



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANIEL BATISTA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO DE
EXTRATOS FENÓLICOS BIOTRANSFORMADOS ORIUNDOS DE
RESÍDUOS AGRÍCOLAS

CAMPINAS/SP

2022

DANIEL BATISTA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO DE EXTRATOS
FENÓLICOS BIOTRANSFORMADOS ORIUNDOS DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de mestre em Alimentos e
Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Alves Macedo

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO DANIEL
BATISTA E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. JULIANA ALVES MACEDO.

CAMPINAS/SP

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C32a Batista, Daniel, 1989-
Avaliação in vitro do potencial anti-hipertensivo de extratos fenólicos biotransformados oriundos de resíduos agrícolas / Daniel Batista. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Juliana Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Resíduos agrícolas. 2. Fenólicos. 3. Biotransformação. 4. Enzima conversora de angiotensina. 5. Hipertensão. I. Macedo, Juliana Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: In vitro evaluation of anti-hypertensive potencial of phenolics extracts from agricultural byproducts

Palavras-chave em inglês:

Agricultural wastes

Phenolics

Biotransformation

Angiotensin converting enzyme

Hypertension

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Juliana Alves Macedo [Orientador]

Ruann Janser Soares de Castro

Luciana Francisco Fleuri

Data de defesa: 07-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7520-8848>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2593367216930446>

LOCAL E DATA DA DEFESA: Campinas, 07 de março de 2022.

COMISSÃO AVALIADORA:

Profa. Dra. Juliana Alves Macedo (Orientadora)

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri

Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

A Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade, capacidade e saúde para realização deste trabalho.

Dedico um agradecimento especial à Profa. Juliana Macedo por ter aceitado o desafio de me orientar em uma área diferente da minha formação e com minhas restrições de horário para desenvolvimento dos ensaios laboratoriais; sem isso eu não teria ao menos começado. Agradeço principalmente por todos os ensinamentos, paciência, carinho, dedicação e atenção despendidos a mim durante todo esse período.

Agradeço também a minha família pelo suporte e amor, respeitando meus momentos difíceis provocados pela dupla jornada de trabalho e estudo e me proporcionando momentos de alegria e descontração sempre que possível. Vocês são a motivação para eu continuar minha jornada.

Por fim, agradeço ao Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro pelo auxílio com os protocolos para testar as atividades enzimáticas e a todas as colegas de laboratório com quem tive o privilégio de trabalhar durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Camila Rubia Christofolletti, que me ajudou com os protocolos e nos primeiros passos dos ensaios.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A hipertensão arterial atinge mais de um bilhão de pessoas no mundo e é considerada um alto fator de risco para doenças cardiovasculares. Dentre os mecanismos de regulação da pressão sanguínea, destaca-se o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), por sua atuação na elevação da pressão arterial (PA) por meio de vaso constrição e reabsorção de sódio, o que o torna o principal alvo para tratamento medicamentoso, principalmente por inibição da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA). Tendo sido o captopril o primeiro medicamento desenvolvido com esse mecanismo de ação, os inibidores de ECA impedem a conversão da angiotensina I em angiotensina II, interrompendo a cascata de reações do SRAA que culminariam na elevação da PA. Além do tratamento convencional, é possível encontrar, na medicina popular recomendações para o consumo de diversas plantas, *in natura* ou chás, para o controle da PA, sendo que diversos estudos correlacionam esta atividade anti-hipertensiva ao teor de fenólicos totais, ou mais especificamente, ao teor de flavonoides, presentes nessas plantas. O presente projeto buscou desenvolver processos para produção de extratos fenólicos de resíduos industriais de uvas tintas e de pele de amendoim; assim como avaliar o potencial dos extratos para inibição da atividade da ECA, como mecanismo de redução potencial da pressão arterial. Foram preparados seis extratos para cada amostra de resíduo, sendo três formas de extração (aquoso, etanólico com tempo de reação de 1 hora e etanólico em 5 horas), com um extrato controle e um submetido à biotransformação enzimática para cada método. Para caracterização foram utilizados os métodos de Folin-Ciocalteu, Dowd e pH diferencial, para teores de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas monoméricas, respectivamente. Para a capacidade antioxidante foram utilizados os métodos DPPH, ORAC e FRAP. Para o potencial anti-hipertensivo foi utilizado o método para determinar a capacidade de inibição da ECA. Os valores de fenólicos totais nos extratos do bagaço de uva tinta variaram entre 17,6 e 54,1 mg GAE/g, enquanto que nos extratos da pele de amendoim os valores ficaram entre 81,1 e 234,6 mg GAE/g. Os melhores resultados foram encontrados para a extração alcoólica. Os extratos etanólicos em 5 horas (UTe5, UEe5, PAe5 e PEe5) foram escolhidos para os demais testes. Os valores para a capacidade antioxidante pelo método ORAC variaram entre $607 \pm 21,2$ e $1844 \pm 78,4$ mg TE/g, com maiores valores para os

extratos de amendoim. A inibição da ECA foi de 16,45% e 37,86% para os extratos de uva (100 µg/mL) e de 47,52% e 39,95% para os extratos de amendoim (50 µg/mL). A extração enzimática apresentou redução no teor de fenólicos totais e potencial antioxidante nos extratos da pele de amendoim e não apresentou alteração nesses valores nos extratos de uva tinta. Enquanto que, para o potencial de inibição da ECA, o extrato biotransformado de uva tinta apresentou valor duas vezes superior que o respectivo controle. Os resultados indicam a viabilidade de utilização desses resíduos para obtenção de compostos bioativos com capacidade antioxidante e potencial anti-hipertensivo.

Palavras-chave: Bagaço de uva tinta; pele de amendoim; compostos fenólicos; biotransformação enzimática; Enzima Conversora de Angiotensina I; hipertensão.

ABSTRACT

High Blood Pressure (HBP) reaches more than one billion people around the world, and it's taken as a high risk factor for cardiovascular diseases. Between the mechanisms for blood pressure (BP) regulation Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) stands up due to its action for BP elevating through blood vessel constriction and sodium reabsorption, which makes it as the main target for drug treatment, mainly by Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) activity inhibition. Having captopril as the first developed drug for this action mechanism, ACE inhibitors prevent the conversion of angiotensin I to angiotensin II, and stop reactions cascade which would lead to a blood pressure elevation. Beyond traditional treatments, it's possible to find, in the popular medicine, recommendation for different plants consumption in order to control BP. Many studies make correlation between this anti-hypertensive activity to total phenolic content, mainly flavonoids, found in those plants. This project searched to develop processes for phenolic extracts production from industrial byproducts of red grapes and peanut skin, as well as to evaluate their potential for ACE activity inhibition, as a mechanism to potential reduction of BP. It was prepared six extracts for each sample, being three extraction methods (water, ethanoic in 1h incubation time, and ethanoic in 5h incubation time), with one control extract and one enzymatic processed extract for each method. For characterization were used Folin-Ciocalteu, Dowd, and differential pH methods, for total phenolic, total flavonoid, and monomeric anthocyanins contents, respectively. For antioxidant capacity were used DPPH, ORAC, and FRAP methods. For anti-hypertensive potential was used capacity ACE inhibition determination method. Total phenolic content fluctuated between 17.6 and 54.1 mg GAE/g for the red grape extracts, and between 81.1 and 234.6 mg GAE/g for the peanut skin extracts. Better results were found for alcoholic extraction. Ethanoic extracts in 5h incubation time were chosen to continue the tests. Values found for antioxidant capacity by ORAC method were between 607 ± 21.2 and 1844 ± 78.4 mg TE/g, with bigger values for peanut skins extracts. Values for ACE inhibition were 16.45% and 37.86% for red grape extracts (100 μ g/mL), and 47.52% and 39.95% for peanut skin extracts (50 μ g/mL). Enzymatic treatment presented a reduction of total phenolic content and antioxidant capacity on peanut skin extracts, and didn't show alteration for these parameters on red grape extracts. In other hand, bioprocessed red grape extract showed double

capacity for ACE inhibition, compared to its control. Found results indicate it's viable to use these byproducts for obtaining bioactive compounds with antioxidant capacity and anti-hypertensive potential.

Key-words: Red grape pomace; peanut skin; phenolic compounds; enzymatic biotransformation; Angiotensin I Converting Enzyme; hypertension.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 HIPERTENSÃO	14
2.2 MECANISMOS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA) .	16
2.3 TRATAMENTOS	18
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E SEU POTENCIAL DE AÇÃO NO SRAA.....	20
2.5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS	26
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES	35
4.2 REAGENTES.....	35
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	36
4.3.1 <i>Resíduos da uva</i>	36
4.3.2 <i>Pele de amendoim</i>	36
4.3.3 <i>Obtenção dos extratos</i>	36
4.4 ENZIMAS.....	38
4.4.1 <i>Atividade de celulase</i>	38
4.4.2 <i>Atividade de pectinase</i>	40
4.4.3 <i>Atividade de β-glicosidase</i>	41
4.4.4 <i>Teor de proteínas solúveis totais nos extratos enzimáticos</i>	42
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	43
4.5.1 <i>Determinação de fenólicos totais</i>	43
4.5.2 <i>Determinação de flavonoides totais</i>	43
4.5.3 <i>Determinação de antocianinas monoméricas</i>	44
4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	45
4.6.1 <i>Capacidade de sequestro do radical DPPH</i>	45
4.6.2 <i>Capacidade de absorção de radicais de oxigênio</i>	46
4.6.3 <i>Poder antioxidante de redução férrica</i>	47
4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PARA INIBIÇÃO DA ECA.....	47
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 ATIVIDADE DAS ENZIMAS E RENDIMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS	49
5.2 TEOR DE FENÓLICOS NOS EXTRATOS.....	50
5.2.1 <i>Teor de flavonoides e antocianinas monoméricas</i>	53
5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	54
5.4 POTENCIAL PARA INIBIÇÃO DA ECA.....	58
6 CONCLUSÃO	60
7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a hipertensão é uma doença caracterizada pela pressão arterial (PA) elevada a valores iguais ou superiores a 140mmHg para a pressão sistólica ou 90mmHg para diastólica (140/90mmHg), valores que foram estabelecidos com base em vários estudos epidemiológicos (OGEDEGBE; PICKERING, 2011; WHO, 2015). Em 2015, cerca de 22% da população mundial era afetada pela pressão arterial elevada, e no Brasil, esse número estava em aproximadamente 23%. A taxa populacional afetada pela doença tem reduzido (em 1975, 28% da população mundial era hipertensa), todavia, estima-se que mais de um bilhão de pessoas ainda sofram da doença mundialmente (WHO, 2015).

