

PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PARTES AÉREAS DA CANA-DE-AÇÚCAR COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

PARAMETERS OF INFLUENCE ON EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM SUGARCANE TOPS WITH TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY

Juliana Aparecida de SOUZA-SARTORI¹; Carolina SCALISE²; Antonio Sampaio BAPTISTA³; Roberta Bergamin LIMA⁴; Claudio Lima de AGUIAR³

1. Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, SP, Brasil; 2. Engenharia Agrônoma; 3. Professor, Doutor, ESALQ – USP, Piracicaba, SP, Brasil. claguiar@usp.br; 4. Mestranda no Programa de Pós Graduação em Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO: Com o aumento de produção de cana-de-açúcar é de se esperar que haja um gradual aumento no excedente de palha no canavial (140 kg de palha/t cana). Uma alternativa viável para essa palha pode ser a extração de compostos ativos e a condição as quais o material é submetido pode influenciar a quantidade e qualidade de compostos extraídos. O objetivo do trabalho foi testar diferentes concentrações de solvente para extração, à diferentes temperaturas e pH, de acordo com um planejamento fatorial. Foram analisadas a quantidade de flavonóides e a capacidade antioxidante obtidas em diferentes combinações. O tratamento 5 (pH igual a 4; Temperatura igual a 70°C e 40% de etanol) foi o tratamento que maior indicou atividade antioxidante, entre todos os tratamentos feitos. E o tratamento que indicou a maior extração de flavonóides foi o de número 16 (concentração de etanol igual a 60%; pH=7 e temperatura igual a 21,7°). Pela análise de superfície de respostas, para a extração de flavonóides, a interação entre o pH e a proporção de etanol:água indicou que a faixa de pH ideal para extração foi de 6 a 8 e a proporção etanol:água foi de 50 a 70% e temperatura em valores inferiores a 30°C e superiores a 70°C. Os resultados demonstraram uma correlação positiva com o aumento da temperatura e de pH, e a proporção de etanol em água teve leve influência sobre a capacidade antioxidante total. Portanto, os parâmetros influenciaram na extração de compostos fenólicos de partes aéreas de cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum* ssp. Flavonóides. Ponteiros.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) tem sido foco de diversos estudos em relação ao seu conteúdo de possíveis compostos biologicamente ativos, os quais estão distribuídos em toda a planta, sendo potenciais responsáveis por diversas ações farmacológicas, como, por exemplo, a capacidade antioxidante.

O Brasil é o país que apresenta o maior crescimento na produção de cana-de-açúcar, com 470 milhões de toneladas produzidas. Segundo a União da Agroindústria Canavieira (UNICA, 2008), em 1975, a produtividade média brasileira era de 50 t cana/ha, enquanto que, em 2005, a produtividade média foi de mais de 80 t/ha. Está previsto que a produção do país atinja mais de 450 milhões de toneladas em 2007/2008 e que, em 2010/2011 esta marca atinja 580 milhões de ton. Desde 1975, com a implantação do Proálcool, as áreas utilizadas na plantação de cana-de-açúcar (em ha) se expandiram e a previsão, até 2012, é que continuarão a crescer, chegando a 7,8 milhões de ha. Com todo esse aumento de produção é de se esperar que haja um gradual aumento no excedente de palha no canavial, o qual poderia ser utilizado para outros fins comerciais, considerando-se que de cada tonelada de cana-de-açúcar produzida 140 kg são de palha (BORBA, 2008).

Desta forma, uma alternativa viável para este material vegetal seria destiná-lo à extração de compostos químicos úteis à química de produtos naturais. As folhas da cana-de-açúcar, segundo Deschamps e Ramos (2002), Takara et al. (2007) e Nakasone et al. (2005), são especialmente ricas em compostos fenólicos, tais como as isoorientina dimetil éter. Isoorientina é uma flavona glicosilada, mais especificamente a luteolina-6-C-glicosil, a qual tem sido reportada em diversas espécies de plantas, como *Gentiana*, *Rumex*, *Swertia* e *Vitex* (HARBONE, 1994).

Os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados, e ainda peneirados ou moídos antes do processo de extração. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração e as enzimas lipoxigenase tornam-se inativas. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática (JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005)

Segundo Shaidi e Nacz (1995), não existe sistema de extração com solventes que seja satisfatório para o isolamento de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos nos alimentos varia do simples ao altamente polarizado, há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como

os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações.

O objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes concentrações de solvente para extração, à diferentes temperaturas e pH, de acordo com um planejamento fatorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos ponteiros de cana-de-açúcar

Os ponteiros de cana-de-açúcar, da variedade SP 81-3250, no ano-safra 2009/2010, foram coletados na fazenda experimental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus da USP, município de Piracicaba/SP, localizado a 554 m, com latitude 22°42’30”S e longitude 47°38’01”W. O corte dos ponteiros foi feito acima do 1° internódio do ápice para a base, sendo em seguida moídos em moinho de facas mod. Mause.

