conteúdo do tecido ou mesmo sua relação com safra, local de produção, período de armazenamento ou qualquer outra variável abiótica. Neste trabalho foram enfatizadas outras características físico-químicas de cada classe. Na Tabela 1 estão os resultados das médias das determinações das características físico-químicas nas diferentes classes de cebolas cultivadas em São José do Norte, Rio Grande do Sul.

**Tabela 1: Composição centesimal e propriedade eletroquímicas das diferentes classes de cebolas cultivadas em São José do Norte, R.S.**

Composição/Classes	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
	(35-50 mm)	(50-70 mm)	(70-90 mm)	(> 90 mm)
Umidade (%)	88,5 <sup>a</sup>	88,4 <sup>a</sup>	88,3 <sup>a</sup>	88,6 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	0,75 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>
Proteínas (%)	0,86 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,91 <sup>a</sup>
Açúcares redutores (%)	3,73 <sup>a</sup>	5,27 <sup>b</sup>	4,76 <sup>c</sup>	4,67 <sup>c</sup>
Fibra bruta (%)	0,61 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>	0,7 <sup>b</sup>
Lipídios (%)	0,17 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a</sup>
Acidez (% de ácido pirúvico)	0,31 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,29 <sup>c</sup>
pH	5,23 <sup>a</sup>	5,08 <sup>b</sup>	5,2 <sup>c</sup>	5,16 <sup>c</sup>

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

De acordo com o Teste de Tukey entre diferentes classes de cebolas comerciais, as frações de umidade e cinzas não apresentaram diferença significativa. Nas demais frações houve diferença significativa entre os níveis encontrados nas classes (Tabela 1), especialmente para o teor protéico e de carboidratos. Este fato sugere que seria interessante considerar para critério de classificação não somente as dimensões e as características visuais, considerando-se a importância do conhecimento do aporte de nutrientes para o estabelecimento de dietas balanceadas especialmente as restrições ao

consumo de carboidratos necessárias a indivíduos diabéticos ou de restrições alimentares diversas.

### 3.2. Conteúdo de Fenóis Totais

Os fenóis constituem uma classe variada de compostos químicos que apresentam diferentes solubilidades e funções conforme a associação de substituintes na estrutura fenólica base. Sendo assim foram extraídos empregando três solventes: metanol, água e acetato de etila. Na Tabela 2 estão os resultados dos teores de compostos fenólicos nos três solventes determinados nas diferentes classes de cebola.

**Tabela 2: Compostos fenólicos totais em diferentes classes de cebola**

<b>Classes</b>	<b>Metanol (mg fenóis/ g de cebola)</b>	<b>Água (mg fenóis/ g de cebola)</b>	<b>Acet. Etila (mg fenóis/ g de cebola)</b>
Classe 2	2,26 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>
Classe 3	2,24 <sup>b</sup>	2,89 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>
Classe 4	2,31 <sup>c</sup>	2,78 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>
Classe 5	2,28 <sup>a</sup>	2,82 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>

\*Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Nas cebolas analisadas o teor de compostos fenólicos extraídos com metanol variou entre 2,24 e 2,31 mg por grama de cebola (Tabela 2), o que representou diferença significativa a 95% entre as classes, sendo a classe 4 a de maior potencial para aproveitamento destes compostos no processo extrativo.

Os teores de compostos extraídos com água e com acetato de etila não apresentaram diferença significativa entre as classes de cebola, sendo que o último propiciou rendimentos 35 e 28 vezes menores que a água e o metanol respectivamente. Os compostos fenólicos solúveis em metanol e água são mais abundantes em cebola, o que é promissor considerando-se que os flavonóides em função de sua solubilidade podem estar neste conjunto e que são os fenóis de maior potencial antioxidante, além de outros efeitos benéficos. Nos extratos obtidos com acetato de etila os valores indicaram que nas classes analisadas a concentração de fenóis polimerizados em relação aos demais é de

aproximadamente 35 vezes menor, o que é esperado considerando-se que estes são mais abundantes em tecidos ainda não amadurecidos e que as cebolas apesar de um órgão subterrâneo possuem paredes celulares pouco desenvolvidas.

Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, tais como banana 0,31 mg fenóis/ g amostra, maçã 1 mg fenóis/ g amostra e batata 0,99 mg fenóis/ g amostra (equivalente de tirosina), a cebola mostrou-se promissora quando se considera apenas o conteúdo total de compostos fenólicos, especialmente no caso de extração aquosa. No entanto, cabe salientar que os efeitos benéficos dos compostos fenólicos decorrem especialmente da estrutura química, a questão quantitativa é relevante em termos de que a probabilidade de estarem presentes estruturas adequadas para a prevenção de processos oxidativos pode ser maior (MELO et al., 2006).

### **3.3. Atividade Específica das Enzimas Oxirredutases**

Os compostos fenólicos desempenham papéis importantes nos organismos, a ação destes compostos pode estar comprometida diante da presença de enzimas do tipo oxirredutases, principalmente as enzimas peroxidase e polifenoloxidase que dependendo de suas características específicas podem ao atuar causar alterações exatamente nos compostos biologicamente ativos.

Estas enzimas aparecem em células de diferentes seres vivos e tem por função oxidar compostos doadores de elétrons. Bioquimicamente a função destas enzimas é de proteção das células contra danos endógenos e exógenos, e sua atividade se manifesta, principalmente, em situações de desequilíbrios físico-químicos do sistema tecidual. O excesso da ação desta enzima pode resultar em danos indesejáveis nas células. No caso de alimentos as principais alterações são perdas de flavor, cor e de nutrientes (ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006; VALDERRAMA, MARANGONI, CLEMENTE, 2001). Em decorrência destes riscos considerou-se interessante, além de conhecer o conteúdo de compostos fenólicos totais, em suas diferentes formas de associação, estimar o seu potencial de aproveitamento durante os períodos e situações que antecedem ao consumo através da determinação da atividade de peroxidase e catalase.

Na Tabela 3 estão as médias das estimativas de atividade específica de catalase e peroxidase expressas em mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposta/ min / mg de proteínas e variação da absorvância / min / mg de proteína, respectivamente nas diferentes classes de cebolas estudadas.

**Tabela 3: Atividade específica da catalase e da peroxidase nas diferentes classes de cebola**

<b>Classes</b>	<b>Atividade Específica Catalase</b>	<b>Atividade Específica Peroxidase</b>
Classe 2	0,025 <sup>a</sup>	0,031 <sup>a</sup>
Classe 3	0,024 <sup>a</sup>	0,003 <sup>b</sup>
Classe 4	0,014 <sup>b</sup>	0,026 <sup>a</sup>
Classe 5	0,017 <sup>c</sup>	0,025 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A atividade específica da catalase nas amostras de cebolas variou quase em dobro (0,014 a 0,025), sendo a classe 2 a que apresentou maior atividade específica, mesmo sem diferença significativa em relação a classe 3. As classes 4 e 5 tiveram atividade enzimática menores, diferindo significativamente em relação as demais. Possivelmente a maior atividade desta enzima nas classes 2 e 3, poderão propiciar a estas uma maior função protetora, visto que esta enzima atua convertendo o peróxido de hidrogênio, que se trata de uma substância tóxica para as células, numa espécie química que seja inócua e dificulta em consequência a atividade da peroxidase que requer a presença de peróxido de hidrogênio como doador de oxigênio no processo oxidativo.

A variação da atividade específica da peroxidase entre as classes foi na razão de 10 vezes entre a menor e a maior, sendo a classe 3 a que apresentou menor atividade específica da enzima peroxidase, diferindo significativamente das demais. Cabe salientar também que a peroxidase pode causar oxidação em compostos doadores de elétrons diversos e não apenas os fenólicos (VALDERRAMA, MARANGONI, CLEMENTE, 2001; ZANATTA, ZOTARELLI e CLEMENTE, 2006; CARNEIRO, ROLIM e FERNANDES, 2003; MELO e VILAS BOAS, 2006). No caso das cebolas ricas em compostos sulfurados também podem ser afetados pela ação das peroxidases endógenas.

Em função de seus mecanismos de atuação é esperado que as enzimas catalase e peroxidase tenham efeito sinérgico antagônico, visto que a catalase decompõem o peróxido de hidrogênio que é doador de oxigênio para o processo oxidativo catalisado pela peroxidase. Apenas na classe 2 este comportamento não foi observado, um exemplo é o caso da classe 3, onde a catalase apresentou atividade específica aproximadamente duas vezes maior que as demais enquanto a peroxidase mostrou uma atividade dez vezes menor. Estes dados de estimativa das atividades específicas dessas enzimas nas diferentes

classes de cebolas comerciais são ferramentas importantes, para a adoção de processos que minimizem danos na composição e na velocidade de degradação dos tecidos e por consequência preservem o potencial de compostos funcionais disponíveis nos tecidos.

No caso de consumidores que buscam em sua dieta não apenas as funções nutricionais básicas, mas também compostos com efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, como é o caso dos compostos fenólicos, a classe 3 seria a mais recomendada para ser consumida na forma *in natura* (salada) tendo como base a atividade estimada para as enzimas oxirredutases. Ao contrário das classes 4 e 5 que apresentaram a maior atividade específica para a peroxidase, sugerindo que ao serem consumidos os compostos fenólicos teriam já sofrido alterações na sua estrutura, dependendo das variáveis abióticas que antecederam o consumo. Neste caso para preservar os fenóis seria interessante inativar as enzimas, ou seja, processar as cebolas de alguma forma, especialmente em caso de armazenamento.

A polifenoloxidase é uma enzima intracelular que ocorre em plantas, animais e fungos. Esta enzima contém cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas (GOMES et al., 2001). Esta enzima não foi detectada nas cebolas analisadas o que sugere também que as cebolas não estavam ainda afetadas por contaminantes exógenos.

Há muitos estudos sobre a determinação de melhor pH e temperatura para inativação de enzimas oxirredutases, principalmente peroxidase e polifenoloxidase, em relação a catalase quase não se encontra estudos a respeito.

Comparando a média da atividade específica da enzima peroxidase encontradas nas classes de cebola com outras matrizes estudadas por alguns autores, como por exemplo, VALDERRAMA, ZOTARELLI e CLEMENTE (2006) que avaliaram o comportamento das atividades enzimáticas da polifenoloxidase e da peroxidase em polpa de goiaba frente ao tratamento térmico, encontraram atividade específica de 1,2 e 2,9 para peroxidase solúvel de polpa de goiaba e peroxidase ionicamente ligada a polpa de goiaba respectivamente. Os valores são expressos como aumento de uma unidade de absorbância por minuto/mL. A enzima peroxidase apresenta atividade específica superior nas classes de cebolas analisadas, ou seja, 4,5 aumento de uma unidade de absorbância por min/mg de proteína. A atividade específica da polifenoloxidase foi de 1,51 na polpa da goiaba. Esta enzima não foi detectada nas classes de cebola.

Em relação à maçã, as classes de cebolas apresentam atividade específica da enzima peroxidase inferior, pois segundo VALDERRAMA, MARANGONI e CLEMENTE (2001) que avaliaram o efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase e

polifenoloxidase em maçã dos cultivares Fuji e Gala. Determinaram 31 e 220 de peroxidase para polpa e casca da maçã do tipo Gala e 128 e 229 para polpa e casca da maçã Fuji. Os resultados são expressos como aumento de uma unidade de absorbância por minuto/g de amostra. Os valores encontrados para a enzima polifenoloxidase foram de 2,4 e 0,96 na polpa e na casca da amostra de maçã Gala e 5,50 e 12,4 da polpa e da casca da maçã Fuji, respectivamente. Nenhum dos trabalhos avaliaram a atividade específica da enzima catalase.

#### 4. CONCLUSÃO

A determinação da composição centesimal das diferentes classes de cebolas comerciais mostrou que umidade e cinzas não apresentaram diferença significativa entre as classes, porém ocorre diferença em outras frações de interesse nutricional, como açúcares redutores e proteínas.

Os extratos da cebola apresentaram ampla faixa de conteúdo fenólico (0,08 e 2,89 mg<sub>fenóis</sub>·g<sub>(bs)</sub><sup>-1</sup>), sendo que os extratos obtidos com água os que se destacaram significativamente, sendo 1,3 e 35 vezes maiores que os extratos metanólicos e os extraídos com acetato de etila respectivamente.

As estimativas de atividade específica de catalase e peroxidase sugerem que a classe 3 seria mais promissora em aporte de compostos fenólicos na dieta, pois seria a menos susceptível as degradações por ação da peroxidase. A atividade de polifenoloxidase não foi detectada nas cebolas coletadas.

As diferenças nas características bioquímicas verificadas entre as diferentes classes de cebola sugerem que seria interessante rever o critério de classificação baseado apenas no diâmetro transversal para atribuir valor comercial a esta matéria-prima.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17<sup>th</sup> edition, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, n 13, p. 105-114, 2003.

BLIGH & DYER, E. C. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, n. 37, p. 911-917, 1959.

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea Becc*) sob a ação de diferentes inibidores. **Biological Sciences**. V. 25, n 1, p. 189-193, 2003.

CIENTEC: Fundação de Ciência e Tecnologia. INTERLAB VI – Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; publicado no Diário Oficial da União em 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19819.

EMATER/RS – Classificação Comercial da Cebola. Disponível: <http://www.emater.tche.br>, acessado em 06/12/2007.

EMBRAPA – Sistema de Produção de Cebola (*Allium Cepa L.*). Disponível: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/autores.htm>, acessado em 21/02/2008.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G de.; MOREIRA, M. A. Propriedades Físico-Químicas de Polifenoloxidase de Feijão (*phaseolus vulgaris L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21 n.1, 2001.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. V 33, n 7, p. 601-617, 1995.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª. Ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 13, 1997.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. da S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 26, n 3, 2006.

MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do Escurecimento Enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 26, n 1, p. 110-115, 2006.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. **Analytical Chemistry**, V 3, n 31, p. 326-428, 1959.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, GERALDO MAGELA.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**. V 30, n 2, p 351-355, 2007.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 21, n 3, p. 321-325, 2001.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, F. M.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26 n.3, p. 2, 2006.

## **ARTIGO 3**

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE CEBOLAS COMERCIAIS E DA MICROALGA CHLORELLA

Vânia Machado Recart; Eliane Cicolatti, Melissa Oliveira, Eliana Badiale Furlong  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande  
Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos  
Departamento de Química  
Rua: Eng. Alfredo Huch, 475, caixa postal 474 – Centro  
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi determinar o conteúdo de fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante dos extratos de cebola extraídos em três sistemas solventes (metanol, água e acetato de etila) e da microalga *Chlorella* em metanol, buscando identificar o emprego mais adequado para a eficiência na prevenção da atividade antioxidante. Os extratos foram avaliados frente a três sistemas oxidativos. A capacidade seqüestradora dos radicais livres (DPPH), inibição da ação de enzimas oxirredutases e inibição de peróxidos e compostos oxidados em sistemas lipídicos. O extrato com maior teor de compostos fenólicos foi o aquoso (2,83 mg de fenóis/g de cebola). Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante nos diferentes sistemas empregados, mas o extrato aceto etílico mostrou-se mais eficiente na ação antioxidante, com 53% de inibição/ $\mu\text{g}$  fenóis em DPPH e 53% em inibição de oxidação e em peroxidase.