A hipertensão arterial acarreta em maior esforço cardíaco para distribuição do sangue, sendo fator de risco para ocorrência de diversas doenças cardiovasculares, dentre elas o infarto e acidentes vasculares cerebrais; além de afetar outros órgãos como olhos e rins. Esses fatores de risco colocam a hipertensão como um dos grandes problemas atuais em saúde pública, sendo estimado, no último relatório publicado, que cerca de nove milhões de mortes ocorram anualmente por complicações da doença (OGEDEGBE; PICKERING, 2011; WHO, 2013).

Fatores comportamentais como uma dieta equilibrada e a prática de exercício físico, entre outros, são importantes para o controle da doença. Porém, na maioria das vezes, é necessária a intervenção medicamentosa. Conforme Ogedegbe e Pickering (2011), o tratamento adequado da doença pode reduzir significativamente suas complicações.

Dentre os diversos mecanismos de controle da pressão arterial em casos de hipotensão, o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) se destaca como um dos mais importantes, pois atua principalmente na liberação de vasoconstritores e reabsorção de sódio e água, provocando aumento na pressão sanguínea. Por esse motivo, esse sistema é o principal alvo para tratamento medicamentoso da hipertensão arterial, com medicamentos que atuam na inibição de enzimas e receptores essenciais na cascata de atividades do sistema, dentre eles, a inibição da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA). O primeiro medicamento desenvolvido para essa finalidade foi o captopril, um potente inibidor

da ECA, que interrompe a cascata de reações desse sistema (SANTOS; FERREIRA; PINHEIRO, 2006; VICTOR; KAPLAN, 2010).

Além do tratamento medicamentoso, é possível encontrar na medicina popular a recomendação para utilização de diversas plantas com a finalidade de controle da pressão sanguínea (CARIBE; CAMPOS, 1997; DUKE, 1987; WHO, 1999).

Estudos publicados nos últimos anos têm investigado a correlação entre a ação anti-hipertensiva de diversas plantas, a presença de compostos fenólicos nessas e seu potencial para modulação do SRAA. A principal ação correlacionada é pela inibição da ECA, tendo apresentado correlação positiva entre o teor de fenólicos, dentre eles os flavonoides, e o potencial para inibição da enzima (HUNG; LING; CHANG; HSU *et al.*, 2017). Estudo publicado por Irondi *et al.* (2016) sugere que, para os flavonoides, essa atividade pode ser atribuída a partes específicas de suas estruturas.

Anualmente são geradas toneladas de resíduos agroindustriais oriundos do processamento de alimentos, o que configura um problema às indústrias quanto ao tratamento e descarte adequados desses, considerando seu impacto ambiental (AKYOL; RICIPUTI; CAPANOGLU; CABONI *et al.*, 2016; DOSHI; ADSULE; BANERJEE; OULKAR, 2015). Por outro lado, há um crescente interesse na utilização de compostos naturais como ingredientes funcionais em alimentos com o intuito de melhorar o perfil tecnológico ou nutricional desses. Isso levou ao desenvolvimento de diversos estudos que buscaram identificar e avaliar a viabilidade da utilização de diferentes resíduos agroindustriais para extração de compostos de interesse nutricional ou tecnológico. A utilização desses resíduos para obtenção de compostos com potencial como aditivos e ingredientes em alimentos se apresenta como uma opção para reduzir o impacto ambiental dessa atividade, agregando ainda valor a esses resíduos e aumentando o lucro da atividade industrial (AKYOL; RICIPUTI; CAPANOGLU; CABONI *et al.*, 2016; AMBIGAIPALAN; DE CAMARGO; SHAHIDI, 2016; CAMARGO; REGITANO-D'ARCE; BIASOTO; SHAHIDI, 2014; DOSHI; ADSULE; BANERJEE; OULKAR, 2015; TANG; HE; SUN; LI *et al.*, 2019; VALDEZ-MORALES; ESPINOSA-ALONSO; ESPINOZA-TORRES; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2014).

Este trabalho teve por objetivo estudar diferentes métodos para obtenção de extratos do bagaço de uva tinta e da pele de amendoim, oriundos da atividade

industrial, sua capacidade antioxidante e o seu potencial para inibição da atividade da ECA em estudo *in vitro*. A escolha dos resíduos considerou as características de extratos obtidos desses resíduos, bem como o aumento no teor de fenólicos totais em extratos desse tipo após a biotransformação enzimática, conforme publicado por Ávila *et al.* (2018) e Martins *et al.* (2017; 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hipertensão

O sangue é distribuído pelo coração ao restante do corpo através dos vasos sanguíneos e a pressão exercida pelo sangue nas paredes desses vasos a cada batida do coração é denominada pressão sanguínea. Essa pressão é mensurada em milímetros de mercúrio (mmHg) e é expressa em dois valores: o maior valor representa a pressão arterial sistólica (quando há contração do músculo cardíaco) e o menor a pressão arterial diastólica (relaxamento do músculo). Para adultos os valores de pressão arterial considerados normais são de 120 mmHg para a pressão sistólica e 80 mmHg para a pressão diastólica (WHO, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS - World Health Organization, WHO, em inglês) indica que o quadro de hipertensão é caracterizado pela pressão arterial sistólica igual ou superior a 140 mmHg, ou diastólica igual ou superior a 90 mmHg (140/90 mmHg), sendo este o valor para os quais foram estabelecidos, por meio de estudos clínicos controlados, os benefícios dos tratamentos farmacológicos (VICTOR; KAPLAN, 2010; WHO, 2015). Já a American Heart Association (AHA) apresenta uma proposta de classificação da pressão arterial em cinco níveis, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação da pressão sanguínea conforme a American Heart Association.

Categoria	Pressão sistólica (mmHg)	e/ou	Pressão diastólica (mmHg)
Normal	<120	e	<80
Elevada	120 – 129	e	<80
Hipertensão estágio 1	130 – 139	ou	80 - 89
Hipertensão estágio 2	>140	ou	>90
Crise hipertensiva	>180	e/ou	>120

Fonte: (AHA, 2021)

Assim, o quadro de hipertensão na definição da OMS, já é considerado hipertensão de estágio 2 pela AHA. A base para definição dos parâmetros de caracterização da hipertensão é estabelecida em vários estudos epidemiológicos, que apresentaram que a distribuição da pressão arterial é contínua, embora haja desvios nas curvas padrão. Assim, a hipertensão é uma doença mais quantitativa que qualitativa e pode ser classificada de diferentes formas, tendo dois indicadores

principais: a severidade (quão acima do valor estabelecido de PA) e a causa principal (primária ou secundária). Dessa forma, para pacientes com a manifestação da doença sem a possibilidade de identificação de causa única e reversibilidade da elevação de PA, utiliza-se o termo “hipertensão primária”, isso representa entre 90-95% dos casos diagnosticados. Já para os casos onde é possível melhor identificação de um provável mecanismo (entre 5-10% dos casos), denomina-se “hipertensão secundária ou identificável”, tendo estudos que indiquem como principais causas as doenças renais crônicas e apneia do sono (OGEDGE; PICKERING, 2011; VICTOR; KAPLAN, 2010).

Fatores comportamentais e socioeconômicos, tais como: condição nutricional, qualidade de vida, consumo de tabaco e álcool, obesidade, falta de atividade física, entre outros, têm importante contribuição na elevação do risco de manifestação da doença. Todavia, fatores como idade, sexo, etnia e genéticos também devem ser considerados. Dados da OMS demonstram que a incidência é maior em homens que em mulheres; e já houve identificação de 14 genes causadores de formas hereditárias da doença, embora o fator genético corresponda a uma pequena fração das ocorrências dessa (KRIEGER; PEREIRA, 2006; VICTOR; KAPLAN, 2010; WHO, 2015).

Conforme dados da OMS, a pressão arterial elevada afetava, em 2015, aproximadamente 22% da população mundial, sendo a maior incidência encontrada em países de baixa renda, chegando a 33% no Níger, contra 11% na Coreia do Sul. No Brasil, a incidência da doença reduziu de aproximadamente 34% para 23% da população entre 1975 e 2015, uma redução de 11%, contra uma redução de aproximadamente 6% mundialmente e 12% nas Américas. É possível notar que a taxa populacional afetada pela doença tem reduzido ao longo dos anos, todavia, estima-se que mais de um bilhão de pessoas ainda sofram da doença mundialmente (WHO, 2015).

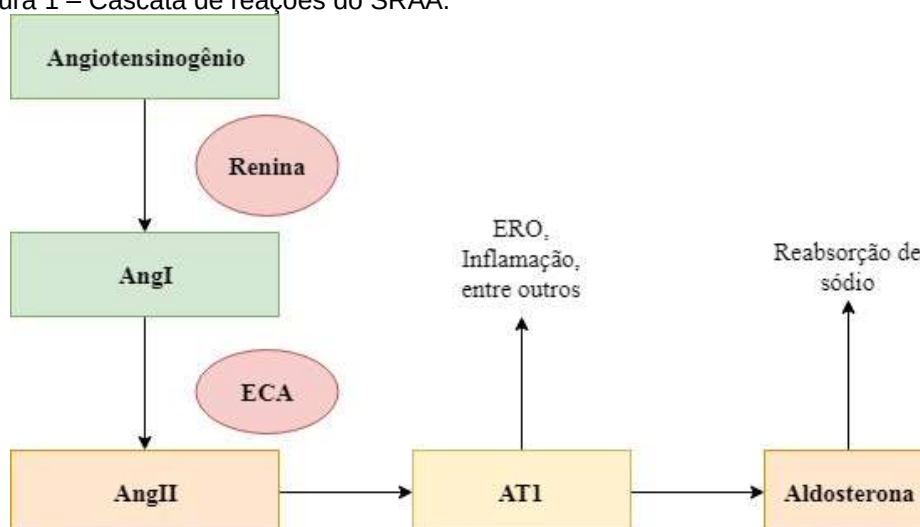
A hipertensão é um dos grandes problemas de saúde pública, uma vez que, quanto maior a pressão sanguínea apresentada, maior o esforço cardíaco para a distribuição do sangue, assim, a pressão arterial descontrolada é um fator de risco para a ocorrência de diversas doenças cardiovasculares, tais como: ataque ou parada cardíacos e derrame cerebral, além de doenças em outros órgãos, como olhos e rins, podendo causar cegueira e doenças renais crônicas. Mundialmente, são estimadas aproximadamente nove milhões de mortes anuais por complicações

provocadas pela ocorrência da hipertensão, cabendo ressaltar que a doença representa ao menos 51% das mortes devidas ao derrame cerebral e 41% das devidas a doenças cardíacas (OGEDEGBE; PICKERING, 2011; WHO, 2013).