Planejamento fatorial

Com o planejamento fatorial, que é constituído de 2³ experimentos com seus pontos centrais e adjacentes, foi possível verificar a influência dos diversos parâmetros na obtenção de extrato através de combinações, quanto a quantidade e qualidade dos compostos extraídos. Para este sistema, foi levada em consideração a atuação de três variáveis de controle, as quais foram: concentração de etanol; temperatura; e pH. Na Tabela 1, é possível visualizar todas as combinações feitas pelo planejamento fatorial para obtenção da atividade antioxidante e flavonóides.

Tabela 1. Valores codificados e reais para o planejamento fatorial completo 2³ para otimização do preparo do extrato do ponteiro de cana-de-açúcar para a análise de atividade antioxidante e flavonóides.

Ensaio	Etanol:Água destilada % v/v	pH	Temperatura, °C
1	(-1) 40	(-1) 4	(-1) 30
2	(+1) 80	(-1) 4	(-1) 30
3	(-1) 40	(+1) 10	(-1) 30
4	(+1) 80	(+1) 10	(-1) 30
5	(-1) 40	(-1) 4	(+1) 70
6	(+1) 80	(-1) 4	(+1) 70
7	(-1) 40	(+1) 10	(+1) 70
8	(+1) 80	(+1) 10	(+1) 70
9	(0) 60	(0) 7	(0) 50
10	(0) 60	(0) 7	(0) 50
11	(0) 60	(0) 7	(0) 50
12	(-√2) 31,7	(0) 7	(0) 50
13	(+√2) 88,3	(0) 7	(0) 50
14	(0) 60	(-√2) 2,8	(0) 50
15	(0) 60	(+√2) 11,2	(0) 50
16	(0) 60	(0) 7	(-√2) 21,7
17	(0) 60	(0) 7	(+√2) 78,3
18	(0) 60	(0) 7	(0) 50
19	(0) 60	(0) 7	(0) 50

Os valores apresentados entre parênteses representam os valores codificados, enquanto os valores laterais representam os valores reais para o planejamento fatorial completo 2³.

Flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais por Park et al. (1995), com pequenas modificações. Os conteúdos de flavonóides totais foram determinados a partir de uma mistura de 0,5 mL das amostras, 4,3 mL de solução 80% de etanol, 0,1 mL de solução 10% de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ e 0,1 mL de solução 1 M de acetato de potássio. Após 40 min a temperatura ambiente, a leitura da absorbância será feita a 415 nm, sendo o conteúdo de flavonóides calculado contra curva de calibração de quercetina ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Capacidade antioxidante total

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto et al. (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. O

complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28 mL, 100 mM) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12 mL, 30 mM) e solução de H_2SO_4 (20 mL, 3 M), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H_2O destilada para 100 mL. Os resultados foram expressos em CAT (Capacidade Antioxidante Total), sendo que a curva de calibração foi elaborada com ácido ascórbico P.A. nas concentrações de 20 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a CAT foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico (μg de ácido ascórbico por mL de solução).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Siqueira et al. (1997), o antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidante, retarda ou inibe o processo de oxidação”. A seguir, são apresentadas as concentrações médias calculadas de capacidade antioxidante dos 19 ensaios considerados para este planejamento fatorial completo (Tabela 2).

Tabela 2. Capacidades Antioxidantes Totais médias perante o delineamento estatístico do planejamento fatorial completo 2^3 com seus valores reais indicados.

Ensaio	Etanol: Água destilada %(v/v)	pH	Temperatura, °C	Capacidade Antioxidante Total (%)
1	40	4	30	15733,3
2	80	4	30	15745,8
3	40	10	30	18870,8
4	80	10	30	18183,3
5	40	4	70	22008,3
6	80	4	70	20608,3
7	40	10	70	20300,0
8	80	10	70	19116,7
9	60	7	50	10501,3
10	60	7	50	12545,8
11	60	7	50	9916,7
12	31,7	7	50	8604,2
13	88,3	7	50	11966,7
14	60	2,8	50	6758,3
15	60	11,2	50	10975,0
16	60	7	21,7	5770,8
17	60	7	78,3	9175,0
18	60	7	50	10362,5
19	60	7	50	12700,0

Como pôde-se observar pela tabela acima, o tratamento 5 (pH igual a 4; Temperatura igual a 70°C e 40% de etanol) foi o tratamento que maior indicou atividade antioxidante, entre todos os tratamentos feitos, sendo a combinação entre os parâmetros que melhor possibilitou a extração de substâncias com propriedade antioxidante. Já o tratamento que demonstrou menor atividade antioxidante foi o 16 (pH igual a 7; Temperatura igual a 21,7°C e 60% de etanol), ou seja, foi a combinação que menos permitiu a extração de compostos antioxidantes.