Palavras-Chave: cebola, *Chlorella*, fenóis, atividade antioxidante

### ABSTRACT

The objective of the work was to determine the total phenolic content and to evaluate the antioxidants activity of extracts of onion extracted in three solvent systems (methanol, water and acetate of etila) and of the microalgae *Chlorella* methanol, searching to identify the job most adequate for efficiency in the prevention of the antioxidants activity. The extracts had been evaluated front the three oxidativos systems, the capacity of scavenging of the free radicals (DPPH), inhibition of the enzyme action oxirredutases and inhibition of peroxides and oxidated compounds lipids in systems. The extract that presented higher concentration of phenolic composite was the watery extract (2,83 mg of fenóis/g of onion). All the extracts had presented antioxidants activity in the different used procedure, but the aceto ethylic shorved the revealed most efficient in the antioxidant action, with 53% of inibição/ $\mu\text{g}$  phenols in DPPH and 53% in inhibition of oxidation and peroxidase.

**Keywords:** onion, *Chlorella*, phenols, antioxidants activity

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que os radicais livres estão entre os fatores responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças crônicas degenerativas, tais como, câncer, diabete, doenças cardiovasculares, catarata e etc. Por se tratarem de moléculas instáveis, ou seja, seus átomos possuem elétrons desemparelhados, estes atingem as membranas lipídicas das células oxidando-as de forma a dificultar sua atividade protetora (SOUSA et al 2007; SROKA e CISOWSKI, 2003; IQBAL, BHANGER e ANWAR, 2007)

A produção de radicais livres nos seres vivos pode ser controlada por diversos compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar. Os antioxidantes podem ser definidos como um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (SINGH e RAJINI, 2004; SOUSA et al 2007; HALLIWELL et al, 1995). O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado e incluem a remoção do oxigênio do meio, seqüestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidante endógeno, inibição de enzimas oxidativas ou mesmo a interação de mais de um mecanismo.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, destacam-se os compostos fenólicos ou polifenóis que são compostos orgânicos que contêm um grupo hidróxi (-OH) ligado diretamente num anel aromático, que conferem a estrutura um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HALLIWELL et al, 1995). Os maiores grupos dos agentes fenólicos com propriedades antioxidantes incluem os fenóis neutros, os ácidos fenólicos, flavonóides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, catequinas e outros presentes naturalmente em frutas e vegetais (OLIVEIRA e FURLONG, 2008; DIMITRIOS, 2006).

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, eles são baseados na estimativa da capacidade seqüestradora de radicais livres, inibição de enzimas oxirredutases e inibição da peroxidação lipídica.

A atividade seqüestradora do radical livre pode ser determinada com o reagente 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve em 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir da diminuição da absorbância do DPPH em presença do antioxidante pode ser estimada a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres. Estes dados permitem estimar a

concentração eficiente (CE) ou chamada de concentração inibitória (CI) do extrato, definida como a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração de DPPH em 50% (SOUSA et al., 2007).

Outra forma de estimar atividade antioxidante de extratos é medir a inibição da reação escurecimento enzimático do guaiacol catalisada pela peroxidase em ausência e presença do composto em estudo. A outra técnica freqüentemente mencionada na literatura consiste em avaliar o grau de oxidação do azeite de oliva pré-oxidado, através das medidas do índice de peróxido e o ácido tiobartitúrico (TBA), usando como inibidor da reação oxidativa os extratos de cebola e *chlorella* contendo compostos fenólicos (PASSOTO, PENTEADO e MANCINI-FILHO, 1998).

Os compostos fenólicos, com atividade antioxidante podem ser obtidos de diferentes fontes, nesse trabalho a obtenção foi a partir de duas matrizes. A cebola (*Allium cepa L.*) que é um bulbo cônico pouco desenvolvido, maciço, envolto por folhas modificadas, as quais se apresentam como túnicas superpostas. As folhas subterrâneas armazenam nutrientes para serem utilizadas por outras porções do vegetal durante o ciclo de vida. (GEMTCHÚJNICOV, 1976; RAVEN et al., 1996). A cebola é considerada como fonte de vitaminas e sais minerais, além de apresentar propriedades terapêuticas comprovadas, como a proteção contra algumas infecções do aparelho digestivo, diminuição do nível de glicose no sangue e proteção contra a arteriosclerose (GOLDMAN et al., 1996).

O segundo tecido estudado foi a *Chlorella*, uma microalga eucariótica unicelular esférica e seu diâmetro varia de 5-10µm, dependendo da espécie (ILLMAN, SCRAGG e SHALES, 2000). É encontrada em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar a fotossíntese. Esta microalga possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento (VONSHAK, 1997). Esta microalga usada como suplemento alimentar, rica em compostos funcionais protetores, não apresenta informações sobre o seu poder antioxidante.

O objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo de fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante dos extratos de cebola e da microalga *chlorella*, buscando identificar o emprego mais adequado para eficiência da atividade antioxidante.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Reagentes

Os solventes e reagentes empregados foram analiticamente puros. Sendo o reagente Folin-Ciocalteu da marca Polipur, a Quercetina e o 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) da Sigma, o ácido gálico da Vetec, e o guaiacol da Merck.

### 2.2. Amostras

As cebolas cedidas e classificadas pela EMATER, Rio Grande, RS foram coletadas no município de São José do Norte no Rio Grande do Sul em março de 2007. A classificação foi realizada segundo Regulamento Técnico de Qualidade da Cebola (1995) portaria n° 529 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FURG as cebolas foram descascadas, lavadas, picadas e secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C, até atingirem valores de umidade de 13%.

A microalga *chlorella* foi obtida na forma de pastilhas, em estabelecimento comercial de lojas especializadas em produtos alimentícios especiais na cidade de Rio Grande – RS. As pastilhas foram moídas com o auxílio de grau e pistilo até ficarem na forma de pó com granulometria 0,35 mm

### 2.3. Extração e Determinação do teor de fenóis totais

A extração dos compostos fenólicos das cebolas foi realizado a frio com água, acetato de etila e metanol e a microalga *chlorella* com metanol, na proporção de 1:5 de massa seca : solvente, em agitador horizontal a temperatura ambiente, seguida da partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5% e filtração. Os extratos foram armazenados em freezer até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais, das diferentes classes de cebolas e da microalga *chlorella* foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, com uma curva de calibração da quercetina e tirosina respectivamente, com faixa de concentração variando de 2 e 16µg/mL (BADIALE-FURLONG et al., 2003). O método esta descrito em detalhes no ANEXO 3.

## 2.4. Determinação da Atividade Antioxidante

### 2.4.1. Atividade Seqüestradora do Radical Livre DPPH

A solução estoque de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) foi preparada pesando 0,0100g e transferindo para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com metanol. Uma alíquota de 10 mL foi retirada da solução estoque e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, e o volume final foi completado com metanol. Alíquotas de 100 µL, 200 µL e 500 µL dos extratos de cebola e *chlorella*, com concentração conhecidas de compostos fenólicos foram colocados em diferentes tubos de ensaio. Em seqüência 3,9 mL, 3,8 mL e 3,5 mL da solução de DPPH em metanol ( $5 \times 10^{-5}$  M) foram adicionados e, após agitação manual, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo de luz. Ao final de 15, 30, 45 e 60 min a absorbância foi medida a 515 nm e a capacidade de seqüestrar o radical, expresso como percentual de inibição, calculada de acordo com as equações 1 e 2 (SOUSA et al., 2007).

#### Equação 1:

$$\% \text{ de Inibição Bruto} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{abs controle} \cdot 100$$

Onde absorbância do controle é igual a solução de DPPH sem antioxidante, sendo o volume completado com metanol

#### Equação 2:

$$\% \text{ de Inibição Específica} = (\% \text{ de inibição bruto} / \mu\text{g de fenóis})$$

Como padrão de comparação foi utilizado a quercetina para avaliar a capacidade de seqüestrar o radical DPPH, determinadas nas mesmas condições dos ensaios realizados com os extratos analisados.

### 2.4.2. Atividade de Inibição Enzimática Oxidativas

A enzima peroxidase foi extraída de polpa de batata (*Solanum Tuberosum* L.) da variedade rosa (20g) com 100 mL de solução tampão fosfato pH 7, sob agitação em blender por 2 min, seguida de filtração com algodão. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi adicionada a 20 mL de acetona para precipitação da enzima. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a enzima ressuspendida com EDTA 0,25M (OLIVEIRA, 2005).

A reação enzimática foi realizada a 30°C e pH 6,0 utilizando o guaiacol como substrato em presença de peróxido de hidrogênio 0,08%. A reação foi realizada misturando 1,5 mL de solução tampão fosfato, 1,7 mL de água destilada, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, 0,5 mL de guaiacol 1%, 1 mL do extrato enzimático e 0,3 mL dos extratos analisados que continham teores conhecidos de compostos fenólicos. Os extratos foram adicionados e para avaliar o seu efeito na velocidade da reação no grupo controle o volume de extrato foi substituído por água destilada. A absorbância foi medida a 470 nm em um espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 100 nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de reação. A atividade antioxidante foi expressa como o percentual de inibição da reação de escurecimento após 10 minutos de reação, em relação ao seu controle. Calculada de acordo a seguinte equação 3.

**Equação 3: (Abs.controlado - Abs. Amostra).100/Abs.controlado**

### **Estudo do Mecanismo de Inibição de Peroxidase pelos Extratos Fenólicos**

Foram utilizadas diferentes concentrações do substrato (guaiacol) e os resultados foram plotados segundo o método gráfico de Lineweaver e Burk. A reação ocorreu em solução tampão fosfato pH 6,0, com o extrato enzimático da batata, peróxido de hidrogênio 0,08% e diferentes alíquotas de guaiacol 0,5% como substrato da reação a saber (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, mL) em cada sistema reator. Além do grupo controle o procedimento foi repetido em presença dos extratos fenólicos obtidos das amostras de cebola e microalga *chlorella*. Para os extratos de cebola extraídos com metanol e com água foram utilizadas alíquotas de 300 µL e 500 µL e para os extratos de cebola tendo com solvente o acetato de etila e a microalga *chlorella* as alíquotas empregadas foram de 500 µL e 800 µL.

#### **2.4.3. Avaliação da Peroxidação Lipídica**

Inicialmente o azeite de oliva foi submetido a diferentes condições pró-oxidantes: tratamento térmico a 100°C durante 30 minutos, tratamento térmico a 30°C durante 30 minutos, adição de cloreto férrico sob agitação a 25°C e exposição à radiação ultra-violeta com comprimento de onda de 260 e 354 nm em diferentes tempos (20, 40, 60 minutos). Para avaliar o efeito dos tratamentos foi determinado o índice de peróxido (IP), que consistia na reação da amostra com iodeto de potássio, solução de ácido acético-

clorofórmio e água destilada. Com determinação do iodo liberado por titulação com solução de tiosulfato de sódio padronizada. O método está descrito em detalhes no ANEXO 3.

O índice de peróxido, expresso como meq/Kg de amostra, foi calculado conforme a equação 4.

**Equação 4:  $I.P. = (V_A - V_B) \cdot N \cdot 1000 / P_A$**

$V_A$  = volume de tiosulfato gasto na amostra

$V_B$  = volume de tiosulfato gasto no branco

N = normalidade do tiosulfato de sódio

$P_A$  = peso da amostra em gramas

O teste do ácido tiobartúrico (TBA) foi realizado segundo metodologia de VYNCKE (1970) com modificações. O método consiste em determinar os malonaldeídos formados da reação durante a oxidação lipídica por decomposição de hidroperóxidos com o TBA. A coloração avermelhada foi determinada espectrofotometricamente a 538 nm após 40 minutos. Os valores das concentrações de malonaldeídos formados foram determinados a partir de uma curva analítica com padrão TMP (1,1-3,3-tetra metoxipropano) com concentração variando de  $1,01 \cdot 10^{-8}$  a  $10,1 \cdot 10^{-8}$ . O método está descrito em detalhes no ANEXO.

Os testes de índice de peróxido e do ácido tiobartúrico foram realizados sem a adição dos extratos (grupo controle) e com a adição dos extratos de cebola e *Chlorella* para avaliar os efeitos antioxidantes destes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Determinação de Fenóis Totais nas Amostras de Cebola e *Chlorella*

A Tabela 1 apresenta a média do conteúdo de compostos fenólicos totais da cebola extraídos em três sistemas solventes e da microalga *Chlorella* em extrato metanólico.

**Tabela 1: Resultados dos fenóis totais presentes nos extratos estudados**

Extrato	Fenóis Totais (mg <sub>fenóis</sub> /g amostra)
Cebola Metanol	2,27
Cebola Água	2,83
Cebola Acetato de Etila	0,08
<i>Chlorella</i> metanol	0,20

Para determinar o conteúdo de compostos fenólicos nas diferentes classes de cebolas foi realizado um procedimento de extração otimizado para obtenção dos indicativos de performance, como limite de quantificação e recuperação, cujas avaliações foram realizadas em triplicata. O limite de quantificação determinado foi de 30,7 µg fenóis/g amostra. O teor médio de recuperação para o método completo usando a extração otimizada foi de 88% e variou entre 84 e 92 % da menor para a maior concentração testada. As condições de extração resultam em valores que estão fora dos valores dos pontos críticos para a confiabilidade de resultados analíticos e neste caso os teores obtidos para limites de quantificação e recuperação sugerem que o método adaptado é promissor para determinar fenóis.

O conteúdo de fenóis totais variou entre 0,08 mg<sub>fenóis</sub>/ g amostra na cebola extraída com acetato de etila e 2,83 mg<sub>fenóis</sub>/ g amostra na cebola extraída com água. A variabilidade na distribuição e composição dos compostos fitoquímicos fenólicos é grande para os diferentes extratos estudados neste trabalho, sendo este mesmo comportamento verificado por outros autores. Cabe lembrar que isto pode ser determinado pela variedade, espécie, procedimento de plantio, condições de estocagem e processo ao qual o tecido é submetido (KIM et al., 2003). Em relação ao extrato da microalga *chlorella* a média do teor de compostos fenólicos encontrado foi de 0,20 mg<sub>fenóis</sub>/ g amostra e não foram encontrados informes na literatura sobre os níveis destes compostos.

Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura, como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 0,31 mg fenóis/ g amostra, maçã 1,0 mg fenóis/ g amostra e batata 0,99 mg fenóis/ g amostra (equivalente de tirosina), 0,061-0,084 mg fenóis/ g de amostra (ácido ferúlico) (ZHOU et al., 2004), 0,69 e 0,35 mg fenóis/ g de amostra em bagaço de laranja e polpa de berinjela (BADIALE-FURLONG et al., 2003), a cebola parece ser bem promissora quando se investiga vegetais com potencial de aporte de compostos fenólicos na dieta.

Uma vez que os solventes que propiciaram a extração de maiores teores de fenóis na cebola foram o metanol e a água, esta resposta mostrou que os compostos fenólicos solúveis em metanol e água são mais abundantes em cebola, o que é promissor considerando-se que flavonóides podem estar neste conjunto em função da solubilidade. Nos extratos obtidos com acetato de etila os valores indicam que foram extraídas baixas concentrações de fenóis que possivelmente se encontravam em estado polimerizado.

### **3.2. Determinação da Atividade Antioxidante**

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. Nesse estudo foram realizadas estimativas da atividade em diferentes sistemas que envolvem oxidação para identificar o tipo de mecanismo de inibição dos compostos fenólicos presentes nos extratos analisados e a melhor forma de aplicar os compostos na sua condição de maior eficiência

#### **3.2.1. Capacidade de Seqüestrar o Radical Livre DPPH**

A Tabela 2 apresenta os resultados das determinações realizadas para avaliar a capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH, expressa em percentual de inibição, exibida pelos extratos de cebola e *chlorella* nas alíquotas de 100 µL, 200 µL e 500 µL com seus respectivos conteúdos de fenóis totais explicitados.

**Tabela 2: Capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH (% de inibição) utilizando-se diferentes níveis de compostos fenólicos**

Extratos	Compostos fenólicos ( $\mu\text{g/mL}_{\text{extrato}}$ )	% de Inibição Bruto				Inibição Específica*
		15 min	30 min	45 min	60 min	
Ceb M-OH 1	3,4	16,7 <sup>a</sup>	20,7 <sup>a</sup>	22,4 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	6
Ceb M-OH 2	7,4	24,5 <sup>b</sup>	29,2 <sup>b</sup>	31,5 <sup>b</sup>	33,2 <sup>b</sup>	4
Ceb M-OH 3	17	37,9 <sup>c</sup>	45 <sup>c</sup>	50 <sup>c</sup>	53,4 <sup>c</sup>	3
Ceb H <sub>2</sub> O 1	12,6	10 <sup>d</sup>	12,4 <sup>d</sup>	13,4 <sup>d</sup>	13,4 <sup>d</sup>	1
Ceb H <sub>2</sub> O 2	25,2	16,2 <sup>a</sup>	17,5 <sup>e</sup>	17,8 <sup>e</sup>	18,2 <sup>e</sup>	0,7
Ceb H <sub>2</sub> O 3	63,2	18,6 <sup>e</sup>	24,2 <sup>f</sup>	26,4 <sup>f</sup>	28,4 <sup>f</sup>	0,4
Ceb Acet 1	0,074	4 <sup>f</sup>	4,2 <sup>g</sup>	3,7 <sup>g</sup>	3,9 <sup>g</sup>	53
Ceb Acet 2	0,15	4,7 <sup>f</sup>	5 <sup>h</sup>	5 <sup>g</sup>	5,2 <sup>g</sup>	34
Ceb Acet 3	0,37	7,1 <sup>g</sup>	7,7 <sup>h</sup>	7,9 <sup>h</sup>	8,7 <sup>h</sup>	21
Chlorella 1	0,29	0,3 <sup>h</sup>	1,75 <sup>g</sup>	2,5 <sup>g</sup>	2,7 <sup>g</sup>	6
Chlorella 2	0,57	0,7 <sup>h</sup>	3,2 <sup>g</sup>	3,7 <sup>g</sup>	5,2 <sup>g</sup>	5,6
Chlorella 3	1,44	2,7 <sup>i</sup>	5,2 <sup>h</sup>	7,7 <sup>h</sup>	10,2 <sup>h</sup>	4,5
Quercetina 1	0,27	10,5 <sup>d</sup>	14,5 <sup>d</sup>	14,7 <sup>d</sup>	15,3 <sup>i</sup>	51
Quercetina 2	0,5	26,6 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	32,2 <sup>b</sup>	60
Quercetina 3	1,3	65 <sup>j</sup>	71 <sup>i</sup>	77,7 <sup>i</sup>	80,4 <sup>j</sup>	56,5

Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Os números 1, 2 e 3 referem-se a utilização de 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  de extratos.

\*Expressos em % de inibição/ $\mu\text{g}$  fenóis.

De acordo com os resultados pode se observar que todos os extratos possuem capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH, entretanto este caráter foi diferenciado entre os extratos analisados, possivelmente em decorrência das diferentes estruturas químicas extraídas pelos solventes utilizados, além da concentração dos compostos fenólicos nos extratos.

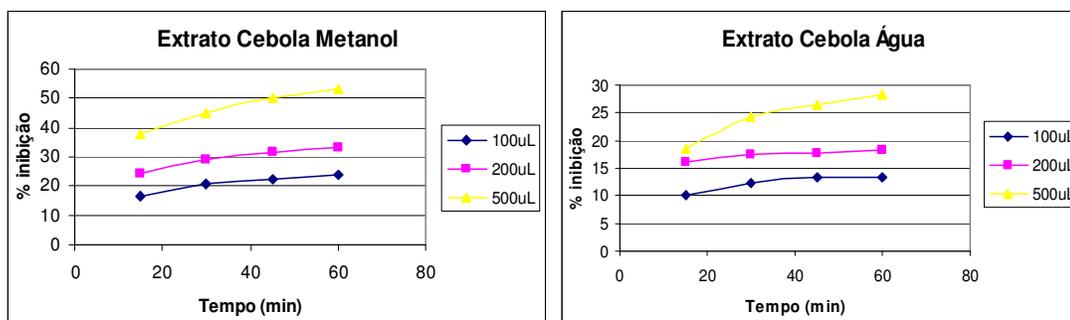
Quando se observa o percentual de inibição bruto nos tempos de reação avaliados os extratos de cebola extraído com os solventes metanol e água foram os que apresentaram maior percentual de inibição respectivamente (Tabela 2). Embora a atividade antioxidante esteja relacionada com as estruturas químicas envolvidas no processo, a concentração de compostos fenólicos também é um aspecto importante considerando-se especialmente que no extrato de cebola metanólico os níveis são até cinquenta vezes superiores em relação aos com acetato de etila e doze vezes maior em relação da microalga *chlorella*. O mesmo caso foi verificado para o extrato aquoso que apresentou uma concentração de compostos fenólicos 170 vezes maior que o acetato de etila e 45 vezes maior que a do extrato de *chlorella*. Ficou evidente por tanto que estes compostos apresentariam resultados maiores na inibição bruta, mas quando se levava em consideração a inibição específica, ou seja, o percentual de inibição em função da concentração dos compostos fenólicos presentes, o extrato de cebola extraído com acetato de etila foi mais eficiente na capacidade de

seqüestrar o radical livre DPPH apresentando valores de 53; 34; e 21 %inibição/  $\mu\text{g}$  fenóis respectivamente para cada concentração empregada, e foram os resultados mais próximos aos do padrão quercetina.

SINGH e RAJINI (2004) investigaram o potencial antioxidante de extratos aquosos de cascas de batata através de várias técnicas de sistemas *in vitro*, tais como, peroxidação lipídica, DPPH, poder de redução e quelação do íon ferro. Os extratos de cascas de batata demonstraram uma considerável atividade antioxidante de seqüestrar o radical livre DPPH tal atividade tinha seu efeito aumentado significativamente quando se aumentava a concentração dos extratos aquosos de cascas de batata. Além de possuir caráter antioxidante nas demais técnicas desenvolvidas, sendo por tanto considerado eficiente ingrediente de alimentos funcionais para minimizar o efeito do estresse oxidativo.

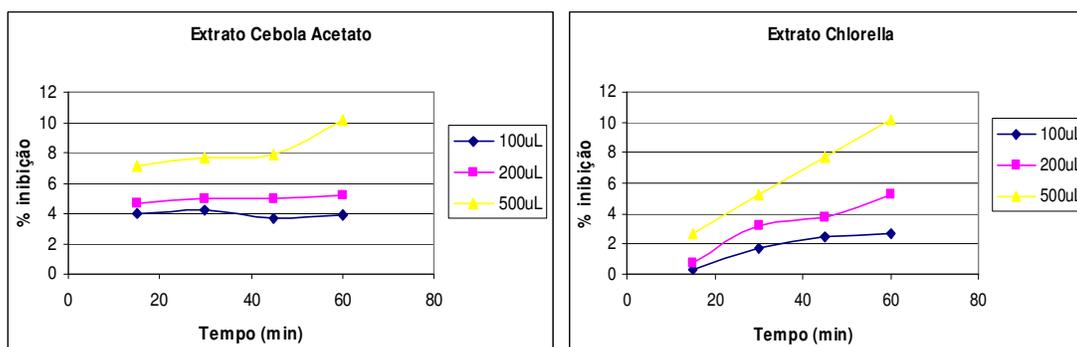
MELO et al (2006) avaliaram a capacidade antioxidante de quinze hortaliças comercializadas na cidade do Recife, PE. Os extratos metanólicos foram testados quanto a atividade antioxidante em sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e a habilidade de seqüestrar o radical estável DPPH. Todas as hortaliças investigadas exibiram propriedades antioxidantes, entretanto a ação foi diferenciada entre os vegetais. Os extratos metanólicos da couve (folha), tomate, batata, couve-flor, repolho verde, espinafre e alface crespa, foram os mais eficazes no seqüestro do radical livre DPPH, com % de inibição superior a 70%. Os extratos metanólicos da alface lisa, cebola branca e vagem apresentaram ação moderada (60-70%), enquanto que a cebola roxa, chuchu, pepino e cenoura exibiram a mais fraca capacidade de sequestrar o radical livre DPPH. No sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico os extratos metanólicos do espinafre e couve-flor exibiram a mais elevada atividade antioxidante (superior a 70%). As hortaliças testadas, assim como as cebolas estudadas, podem ser vistas como fontes dietéticas de antioxidantes que podem trazer benefícios à saúde, portanto o seu consumo deve ser estimulado.

Em função do percentual de inibição do radical livre pelos extratos de cebola e *chlorella* foi realizado a avaliação do efeito da variável tempo de reação para melhor interferir sobre o mecanismo de atuação do antioxidante.



(a)

(b)



(c)

(d)

(a) Extrato Cebola Metanólico. (b) Extrato Cebola Aquoso. (c) Extrato Cebola Acetato de Etila. (d) Extrato Chlorella.

**Figura 1:** Avaliação da variável tempo em função do percentual de inibição dos extratos

De acordo com a Figura 1 pode-se observar que todos os extratos tiveram o mesmo tipo de comportamento, ou seja, com o passar do tempo e com o aumento da concentração de extrato utilizado, houve um maior percentual de inibição que tendia a se estabilizar após 20 minutos de interação com o radical livre DPPH.

### 3.2.2. Estudo da Inibição de Enzimas Oxidativas pelos Extratos em Estudo

O mecanismo de inibição de oxidação dos extratos em um sistema enzimático aquoso de peroxidase extraída da batata foi avaliado para compreensão e identificação da melhor forma para um possível emprego dos compostos extraídos.

A Tabela 3 apresenta a concentração de compostos fenólicos contida nos extratos utilizados em cada experimento, os valores de Kms e velocidades máximas obtidos a partir das equações das retas dos gráficos de Lineweaver e Burke e o percentual de inibição, causada pela presença dos extratos de cebola e *chlorella* no meio reacional.

**Tabela 3: Conteúdo de Fenóis Totais, Valores de Km, Velocidades Máximas e % de Inibição das Reações de Escurecimento Enzimático pelos Compostos Fenólicos dos Extratos em estudo**

Extrato	Fenóis (mg <sub>fenóis</sub> /mL)	Km controle	Km extrato	V <sub>máx.</sub> controle	V <sub>máx.</sub> extrato	% de Inibição da reação
Ceb. Metanol 1	2,14	0,12	0,12	0,18	0,15	17
Ceb. Metanol 2	1,29	0,17	0,45	0,26	0,19	27
Ceb. Água 1	4,54	0,21	0,38	0,16	0,12	25
Ceb. Água 2	2,73	0,17	0,36	0,26	0,18	31
Ceb. Acetato 1'	0,005	0,07	0,065	0,15	0,105	30
Ceb. Acetato 2'	0,008	0,07	0,068	0,15	0,07	53
Chlorella 1'	0,019	0,07	0,044	0,15	0,08	47
Chlorella 2'	0,030	0,07	0,05	0,15	0,05	67

1 e 2: níveis de fenóis decrescentes

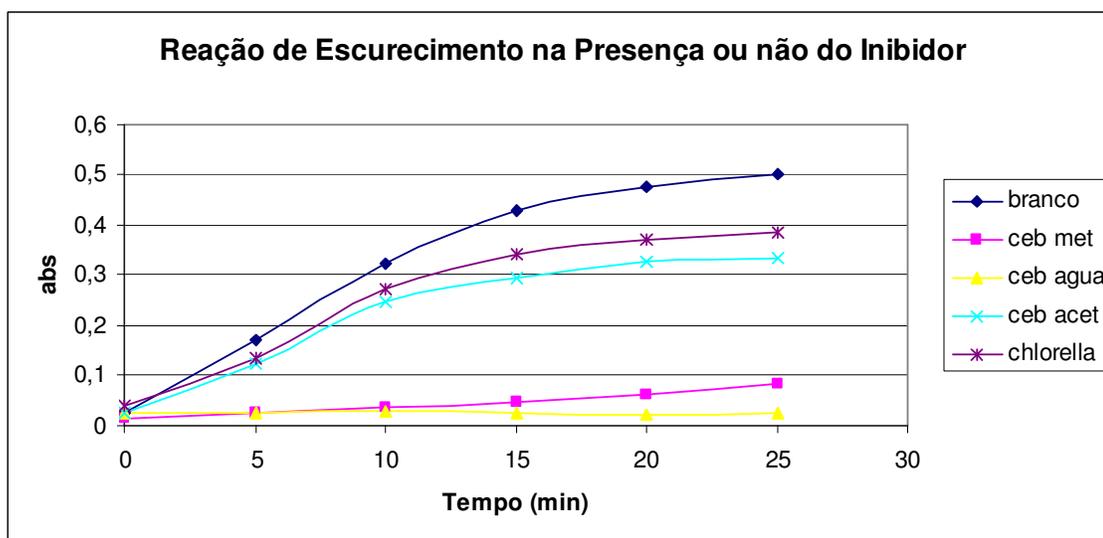
1' e 2': níveis de fenóis crescentes

De acordo com a Tabela 3 não foi observada relação linear crescente entre os teores de fenóis e a inibição do escurecimento avaliada pela velocidade máxima relativa ao controle (ausência de extrato). Este efeito reforça o esperado em relação ao efeito da estrutura química dos componentes ativos dos extratos, tais como a posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos polifenóis são fatores relevantes para esta atividade (MELO et al., 2006).