2.2 Mecanismos do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

Conforme Santos *et al.* (2006), o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é um dos mais importantes mecanismos para regulação das funções cardiovasculares e renais, sendo ativado principalmente em episódios de hipovolemia e hipotensão. Durante esses episódios, o sistema é ativado e promove a reabsorção de sódio e água pelos rins, além da liberação de vaso constritor (Angiotensina II), elevando a pressão arterial a níveis normais. A desregulação do SRAA por fatores genéticos ou ambientais pode levar a uma elevação contínua e desregulada da pressão arterial (VICTOR; KAPLAN, 2010). Os principais componentes do sistema são: renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina-I (ECA), angiotensinas (principalmente I e II), os receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) e 2 (AT2) e a aldosterona. Uma esquematização do SRAA é apresentada na Figura 1.

Figura 1 – Cascata de reações do SRAA.



A ação da renina promove a liberação da angiotensina I do angiotensinogênio. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina I. A resposta biológica se dá pela interação da angiotensina II com seus receptores, promovendo vasoconstrição e secreção de aldosterona, que atuará nos rins para reabsorção de sódio e água, culminando na elevação da pressão arterial. AngI e AngII: angiotensina I e II. ECA: enzima conversora de angiotensina I. AT1: receptor de angiotensina II tipo 1. ERO: Espécie reativa de oxigênio. Adaptada de Victor e Kaplan (2010).

O angiotensinogênio é uma α -2-globulina plasmática de aproximadamente 57 kDa que tem em sua porção N-terminal os peptídeos angiotensinérgicos e é secretada, principalmente, pelo fígado. A renina é uma aspartil-protease codificada de forma inativa como pró-renina com 401 aminoácidos (aas) e produzida nos rins. Depois de ativada, é responsável pela clivagem do angiotensinogênio para formação da angiotensina I (AngI), que é um decapeptídeo sem atividade biológica. A AngI será convertida em angiotensina II (AngII), um octapeptídeo responsável por desencadear as respostas biológicas do SRAA. Essa conversão de AngI em AngII é feita pela Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA), que pode ocorrer em dois tipos, a depender do promotor da síntese. A ECA testicular, com 732 aas e apenas o C-domínio, é encontrada apenas nos testículos, e a ECA somática, com 1306 aas e dois domínios, é amplamente distribuída pelo corpo. Os domínios da ECA contêm um centro ativo no qual há um átomo de zinco ligado a dois resíduos de histidina e um de glutamato, atuando como cofator. A nomenclatura N-domínio e C-domínio é utilizada para identificar a posição destes na cadeia, a depender de sua proximidade da porção N ou C-terminal (SANTOS; FERREIRA; PINHEIRO, 2006; SCHMIDT, 2011; VICTOR; KAPLAN, 2010).

O estímulo para a sinalização química que desencadeará as ações de AngII no organismo dependerá de sua interação com os respectivos receptores; dentre esses, o principal é o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), acoplado à proteína G. Essa interação ativará diversos processos celulares que colaboram para a ocorrência da hipertensão e aceleram as lesões em órgãos alvos por essa doença, incluindo inflamação vascular, vasoconstrição, remodelamento vascular e cardíaco, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produção de aldosterona. A aldosterona, por sua vez, aumenta a reabsorção de sódio e água, contribuindo para o aumento da pressão arterial. Assim, é principalmente pela interação entre AngII e AT1 que o SRAA influencia o controle da PA, mas deve ser levado em consideração também a ação da ECA na degradação da bradicinina, um potente vasodilatador (SANTOS; FERREIRA; PINHEIRO, 2006; SCHMIDT, 2011; VICTOR; KAPLAN, 2010).

Outro mecanismo para elevação de pressão arterial é o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade do corpo em neutralizá-las. O estresse oxidativo pode provocar inflamação vascular, a oxidação de vasodilatadores e o aumento na liberação de

ECA, podendo ser correlacionado com a hipertensão arterial e a arteriosclerose (AHMAD; YUAN YUAN; NAWAZ; ZE *et al.*, 2017; SINHA; DABLA, 2015; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015)

2.3 Tratamentos

Ogedegbe e Pickering (2011) afirmaram que o tratamento adequado da hipertensão pode reduzir entre 35-40% a taxa de ocorrência de derrames e entre 20-25% a taxa de doenças coronarianas. Estimam ainda que, em um período de 10 anos, a redução da PA em 12 mmHg por meio de medicamentos anti-hipertensivos em pacientes no primeiro estágio da doença (PA entre 140/90 e 159/99 mmHg) irá prevenir uma morte a cada 11 pacientes, demonstrando a importância do diagnóstico precoce e tratamento da doença.

Além das mudanças comportamentais, como uma dieta equilibrada, baixa ingestão de sal, não fumar, baixo consumo de álcool e prática de atividades físicas, na maioria das vezes é necessária a intervenção medicamentosa para controlar a hipertensão. Esses medicamentos atuam de diferentes formas no organismo, como por exemplo, promovendo a redução de sal e fluídos no corpo, redução dos batimentos cardíacos ou o relaxamento e dilatação dos vasos sanguíneos. Devido à sua importância no controle da pressão arterial, os principais medicamentos anti-hipertensivos envolvem a inibição de atividades do SRAA, podendo ter como mecanismos o bloqueio da liberação da renina ou a inibição de sua atividade (impedindo a formação da angiotensina I), inibição da ECA ou bloqueio do principal receptor de angiotensina II (AT1), sendo que os dois últimos mecanismos são os mais utilizados clinicamente (VICTOR; KAPLAN, 2010; WHO, 2013).

Conforme Victor e Kaplan (2010), o primeiro inibidor de ECA sintetizado foi o captopril. Esse tipo de medicamento atua impedindo a conversão de AngI em AngII pela ECA, interrompendo a sequência do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (uma vez que AngI é um peptídeo biologicamente inativo), inibindo a ação endógena de AngII como vasoconstritor e sinalizador para a síntese e liberação da aldosterona. Cabe ainda destacar que a inibição de ECA reduz a degradação da bradicinina, dessa forma, esse tipo de inibidor atua na redução da liberação de um hormônio vasoconstritor ao mesmo tempo em que proporciona a manutenção do nível circulante de um vasodilatador. Os autores ainda destacaram

que esses medicamentos apresentam vantagens especiais a pacientes com insuficiência cardíaca, isquemia coronariana e nefropatia, uma vez que possuem pouco efeito sobre a frequência e o débito cardíacos ou sobre o volume extracelular.

Os bloqueadores dos receptores AT1 atuam como antagonistas da AngII nesses receptores, interrompendo também a sequência do SRAA. Esses medicamentos atuam de forma mais completa no bloqueio do mecanismo, uma vez que a concentração de AngII circulante é maior, o que reduz sua produção e inibe também a ação da AngII produzida por mecanismos independentes da ECA. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois tipos de medicamentos, embora os bloqueadores de AT1 não apresentem os efeitos colaterais dos inibidores de ECA, sendo usualmente prescritos a pacientes intolerantes a esses (VICTOR; KAPLAN, 2010).

Além dos medicamentos tradicionais, é comum, na medicina popular, a utilização de plantas no controle de diversas doenças, incluindo a hipertensão. As plantas representaram a única fonte de compostos de ação farmacológica durante séculos, sendo a origem da descoberta de diversos medicamentos e, mesmo na farmacologia moderna, representam a origem de cerca de 25% dos agentes terapêuticos prescritos nos países desenvolvidos e mais de 40% das novas drogas desenvolvidas têm envolvimento de produtos naturais. Ainda nos tempos modernos, é grande a utilização de chás e extratos padronizados de plantas consideradas medicinais, incluindo alimentos, um mercado que movimenta milhões de dólares ao ano (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Em livros como o *CRC Handbook of Medicinal Herbs*, dentre outros da área de medicina popular e plantas medicinais, podem ser encontradas recomendações para utilização de ervas e alimentos no controle da pressão arterial. Caribé e Campos (1997) sugerem o consumo de 3 a 4 dentes de alho (*Allium sativum*) por dia; ou uma xícara de suco de espinafre (*Spinacea oleracea*) ou um copo de suco de pera (*Pyrus communis*) três vezes ao dia; ou ainda chá por decocção de folhas verde da oliveira (*Olea europea*) ou pitangueira (*Stenocalyx pitanga*) duas a quatro vezes ao dia. WHO (1999) afirma haver dados clínicos da efetividade na utilização do alho ou seu extrato, bem como de pó da raiz de rauwolfia (*Rauwolfia serpentina*, planta indiana), no tratamento da hipertensão média; traz também a indicação, na medicina popular, ainda que sem dados clínicos, da

utilização da raiz da Flor-de-balão (*Platycodon grandiflorum*, planta chinesa) ou seu extrato, no tratamento da doença.

Duke (1987) apresentou a utilização de diversas ervas para o tratamento dos mais variados tipos de doença na medicina popular, dentre elas, a utilização de Milefólio (*Achillea millefolium*), Salsão (*Apium graveolens*), Estragão (*Artemisia dracunculus*), Espinheiro-alvar (*Crataegus oxyacantha*), Arruda (*Ruta graveolens*), Pervinca (*Vinca Minor*), Visco (*Viscum album*), entre outras plantas, no controle da pressão arterial; embora o autor tenha atribuído a atividade hipotensora dessas plantas principalmente aos alcaloides nelas presentes, há destaque também aos flavonoides, especialmente à rutina.