O comportamento dos resultados oriundos das análises realizadas de flavonóides extraídos não se manifestou regular como os resultados observados na atividade antioxidante, ou seja, não houve uma faixa crítica para o aumento ou para a diminuição da concentração desse composto fenólico de acordo com a atuação dos parâmetros em cada tratamento. A seguir, na Tabela 3, encontram-se todos os resultados obtidos nas análises das extrações de compostos fenólicos, os flavonóides.

Tabela 3. Resultados obtidos nas análises das extrações de flavonóides do ponteiro de cana-de-açúcar, em relação aos parâmetros percentagem de etanol em água destilada, pH e temperatura.

Ensaio	Etanol:Água destilada %(v/v)	pH	Temperatura, °C	Flavonóides totais, mg/mL
1	40	4	30	11,8
2	80	4	30	12,8
3	40	10	30	10,2
4	80	10	30	14,8
5	40	4	70	22,5
6	80	4	70	22,1
7	40	10	70	20,8
8	80	10	70	18,5
9	60	7	50	14,5
10	60	7	50	16,7
11	60	7	50	14,4
12	31,7	7	50	8,8
13	88,3	7	50	11,3
14	60	2,8	50	6,4
15	60	11,2	50	4,2
16	60	7	21,7	33,7
17	60	7	78,3	24,6
18	60	7	50	8,7
19	60	7	50	16,7

Métodos estatísticos como o planejamento fatorial completo tem sido extensivamente utilizado como ferramenta de otimização de processos de extração dos mais variados componentes químicos em matrizes alimentares, como por exemplo, a extração protéica a partir de farelo de soja demonstrado em Aguiar et al. (2009b).

O tratamento que indicou a maior de extração do composto em questão foi o de número 16 (concentração de etanol igual a 60%; pH=7 e temperatura igual a 21,7°C). Já o tratamento que demonstrou a menor extração de flavonóides foi o ensaio 15 (concentração de etanol igual a 60%; pH=11,2 e temperatura igual a 50°C), mostrando,

assim, que a combinação feita pelo modelo estatístico não se mostrou eficiente para essa atividade.

Pode-se observar que os parâmetros estudados (solvente, temperatura e pH) influenciam nos teores de flavonóides obtidos e na capacidade antioxidante. Em estudo feito por Vedana et al. (2008), foi observado que a trituração associada a uma extração hidroalcoólica quente favoreceu a extração dos compostos fenólicos e conseqüentemente ao aumento da atividade antioxidante. Ou seja, um valor de temperatura maior, permitiu uma maior extração de compostos fenólicos.

Com relação a influência do solvente utilizado, Spagolla et al. (2009) verificaram que, na extração alcoólica em mirtilo, foram obtidos maiores teores de

fenólicos e flavonóides totais na mistura metanol/água 80:20 (v/v) e na mistura etanol/água 60:40 (v/v). Assim como Park et al.(1998) mostrou que para extratos etanólicos de própolis foi possível extrair uma maior quantidade de flavonóides nas concentrações alcoólicas entre 60 e 80% e os extratos etanólicos a 70 e 80% apresentaram grande atividade antioxidante.

Portanto, considera-se que o tipo de solvente, temperatura e pH afetam a quantidade de compostos fenólicos a serem extraídos. Porém, não existe na literatura estudos que relacionem os três parâmetros estudados, obtendo assim uma condição ideal para a extração.

Pela análise de superfície de respostas (Figuras 1, 2 e 3), pôde-se observar que a extração hidro-alcoólica de flavonóides do ponteiro de cana-de-açúcar foi mais eficiente, conforme a variação dos fatores (pH e percentagem de etanol em água destilada), indicando uma correlação com os parâmetros investigados. Na Figura 1, pode-se notar que as melhores condições para a extração de flavonóides totais de ponteiros de cana-de-açúcar foram para proporção de etanol em água na faixa de 50 a 70% e de pH na faixa de 6 a 8.

Diversos autores têm demonstrado que a extração de flavonóides de diferentes matrizes vegetais tem sido eficiente na combinação de etanol em água e na proporção de 60% (v/v) (AGUIAR et al., 2007; AGUIAR, 2004; COLOMBO, 2003). No entanto, quando foi analisado o efeito de interação entre proporção de etanol em água e a temperatura de extração, os resultados para a superfície de resposta foram completamente diferentes (Figura 2).