As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuíram em presença dos extratos de cebola e *chlorella*, o que caracterizaria o efeito de inibição da oxidação do guaiacol catalisado pelas peroxidases extraídas da batata. Os valores de Km das reações em presença de alguns extratos fenólicos, como por exemplo, o extrato de cebola extraído com acetato de etila e o extrato da microalga *chlorella*, diminuíram em relação à reação controle. Este comportamento não ocorreu com os extratos de cebola metanólico (300 µL) e com os extratos aquosos que tiveram valores de Km aumentados em relação ao controle. O extrato de cebola metanólico (500 µL) teve valor de Km igual ao do controle. Os valores de Km diferenciados em relação ao controle deve-se aos diferentes tipos de inibição ou ativação provocada pelos extratos analisados. No menor nível do extrato metanólico e dos aquosos foi observado o mesmo tipo de inibição, a inibição competitiva, ou seja, o inibidor se combina com a enzima livre de tal maneira que ele compete com o substrato normal pela ligação ao sítio ativo. E os extratos de cebola extraídos com acetato de etila e o extrato da microalga *chlorella* apresentaram o mesmo tipo

de inibição, que é a inibição não-competitiva, a qual o inibidor pode combinar-se com a enzima livre ou com o complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos.

A Figura 2 ilustra o comportamento da reação de escurecimento enzimático do guaiacol catalisada pela peroxidase em ausência e presença de extratos fenólicos ao longo de 25 minutos.



Branco = reação sem adição de extrato fenólico; ceb met = extrato fenólico de cebola extraído com metanol; ceb água = extrato fenólico de cebola extraído com água; ceb acet = extrato fenólico de cebola extraído com acetato de etila; chlorella = extrato fenólico de chlorella extraído com metanol.

**Figura 2:** Inibição da Reação de Escurecimento Enzimático pelos Extratos Fenólicos de Cebola e *Chlorella*

De acordo com a Figura 2 pode ser observado que houve diminuição da velocidade de escurecimento ao longo do tempo quando se empregava os extratos das diferentes fontes, sugerindo que a reação de escurecimento enzimático foi inibida, destacando-se os extratos de cebola aquoso e metanólico. Nestes casos as atividades inibitórias coincidem com os maiores teores de compostos fenólicos determinados.

### 3.2.3. Avaliação da Peroxidação Lipídica

Inicialmente foram estudadas diferentes condições para oxidar o azeite de oliva, visando escolher a melhor condição que seria empregada para avaliar o efeito antioxidante. A condição foi escolhida baseada nos valores de Índice de peróxido e concentrações de malonaldeído. A Tabela 4 apresenta as condições empregadas para oxidação do azeite de oliva, monitorado pela determinação do índice de peróxido e concentrações de malonaldeído que antecederam o estudo.

**Tabela 4: Índice de Peróxido e Concentração de Malonaldeído em diferentes Condições Pró-Oxidantes**

Condição Pró-Oxidante	Índice de Peróxido*	[malonaldeído]**
Tratamento Térmico (100°C/30min)	Não detectado	1,15. 10 <sup>-8</sup>
Tratamento Térmico (30 °C/30min)	0,98	0,69. 10 <sup>-8</sup>
Tratamento Metal (FeCl <sub>3</sub> agitação/25 °C)	22,4	2,27. 10 <sup>-8</sup>
UV (20, 40, 60 min)	Não detectado	Não detectado
NaCl (50°C/30min)	Não detectado	0,93. 10 <sup>-8</sup>

\* Expressos em mEq peróxido/kg amostra; \*\* Expresso em molaridade (M).

De acordo com a Tabela 4, a condição que melhor permitiria o acompanhamento do processo oxidativo para estudo *in vitro* do processo, foi aquela em que tanto os teores de peróxido como os de malonaldeídos formado variaram dentro do mesmo intervalo do experimento , ou seja, quando o processo oxidativo foi catalisado pelo cloreto férrico sob agitação a 25 °C.

Nos primeiros experimentos os extratos de cebola e *chlorella* e o cloreto férrico foram colocados ao mesmo tempo no sistema lipídico, ocasionando uma pequena variação no índice de peróxido comparada a não adição dos antioxidantes, ou seja, sem a adição do extrato o índice de peróxido foi igual a 20,3 mEq peróxido/Kg amostra e com a adição dos extratos de cebola metanólico, aquoso, acetato de etila e da microalga *chlorella* o índice de peróxido encontrado foi 19, 18, 17 e 20 mEq peróxido/Kg amostra respectivamente. Este comportamento mostrou que uma vez iniciado o processo oxidativo ele não era interrompido

pela adição dos extratos com a eficiência necessária para proteger o sistema lipídico do dano. Portanto as análises foram realizadas se adicionando os extratos estudados antes do início da oxidação. A Tabela 5 apresenta o índice de peróxido, a concentração de malonaldeídos e % de inibição causados pelos extratos estudados antes do início do processo oxidativo.

**Tabela 5: Índice de Peróxido, Concentração de Malonaldeído e % de Inibição com Adição do Extrato antes do Processo Oxidativo**

Extrato	Compostos Fenólicos nos Extratos*	Índice de Peróxido**	Concentração de Malonaldeído***	% de Inibição
Ceb. M-OH	9,1	12	$1,82 \cdot 10^{-8}$	20
Ceb. H <sub>2</sub> O	14,6	16,9	$1,16 \cdot 10^{-8}$	49
Ceb. Acet.	0,012	6,6	$1,08 \cdot 10^{-8}$	53
Chlorella	0,53	17,0	$1,87 \cdot 10^{-8}$	18

\* Expressos em µg fenóis/mL extrato; \*\* Expressos em mEq peróxido/kg amostra; \*\*\* Expresso em molaridade (M).

De acordo com a Tabela 5 o extrato de cebola mais promissor para evitar a oxidação ocasionada pela catálise metálica em sistema lipídico foi o extraído com acetato de etila com uma inibição percentual de 53% acompanhado pela menor formação de peróxido (até três vezes menor) e de malonaldeído (1,5 vezes menor) ao longo do tempo do experimento.

Estudos têm sido realizados visando oferecer alguma contribuição para a estabilização de alimentos lipídicos, por exemplo, PASSOTO, PENTEADO e MANCINI-FILHO (1998) avaliaram a atividade antioxidante da vitamina A na forma de acetato de retinol e de seu principal precursor o β-caroteno, adicionados a um sistema de óleo de soja previamente sensibilizado à oxidação. Os parâmetros utilizados como grau de atividade oxidativa como neste estudo foram o índice de peróxido (I.P.) e teores de malonaldeído. As determinações das atividades antioxidantes foram comparadas à do butilhidroxitolueno (BHT). E foi verificado que o óleo de soja adicionado de β-caroteno apresentou os I.P. reduzidos (131,3 meq/Kg) em relação ao controle (151,3 meq/Kg), portanto de menor magnitude em relação ao deste trabalho. Quanto aos teores de malonaldeído, não houve diferença significativa em relação ao controle. No caso do acetato de retinol o índice de peróxido reduziu em aproximadamente quatro vezes em relação ao do controle.

Comparando os resultados obtidos com este que utilizada a o  $\beta$ -caroteno e o acetato de retinol como antioxidantes, o extrato aceto etílico foi mais eficiente contra a oxidação dos ácidos graxos, pois o percentual de inibição obtido por eles após 72 horas foi de 54,5% em relação a concentração de malonaldeído ao extrato controle, este percentual foi aproximadamente o encontrado para o extrato de cebola mencionado.

#### 4. CONCLUSÃO

Os extratos de cebolas extraídos com diferentes solventes apresentaram uma ampla faixa de compostos fenólicos (0,08 e 2,83 mg<sub>fenóis</sub>/g amostra), sendo que o extrato aquoso foi o que extraiu maior conteúdo de compostos fenólicos. No extrato da microalga *chlorella* a média do teor de fenóis encontrado foi de 0,20 mg<sub>fenóis</sub>/g amostra.

Todos os extratos apresentaram capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH, mas o extrato aceto etílico foi mais eficiente quanto a capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH apresentando valores de inibição específica de 53; 34 e 21 %inibição/ $\mu$ g fenóis respectivamente para cada concentração empregada, e foram os resultados mais próximos aos do padrão quercetina.

As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuíram em presença dos extratos de cebola e *chlorella*, o que caracteriza o efeito de inibição da oxidação do guaiacol catalisado pela peroxidase. Os aceto etílicos de cebola e os de *chlorella* ocasionaram inibição não-competitiva, o extrato metanólico e os extratos aquosos apresentaram inibição competitiva.

O extrato de cebola mais promissor para evitar a oxidação ocasionada pela catálise metálica em sistema lipídico foi o obtido com acetato de etila com uma inibição percentual de 53% acompanhado pela menor formação de peróxido (até três vezes menor) e de malonaldeído (1,5 vezes menor) ao longo do tempo do experimento.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Veter**, n. 13, p. 105-114, 2003.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Food science e technology**. v 17, p. 505-512, 2006.

GEMTCHUJNICOV, I.; **Manual de taxonomia vegetal agrônômica**, editora ARES, SP, 1976.

GOLDMAN, I. L. KOPELBERG, M, DEBAENE JEP, SCHWARTZ B. S. – **Antiplatetele activity in onion (*Allium cepa L*) is sulfur dependent, Thrombosis and Haemostasis** v 3, p. 450 – 452, 1996.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v 33, n 7, p. 601-617, 1995.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro Barcelona**: Ediciones Urano S. A., ISBN 84-7953-047-2, 1994.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. v 27. p. 631-635, 2000.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. v 40, p. 361-367, 2007.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, n. 81, p. 321-326, 2003.

MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. da S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v 26, n 3, 2006.

OLIVEIRA, M. S. Inibição de crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos. **(Dissertação de Mestrado)**, Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

OLIVEIRA, M. S.; FURLONG, E. B. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**. v 1, n 2, p. 1-10, 2008.

- PASSOTO, J. A.; PENTEADO, M. D. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade Antioxidante do  $\beta$ -caroteno e da Vitamina A. estudo comparativo com Antioxidante Sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v 18, n 1, Campinas, 1998.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S. A.**, 1996. 728p.
- SINGH, N.; RAJINI. P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chemistry**. v 85, p. 611-616, 2004.
- SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, GERALDO MAGELA.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**. v 30, n 2, p 351-355, 2007.
- SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**. v 41, p. 753-758, 2003.
- VONSHAK, A. SPIRULINA PLATENSIS (Arthrospira). **Physiology, Cell-biology and Biotechnology**, London: Tasylor & Francis. ISBN 0 – 7484-0674-3. 1997.
- VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**. v 12. p. 1084-1087, 1970.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, n. 87, 401-406, 2004.

## **ARTIGO 4**

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROALGA *CHLORELLA*

Vânia Machado Recart; Eliana Badiale Furlong  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande  
Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos  
Departamento de Química  
Rua: Eng. Alfredo Huch, 475, caixa postal 474 – Centro  
Rio Grande – RS – CEP 96201-900, Brasil

### RESUMO

Alguns tipos de microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. O objetivo do trabalho foi determinar a composição centesimal, o pH, a acidez e o teor de compostos fenólicos da microalga *chlorella* extraído comercializada como pastilha. As médias dos valores encontrados foram 4,1% de umidade; 6,3% de cinzas; 22,3% de carboidratos; 2,8% de fibra-bruta; 56,9% de proteína; 7,6 de lipídios; 0,2% de acidez; pH 5,7 e 0,20 mg<sub>fenóis</sub>·g<sub>(bs)</sub><sup>-1</sup> de compostos fenólicos.

### ABSTRACT

The microalgae is commercialized as natural food or alimentary supplement and is found formularizations in dust, tablets, capsules or extracts. The objective of the work was to determine the centesimal composition, pH, the acidity and phenolic composite the text of the microalgae *chlorella* extracted with methanol. The averages of the joined values had been 4.1% of humidity; 6,3% of leached ashes; 22,3% of carboidratos; 2,8% of fiber-rude; 56,9% of protein; 7,6 of lipídios; 0,2% of acidity; pH 5,7 and 0,20 mg<sub>fenóis</sub>·g<sub>(bs)</sub><sup>-1</sup> of phenolic composites.

### 1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos vêm sendo realizados com relação às aplicações das microalgas e dos produtos extraídos destas na indústria de alimentos tais como: no tratamento de águas residuais de inúmeros processos industriais, para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados, como bioindicadores, na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas. As microalgas podem produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, antiinflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras propriedades farmacêuticas. O conteúdo lipídico confere potencial para seu emprego na produção de biocombustíveis (biodiesel, por exemplo) (DERNER et al., 2006).

As microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc, tanto como suplemento alimentar quanto como corantes naturais, no entanto sua atividade como conservante não vem sendo explorada sendo usualmente enfatizada a qualidade de proteínas e ácidos graxos essenciais (COLLA et al., 2004; PULZ & GROSS, 2004).

A *Chlorella* é uma microalga eucariótica unicelular esférica e seu diâmetro varia de 5-10 µm, dependendo da espécie (ILLMAN, SCRAGG e SHALES, 2000). Aparece espontaneamente em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar a fotossíntese, caracteriza-se por ser rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais, aminoácidos essenciais. Além de alto conteúdo de lipídios, podendo chegar a mais de 50%, em base seca, quando cultivada em meio com baixos níveis de nitrogênio (PIORRECK, BAASCH e POHL, 1984). Em sua composição estão ainda presentes 18 aminoácidos essenciais importantes na biossíntese das proteínas. A *chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B<sub>12</sub>, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que, juntamente com o ferro, fazem desta alga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia.

Visando estimar o aporte de compostos funcionais, especialmente antioxidantes em suplemento alimentar disponível comercialmente, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição centesimal, o pH, a acidez e o teor de compostos fenólicos da microalga *chlorella* extraído com metanol.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Reagentes**

Os solventes e reagentes empregados foram analiticamente puros (P.A). O reagente de Folin-Ciocalteu pertencia a Polipur e a Tirosina a marca Sigma.

### **2.2. Amostra**

A microalga *chlorella* foi obtida na forma de pastilhas, em estabelecimento comercial de lojas especializadas em produtos alimentícios especiais na cidade de Rio Grande – RS. As pastilhas foram moídas com o auxílio de grau e pistilo até ficarem na forma de pó com granulometria 0,35 mm.