A revisão realizada por Ajebli e Eddouks (2020) avaliou estudos com ensaios *in vivo*, *in vitro* e clínicos publicados entre 2008 e 2018 que buscavam identificar a capacidade anti-hipertensiva de extratos derivados de plantas medicinais. Os autores destacaram que diferentes extratos ou moléculas isoladas de 46 plantas apresentaram potencial anti-hipertensivo; dentre esses, as famílias *Asteraceae*, *Apiaceae* e *Rosaceae* estão entre as mais estudadas no período em análise, enquanto algumas espécies como alho, salsão, ginseng e cominho preto estão entre as mais utilizadas para obtenção de derivados com o intuito de utilização para essa finalidade.

De fato, diversos trabalhos publicados nos últimos anos estudaram a possibilidade de atividade anti-hipertensiva de polifenóis, obtidos de diferentes plantas, através de ação no sistema renina-angiotensina-aldosterona, com apresentação de resultados positivos, porém, ainda não temos o uso comercial sistematizado e acessível de nenhum desses produtos pela população em geral, provavelmente por se tratarem de fontes exóticas, com baixa disponibilidade e baixo potencial de exploração comercial.

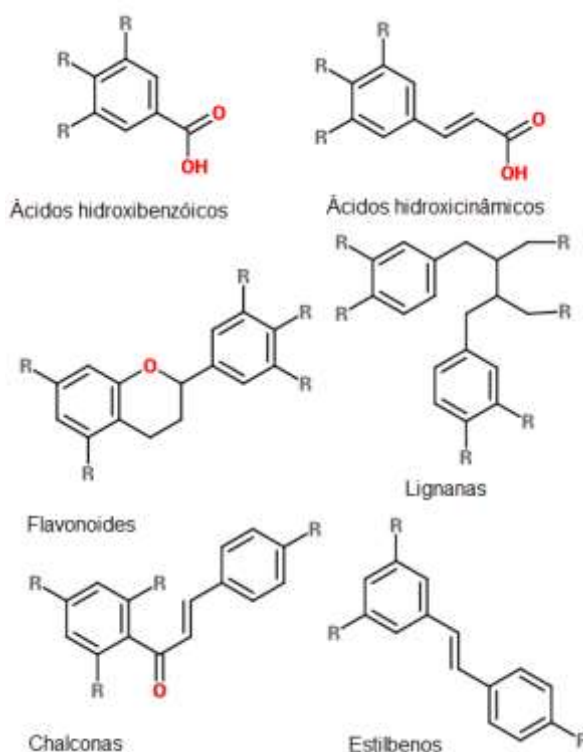
2.4 Compostos fenólicos e seu potencial de ação no SRAA

Compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo das plantas, cuja presença foi constatada em diversos tipos de alimentos, e são quimicamente caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos, contendo um ou mais grupo hidroxila ligado a esse. Esses compostos são classificados conforme a quantidade e posição de anéis aromáticos e hidroxilas que

compõem sua estrutura, bem como o tipo de ligação entre esses anéis (Figura 2). Presentes principalmente na forma glicosilada (ligados à glicose ou ramnose) e em diferentes concentrações, dependendo do tipo, clima de cultivo e grau de maturação, esses compostos têm grande influência na cor e no sabor dos alimentos. São amplamente conhecidos, principalmente, por seu potencial antioxidante, atividade que depende da quantidade e posição de suas hidroxilas e do pH do meio (ANDRÉS-LACUEVA; MEDINA-RAMON; LLORACH; URPI-SARDA *et al.*, 2010; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Dentre a grande classe dos polifenóis, se destacam os flavonoides, por estarem amplamente presentes em alimentos de origem vegetal, uma vez que podem ser sintetizados por quase todos os tecidos de plantas, com ocorrência natural de ao menos duas mil moléculas dessa classe, sendo considerados componentes importantes na dieta humana. São classificados em seis diferentes subgrupos, conforme suas características químicas: flavanona, flavona, flavanol (flavan-3-ol), flavonol, antocianina e isoflavona (Figura 3) (ANDRÉS-LACUEVA; MEDINA-RAMON; LLORACH; URPI-SARDA *et al.*, 2010; HO; RAFI; GHAI, 2010).

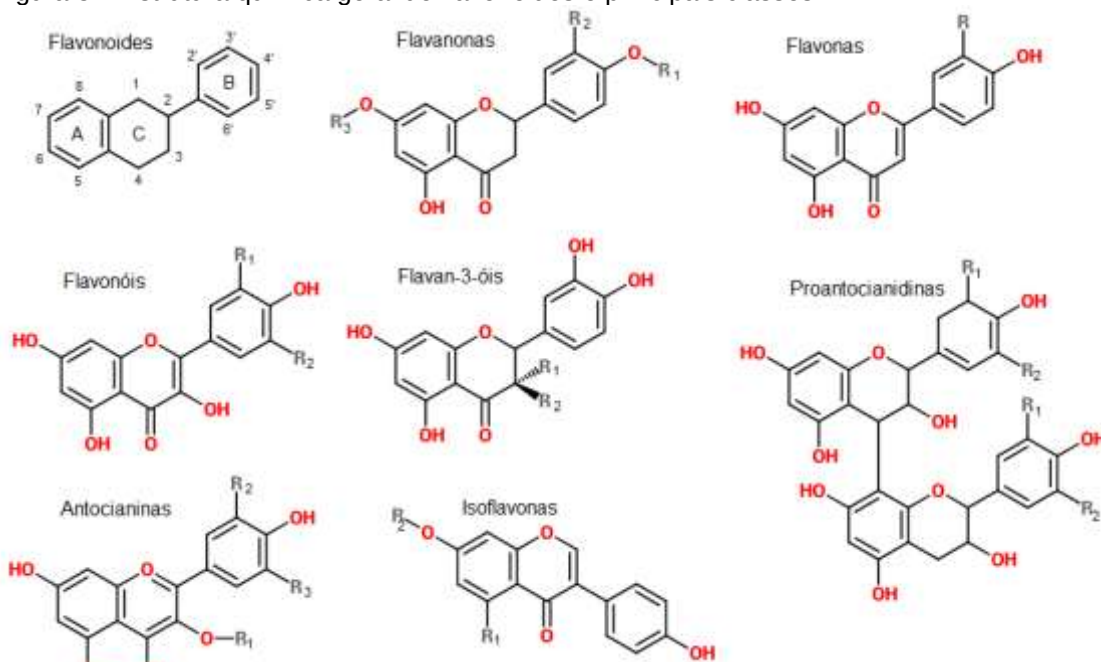
Figura 2 – Classificação dos compostos fenólicos conforme a estrutura química.



Adaptado de Belitz *et al.* (2009).

Diversos estudos avaliaram e indicaram potenciais benefícios do consumo desses compostos à saúde humana, tais como ação anticarcinogênica, antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, entre outras. A Tabela 2 apresenta alguns flavonoides, suas principais fontes alimentares e seus potenciais benefícios à saúde.

Figura 3 – Estrutura química geral de flavonoides e principais classes.



Adaptado de Andrés-Lacueva *et al.* (2010).

Tabela 2 – Citações das principais fontes alimentares e benefícios à saúde atribuídos aos flavonoides.

Flavonoides (subgrupo)	Fonte alimentar	Potenciais benefícios à saúde
Catequinas (Flavanol): Epigallocatequina-3-galato Epigallocatequina Epicatequina-3-galato Epicatequina	Chá-da-índia (<i>Camellia sinensis</i>) e cacau	Anticarcinogênico
Quercetina (Flavanol)	Uva, chás, cebola, maçã, vegetais folhosos e alcaparra.	Antioxidante, anti-inflamatório, proteção vascular/ doenças cardiovasculares e redução das lipoproteínas de baixa densidade (LDL).
Genisteína (Isoflavona)	Principalmente soja e em menores concentrações em feijões e favas	Ação antiestrogênica com potencial anticarcinogênico
Proantocianidinas	Canela, sorgo, nozes, feijões, cacaos e vinho.	Cardioproteção

(ANDRÉS-LACUEVA; MEDINA-RAMON; LLORACH; URPI-SARDA *et al.*, 2010; HO; RAFI; GHAI, 2010)

O potencial que alguns flavonoides apresentam para inibição de determinadas enzimas despertou o interesse no estudo de seu potencial de ação na regulação da pressão arterial, principalmente por modulação do SRAA através da inibição de ECA, um efeito similar aos medicamentos comercializados para controle da doença. Esse interesse é motivado principalmente pela concentração desses compostos em chás popularmente utilizados para essa finalidade.

Trabalhos publicados nos últimos anos tiveram por objetivo avaliar ervas e alimentos que, popularmente, são utilizados para controle da pressão arterial, buscando elucidar a forma de ação desses no organismo, partindo da hipótese de que teriam ação sobre o SRAA, principalmente na inibição da ECA. Para tanto, em sua maioria, as pesquisas avaliaram o potencial de inibição da enzima e a composição dos extratos dessas plantas, em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, a maioria dos trabalhos avaliou o potencial de inibição da enzima por meio do valor de concentração no qual ocorre 50% de inibição da atividade enzimática (IC₅₀), obtido através da equação da curva de inibição dose-dependente. Nos estudos *in vivo*, foi avaliada a capacidade desses extratos em reduzir a pressão arterial em ratos, sob condições controladas.

Estudo realizado por Sharifi *et al.* (2013) avaliou o potencial de inibição da ECA por extratos metanólicos de 50 plantas medicinais iranianas tradicionalmente utilizadas no tratamento da hipertensão, com intuito de identificação de plantas com potencial para serem utilizadas como fonte para isolamento de inibidores da enzima. Dentre estes, seis extratos apresentaram potencial de inibição acima de 50% na concentração de 330 µg/mL, com destaque para o extrato de *Quercus infectoria* (93,9%), *Barberis integerrima* (88,2%) e *Onopordum acanthium* (80,2%).

Estudo *in vivo* realizado por Mugabo e Raji (2013), observou que o extrato aquoso da *Asystasia gangetica* (Coromandel) apresentou efeito sobre a pressão sanguínea (PA) e a frequência cardíaca (FC) em ratos espontaneamente hipertensivos (SHR), inclusive reduzindo o efeito da administração venosa de AngI e AngII junto com o extrato. Conforme Agunloye e Oboh (2018), o processo de extração também têm grande influência no teor de fenólicos e flavonoides no extrato, bem como sobre sua atividade para inibição da ECA. Neste estudo, encontraram que, dentre os métodos testados, o processo de extração aquosa por imersão apresentou maior teor desses compostos e maior atividade inibitória.