Na Figura 2 acima, os resultados para a extração de flavonóides mostrou-se desfavorável ao efeito da variação da temperatura, sendo que o efeito de correlação foi positivo para temperaturas mais baixas e para as mais altas. Os teores de flavonóides totais foram maiores para temperaturas inferiores a 30°C, em média e; para temperaturas superiores a 70°C. Este fato pode ser corroborado pela grande quantidade de literatura a respeito de extração de flavonóides relatando em suas técnicas analíticas o uso de temperaturas entre 60 e 80°C. O aumento da temperatura promoveria um aumento da reatividade do etanol, o que facilitaria o processo extrativo das fibras vegetais.

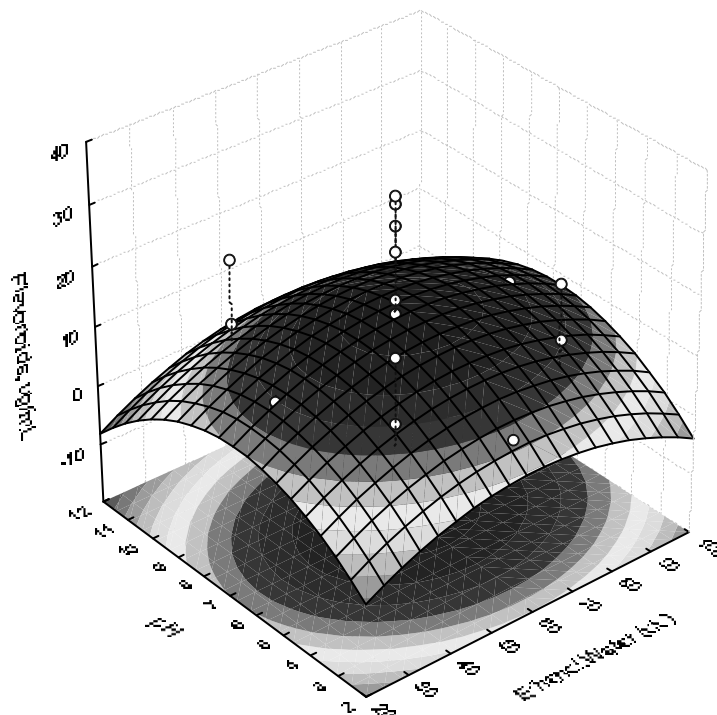


Figura 1. Superfície de respostas para a extração de flavonóides totais de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis pH e proporção de etanol:água destilada (v/v, %).

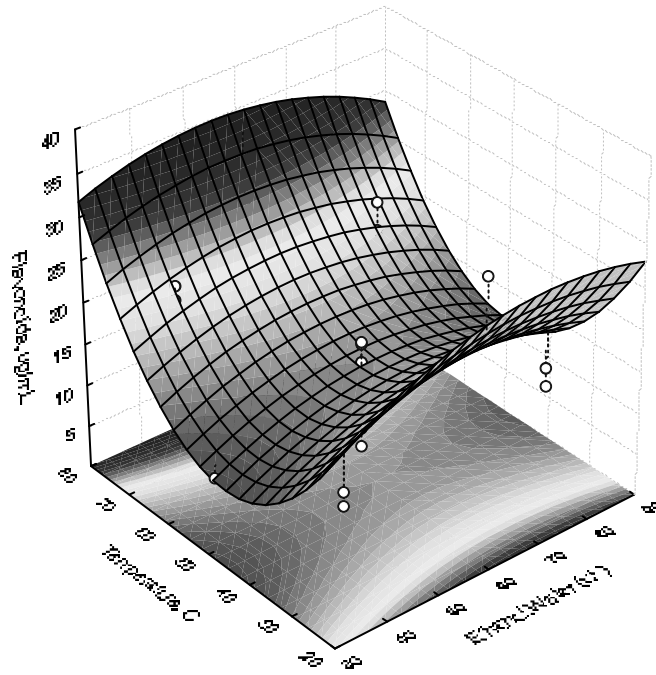


Figura 2. Superfície de respostas para a extração de flavonóides totais de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis temperatura e proporção de etanol:água destilada (v/v, %).