### 2.3. Caracterização da Amostra

Os teores de umidade da microalga *chlorella* foram determinados em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS sob temperatura de 105°C. Os percentuais de cinzas foram determinados pelo método gravimétrico em mufla 550°C. Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl, empregando como fator de conversão de nitrogênio o valor de 6,25, para a microalga *chlorella*. Todos os métodos seguiram a metodologia da AOAC (2000), com exceção de fibras brutas determinadas conforme o método do INTERLAB VI (CIEN TEC, 1991).

A determinação de lipídios foi realizada pelo método de Bligh & Dyer (1959), adaptado para os teores de umidade da microalga. Os açúcares redutores da microalga *chlorella* foram determinados por diferença. Os métodos estão descritos em detalhes no ANEXO 2.

### 2.4. Propriedades Eletroquímicas

O pH da microalga *chlorella* foi determinado conforme AOAC (2000). Esta foi homogeneizada em água previamente fervida na proporção de 1:9, sob agitação por 30 minutos. No sobrenadante foi determinado o pH potenciometricamente, utilizando um pHmetro marca Hanna modelo 200, calibrado com tampão fosfato neutro (pH 7,0).

A acidez foi determinada por titulometria de neutralização com NaOH 0,01N. Os métodos estão descritos em detalhes no ANEXO 2.

### 2.5. Determinação do teor de fenóis totais

A extração dos compostos fenólicos da microalga *chlorella* foi realizado a frio com metanol, na proporção de 1:5 de massa seca:solvente, em agitador horizontal a temperatura ambiente, seguida da partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5% e filtração. Os extratos foram armazenados em freezer até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais da microalga *chlorella* foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, com uma curva de calibração de tirosina, com faixa de concentração variando de 2 a 16µg/mL (BADIALE-FURLONG et al., 2003). O método está descrito em detalhes no ANEXO.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No comércio estavam disponíveis várias marcas de *chlorella* com preço variável em uma ampla faixa de valores. Considerando que o material para a produção de pastilhas é importado e que não são muito difundidos os cultivos desta espécie foi escolhido a marca de maior valor comercial para a amostragem.

As determinações de componentes físico-químicos da microalga *chlorella* foram todas realizadas em triplicatas, e os resultados das médias foram os seguintes: 4,1% de umidade; 6,3% de cinzas; 22,3% de carboidratos; 2,8% de fibra-bruta; 56,9% de proteína; 7,6 de lipídios; 0,2% de acidez e pH 5,7. Os valores encontrados para a microalga *chlorella* são condizentes com a literatura levando-se em conta as diferentes condições de apresentação (pastilhas, pó, cápsulas e etc) (HENRIKSON, 1994). A média do conteúdo de compostos fenólicos do extrato da microalga *chlorella* encontrado foi de 0,20 mg<sub>fenóis·g<sup>(bs)</sup></sub><sup>1</sup>.

Comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura, como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 0,31 mg fenóis/ g amostra, maçã 1,0 mg fenóis/ g amostra e batata 0,99 mg fenóis/ g amostra (equivalente de tirosina), 0,061-0,084 mg fenóis/ g de amostra (ácido ferúlico) (ZHOU et al., 2004), 0,69 e 0,35 mg fenóis/ g de amostra em bagaço de laranja e polpa de berinjela (BADIALE-FURLONG et al., 2003), a microalga *chlorella* apresenta menor conteúdo fenólico.

### 4. CONCLUSÃO

As médias dos valores encontrados foram 4,1% de umidade; 6,3% de cinzas; 22,3% de carboidratos; 2,8% de fibra-bruta; 56,9% de proteína; 7,6 de lipídios; 0,2% de acidez e pH 5,7. Os valores encontrados para a microalga *chlorella* são condizentes com a literatura. A média do conteúdo de compostos fenólicos do extrato da microalga *chlorella* encontrado foi de 0,20 mg<sub>fenóis·g<sup>(bs)</sup></sub><sup>1</sup>, valor inferior a alguns tecidos mencionados na literatura.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17<sup>th</sup> edition, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.

BLIGH & DYER, E. C. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, n. 37, p. 911-917, 1959.

CIENTEC: Fundação de Ciência e Tecnologia. INTERLAB VI – Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; publicado no Diário Oficial da União em 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19819.

COLLA, L.M. et al. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v 59c, p.55-59, 2004.

DERNER, R, B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas Produtos e Aplicações. **Ciência Rural**, v 36, n.6, nov-dez, 2006.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro Barcelona**: Ediciones Urano S. A., ISBN 84-7953-047-2, 1994.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. v 27. p. 631-635, 2000.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophyllis, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v 23. n 2, p.207 – 216, 1984.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v 65, p.635-648, 2004.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, n. 87, p. 401-406, 2004.

## **CAPÍTULO IV**

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

As condições ótimas de extração de compostos fenólicos totais empregando duas etapas de planejamento experimental para emprego das variáveis, solvente, tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções do processo de extração, apresentou resultados preditivos e significativos para o conteúdo de fenóis totais. As condições otimizadas ocorriam quando foi utilizado o metanol, tempo de extração de 120 minutos e a rotação de 3,13 G em mesa agitadora orbital. Sendo que a classe 4 foi a melhor para incorporar fenol na dieta com um conteúdo de 2387,6 µg fenóis/ g de cebola.

As diferentes classes de cebola apresentaram diferença significativa ao nível de confiança de 95%, entre todas as frações dos macrocomponentes estudadas, com exceção da umidade e dos teores de cinzas.

Os extratos da cebola obtidos com os diferentes solventes continham uma faixa ampla de compostos fenólicos totais variando entre 0,08 no extrato aceto-etílico e 2,83 mg fenóis/g amostra no extrato aquoso. Nos extratos de *chlorella* a média do conteúdo de compostos fenólicos encontrados foi de 0,20 mg fenóis/g amostra.

Todos os extratos apresentaram atividade seqüestradora do radical livre DPPH, porém o extrato aceto etílico de cebola foi o que apresentou maior inibição específica (53% inibição/µg fenóis) em relação aos demais.

As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuíram em presença dos extratos de cebola e *chlorella*, o que caracteriza o efeito de inibição da oxidação do guaiacol catalisado pelas peroxidases extraídas da batata. Os aceto etílicos de cebola e os de *chlorella* ocasionaram inibição não-competitiva, os extratos metanólicos e os aquosos apresentaram inibição competitiva.

O extrato mais promissor para evitar a oxidação ocasionada pela catálise metálica em sistema lipídico foi o extrato de cebola extraído com acetato de etila com uma inibição percentual de 53% acompanhado pela menor formação de peróxido (até três vezes menor) e de malonaldeído (1,5 vezes menor) ao longo do tempo do experimento.

## **CAPÍTULO V**

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AARDT, M. V.; DUNCAN, S. E.; LONG, T. E.; et al. Effect of Antioxidants on Oxidative Stability of Edible Fats and Oils: Thermogravimetric Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 587-591, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.

Disponível no site: [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109\\_](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109_) Acessado em 27/09/2006.

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.

ANDRADE, C. A.; COSTAL, C. K.; BORAL, K.; MIGUELL, M. D.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João pessoa, v. 17, n. 2, abri/jun, 2007.

ANDRADE, M. R. Cultivos autotrófico de *Spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no extremo sul do Brasil. (**Dissertação de Mestrado**), Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds en fruits. **Analyst**, n. 125, p. 989-1009, 2000.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17<sup>th</sup> edition, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, n. 13, p. 105-114, 2003.

BANNWART, G. C. M. C.; TOLEDO, M. C. F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. **Boletim da SBCTA**, vol. 33, nº 2, pg. 245-255, jul/dez, 1999.

BAPTISTA, M. J.; GLORIA, B. A.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, 1999.

- BATELLO, C. F. Efeito antioxidante in vitro dos Medicamentos Homeopáticos arsenicum album, cuprum metallicum, manganum e zincum metallicum. **(Dissertação de Mestrado)**. Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo. São Paulo, 2002.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999. Disponível no site <http://www.scielo.br/pdf/rn/v12n2/v12n2a01.pdf#search=%22antioxidantes%22>. Acessado em 01/10/2006.
- BLIGH & DYER, E. C. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, n. 37, p. 911-917, 1959.
- BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. B. **Química do processamento de alimentos**. Editora Varela, 3ª edição, 143pg, São Paulo, 1992.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, 70, 313 – 321, 1999.
- CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das Atividades de Peroxidasas e Polifenoloxidasas de guariroba (*Syagrus oleracea Becc*) sob ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. V 25, n 1, p. 189-193, 2003.
- CHEN, Z, Y.; CHAN, P, T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemey extract. **Journal Analytical Official Chemistry Society**, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.
- CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, 20, 221 – 224, 1997.
- CIENTEC: Fundação de Ciência e Tecnologia. INTERLAB VI – Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; publicado no Diário Oficial da União em 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19819.
- COLLA, L.M. et al. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, V 59c, p.55-59, 2004.
- COLLA, L. M. ; FURLONG, E. B. COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Braz. Arch. Biol. Technol.** V 50, n 1, 2007.
- CUTLER, R.G. – Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 621: 1-28, 1991.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p. 1959-1967, 2006.

- DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Food science e technology**. V 17, p. 505-512, 2006.
- EMATER/RS – Classificação Comercial da Cebola. Disponível: <http://www.emater.tche.br>, acessado em 06/12/2007.
- EMBRAPA – Sistema de Produção de Cebola (*Allium Cepa L.*). Disponível: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/autores.htm>, acessado em 21/02/2008.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 26, n 1, p. 171-178, 2006.
- GEMTCHUJNICOV, I.; **Manual de taxonomia vegetal agrônômica**, editora ARES, SP, 1976.
- GIACOMINI, R. A.; SANTOS, C.; NOGUEIRA, R. T.; CARVALHO, J. E.; LUNARDI, I.; SORIANO, M. P. del C.; IDE, R. M.; IMAMURA, P. M. Atividade Biológica de Alguns Ácidos Diterpênicos Naturais e de seus Derivados Semi- Sintéticos. **Revista Fitos**, v 1, n 01, p. 61, 2005.
- GOLDMAN, I. L. KOPELBERG, M, DEBAENE JEP, SCHWARTZ B. S. – **Antiplatele activity in onion (*Allium cepa L*) is sulfur dependent, Thrombosis and Haemostasis** v., 3, p. 450 – 452, 1996.
- GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G de.; MOREIRA, M. A. Propriedades Físico-Químicas de Polifenoloxidase de Feijão (*phaseolus vulgaris L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21 n.1, 2001.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Invited Review Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Commun.* 19: 141-58, 1993.
- HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press. P.543, 1989.
- HALLIWELL, B. – How to characterize a biological antioxidant. *Free rad.Res.Comm.*, 9 (1): 1-32, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* V 119, n 6, p. 568-620, 1992.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. V 33, n 7, p. 601-617, 1995.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*. V 47, p. 410-418, 2000.
- HAMILTON, B. K.; YOO, K. S.; PIKE, L. M. – Changes in pungency of onions by soil type, Sulphur nutrition and bulb maturity, **Scientia Horticulturae**, 74 (4): 249-256, 1998.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro Barcelona**: Ediciones Urano S. A., ISBN 84-7953-047-2, 1994.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. 27, 631-635, 2000.

IMEH, U.; KHOKBAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, 2002

IQBAL, S.; BHANGER, M. I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. V 40, p. 361-367, 2007.

JORDÃO Jr, A. A. ; CHIARELLI, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação Lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, V 31, p. 434-449, 1998.

JORGE, P, A, R.; NEYRA, R, M, O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídios plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.

KEHRER, J. P.; SMITH, C. V. Free radical in biology, sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. In: FREI, B.; ed. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press, p. 25-62, 1994.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, n. 81, p. 321-326, 2003.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v. 2, n. 50, p. 213-218, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. ISBN 85-7378-026-6.

LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vignaradiata*L.). **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, jan/mar, 2004.

MALACRIDA, C.R. MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 25, n 4. Campinas, 2005.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIOGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutricion*, v. 50, n. 1, 2000.

- MARTINS, I. G. Secagem de cebola (*Allium cepa* L.) em leito de jorro: operação do equipamento e características do produto final. (**Dissertação de Mestrado**), Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2003.
- MARTINS, P. C.; PINTO, L. A. de A. Caracterização da Secagem de Cebola (*Allium cepa* L.) em camada delgada e da Reidratação do Produto Desidratado. **Braz. J. Food Technol.**, V 6, n 2, p. 143-151, 2003.
- MARTINS, P. C.; PORTO, P. S. da S.; PINTO, L. A. de A. Estudo das Propriedades Físicas e de transporte na secagem de cebola Cebola (*Allium cepa* L.) em camada delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 24, n 3, p. 319-326, 2004.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2<sup>a</sup>. Ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 13, 1997.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos**, n 36, jan/jun, 1-11, 2002.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. da S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 26, n 3, 2006.
- MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do Escurecimento Enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V 26, n 1, p. 110-115, 2006.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. **Analytical Chemistry**, V 3, n 31, p. 326-428, 1959.
- MINAMI, K.; ANDRADE, M. O.; LIMA, U. A. – **Cebola: Produção, Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial**. Governo do Estado de São Paulo, Coordenadoria da Indústria e Comércio. 1980. 152p
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). **Journal of Chromatography A**, n 1054, p. 95-111, 2004.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2° ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, 20, 459 – 466, 2003.
- OLIVEIRA, M. S. Inibição de crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos. (**Dissertação de Mestrado**),

Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

OLIVEIRA, M. S.; FURLONG, E. B. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**. V 1, n 2, p. 1-10, 2008.

PARTINGTON, J. R. A short history of chemistry. New York: **Dover Publications**, p. 220, 1989.

PASSOTTO, J. A.; PENTEADO, M. V. C., FILHO, J. M. Atividade antioxidante do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e tecnologia de alimentos**. V 18, n 1. Campinas, 1998.

PASTORE, G. M. **Alimentos Funcionais: a inovação industrial na área de alimentos**. Publicação página da ComCiência, 2005. Disponível em:

<http://www.comciencia.br/reportagens/2005/09/13.shtml>. Acesso em 23 de setembro de 2006.

PAZOS, M.; ANDERSEN, M. L.; MEDINA, I.; SKIBSTED, L. H. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating  $\alpha$ -tocopherol from  $\alpha$ -tocopheroxil radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V 55, p. 3661-3666, 2007.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo, Editora Varela; 2005.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophyllis, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, 23 (2), 207 – 216, 1984.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science & Technology**. V. 2, n 9, p. 223-227, 1991.

PRENZLER, M, S.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, n. 73, p. 73, 84, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, V 65, p.635-648, 2004.