Sultana *et al.* (2020) avaliaram a atividade de extratos aquosos de 9 vegetais de Bangladesh contra cinco diferentes enzimas (lipase pancreática, α -glicosidase, α -amilase, renina e ECA). Os melhores resultados para inibição *in vitro* da ECA variaram entre 76% para a abóbora d'água e 66% para o quiabo de metro, para concentração do extrato em 1 mg/mL. Dentre os 9 extratos testados, os de berinjela e espinafre indiano apresentaram maior potencial inibitório, considerando a atividade sobre as 5 enzimas do estudo.

Observando-se os resultados obtidos em diversos estudos, é possível inferir que a concentração de fenólicos, em especial flavonoides, nos extratos deva ser determinante na ação inibitória desses sobre a ECA. Estudo publicado por Hung *et al.* (2017) correlacionou o potencial para inibição da ECA, apresentado por extrato alcoólico da *Siegesbeckia orientalis* (erva-de-são-mocambola), e a concentração total de fenólicos e de flavonoides, obtendo valores de 0,983 e 0,926, respectivamente, demonstrando forte correlação entre o teor dessas classes de compostos e a capacidade para inibição da enzima.

Ramos *et al.* (2019) estudaram a composição fenólica em extratos da casca de diferentes espécies salgueiro (*Salix spp*) e sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antibacteriana. Os resultados obtidos apontaram uma maior atividade antioxidante e de inibição da ECA nos extratos com maior concentração de fenólicos totais, com destaque para a espécie *Salix atrocinereum Brot.*, que apresentou inibição de 84% para ECA na concentração de 0,615 mg/mL.

Irondi *et al.* (2016) avaliaram o extrato metanólico de folhas da goiabeira e seu potencial na inibição das enzimas envolvidas na prevalência de gota e hipertensão (xantina oxidase e ECA), bem como a concentração de flavonoides e ácidos fenólicos nesse. O valor de IC₅₀ encontrado para ECA (21,06 μ g/mL) foi atribuído, principalmente, à afinidade de ligação da quercetina (presente na ordem de 5,11 mg/g) à enzima, com energia de ligação de -8,5 kcal/mol, destacando ainda que parte da estrutura dos flavonoides, como o grupo catecol no anel B ou cetona na posição C4, podem ser responsáveis por essa inibição.

Shafaei *et al.* (2016) comparam o potencial de diferentes extratos de Chá de Java para inibição da enzima, analisando a concentração de quatro diferentes fenólicos (ácido rosmarínico, simensetina, eupatorina e 3'-hidroxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona) e simulando em software a interação molecular desses com o sítio ativo da enzima. O extrato com maior potencial de inibição (alcoólico, IC₅₀= 45,8

µg/mL) apresentou maior concentração dos fenólicos analisados, dentre esses, em simulação, o ácido rosmarínico e a eupatorina apresentaram maior afinidade pelo sítio ativo da enzima, com energias de ligação de -17 e -29kJ/mol, respectivamente.

Além dos extratos de plantas medicinais, há também diversos estudos que avaliaram o potencial de inibição da ECA por extratos de alimentos que, popularmente, apresentam atividade anti-hipertensiva. Em avaliação da ação de extratos de diferentes partes de graviola sobre enzimas chaves na ocorrência de hipertensão (ECA) e diabetes mellitus tipo 2 (α -amilase e α -glicosidase), o extrato do pericarpo apresentou maior potencial para inibição de ECA (IC_{50} =0,03 mg/mL) e maior teor de fenólicos totais e de flavonoides (ADEFEGHA; OYELEYE; OBOH, 2015).

Estudos realizados por Oboh e colaboradores estudaram a atividade de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e ECA por extratos de sementes de cacau, de alho e de cebola (branca e roxa). Para ECA, o extrato aquoso de sementes de cacau apresentou inibição dose-dependente, com IC_{50} = 674 µg/mL (OBOH; ADEMOSUN; ADEMILUYI; OMOJOKUN *et al.*, 2014). Enquanto que, para os extratos aquosos de alho e cebolas branca e roxa, foram encontrados valores de IC_{50} = 590, 660 e 960 µg/mL, respectivamente; sendo que o extrato de alho apresentou maior teor de fenólicos totais e de flavonoides (OBOH; ADEMILUYI; AGUNLOYE; ADEMOSUN *et al.*, 2018).

Estudo da atividade hipertensiva de diferentes extratos de maçã estrela (*Chrysophyllum cainito* L.) foi realizado *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, com concentrações fixadas em 50 µg/mL em equivalente de ácido gálico (GAE). Para inibição de ECA *in vitro*, a fração com acetato de etila do extrato alcoólico apresentou menor IC_{50} (34,26 µg GAE/mL), resultado que se confirmou nos ensaios *ex vivo*, por meio da contração (com cloreto de potássio) e relaxamento (com extrato) de pedaços de aorta torácica de ratos, e *in vivo* em ratos Wistar com hipertensão induzida por solução de cloreto de sódio, com reversão da PA aos níveis do grupo controle (normotensos) (MAO; QI; HAO; LIU *et al.*, 2015).

De forma generalizada, o conteúdo de fenólicos totais, especialmente flavonoides, tem uma relação positiva com o potencial dos extratos para inibição da ECA, todavia, alguns estudos indicam que o tipo e estrutura desses fenólicos também são preponderantes.

Estudo que avaliou a ação dos extratos aquosos de diferentes espécies do gênero *Solanum* (dentre eles jiló e jurubeba) sobre enzimas ligadas à hipertensão e diabetes mellitus tipo 2 apontou que somente o conteúdo total de fenólicos não determina o potencial de inibição para ECA. Dentre as espécies estudadas, o extrato de jurubeba (*Solanum torvum*) apresentou maior inibição da ECA (IC_{50} = 106 µg/mL), mesmo não possuindo o maior teor de fenólicos totais e de flavonoides. Por sua vez, a análise da composição desse extrato por cromatografia líquida de alta eficiência ligada a detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD) apresentou maior concentração de fenólicos de interesse, como o ácido gálico, a rutina e a isoquercitrina, demonstrando que, além da quantidade, a qualidade dos fenólicos presentes deve ser considerada (NWANNA; IBUKUN; OBOH; ADEMOSUN *et al.*, 2014).

2.5 Resíduos agroindustriais como fonte de compostos bioativos

Resíduos de frutas e legumes, tais como cascas e sementes, oriundos do processamento de alimentos, como, por exemplo, a produção de sucos, vinhos ou alimentos congelados, são considerados resíduos agroindustriais. Anualmente, são geradas toneladas desses resíduos, configurando um problema às indústrias quanto ao tratamento e descarte adequados para amenizar seu impacto ambiental (AKYOL; RICIPUTI; CAPANOGLU; CABONI *et al.*, 2016; DOSHI; ADSULE; BANERJEE; OULKAR, 2015).

Grande parte desses resíduos é utilizada na composição de ração animal. Por outro lado, considerando o crescente interesse na utilização de compostos naturais como ingredientes funcionais em alimentos com o intuito de aumentar o perfil tecnológico ou nutricional desses, diversos estudos já publicados buscaram identificar e avaliar a viabilidade da utilização de diferentes resíduos para extração de compostos de interesse nutricional ou tecnológico como compostos fenólicos, alcaloides, pectina, entre outros. A utilização dos resíduos agroindustriais para obtenção de compostos de interesse para utilização como aditivos em cosméticos ou na indústria de alimentos se apresenta como uma das melhores opções para reduzir o impacto ambiental dessa atividade, agregando ainda valor a esses resíduos e aumentando o lucro da atividade industrial (AKYOL; RICIPUTI; CAPANOGLU; CABONI *et al.*, 2016; AMBIGAIPALAN; DE CAMARGO; SHAHIDI,

2016; CAMARGO; REGITANO-D'ARCE; BIASOTO; SHAHIDI, 2014; DOSHI; ADSULE; BANERJEE; OULKAR, 2015; TANG; HE; SUN; LI *et al.*, 2019; VALDEZ-MORALES; ESPINOSA-ALONSO; ESPINOZA-TORRES; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2014).

Diferentes processos podem ser utilizados para extração dos compostos de interesse presentes nesses resíduos, dentre eles, há os bioprocessos.

O processo de biotransformação é caracterizado pela ação de células, micro-organismos ou enzimas isoladas que provocam alterações nas estruturas químicas com intuito de influenciar benéficamente a biodisponibilidade e/ou bioatividade de compostos de interesse em plantas (LOPES; DE QUEIRÓS; DE ÁVILA; MONTEIRO *et al.*, 2017).

Dentre os métodos de biotransformação, o tratamento enzimático é de grande interesse, pois pode aumentar a extração de compostos em plantas, rompendo as paredes celulares da matriz e liberando os compostos ligados a ela, bem como aumentar as propriedades biológicas desses, por meio de modificação estrutural, aumentando a absorção ou atividade biológica (RUVIARO; BARBOSA; MACEDO, 2018).

Diferentes enzimas são utilizadas na indústria alimentícia para aumentar o rendimento da produção ou melhorar as propriedades tecnológicas e nutricionais de alimentos. Como exemplo, pode-se citar a utilização de enzimas como a celulase, a pectinase e a β -glicosidase na indústria de bebidas com o intuito de aumentar a produção e qualidade dos produtos (UZUNER; CEKMECELIOGLU; KUDDUS, 2019).

Celulase (EC 3.2.1.4) é um conjunto de enzimas utilizado na catálise da hidrólise de ligações (1-4)- β -glicosídeas na celulose. Essas enzimas podem ser produzidas por bactérias e fungos, principalmente do gênero *Aspergillus*. Na indústria de alimentos é utilizada principalmente na clarificação e maceração para obtenção de sucos e néctares de frutas. Pectinase (EC 3.2.1.15) é uma classe de enzimas que atuam na hidrólise de ligações α -1-4 entre ácidos galacturônicos e podem ter diferentes aplicações, conforme sua especificidade. É utilizada na indústria de alimentos principalmente na produção de sucos (clarificação, maceração e extração) e são obtidas principalmente de bactérias do gênero *Bacillus*. Presentes em todos os tipos de organismos, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que atuam na hidrólise de resíduos β -D-glicosídeos de terminais não redutores, liberando β -D-glicose, convertendo oligossacarídeos em monossacarídeos. Na indústria

vinícola, é utilizada para melhorar o perfil aromático em vinhos (MCDONALD; BOYCE; TIPTON, 2009; UZUNER; CEKMECELIOGLU; KUDDUS, 2019).