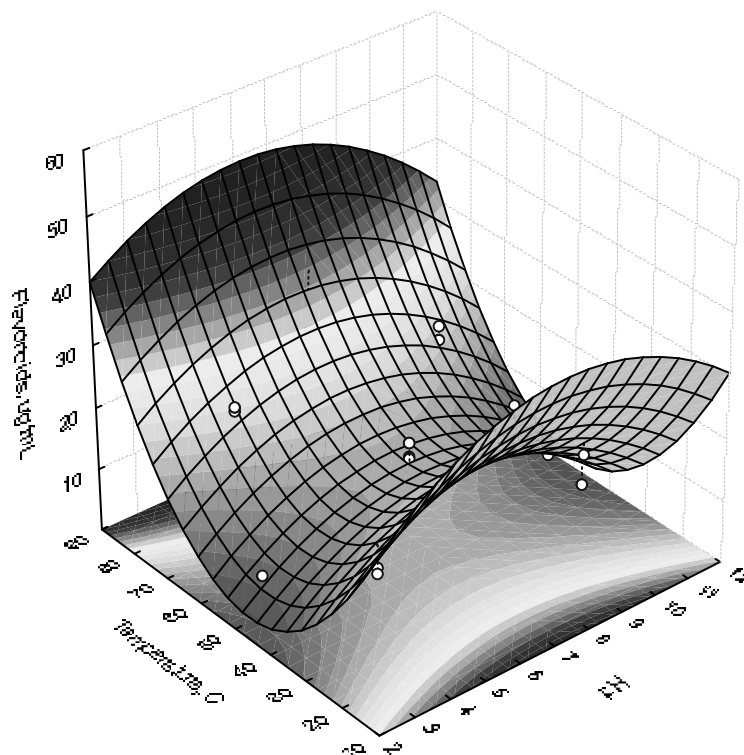


Figura 3. Superfície de respostas para a extração de flavonóides totais de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis temperatura e pH.

Lee et al. (2003) demonstraram em seus estudos que flavonóides, como os isoflavonóides, estão relacionados como importantes agentes químicos naturais na atividade antioxidante *in vitro*. Outros trabalhos também relacionam a presença de flavonóides as atividades biológicas de extratos vegetais (MAKRIS e ROSSITER, 2001); muito embora, Aguiar et al. (2007) e Aguiar et al. (2009a) tenham observado que há grande variação nos conteúdos de flavonóides

dependendo da espécie vegetal e/ou condições de processamento industrial.

Na Figura 3, pode-se observar que o efeito do pH se manteve inalterado configurando uma melhor extração dos flavonóides na faixa de 6 a 8 e; para o efeito da temperatura em valores inferiores a 30°C e superiores a 70°C. Note-se que os valores observados se apresentaram pouco dispersos em relação aos valores preditos (Figura 4).

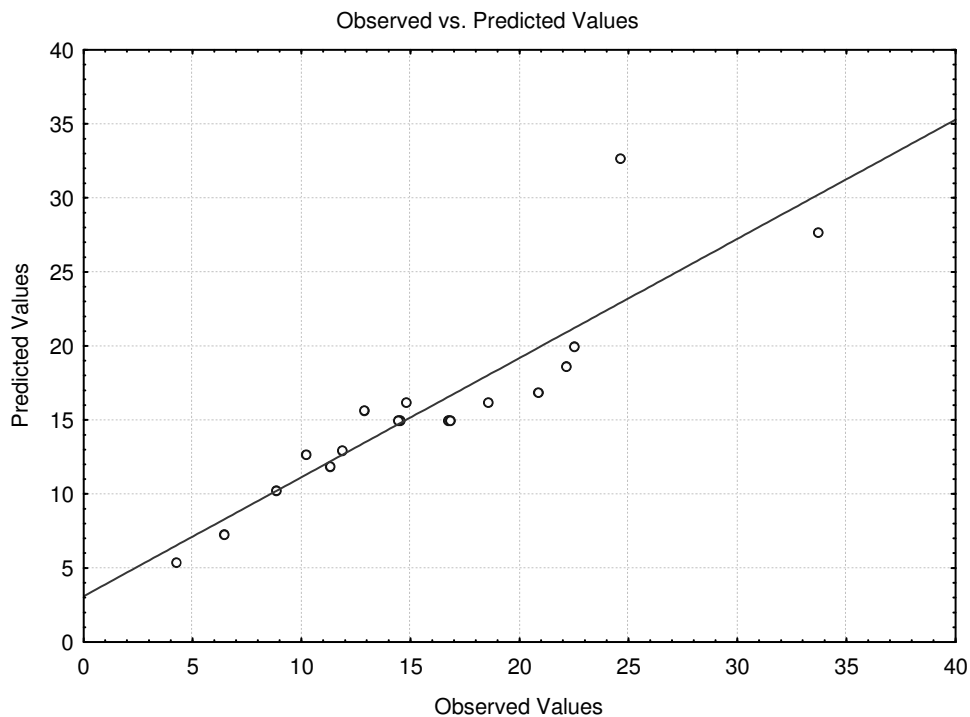


Figura 4. Diagrama para interpretação de valores preditos e observados do planejamento fatorial 2^3 .

Pela análise de superfície de respostas apresentadas nas Figuras 5, 6 e 7, pôde-se observar que a extração hidro-alcoólica de compostos ativos com atividade antioxidante extraídos do ponteiro de cana-de-açúcar foi mais eficiente conforme a variação dos fatores (pH, temperatura e percentagem de etanol em água destilada), indicando uma correlação positiva com os parâmetros investigados.