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

RANDLE, W. M. – Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity, **ACS SYMPOSIUM SERIES** 660: 41 – 52, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S. A.**, 1996. 728p.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de.; PELÚZO, M. do C. G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S. L. P. da.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosc. J.** V 21, n 3, p. 133-149, 2005.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boston: CRC Press, 1990.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos.** 1ª ed, Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SIES, H. – Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am.J.Med.*, 91 (suppl 3C): 31S-38S, 1991.

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

SINGH, N.; RAJINI. P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chemistry.** V 85, p. 611-616, 2004.

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

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, GERALDO MAGELA.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova.** V 30, n 2, p 351-355, 2007.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology.** V 41, p. 753-758, 2003.

TORRES, A, M.; MAU LASTOVICKA, T.; REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI. F.; CLEMENTE. E. Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** V 21, n 3, p. 321-325, 2001.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 19, n. 46, p. 4113-4117, 1998

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira). **Physiology, Cell-biology and Biotechnology**, London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3. 1997.

- VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**. V 12. p. 1084-1087, 1970.
- WACH, A.; PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**. V. 100, p. 699-704, 2007.
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **Washington**, V.74, p. 139-161, 1994.
- ZAMBIAZI, C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. **Boletim da S.B.C.T.A.**, V 33, n 1, p. 1-7, 1999.
- ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, F. M.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V 26 n.3, p. 2, 2006.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, n. 87, 401-406, 2004.

## **ANEXOS**

### ANEXO 1 - Tabelas e figuras do artigo 1

Tabela 1: Valores de conteúdo de fenóis ( $\mu\text{g}$  fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial  $2^4$  e 6 pontos centrais.

Ensaio	Solvente	Intervalo descanso(min)	Rotação(G)	Tempo(min)	Fenóis( $\mu\text{g}$ fenóis/g cebola)
1	Metanol	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	1556,6
2	Metanol	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	1767,6
3	Metanol	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	2363,6
4	Metanol	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	2372,4
5	Metanol	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	2263,2
6	Metanol	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	2131,4
7	Metanol	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	2119,6
8	Metanol	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	2238,5
9	Acet etl	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	97,1
10	Acet etl	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	63,1
11	Acet etl	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	95,1
12	Acet etl	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	85,3
13	Acet etl	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	88,9
14	Acet etl	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	82,4
15	Acet etl	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	45,9
16	Acet etl	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	49,3
17	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2160,9
18	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2101,5
19	Metanol	15(0)	1,76(0)	150(0)	2134,3
20	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	81,6
21	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	80,4
22	Acet etl	15(0)	1,76(0)	150(0)	81,8

Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico.

	<b>Efeito</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>p</b>	
	<b>Média/interação</b>	1093,66	239,5349	0,006025
	<b>(1)Solvente (L)</b>	-2025,73	561,7592	0,015445
	<b>(2)Intervalo (L)</b>	20,00	561,7592	0,972977
	<b>(3)Rotação (L)</b>	164,93	561,7592	0,780870
	<b>(4)Tempo(L)</b>	77,30	561,7592	0,895923
	<b>1L com 2L</b>	-31,73	561,7592	0,957151
	<b>1L com 3L</b>	-178,90	561,7592	0,763006
	<b>1Lcom 4L</b>	-95,82	561,7592	0,871242
	<b>2L com 3L</b>	10,32	561,7592	0,986047
	<b>2L com 4L</b>	-24,00	561,7592	0,967576
	<b>3L com 4L</b>	-193,07	561,7592	0,745055

Tabela 3: Valores de conteúdo de fenóis ( $\mu\text{g}$  fenóis/g de cebola) para o planejamento fatorial  $2^3$  e 3 pontos centrais.

<b>Ensaio</b>	<b>Intervalo descanso(min)</b>	<b>Rotação(G)</b>	<b>Tempo(min)</b>	<b>Fenóis(<math>\mu\text{g}</math>fenóis/g de cebola)</b>
1	0(-1)	0,78(-1)	120(-1)	1556,6
2	30(+1)	0,78(-1)	120(-1)	1767,6
3	0(-1)	3,13(+1)	120(-1)	2363,6
4	30(+1)	3,13(+1)	120(-1)	2372,4
5	0(-1)	0,78(-1)	180(+1)	2263,2
6	30(+1)	0,78(-1)	180(+1)	2131,4
7	0(-1)	3,13(+1)	180(+1)	2119,6
8	30(+1)	3,13(+1)	180(+1)	2238,5
9	15(0)	1,76(0)	150(0)	2160,9
10	15(0)	1,76(0)	150(0)	2101,5
11	15(0)	1,76(0)	150(0)	2134,3

Tabela 4: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico

	<b>Efeito</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>p</b>	
	<b>Média/Interação</b>	2109,964	8,97113	0,000018
	<b>(1)INTERVALO(L)</b>	51,725	21,03917	0,133181
	<b>(2)ROTAÇÃO (L)</b>	343,825	21,03917	0,003724
	<b>(3)TEMPO(L)</b>	173,125	21,03917	0,014449
	<b>1L com 2L</b>	12,125	21,03917	0,622622
	<b>1L com 3L</b>	-58,175	21,03917	0,109689
	<b>2L com 3L</b>	-362,075	21,03917	0,003359

Tabela 5: Coeficiente de regressão para as variáveis significativas obtidas pelo tratamento estatístico

	<b>Coef. regressão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>p</b>	
	<b>Média/interação</b>	2109,964	8,97113	0,000018
	<b>(2)Rotação(L)</b>	171,913	10,51958	0,003724
	<b>(3)Tempo (L)</b>	86,563	10,51958	0,014449
	<b>2L com 3L</b>	-181,037	10,51958	0,003359

Tabela 6: Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando rotação, tempo e interação da rotação com o tempo

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Grau Liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>Teste F</b>	<b>F<sub>tab</sub> (95%)</b>	<b>F<sub>calc</sub>/F<sub>tab</sub></b>
Regressão	558572,4	3	186190,8	31,1	4,35	7,15
Resíduo	41869,8	7	5981,4			
Falta de ajuste	40099,2					
Erro puro	1770,6					
Total	600442,2	10				

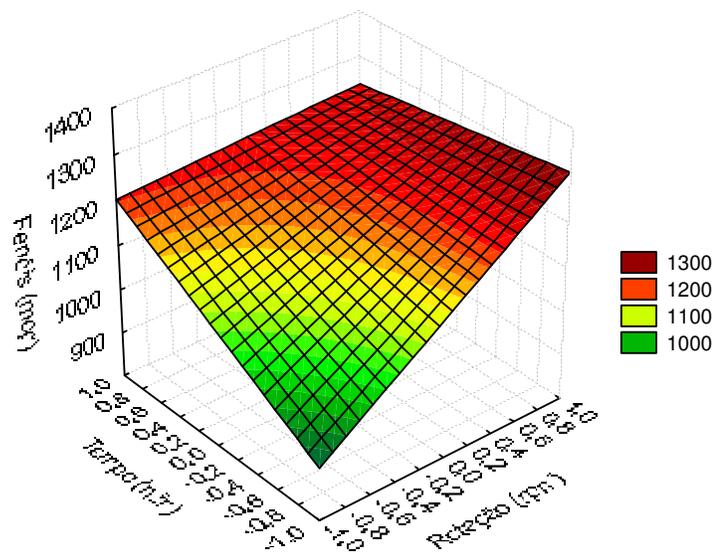
Tabela 7: Conteúdo de fenóis totais em cebola nas diferentes classes

<b>Classes</b>	<b>Conteúdo (<math>\mu\text{g}</math> fenóis/ g de cebola)</b>
Classe 2	2265,9 <sup>a</sup>
Classe 3	2244,3 <sup>b</sup>
Classe 4	2306,4 <sup>c</sup>
Classe 5	2282,9 <sup>a</sup>

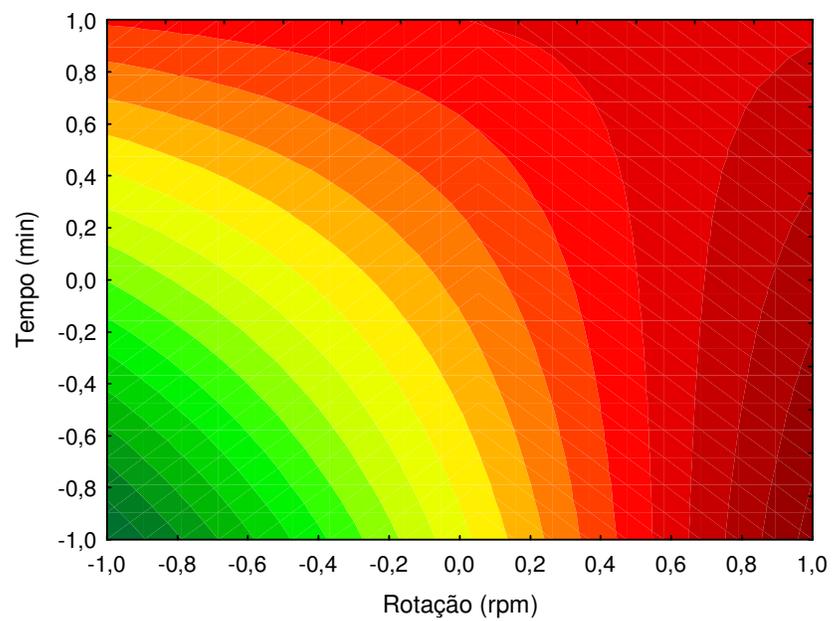
Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 8: Teste de Tukey entre as variações médias dos fenóis extraídos com metanol nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	2265,9	2244,3	2306,4	2282,9
Classe 2 {1}		0,001492	0,000242	0,010301
Classe 3 {2}	0,001492		0,000231	0,000242
Classe 4 {3}	0,000242	0,000231		0,001480
Classe 5 {4}	0,010301	0,000242	0,001480	

**Superfície de resposta e condições de contorno para os fenóis**

(a)



(b)

Figura 1: Superfície de resposta (a) e curva de contorno para fenóis (b)

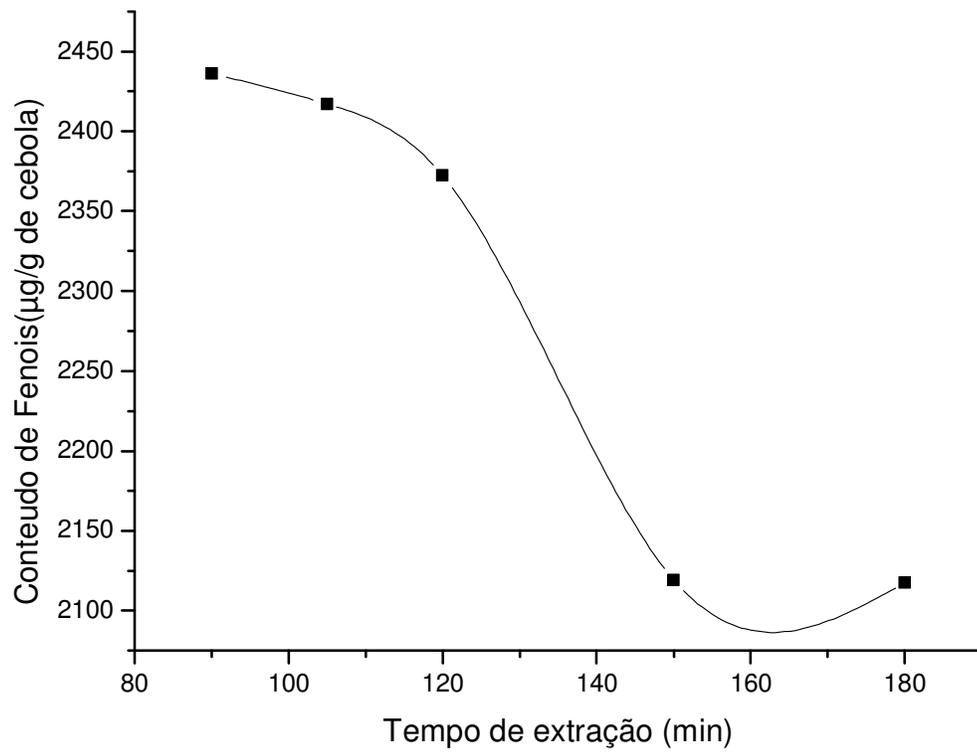


Figura 2: Cinética de rendimento de extração de fenóis por tempo

## **ANEXO 2 - Descrição dos Procedimentos Analíticos e Tabelas Estatísticas do Artigo 2**

### **Determinação de Umidade**

- Colocar as cápsulas de alumínio em estufa de circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C durante 1 hora;
- Após colocar num dessecador e pesar no momento do uso;
- Pesar 5 gramas de cebola;
- Colocar estas em estufa de circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C durante 6 horas;
- Colocar as amostras num dessecador até atingir a temperatura ambiente;
- Pesar as cápsulas novamente.

### **Determinação de Cinzas**

- Tarar os cadinhos de porcelana;
- Colocar 3 gramas da amostra seca ou com teor de umidade inferior a 30%;
- Efetuar a calcinação da amostra em capela;
- Transferir o cadinho de porcelana para uma mufla a 550°C e deixar até que as cinzas estejam brancas;
- Desligar a mufla e quando estiver 250°C retirar os cadinhos e colocar num dessecador para o seu resfriamento;
- Pesar o conjunto amostra + cadinho até atingir peso constante;
- Calcular a relação percentual entre a massa final e a massa inicial da amostra.

### **Determinação de Proteínas em Tecidos Vegetais, segundo Método de Kjeldahl**

Preparo dos reagentes:

#### a) Padronização do HCl

- Colocar 2 gramas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para secar em estufa a 300°C por 1 hora;
- Pesar 0,15 gramas e adicionar 25 mL de água (fazer quadruplicata deste procedimento);
- Adicionar 4 gotas de indicador misto;

OBS: o indicador misto é mistura das soluções alcoólicas de vermelho de metila 0,1% e vermelho de bromocresol 0,1%, proporção 1:1.

- Titular com HCl 0,1N

Cálculo do fator de correção:

$$\text{Fator} = \frac{P_c \times 1000}{V \times 5,2995}$$

$P_c$  = peso do carbonato

$V$  = volume gasto de HCl

b) Ácido bórico 4%

- Pesar 40 gramas de ácido bórico e levar a um balão de 1000 mL completando o volume com água destilada.

c) Hidróxido de Sódio 40%

- Pesar 400 gramas de hidróxido de sódio e diluir em um béquer aos poucos com água destilada (em banho de gelo), transferir para um balão volumétrico de 1L e completar o volume com água destilada.