O interesse na recuperação dos compostos bioativos presentes em resíduos de plantas oriundos de processamento industrial levou aos estudos da utilização do tratamento enzimático para tal propósito. Esse tratamento é um processo alternativo para promover maior extração e transformação desses compostos em resíduos agroindustriais, apresentando-se ainda como uma ferramenta para reduzir o impacto ambiental e aumentar o valor agregado desses (CHAMORRO; VIVEROS; ALVAREZ; VEGA *et al.*, 2012; RUVIARO; BARBOSA; MACEDO, 2018).

Dentre os compostos bioativos de interesse presentes nesses resíduos, destacam-se os fenólicos. Naturalmente, os polifenóis são apresentados em sua forma glicosilada, éster ou polímeros, o que dificulta sua absorção e metabolismo, assim, suas formas agliconas apresentam maiores benefícios à saúde humana (AVILA; QUEIRÓS; LOPES; BARIN *et al.*, 2018; LOPES; DE QUEIRÓS; DE ÁVILA; MONTEIRO *et al.*, 2017). Dessa forma, diversos estudos têm demonstrado os benefícios da realização de tratamentos enzimáticos para obtenção de extratos fenólicos com maior potencial biológico.

O tratamento enzimático do suco de laranja mostrou-se capaz de alterar o perfil fenólico do produto, principalmente ao apresentar as formas agliconas da naringina e hesperidina, aumentando significativamente seu potencial antioxidante e efeito antiproliferativo sobre determinadas linhagens de células de carcinoma (FERREIRA; MACEDO; RIBEIRO; MACEDO, 2013).

Estudo realizado por Ruviaro *et al.* (2020) investigou a extração e biotransformação de fenólicos do bagaço de laranja oriundo da produção de suco da extração de pectina, assistidas pelas enzimas pectinase, celulase, tanase e β -glicosidase de forma individual ou combinada. Os resultados demonstraram aumento no teor de flavonoides na forma aglicona e variaram conforme a combinação, tipo e concentração das enzimas. Foi observado ainda um aumento da capacidade antioxidante e do potencial para inibição da ECA para os extratos com tratamento enzimático. O melhor resultado foi observado para o extrato obtido do resíduo submetido ao processo de extração da pectina. Os dados obtidos indicam que o processo pode ser aplicado e ajustado para aumentar a obtenção de compostos bioativos desses resíduos, aumentando sua utilização.

Chamorro *et al.* (2012) também avaliaram o efeito do tratamento enzimático (carboidrases com atividades celulítica e pectinolítica e tanase) sobre a atividade antioxidante e solubilização de açúcares em extratos de semente e bagaço de uva. O tratamento com tanase aumentou o teor total de fenólicos (41%), ácido gálico (6x), epicatequina (22%) e procianidina B2 (42%) no extrato da semente, sendo observado o aumento da atividade antioxidante, com um efeito ainda maior quando utilizadas tanase e pectinase combinadas.

Estudo realizado por Ávila *et al.* (2018) observou aumento no potencial estrogênico de extrato hidrossolúvel de soja após o tratamento com tanase, atribuindo esse efeito ao aumento na concentração de isoflanonas na forma aglicona, o que aumentou sua biodisponibilidade. Foi constatada ainda a presença de um metabólito bioativo da daidzeína, o equol (7-hidróxi-3-(4-hidróxifenil)-cromano), apontando a possibilidade de utilização da biotransformação em extrato de soja com intuito de aplicação como um nutracêutico na melhora de sintomas da menopausa.

O efeito do tratamento com as enzimas pectinase, tanase e β -glicosidase no pericarpo de lichia foi estudado por Kessy *et al.* (2018) e apresentou como resultado um aumento de 2,6 vezes no teor total de fenólicos e um aumento de 28% do potencial antioxidante, bem como um aumento de inibição da ECA, em comparação com o extrato controle.

Além do tratamento enzimático, a biotransformação pode ser feita também pelo processo fermentativo. Yeon *et al.* (2019) avaliaram o efeito da fermentação com *Bacillus licheniformis* sobre extrato aquoso de pimenta cheongyang picante. Os resultados apresentaram um aumento no total fenólico, na capacidade antioxidante e no potencial para inibição da ECA para o extrato submetido à fermentação.

Baseado nos dados encontrados na literatura, este estudo se propôs a avaliar a capacidade antioxidante e o potencial para inibição da ECA para extratos do bagaço de uva e da pele de amendoim, bem como as mudanças nessas propriedades quando a extração é assistida pelas enzimas celulase, pectinase e β -glicosidase comerciais. Esse dois resíduos foram escolhidos por sua abundância e disponibilidade, mas também considerando principalmente o fato de se apresentarem como fontes em comum de alguns compostos bioativos de interesse, como os flavonóis e o resveratrol (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016; MA; KERR;

SWANSON; HARGROVE *et al.*, 2014; MONTEALEGRE; PECES; VOZMEDIANO; GASCUEÑA *et al.*, 2006; ROCKENBACH; GONZAGA; RIZELIO; GONÇALVES *et al.*, 2011). A proposta de utilização de enzimas comerciais é possibilitar, em caso de resultados significativos, a aplicação do método de extração em maior escala.

A vinicultura é uma das maiores culturas de frutas no mundo, sendo as uvas consumidas *in natura* ou utilizadas na produção de vinhos, sucos, geleias, óleo (das sementes), entre outros produtos. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de uvas em 2019 foi de mais de 77 milhões de toneladas, com um valor pouco abaixo de 1,5 milhão toneladas no Brasil. Em 2014, foram produzidas mais de 50 milhões de toneladas da fruta, sendo que cerca de 75% foi destinada à vinificação. Dos resíduos gerados nesse processo, o bagaço corresponde à maior parte, variando entre 20 e 30% do peso original de frutas frescas, a depender do processo de vinificação empregado (BERES; COSTA; CABEZUDO; DA SILVA-JAMES *et al.*, 2017; FAO, 2019).

A indústria vinícola produz anualmente milhares de toneladas de bagaço de uva, composto principalmente de pele, semente, resíduo de polpa e hastes da fruta. Historicamente, esse resíduo tem sido utilizado como fertilizante, ração animal ou produção de ácido cítrico, etanol, metanol e xantana. Todavia, há relatos de problemas na utilização do bagaço de uva como fertilizante, devido à possível influência dos compostos fenólicos nas propriedades de germinação, ou como ração animal devido a sua resistência à digestão. Estudos indicaram que o bagaço de uva possui alto teor de fibras dietéticas (associadas à redução do risco de doenças cardiovasculares, entre outras), óleos poli-insaturados e, principalmente, compostos fenólicos, despertando o interesse no potencial de utilização desse resíduo na obtenção de produtos com alto valor agregado. Dentre esses, os extratos fenólicos (ricos principalmente em antocianinas e flavonóis), que podem ser utilizados como aditivo em alimentos funcionais ou suplementação, devido ao seu potencial antioxidante. Um melhor aproveitamento desse resíduo pode, além de beneficiar economicamente a indústria vinícola, reduzir o impacto ambiental de seu acúmulo, evitando a poluição do solo e água (BERES; COSTA; CABEZUDO; DA SILVA-JAMES *et al.*, 2017; DENG; PENNER; ZHAO, 2011; KAMMERER; CLAUS; CARLE; SCHIEBER, 2004; MARTINS; ROBERTO; BLUMBERG; CHEN *et al.*, 2016).

Beres *et al.* (2017) classificaram esse resíduo de duas formas, a depender do objetivo de aplicação: bagaço sem sementes e somente as sementes.

O bagaço sem sementes (polpa residual, pele e hastes) corresponde entre 48 e 62% do bagaço de uva e pode ser empregado como fonte de fibras dietéticas solúveis e insolúveis, enquanto que as sementes correspondem entre 38 e 52% do bagaço e são comumente empregadas na extração de óleo essencial, rico em ácidos graxos poli-insaturados. A extração de compostos fenólicos pode utilizar ambas as partes do bagaço, sendo que, conforme estudo realizado por Maier *et al.* (2009), as sementes podem ser utilizadas para extração dos fenólicos mesmo após o processo de extração do óleo essencial, processo esse que não alterou significativamente o teor desses compostos nas sementes no estudo realizado.

Martins *et al.* (2016) avaliaram extratos fenólicos de bagaços de uvas tintas, brancas e mista (tintas e brancas) oriundos da produção de vinho nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, bem como seu potencial antioxidante. Dentre os extratos estudados, o de uva tinta apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, com destaque para catequina e procianidina B2, e maior atividade antioxidante. Outro estudo de Martins *et al.* (2017) avaliou o potencial antioxidante e a ação anti-inflamatória de extrato de bagaço de uva tinta oriundo da produção de vinho na cidade de Valinhos/SP, que apresentou efeito anti-inflamatório em cultura de células Caco-2. Em ambos os estudos foi avaliado ainda o efeito do tratamento com a enzima tanase sobre o teor de fenólicos e os respectivos potenciais dos extratos, tendo como resultado o aumento de ambos.

Diante dos fatos observados, sabendo do alto teor de fenólicos totais dos resíduos de uva, torna-se interessante investigar o potencial que um extrato rico em fenólicos apresenta para inibição da ECA. Lembrando que a inibição dessa enzima não tem relação apenas com a quantidade de fenólicos, mas que os estudos indicam haver compostos mais ativos nessa inibição do que outros, dentre os fenólicos. Eriz *et al.* (2011) avaliaram a inibição da ECA por proantocianidinas isoladas de sementes e peles de uvas pretas chilenas (*Vitis vinífera*) colhidas em diferentes regiões do país, correlacionando a atividade com a concentração e tipo desses flavonoides presentes no extrato. Os dados de inibição levaram à consideração de que as diferenças estruturais têm mais influência na inibição da enzima que as concentrações das proantocianidinas, uma vez que os extratos das sementes apresentaram menor atividade inibitória que os extratos das peles, apesar de possuir maior concentração de flavonoides. Os autores atribuíram esse resultado ao número de hidroxilas disponíveis, à maior ocorrência de epigallocatequinas e ao

grau médio de polimerização das proantocianidinas presentes nesse extrato. Essa consideração quanto à disponibilidade de hidroxilas e ao grau de polimerização na atividade dos fenólicos pode indicar que o processo de biotransformação dos fenólicos nos extratos de resíduos de uva pode ser um processo muito promissor na obtenção de extratos mais bioativos na hipertensão arterial.