Os resultados para capacidade antioxidante total demonstraram uma correlação positiva com o aumento da temperatura, e a proporção de etanol em água destilada utilizada na extração dos compostos ativos com atividade antioxidante teve leve influência sobre a capacidade antioxidante total (Figura 5). Pode-se observar que os resultados para capacidade antioxidante total sob interação da temperatura e pH demonstraram uma correlação positiva com o aumento tanto de um quanto de outro fator analisado (Figura 6). Não foi possível obter um ponto de ótimo para a análise

em superfície de resposta, no entanto, é possível perceber que o aumento do pH promoveu a capacidade antioxidante total, bem como, o aumento da temperatura também promoveu da mesma forma.

Da mesma forma que na Figura 6, a Figura 7 ilustra um leve efeito do pH sobre a capacidade antioxidante total. Por outro lado, o efeito do proporção etanol:água (% v/v) foi mais pronunciado.

Muitos autores descrevem que a mudança no pH de soluções alcoólicas extratoras de compostos fenólicos com atividade antioxidante, promovem a extração dos mesmos, fato que pode explicar o comportamento descrito na Figura 7 pela interação de pH e proporção de etanol:água.

E na Figura 8 verifica-se que os valores observados apresentaram-se pouco dispersos em relação aos valores preditos; ao contrário do perfil apresentado na Figura 4, que mostra uma grande dispersão entre os valores preditos e observados.

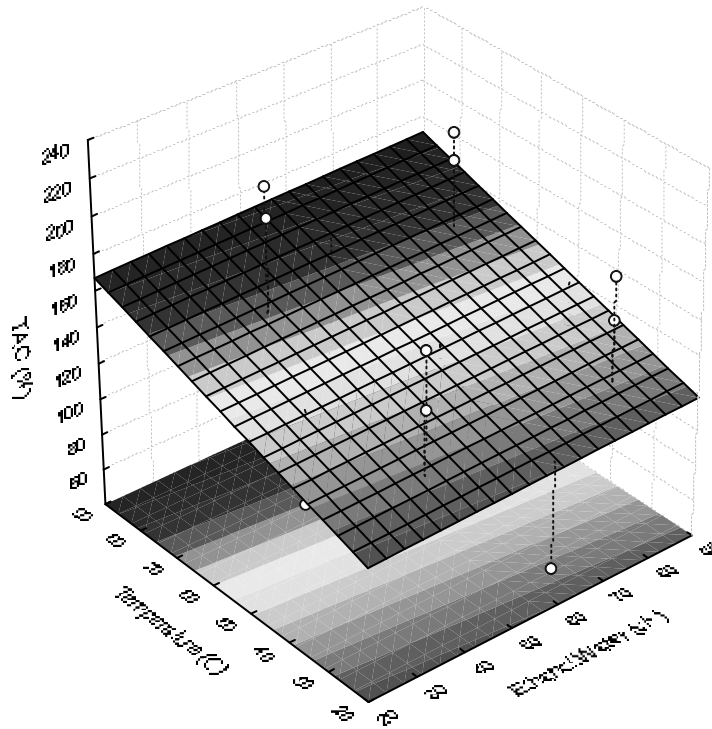


Figura 5. Superfície de respostas para a capacidade antioxidante total dos extratos de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis temperatura e proporção de etanol:água (% v/v).

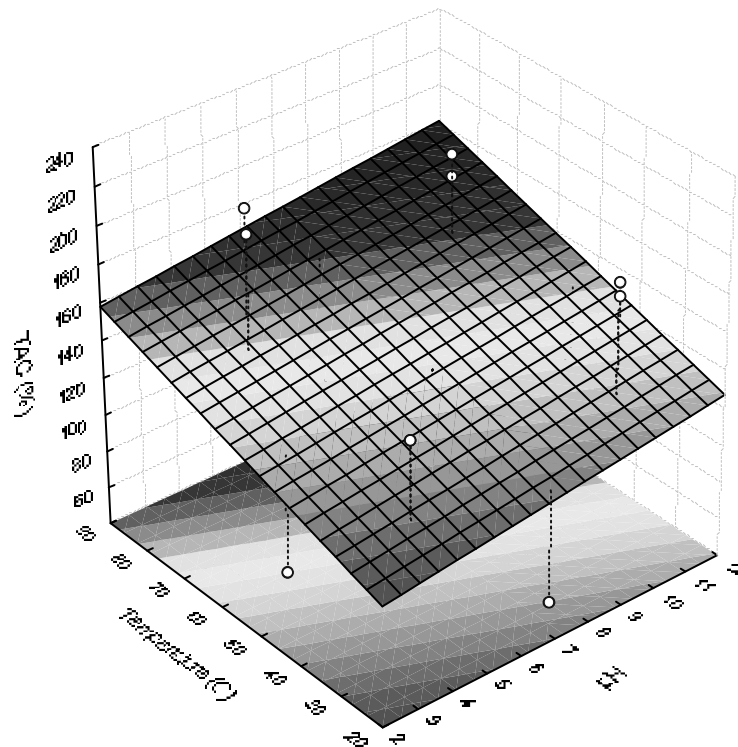


Figura 6. Superfície de respostas para a capacidade antioxidante total dos extratos de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis temperatura e pH.