Procedimento de digestão e destilação:

Em um tubo de digestão colocar 0,2 gramas de amostra embrulhada em papel de seda ou filtro, juntar 0,7 gramas de catalisador (3 gramas de sulfato de potássio e 0,03 gramas de selênio em pó). Adicionar 3 mL de peróxido de hidrogênio e 7 mL de ácido sulfúrico (adicionar o ácido aos poucos). Colocar os tubos em um bloco digestor e efetuar a digestão a quente até a solução se tornar clara. Após esta etapa, esfriar a solução a temperatura ambiente.

Destilar em um destilador de arraste a vapor todo o conteúdo do digerido passando para o recipiente coletor do destilador. Adicionar 50 mL de NaOH 40%, para conferir a neutralidade do meio adicionar 3 gotas de indicador de fenolftaleína na mistura. Recolher o destilado em um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico 4% (adicionado de 4 gotas de indicador misto), coletar 125 mL e titular com HCL 0,1N padronizado até viragem do indicador.

### **Determinação de Fibra Bruta**

- Pesar 2 gramas de amostra conforme o teor de fibra bruta estimada em relação a amostra analisada (consultar a literatura ou pelos teores dos componentes maiores);
- Adicionar 200 mL de ácido sulfúrico 1,25% em ebulição (sistema de refluxo) e algumas gotas de solução anti-espumante (álcool amílico/ isoamílico – 5 gotas).
- Deixar em refluxo por exatamente 30 minutos;
- Filtrar quantitativamente sob vácuo em funil de Buchner provido de tela de náilon, ou poliéster, ou aço inox, ou cadinho de vidro sintetizado em sistema automático de filtração;
- Lavar o resíduo com água fervente até completa neutralização;

- Passar o resíduo quantitativamente para o erlenmeyer já usado, lavando a tela ou o recipiente filtrante com 200 mL de NaOH 1,25N em ebulição, adicionar algumas gotas de solução anti-espumante;
- Deixar em refluxo por exatamente 30 minutos;
- Filtrar diretamente em cadinho de vidro sintetizado ou no sistema filtrante adotado utilizando água destilada para a transferência;
- Lavar com aproximadamente 20 mL de álcool etílico ou acetona e 20 mL de acetona ou éter de petróleo;
- Colocar em estufa a 105°C até peso constante (4 a 6 horas), retirar, deixar em dessecador até temperatura ambiente e pesar;
- Queimar em mufla a 560°C por 3 horas (colocar o cadinho na mufla ainda fria e então iniciar o aquecimento);
- Desligar a mufla e quando estiver a 250°C retirar o cadinho, colocar em dessecador, deixar esfriar até temperatura ambiente e pesar;

#### **Determinação de pH**

- Pesar 10 gramas de amostra;
- Homogeneizar em água destilada previamente fervida na proporção 1:9, sob agitação por 30 minutos;
- Determinar no sobrenadante o pH potenciometricamente, utilizando um pHmetro marca Hanna modelo 200.

#### **Determinação de Acidez**

- Pesar 5 gramas de amostra e diluir com água destilada na proporção de 1:10,
- Agitar em mesa agitadora orbital TE - 141 da marca TECNAL por 30 minutos e repousar por 10 minutos;
- Filtrar e retirar uma alíquota de 10 mL;
- Transferir a alíquota para um erlenmeyer e adicionar 10 mL de água destilada e previamente fervida.
- Homogeneizar a amostra e adicionar 0,5 mL de fenolftaleína como indicador;
- Titular com uma solução padrão de NaOH até mudança de coloração.

**Determinação de Lipídios em Cebola e Chlorella - Método de Bligh & Dyer (1959) adaptado.**

- Pesar 10 gramas da amostra (até 10% de umidade);
- Colocar a amostra em um erlenmeyer de 250 mL e adicionar 50 mL de metanol, 25 mL de clorofórmio e 30 mL de água;
- Tampar o erlenmeyer e colocá-lo sob agitação rigorosa em mesa agitadora por 20 minutos;
- Em seguida, adicionar mais 25 mL de clorofórmio e 25 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%;
- Agitar a mistura por mais 4 minutos;
- Filtrar;
- Transferir o filtrado para um funil de separação, onde ocorrerá a formação do sistema bifásico;
- Agitar e deixar em repouso por 5 minutos;
- Remover a camada inferior (que contém os lipídios) para um erlenmeyer de 125 mL;
- Medir o volume da camada inferior, Valor: \_\_\_\_\_
- Retirar uma alíquota de 6 mL e transferir para uma balão de fundo chato para a quantificação dos lipídios totais,
- Evaporar o solvente em rotaevaporador e colocar o balão em estufa com circulação de ar a 50 °C por 1 hora e 30 minutos;
- Retirar da estufa e colocar o balão em dessecador para resfriar por 20 minutos;
- Pesar o balão com a amostra em balança analítica;
- Estimar o conteúdo de lipídios em percentual relativo massa inicial da amostra e/ou volume de clorofórmio obtido.

**Determinação de açúcares em cebolas (*Allium cepa L.*) utilizando a propriedade redutora através do método de redução do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS).**

Esta análise foi efetuada baseada no método de MILLER (1959), conforme as seguintes etapas:

1ª etapa) Preparo da amostra:

- Pesar 10 gramas de cebola (seca)
- Colocar a cebola seca (10g) em béquer e adicionar 40 mL de água destilada, levando-se a banho-maria por 30 minutos a 50 °C.
- Passar a solução do béquer para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL da solução de Carrez I e 10 mL da solução de Carrez II, completando a seguir o volume do balão (até 100 mL) com água destilada.
- Centrifugar a solução obtida (suspensão turva e floculada) até se obter a perfeita separação das fases lípida (sobrenadante) e a suspensão turva e floculada (precipitado).
- Recolher o sobrenadante em proveta e tomar nota do volume obtido, o qual é o volume da amostra preparada para os ensaios de hidrólise ácida (VOLUME DA AMOSTRA PREPARADA).

2ª etapa) Determinação da curva padrão de glicose:

- Preparar uma solução estoque de 0,5 mg/mL de glicose padrão seca (levada a estufa e dessecador).
- Num conjunto de 10 tubos de ensaio, transferir 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL e 1 mL para cada tubo e, em seguida, adicionar água destilada elevando o volume a 1 mL. Na seqüência, adicionar 1 mL da solução do ácido 3,5 dinitrossalicílico a estes, como também ao branco da análise. Colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Finalizado o período, retirar os tubos de ensaio e adicionar 8 mL de água destilada em cada tubo.
- Deixar as alíquotas esfriar e em seguida fazer as leituras das suas respectivas absorbâncias em espectrofotômetro a 546 nm.

3ª etapa) Hidrólise ácida dos açúcares contidos na amostra preparada:

Num conjunto de 6 tubos de ensaio transferir 1 mL da solução obtida na primeira etapa, adicionar 1 mL de HCl 2N, como também ao branco, e colocar em banho-maria por 40 minutos. Logo em seguida, adicionar 1 mL de NaOH 2N a todos os tubos.

4ª etapa) Determinação dos açúcares da amostra:

Após a hidrólise ácida se aplica o mesmo tratamento dado as alíquotas da solução de glicose preparadas para a determinação da curva padrão, ou seja, adicionar 1 mL da solução do ácido 3,5 dinitrossalicílico a estes, como também ao branco da análise. Colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Finalizado o período, retirar os tubos de ensaio e adicionar 6 mL de água destilada em cada tubo. Deixar as alíquotas

esfriar e logo em seguida se faz a leitura das suas respectivas absorbâncias em espectrofotômetro a 546 nm.

Preparo dos reagentes:

a) Reagente de 3,5 dinitrossalicílico:

Preparar as seguintes soluções:

- Solução A: 13,5 g de NaOH em 300 mL de água destilada.
- Solução B: 8,8 g de DNS, 255 g de tartarato de sódio e potássio em 800 mL de água destilada (dissolver o reagente de 3,5 DNS em 400 mL de água e depois adicionar aos poucos a solução de tartarato).
- Solução C: mistura das soluções A e B.

b) Soluções de Carrez I e II:

- Carrez I: 150 g de  $K_4Fe(CN)_6$ , completando o volume em balão volumétrico de 1 L.
- Carrez II: 300 g de  $ZnSO_4$  completando o volume em balão volumétrico de 1 L.

### **Preparação dos Extratos de Cebola e Chlorella**

#### **Extrato de Cebola**

- Secar as cebolas em estufa de circulação de ar da marca QUIMIS a 60 °C durante duas horas;
- Pesar 10 gramas de cebola
- Adicionar 50 mL de solvente (metanol, ou acetato de etila ou água)
- Agitar durante 2 horas consecutivas a temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE 141 da marca Tecnal;
- Filtrar o extrato com papel filtro n° 1
- Clarificar com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Filtrar a solução novamente e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL;
- Completar o volume final com o solvente utilizado na extração.

#### **Extrato de Chlorella**

- Pesar 5 gramas da microalga chlorella;
- Adicionar 30 mL de metanol;

- Agitar a temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE – 141 da marca TECNAL durante uma hora;
- Interromper a agitação por 15 minutos;
- Reiniciar após a adição de 20 mL de metanol, durante uma hora.
- Filtrar o extrato;
- Colocar o extrato num funil de separação e lavar cinco vezes com 10 mL de hexano;
- Transferir o extrato para balão de fundo chato e evaporar o solvente;
- Ressuspender os resíduos do balão com 40 mL de água;
- Clarificar o extrato com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Deixar em repouso durante 20 minutos;
- Filtrar para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com o solvente utilizado na extração.

### **Metodologia para Determinação de Fenóis Totais na Cebola**

Reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%,  $\text{CuSO}_4$  2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman n°1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.

### **Curva Padrão de Quercetina**

A partir de uma solução padrão de Quercetina  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , seguir o procedimento da Tabela 1.

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina

Tubo	Quercetina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a 40 °C por 15 minutos;
- Adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (em água);
- Fazer a leitura da absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 750 nm

#### **Quantificação dos Fenóis Totais na Cebola**

- Tomar quatro tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato;
- Completar o volume com 1 mL de água;
- Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1);
- Deixar 15 minutos em banho-maria a 40 °C;
- Adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (água);
- Deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- Realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750 nm;
- Fazer triplicatas para todas as leituras.

### Metodologia para determinação de fenóis totais na microalga chlorella

Reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%,  $\text{CuSO}_4$  2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman n°1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.

### Curva Padrão de Tirosina

A partir de uma solução padrão de tirosina  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , seguir o procedimento da Tabela 2.

Tabela 2: Procedimento da curva padrão de tirosina

Tubo	Tirosina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  por 15 minutos;
- Adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:2 (em água);
- Fazer a leitura da absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 660 nm.

**Quantificação dos Fenóis Totais na Microalga Chlorella**

- Tomar quatro tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato;
- Completar o volume com 1 mL de água;
- Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1);
- Deixar 15 minutos em banho-maria a 40 °C;
- Adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (água);
- Deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- Realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 660 nm;
- Fazer triplicatas para todas as leituras.

**Determinação da Atividade Específica da Catalase****Preparação do Extrato Enzimático**

- Pesar 10 gramas de cebola;
- Homogeneizar em blender com 100 mL água destilada;
- Filtrar a amostra com algodão.

**Atividade Enzimática da Catalase**

- Adicionar uma alíquota de 4 mL do extrato enzimático a 2 mL de tampão fosfato pH 7 e peróxido de hidrogênio 0,005M previamente padronizado com permanganato de potássio 0,01N;
- Colocar a solução obtida em banho-maria a 40 °C durante 20 minutos;
- Interromper a reação pela adição de 5 mL de ácido sulfúrico 10%;
- Passar os conteúdos dos tubos para erlenmeyers e titular com permanganato de potássio até a viragem do indicador;
- Expressar os resultados em atividade específica (mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposta/min/mg proteínas) para as quatro classes de cebolas comerciais.

**Determinação do extrato enzimático da peroxidase e polifenoloxidase**

- Pesar cerca de 20 gramas de cebola;
- Homogeneizar a amostra em blender com 100 mL de solução tampão fosfato 5,2mM, pH 5,2 durante 2 minutos;
- Filtrar a amostra com algodão;

- Retirar do sobrenadante uma alíquota de 25 mL e adicionar 25 mL de acetona para serem agitados em mesa agitadora orbital TE 141 da marca Tecnal.;
- Interromper a agitação e adicionar mais 25 mL de acetona e agitar novamente por mais 5 minutos;
- Realizar este mesmo procedimento mais uma vez;
- Centrifugar por 8 minutos.
- Ressuspender o resíduo da centrifugação utilizando 25 mL de solução tampão fosfato 5mM, pH 5,2.

#### **Determinação da Atividade Enzimática da Peroxidase**

- Misturar 1 mL do extrato enzimático com 1,5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 e 1,5 mL de água destilada;
- Colocar a solução em banho-maria a 40°C durante 5 minutos para uniformizar a temperatura;
- Acrescentar 1 mL de água oxigenada 0,08% e 1 mL de guaiacol 0,5%.
- Aguardar 10 minutos para realização das leituras;
- Realizar as leituras em espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Conc da Varian a 470 nm.
- Expressar os resultados em atividade específica (Abs/ min/mg proteínas) para as quatro classes de cebolas comerciais.

Para o tempo zero adicionar a enzima, o tampão, a água destilada e ferver por 5 minutos para inativar a enzima. Logo após deve-se adicionar o guaiacol e a água oxigenada.

#### **Determinação da Atividade Enzimática da Polifenoloxidase**

- Misturar 1 mL do extrato enzimático com 1,5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 2,5 mL de água destilada;
- Colocar a solução em banho-maria a 30°C durante 5 minutos para uniformizar a temperatura;
- Acrescentar 1 mL de catecol 0,05M;
- Aguardar 10 minutos para realização das leituras;
- Realizar as leituras em espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Conc da Varian a 425 nm.
- Expressar os resultados em atividade específica (Abs/ min/mg proteínas) para as quatro classes de cebolas comerciais.

Para o tempo zero adicionar a enzima, o tampão, a água destilada e ferver por 5 minutos para inativar a enzima. Logo após deve-se adicionar o catecol.

### TABELAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NO ARTIGO 2:

Tabela 3: Teste de Tukey para umidade nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	88,5	88,4	88,3	88,6
Classe 2 {1}		0,742886	0,414172	0,975579
Classe 3 {2}	0,742886		0,925364	0,517532
Classe 4 {3}	0,414172	0,925364		0,250366
Classe 5 {4}	0,975579	0,517532	0,250366	

Tabela 4: Teste de Tukey para cinzas nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,75	0,73	0,76	0,75
Classe 2 {1}		0,805738	0,929411	0,998739
Classe 3 {2}	0,805738		0,480690	0,727349
Classe 4 {3}	0,929411	0,480690		0,967898
Classe 5 {4}	0,998739	0,727349	0,967898	

Tabela 5: Teste de Tukey para proteína nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,86	1,04	0,98	0,91
Classe 2 {1}		0,000247	0,001148	0,066115
Classe 3 {2}	0,000247		0,024712	0,000659
Classe 4 {3}	0,001148	0,024712		0,040262
Classe 5 {4}	0,066115	0,000659	0,040262	

Tabela 6: Teste de Tukey para fibra bruta nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,61	0,62	0,70	0,70
Classe 2 {1}		0,768002	0,000265	0,000299
Classe 3 {2}	0,768002		0,000334	0,000428
Classe 4 {3}	0,000265	0,000334		0,913114
Classe 5 {4}	0,000299	0,000428	0,913114	

Tabela 7: Teste de Tukey para pH nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	5,23	5,08	5,2	5,16
Classe 2 {1}		0,008279	0,800907	0,257290
Classe 3 {2}	0,008279		0,27407	0,129869
Classe 4 {3}	0,027407	0,800907		0,693342
Classe 5 {4}	0,129869	0,257290	0,693342	

Tabela 8: Teste de Tukey para acidez nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,31	0,38	0,31	0,29
Classe 2 {1}		,001550	1,000000	,037275
Classe 3 {2}	,001550		,001550	,000263
Classe 4 {3}	,001550	1,000000		,037275
Classe 5 {4}	,000263	,037275	,037275	

Tabela 9: Teste de Tukey para lipídios nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,17	0,18	0,19	0,16
Classe 2 {1}		,656793	,164718	,445340
Classe 3 {2}	,656793		,656793	,095337
Classe 4 {3}	,656793	,164718		,018608
Classe 5 {4}	,095337	,445340	,018608	

Tabela 10: Teste de Tukey para açúcares redutores nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	3,73	5,27	4,76	4,67
Classe 2 {1}		,000230	,000230	,000231
Classe 3 {2}	,000230		,000518	,000300
Classe 4 {3}	,000518	,000230		,585017
Classe 5 {4}	,000300	,000231	,585017	

Tabela 11: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com metanol para as diferentes classes de cebolas

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	2265,9	2244,3	2306,4	2282,9
Classe 2 {1}		0,001492	0,000242	0,010301
Classe 3 {2}	0,001492		0,000231	0,000242
Classe 4 {3}	0,000242	0,000231		0,001480
Classe 5 {4}	0,010301	0,000242	0,001480	

Tabela 12: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com água para as diferentes classes de cebolas

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	2840,3	2889,3	2784,6	2818,2
Classe 2 {1}		0,627639	0,534733	0,942531
Classe 3 {2}	0,627639		0,112888	0,346452
Classe 4 {3}	0,534733	0,112888		0,833747
Classe 5 {4}	0,942531	0,346452	0,833747	

Tabela 13: Teste de Tukey para fenóis totais extraídos com acetato de etila para as diferentes classes de cebolas

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	76,8	77,0	78,4	77,7
Classe 2 {1}		0,998690	0,649567	0,880894
Classe 3 {2}	0,998690		0,733657	0,934768
Classe 4 {3}	0,649567	0,733657		0,966713
Classe 5 {4}	0,880894	0,934768	0,966713	

Tabela 14: Teste de Tukey para atividade específica da enzima catalase nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,0256667	0,0240000	0,0146667	0,0176667
Classe 2 {1}		0,163900	0,000230	0,000235
Classe 3 {2}	0,163900		0,000231	0,000286
Classe 4 {3}	0,000230	0,000231		0,012195
Classe 5 {4}	0,000235	0,000286	0,012195	

Tabela 15: Teste de Tukey para atividade específica da enzima peroxidase nas diferentes classes de cebola

	{1}	{2}	{3}	{4}
Média	0,0306667	0,0033333	0,0263333	0,0250000
Classe 2 {1}		0,000230	0,160242	0,057545
Classe 3 {2}	0,000230		0,000231	0,000233
Classe 4 {3}	0,160242	0,000231		0,882395
Classe 5 {4}	0,57545	0,000233	0,882395	

### **ANEXO 3 - Descrição dos Procedimentos Analíticos e Tabelas Estatísticas do Artigo 3**

#### **Preparação dos Extratos de Cebola e Chlorella**

##### **Extrato de Cebola**

- Secar as cebolas em estufa de circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C durante duas horas;
- Pesar 10 gramas de cebola
- Adicionar 50 mL de solvente (metanol, ou acetato de etila ou água)
- Agitar durante 2 horas consecutivas a temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE 141 da marca Tecnal;
- Filtrar o extrato com papel filtro n° 1
- Clarificar com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Filtrar a solução novamente e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL;
- Completar o volume final com o solvente utilizado na extração.

##### **Extrato de Chlorella**

- Pesar 5 gramas da microalga chlorella;
- Adicionar 30 mL de metanol;
- Agitar a temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE – 141 da marca TECNAL durante uma hora;
- Interromper a agitação por 15 minutos;
- Reiniciar após a adição de 20 mL de metanol, durante uma hora.
- Filtrar o extrato;
- Colocar o extrato num funil de separação e lavar cinco vezes com 10 mL de hexano;
- Transferir o extrato para balão de fundo chato e evaporar o solvente;
- Ressuspender os resíduos do balão com 40 mL de água;
- Clarificar o extrato com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%;
- Deixar em repouso durante 20 minutos;
- Filtrar para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com o solvente utilizado na extração.

## Metodologia para Determinação de Fenóis Totais na Cebola

Reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%,  $\text{CuSO}_4$  2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman n°1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.

### Curva Padrão de Quercetina

A partir de uma solução padrão de Quercetina  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , seguir o procedimento da Tabela 1.

Tabela 1: Procedimento da curva padrão de quercetina

Tubo	Quercetina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  por 15 minutos;
- Adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (em água);
- Fazer a leitura da absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 750 nm.

### **Quantificação dos Fenóis Totais na Cebola**

- Tomar quatro tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato;
- Completar o volume com 1 mL de água;
- Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1);
- Deixar 15 minutos em banho-maria a 40 °C;
- Adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (água);
- Deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- Realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750 nm;
- Fazer triplicatas para todas as leituras.

### **Metodologia para determinação de fenóis totais na microalga chlorella**

Reagentes:

- Solução Alcalina: mistura das soluções  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%,  $\text{CuSO}_4$  2% e Tartarato duplo de sódio e potássio 4% nas proporções 100:1:1, respectivamente. Filtrar a solução de carbonato de sódio 4% em papel Whatman nº1 antes de adicionar o tartarato duplo de sódio e potássio 4% e o sulfato de cobre 2%.

### **Curva Padrão de Tirosina**

A partir de uma solução padrão de tirosina  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , seguir o procedimento da Tabela 2.

Tabela 2: Procedimento da curva padrão de tirosina

Tubo	Tirosina (mL)	Água (mL)	Solução Alcalina (mL)
1	0	1,0	4,5
2	0,1	0,9	4,5
3	0,2	0,8	4,5
4	0,3	0,7	4,5
5	0,4	0,6	4,5
6	0,5	0,5	4,5
7	0,6	0,4	4,5
8	0,7	0,3	4,5
9	0,8	0,2	4,5
10	0,9	0,1	4,5
11	1,0	0	4,5

- Colocar os tubos em banho-maria a 40 °C por 15 minutos;
- Adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (em água);
- Fazer a leitura da absorbância após 30 minutos utilizando comprimento de onda a 660 nm.

#### **Quantificação dos Fenóis Totais na Microalga *Chlorella***

- Tomar quatro tubos de ensaio e colocar nestes 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL de extrato;
- Completar o volume com 1 mL de água;
- Adicionar 4,5 mL da solução alcalina (Tabela 1);
- Deixar 15 minutos em banho-maria a 40 °C;
- Adicionar a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 (água);
- Deixar em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- Realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro a 660 nm;
- Fazer triplicatas para todas as leituras.

**Índice de Peróxido**

Reagentes:

- Solução ácido acético-clorofórmio (3:2);
- Solução saturada de KI (tem que ser preparada na hora): colocar 144g KI e completar com 100 mL de água;
- Solução Tiosulfato de sódio 0,1N (padronizado com  $K_2CrO_4$ );
- Solução de amido 1% (tem que ser preparada na hora): 1g de amido (indicador) em 100 mL de água.

**Padronização de tiosulfato de potássio com dicromato de potássio:**

- Pesar 0,14-0,16 gramas de dicromato de potássio;
- Colocar em erlenmeyer de 250 mL;
- Colocar 50 mL de água (previamente fervida) – temperatura ambiente;
- Agitar;
- 2 gramas de iodeto de potássio;
- 8 mL de ácido clorídrico concentrado;
- Titular – bureta 50 mL com solução padrão de tiosulfato, ao observar mudança de coloração (castanho → amarelo), adicionar 2 mL de solução de amido (indicador) e continua titulação (azul → verde).

**Método:**

- Pesar 5 gramas de amostra em erlenmeyer de 250 mL;
- Adicionar 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio;
- Agitar para dissolução da amostra;
- Adicionar 0,5 mL da solução de KI saturada e agitar
- Deixar em repouso por 1 minuto no escuro;
- Adicionar 30 mL de água destilada previamente fervida e fria e agitar;
- Adicionar 0,5 mL de solução de amido;
- Titular com solução de tiosulfato de sódio 0,1N até o desaparecimento da cor azul.

**Método Ácido Tiobarbitúrico**

- Pesar a amostra em balança analítica;
- Adicionar 30 mL de TCA 7,5% (homogeneizar primeiramente com uma parte desse volume, e a seguir adicionar o restante);
- Filtrar, descartar o precipitado, reservando o filtrado, do filtrado coletar alíquota de 5 mL e transferir para tubos de ensaio (em triplicata);
- Adicionar 5 mL de TBA (0,02M) aos tubos de ensaio;
- Branco: em tubos de ensaio adicionar 5 mL de TBA e 5 mL de TCA 7,5%.
- Levantar todos os tubos para banho a 100°C, por 40 minutos, a seguir resfriar em banho de água. Ler em espectrofotômetro a 538 nm.

**Curva padrão de TMP:**

Reagentes e soluções:

- Solução aquosa de TCA 7,5%
- Solução aquosa de TBA 0,02M
- Reagente TMP (1,1- 3,3 – tetra metoxipropano) padrão
- Solução estoque de TMP: pesar 0,1659g de TMP e transferir para balão de 100 mL com TCA 7,5% e completar o volume;
- Solução diluída de TMP: volume de 0,1 mL da solução estoque e completar o volume para 50 mL com TCA 7,5.

Adicionar a cada tubo as alíquotas a seguir, fechar tubos.

Tabela 3: Procedimento da curva padrão de TMP

<b>Tubos</b>	<b>TMP (mL)</b>	<b>[TMP] (M)</b>	<b>TCA (mL)</b>
Branco	0,0	0	5,0
1	0,5	$1,01 \times 10^{-8}$	4,5
2	1,0	$2,02 \times 10^{-8}$	4,0
3	1,5	$3,03 \times 10^{-8}$	3,5
4	2,0	$4,04 \times 10^{-8}$	3,0
5	2,5	$5,05 \times 10^{-8}$	2,5
6	3,0	$6,06 \times 10^{-8}$	2,0
7	3,5	$7,07 \times 10^{-8}$	1,5
8	4,0	$8,08 \times 10^{-8}$	1,0
9	4,5	$9,09 \times 10^{-8}$	0,5
10	5,0	$10,10 \times 10^{-8}$	0,0

- Adicionar a cada tubo, 5 mL da solução TBA
- Fechar a tampa e aquecer em banho de água fervente por 40 minutos (colocar os tubos somente quando a água estiver fervendo, e marcar o tempo).
- Após completar o tempo, imediatamente resfriar, sob água corrente (10 minutos são suficientes)
- Fazer a leitura a 538 nm

**TABELAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NO ARTIGO 3:**

Tabela 4: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 15 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	16,733	9,8667	4,0667	,17000	10,567
Ceb. metanol		0,000187	0,000176	0,000176	0,000219
Ceb. água	0,000187		0,000260	0,000176	0,877752
Ceb. Acetato	0,000176	0,000260		0,002992	0,000199
Chlorella	0,000176	0,000176	0,002992		0,000176
Quercetina	0,000219	0,877752	0,000176	0,000176	

Tabela 5: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 30 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	20,733	12,400	4,1667	1,7533	14,500
Ceb. metanol		0,000180	0,000176	0,000176	0,000304
Ceb. água	0,000180		0,000180	0,000176	0,166359
Ceb. Acetato	0,000176	0,000180		0,095223	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,095223		0,000176
Quercetina	0,000304	0,166359	0,000176	0,000176	

Tabela 6: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 45 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	22,300	13,423	3,6000	2,5000	14,733
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,024773
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,062707	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,062707		0,000176
Quercetina	0,000176	0,024773	0,000176	0,000176	

Tabela 7: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 100 µL de extrato em 60 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	23,700	13,367	3,9167	2,6667	15,333
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,034723
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,240212	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,240212		0,000176
Quercetina	0,000176	0,034723	0,000176	0,000176	

Tabela 8: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 15 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	24,400	16,200	4,6967	,71000	26,600
Ceb. metanol		0,000179	0,000176	0,000176	0,126432
Ceb. água	0,000179		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,004694	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,004694		0,000176
Quercetina	0,126432	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 9: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200 µL de extrato em 30 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	29,197	17,477	5,0067	3,2000	29,000
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,980426
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,003957	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,003957		0,000176
Quercetina	0,980426	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 10: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200  $\mu$ L de extrato em 45 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	31,597	17,767	5,0333	3,6833	32,000
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,993705
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,673492	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,673492		0,000176
Quercetina	0,993705	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 11: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 200  $\mu$ L de extrato em 60 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	33,167	18,133	5,2000	5,1333	32,167
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,202866
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,999843	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,999843		0,000176
Quercetina	0,202866	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 12: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500  $\mu$ L de extrato em 15 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	37,907	18,633	7,1000	2,7633	65,000
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000177	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000177		0,017340	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,017340		0,000176
Quercetina	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 13: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500  $\mu$ L de extrato em 30 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	45,027	24,200	7,7000	5,4600	71,033
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,099286	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,099286		0,000176
Quercetina	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 14: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500  $\mu$ L de extrato em 45 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	50,090	26,400	7,9000	7,6800	77,733
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,998377	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,998377		0,000176
Quercetina	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	

Tabela 15: Teste de Tukey para avaliar a capacidade de seqüestrar o DPPH utilizando 500  $\mu$ L de extrato em 60 minutos

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Média	53,400	28,367	8,7667	10,267	80,433
Ceb. metanol		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. água	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Ceb. Acetato	0,000176	0,000176		0,162428	0,000176
Chlorella	0,000176	0,000176	0,162428		0,000176
Quercetina	0,000176	0,000176	0,000176	0,000176	