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma das leguminosas mais utilizadas no mundo, principalmente para a produção do óleo, mas também para produção de manteiga de amendoim, aperitivos, sobremesas, aditivos em alimentos, entre outros. Além do óleo, rico em ácidos graxos poli-insaturados, essa leguminosa contém outros compostos de interesse biológico, tais como proteínas, fibras, compostos fenólicos, vitaminas e minerais. (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016; LEWIS; HARRIS; SANDERS; WHITE *et al.*, 2013).

O consumo dessa leguminosa varia ao redor do mundo, devido, principalmente, à diversidade de produtos que podem ser obtidos. Há estudos que correlacionam seu consumo a benefícios à saúde, como redução do risco de doenças cardiovasculares e de câncer de cólon (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016).

Em 2019, a produção mundial de amendoim, com a casca, foi de aproximadamente 50 milhões de toneladas, sendo a China a maior produtora, correspondendo a cerca de 30% desse total, enquanto a produção brasileira foi de aproximadamente 600 mil toneladas (FAO, 2019).

Enquanto os grãos de amendoim têm alto valor no mercado, sua pele é um subproduto de baixo valor, utilizada principalmente na composição de ração animal ou como combustível para caldeiras. Todavia, estudos indicam que esse resíduo contém concentrações importantes de compostos fenólicos e outros fitoquímicos que podem proporcionar benefícios à saúde, com potencial para utilização como ingrediente funcional em alimentos. A utilização do extrato da pele de amendoim como ingrediente alimentício pode colaborar economicamente com a indústria de amendoim, agregando valor e aumentando a qualidade nutricional dos produtos (CHRISTMAN; DEAN; BUENO ALMEIDA; WEISSBURG, 2018; OLDONI; MELO; MASSARIOLI; MORENO *et al.*, 2016). Estudo realizado por Ma *et al.* (2014) demonstrou que a adição da pele do amendoim aumentou significativamente o conteúdo de fibras e compostos fenólicos na manteiga de amendoim.

Segundo Christman *et al.* (2018), a pele do amendoim corresponde a aproximadamente 2,5% da massa da semente. Em um de seus estudos, os autores

encontraram um total fenólico variando entre 90 e 160 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato, dependendo da forma de extração, sendo que os flavonoides foram os mais abundantes. Esse estudo avaliou a viabilidade de adição do extrato da pele de amendoim em coberturas de amendoim de dois sabores, encontrando valores de fenólicos totais e capacidade antioxidante superiores para os produtos com a adição do extrato.

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo avaliou a capacidade de extratos da pele de amendoim em atenuar a resposta hiperglicêmica *in vivo* e *in vitro*. Os resultados apresentaram um efeito protetivo contra indução de morte celular por hiperglicemia em células de carcinoma hepático humano (HepG2) e redução da resposta glicêmica em humanos, demonstrando um possível efeito antidiabético para esse extrato (CHRISTMAN; DEAN; ALLEN; GODINEZ *et al.*, 2019).

Lewis *et al.* (2013) avaliaram, *in vitro*, o potencial anti-inflamatório de extratos de amendoim obtidos com soluções de etanol ou acetona (50%), tendo como marcadores a redução da expressão da Ciclooxigenase-2 e dos níveis de prostaglandina E2 e óxido nítrico. Ambos os extratos avaliados apresentaram redução significativa dos marcadores inflamatórios avaliados.

Em levantamento bibliográfico realizado em dezembro de 2021, não foram encontrados estudos que avaliassem o potencial anti-hipertensivo para extratos fenólicos de amendoim ou de sua pele, *in vivo* ou *in vitro*, ou sobre o efeito da biotransformação enzimática no perfil de compostos fenólicos extraídos dessa matriz.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação de diferentes processos de obtenção de extratos ricos em fenólicos a partir de resíduos da agroindústria (bagaço de uvas e pele de amendoim), e o potencial desses extratos em ensaios *in vitro* de capacidade antioxidante, e de inibição da ECA, como parâmetros de avaliação do potencial do extrato no tratamento auxiliar da hipertensão arterial.

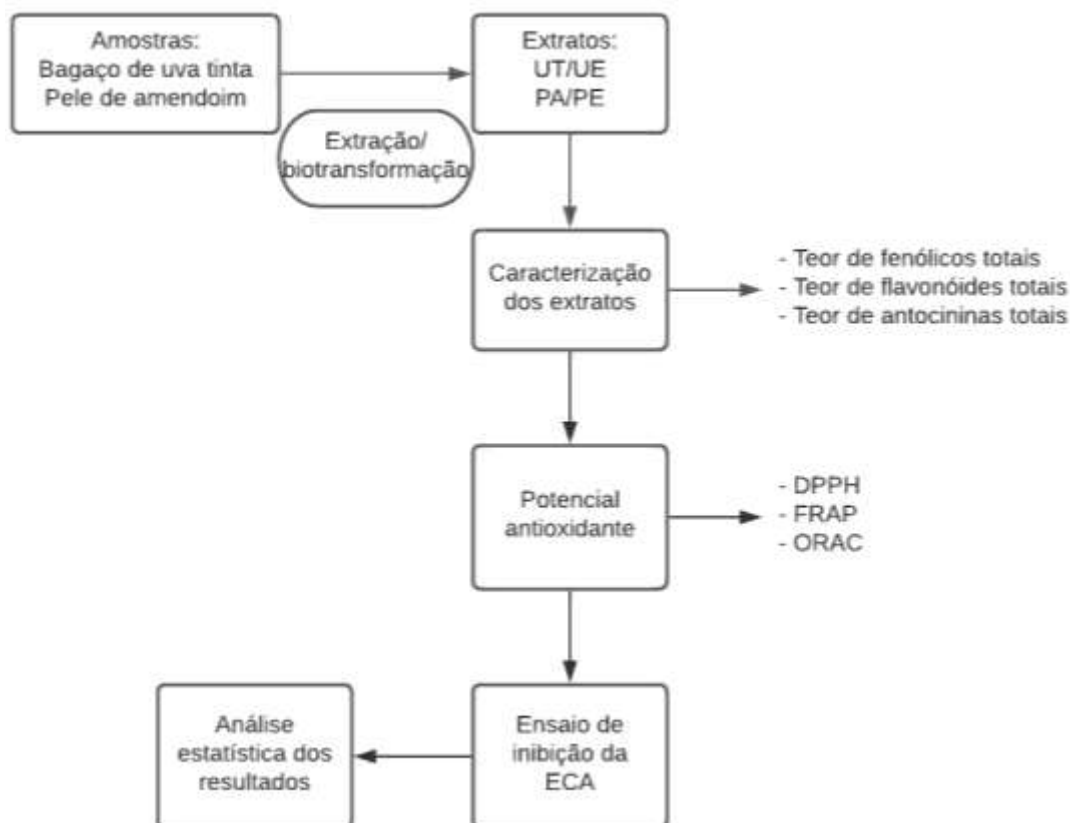
3.2 Objetivos específicos

- Obter e tratar os resíduos de uvas oriundos da vinificação e da pele de amendoim oriunda da indústria de alimentos;
- Obtenção dos extratos ricos em fenólicos a partir dos resíduos por meio de diferentes meios de extração auxiliada por enzimas comerciais e em soluções aquosas ou etanoicas;
- Caracterizar os extratos produzidos quanto ao teor de fenólicos totais, teor de flavonoides totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante por métodos *in vitro*;
- Avaliar o potencial dos extratos na modulação da atividade da enzima conversora de angiotensina I em ensaio *in vitro*, como indício do potencial desses extratos para uso em alimentos funcionais de co-tratamento de hipertensão arterial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma das atividades

Figura 4: Fluxograma das atividades do projeto



UT: Extrato de uva tinta, UE: Extrato de uva tinta biotransformado, PA: Extrato da pele de amendoim e PE: Extrato da pele de amendoim biotransformado.

4.2 Reagentes

Ácido gálico, quercetina, trolox, fluoresceína, Azul de Coomassie Brilhante G-250, 2,2'azobis(1-metilpropionamidina)dihidrocloreto (AAPH), tripiridiltriazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), p-nitrofenil- β -glicosídeo (N7006), naringinase de *Penicillium decumbers* (N1385), hipuril-L-histidil-L-leucina (H1635), ECA de pulmão de coelho (A6778), HEPES sódico (H7006) e ácido galacturônico, adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Reagente de Folin-Ciocalteu, fosfato de sódio monobásico e dibásico, carbonato de sódio, ácido fórmico, ácido 3,5-dinitrosalicílico, adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea (Diadema, SP, Brasil). Enzimas Celluclast® 1.5 L e Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes®) doadas

por LNF Latino América (Bento Gonçalves, RS, Brasil). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

4.3 Preparo das amostras

4.3.1 Resíduos da uva

Resíduos de vinificação de uva tinta (Máximo IAC 138-22), constituídos de cascas e sementes que foram submetidos a processo fermentativo com microbiota natural dos frutos, variedade híbrida de uvas Syrah (75%) e Seibel (25%), provenientes do Rio Grande do Sul, coletados durante período de produção (Janeiro a Março) do ano de 2013. Os resíduos foram liofilizados, moídos até sua transformação em pó, envazados em embalagem vedadas e armazenados à -80°C até o momento de preparo do extrato.

4.3.2 Pele de amendoim

Foram utilizadas amostras de pele de amendoim provenientes da empresa Ampendupã (Tupã - SP), recebidas em dezembro de 2018. As amostras foram trituradas em processador, envasadas em embalagens vedadas e armazenado à -18°C até o momento de preparo do extrato.