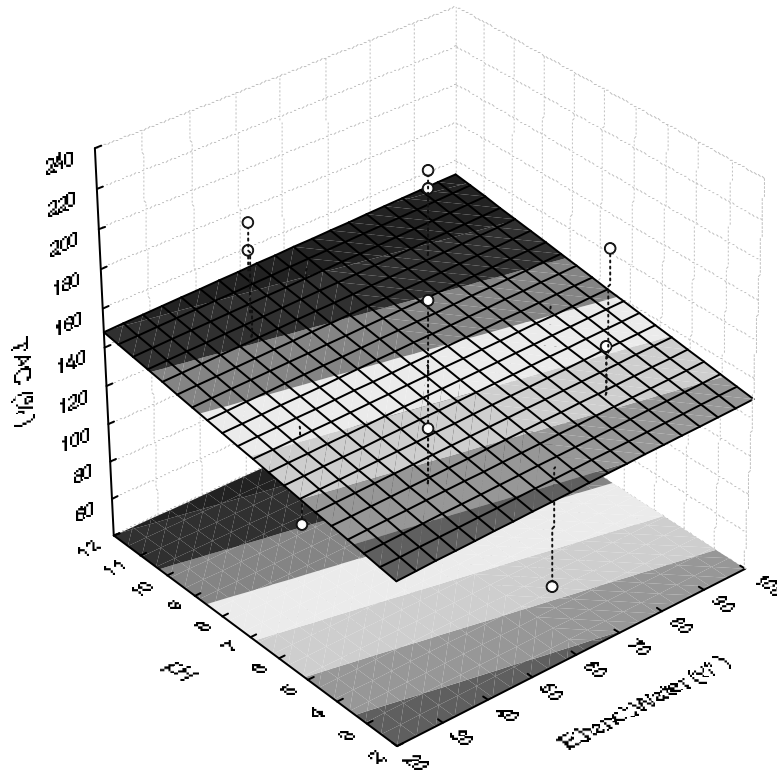


Figura 7. Superfície de respostas para a capacidade antioxidante total dos extratos de ponteiros de cana-de-açúcar em função da interação das variáveis proporção de etanol:água (% v/v) e pH.

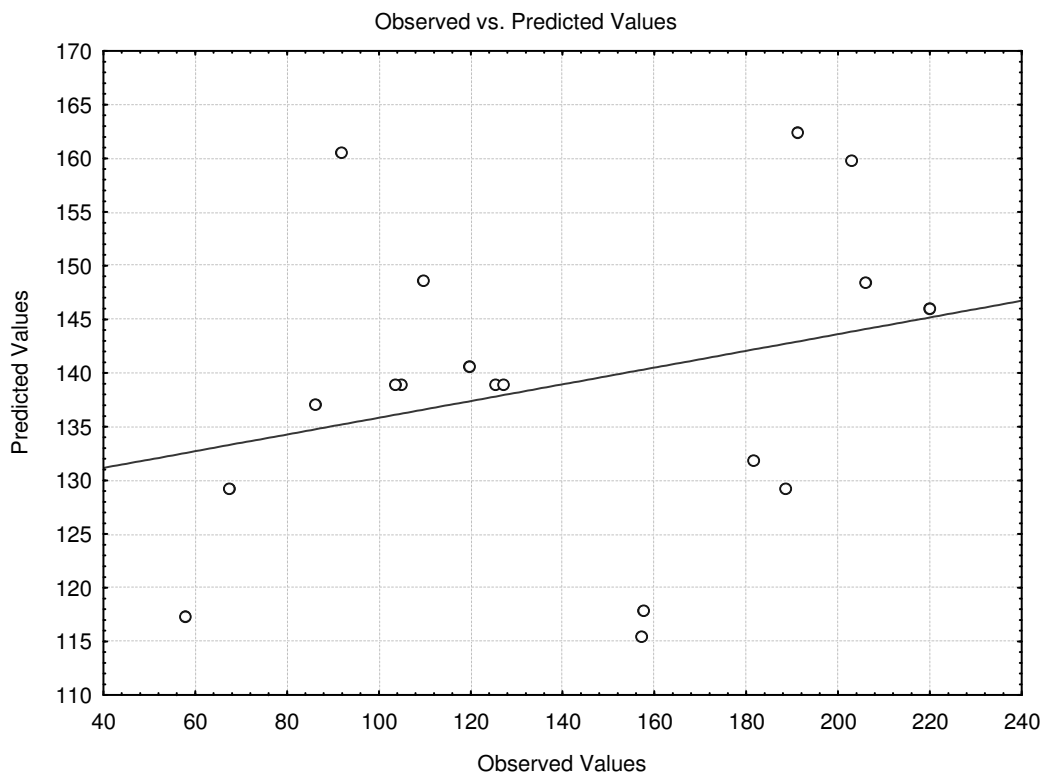


Figura 8. Diagrama para interpretação de valores preditos e observados do planejamento fatorial 2^3 .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo na concessão de bolsa de Iniciação Científica (Proc. FAPESP 2009/54634-5) e no auxílio à pesquisa Proc. FAPESP 2009/54635-1.

ABSTRACT: With the increase of production of sugarcane is expected that there is a gradual increase in the surplus of sugarcane straw (140 kg of straw/ t cane). A viable alternative for this straw may be the extraction of active compounds and the condition which the material is subjected may influence the quantity and quality of extracted compounds. The objective of this study was to test different concentrations of solvent for extraction at different temperatures and pH, according to a factorial design. We analyzed the amount of flavonoids and antioxidant capacity obtained in different combinations. Treatment #5 (pH = 4; temperature equal to 70 ° C and 40% ethanol) was the treatment indicated that greater antioxidant activity among all treatments did. The treatment was yield the highest flavonoids extraction was #16 (concentration of 60% ethanol, pH 7 and temperature at 21.7 °C). By analyzing the response surface for flavonoids extraction the interaction between pH and the ratio of ethanol:water indicated that the ideal pH for extraction was between 6 and 8 and the ratio ethanol: water was 50-70% and temperature below 30°C and above 70°C. The results demonstrated a positive correlation with increasing temperature and pH, and the proportion of ethanol in water had a slight effect on the total antioxidant capacity. The parameters influenced the extraction of phenolic compounds from sugarcane tops.

KEYWORDS: *Saccharum* ssp. Flavonoids. Top.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; WALDER, J. M. M.; TSAI, S. M.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAJIMA, E. W. Changes in isoflavone profiles of soybean treated with gamma irradiation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 60, n. 5, p. 387-94, 2009.
- AGUIAR, C. L.; SANTOS, S. C. T.; FREIXO, J. M.; OKUDA, M. H. Método multivariado na otimização do processo de extração protéica do farelo de soja com soro de leite bovino. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 171-80, 2009.
- AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; ALENCAR, S. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Analysis de isoflavonoids from Leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. **Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 58, n. 2, p. 116-24, 2007.
- AGUIAR, C. L. Transformações física e bioquímica de isoflavonóides conjugados de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica in vitro [Tese] Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp; 2004.
- BORBA, P. S. Aproveitamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar na indústria sucroalcoeira. Monografia apresentada ao Eco_Lógicas: Concurso Catarinense de Monografias sobre Energias Renováveis e Eficiência Energética, promovido pelo Instituto IDEAL. Florianópolis, 2008.
- COLOMBO, R. Extração e Análise Cromatográfica (CLAE/UV E CLAE/EM) dos Flavonóides da Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*). 2003. 166f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular das forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1634-1639, 2002.
- HARBORNE, J. B. In “THE FLAVONOIDS: ADVANCES IN RESEARCH SINCE 1986,” ed. New York:Chapman and Hall,1994, 450 p.
- JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

LEE, M. M.; GOMEZ, S. L.; CHANG, J. S.; WEY, M.; WANG, R. T.; HSING, A. W. Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 12, n. 7, p. 665-8, 2003.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 49, p. 3216-22, 2001.

NAKASONE, Y.; KAWAKAMI, H.; ISHII, K.; SUEYOSHI, K.; TAKARA, K.; WADA, K.; KUWAE, I.; KUNINAKA, S. The changes in the phenolic glycosides from sugarcane juice during kokuto production in Okinawa. **Science Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Kyushu, v. 52, p. 5-7, 2005

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; Contado, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v.269, p. 337-341, 1999.

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

SIQUEIRA, F. M.; OETTERER, M.; Reginato-D'ARCE, M. B. Nutrientes antioxidantes. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

TAKARA, K.; USHIJIMA, K.; WADA, K., et al. Phenolic compounds from sugarcane molasses. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 56, n. 11, p. 611-4, 2007.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>>. Acesso em: 24 jun 2008.

VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 159-165, abr./jun.2008. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/229/224>>. Acesso em 01/05/2012.