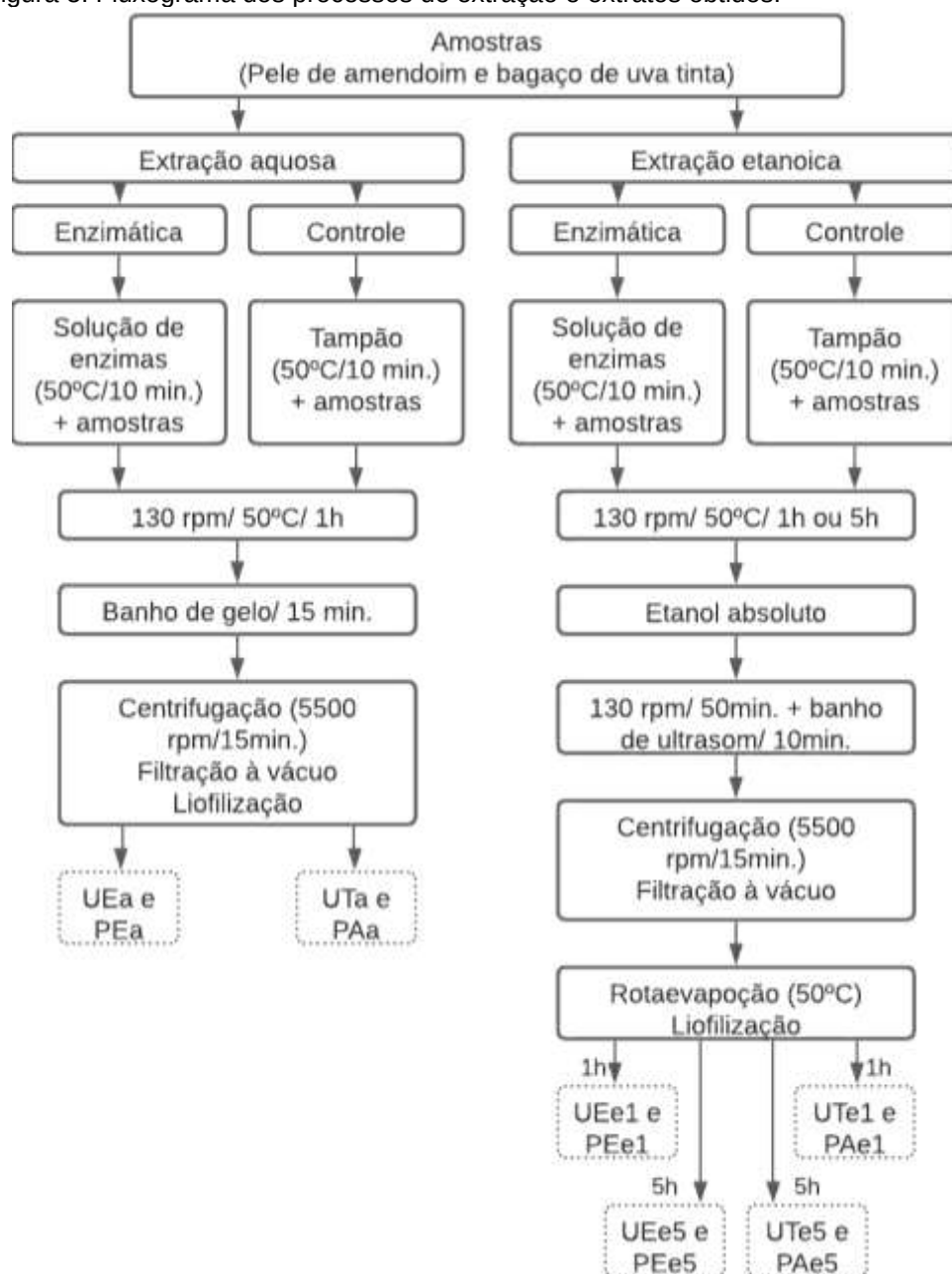
4.3.3 Obtenção dos extratos

Os extratos de resíduos de uvas e de pele de amendoim foram preparados seguindo um mesmo protocolo, adaptado de Martins *et al.* (2016) e Xu *et al.* (2014).

A Figura 5 apresenta o fluxograma dos processos de extração, com os respectivos extratos obtidos.

Para a produção do extrato biotransformado, foi preparada uma solução de 100U de celulase, 10U de pectinase e 25U de β -glicosidase em 10mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,0). Após aclimatar a solução de enzimas por 10 minutos à 50°C, foi adicionado 1g da amostra (resíduo seco e triturado) e levado ao banho tipo Dubnoff (Tecnal TE-053, Brasil) com agitação a 130 rpm por 1 ou 5h à 50°C.

Figura 5: Fluxograma dos processos de extração e extratos obtidos.



Extratos - UT: uva tinta, UE: uva tinta biotransformado, PA: pele de amendoim, PE: pele de amendoim biotransformado; a (aquoso): UTa, UEa, PAa e PEa; e1 (etanólico em 1h): UTe1, UEe1, PAe1 e PEE1; e5 (etanólico em 5h): UTe5, UEe5, PAe5 e PEE5.

Para os extratos aquosos as soluções foram mantidas nessas condições por 1h e a reação foi interrompida em banho de gelo por 15 minutos, em seguida foram centrifugadas (Centrífuga Megafuge 16R, Thermo Scientific, EUA) a 5.500 rpm por 15 minutos e filtradas à vácuo. Essas amostras foram nomeadas UTa e UEa (extrato do bagaço de uva tinta controle e biotransformado, respectivamente) e PAa e PEa (extrato da pele de amendoim controle e biotransformado, respectivamente).

Para os extratos etanólicos, a reação foi paralisada com a adição de 10mL de etanol absoluto. A mistura foi então levada novamente ao banho com agitação a 130 rpm por mais 50 minutos. Posteriormente, desligado o aquecimento, foram levados por mais 10 minutos ao banho de ultrassom (Unique USC-1800A, Brasil). As amostras foram então centrifugadas (Centrífuga Megafuge 16R, Thermo Scientific, EUA) a 5.500 rpm por 15 minutos, seguido por filtração à vácuo.

Os extratos etanólicos foram levados ao rotaevaporador (Büchi W240, Suíça) à 50°C até redução do volume a 50% do inicial, garantindo a evaporação do etanol, sobrando apenas o tampão. Desse processo saíram as amostras: UEe1, UEe5, PEe1 e PEe5, sendo os números o indicativo do tempo de incubação antes da adição do etanol.

Para fins de controle, os extratos fenólicos não submetidos à biotransformação foram preparados da mesma forma descrita acima, sem a adição das enzimas. Desse processo foram obtidas as amostras: UTe1, UTe5, PAe1 e PAe5.

Todos os extratos foram congelados em ultrafreezer a -20°C, liofilizadas em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras, Brasil) a -40°C por 48 horas e armazenadas à -20°C até a utilização.

Para calcular a massa de extrato obtido, o recipiente foi pesado vazio e após a liofilização, obtendo-se a massa diferencial. O rendimento foi calculado dividindo-se a massa do extrato pela massa de amostra utilizada.

4.4 Enzimas

Para obtenção dos extratos biotransformado, foram utilizadas as enzimas comerciais Celluclast® 1.5 L (celulase) e Pectinex® Ultra SP-L (pectinase) da marca Novozymes, com atividade expressa em U/mL do produto, e naringinase de *Penicillium decumbers* da marca Sigma-Aldrich, com atividade de β -glicosidase expressa em U/g do produto.

4.4.1 Atividade de celulase

A determinação da atividade enzimática da Celluclast® 1.5 L foi realizada pelo método DNS conforme proposto por Wood e Garcia-Campayo (1990), com modificações. O método baseia-se na reação entre um composto redutor, como a

glicose ou o ácido galacturônico, e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que é reduzido ao composto 3-amino-5-nitrosalicílico, alterando a coloração de amarela para avermelhado. A alteração da coloração é utilizada para medir a liberação de glicose com a degradação da celulose, possibilitando mensurar a atividade enzimática.

Para determinação da atividade enzimática, 0,45mL de solução de carboximetilcelulase (CMC) 1% em tampão citrato 5mM (pH 4,8) foi adicionada em tubos de ensaio e ambientada à 40°C por 10 minutos em banho termostatizado (Tecnal TE-056-MAG, Brasil). Após aclimatar, 0,05mL da solução de extrato enzimático foi adicionado, seguido por incubação em banho à 40°C por 60 minutos, com agitações leves e periódicas. Após o período de incubação, 0,5mL do reagente DNS foi adicionado e feita homogeneização em vórtex, seguido por aquecimento em banho a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram levados ao banho de gelo e 4mL de água destilada foram adicionados. Foram utilizadas diluições entre 1:500 a 1:9000 do extrato enzimático em tampão citrato.

Para construção da curva de calibração 0,5mL de solução de glicose em tampão de reação, na concentração entre 0,56 e 5,6 $\mu\text{mol/mL}$, foi adicionado em tubos de ensaio e seguidas as etapas descritas acima, a partir da adição do DNS.

A leitura foi realizada em comprimento de onda de 540nm, em placa transparente de 96 poços em leitor de placas (KHB ST-360, China).

Os cálculos da atividade enzimática foram realizados utilizando-se as absorbâncias líquidas, descontando o branco de cada amostra. Para obtenção dos brancos das amostras a adição do DNS e do extrato enzimático foi invertida. Enquanto que para o branco da curva de calibração a solução de glicose foi substituída por tampão.

A atividade enzimática foi calculada em unidade por mililitro de extrato enzimático (U/mL), considerando 1U de atividade a capacidade de liberação de 1 μmol de glicose por minuto de reação, utilizando a Equação 1 (abaixo).

$$\text{U/mL} = \frac{\text{glicose } (\mu\text{mol/mL})}{t \times V \times [d]} \quad (1)$$

Onde, U/mL é a unidade enzimática por mL de extrato, t é o tempo de reação em minutos, V é o volume de solução enzimática em mL e [d] é a diluição da solução enzimática.

4.4.2 Atividade de pectinase

A determinação da atividade enzimática da Pectinex® Ultra SP-L foi realizada pelo método DNS conforme proposto por Couri (1993), com modificações. A alteração da coloração foi utilizada para medir a liberação de ácido galacturônico com a hidrólise da pectina, possibilitando mensurar a atividade enzimática.

Para o ensaio, 2mL de solução de ácido poligalacturônico (pectina) 0,25% em tampão acetato 20mM (pH 5) foi adicionada em tubos de ensaio e ambientada à 40°C por 10 minutos em banho termostatizado (Tecnal TE-056-MAG, Brasil). Após aclimatar, 0,05mL da solução de extrato enzimático foi adicionado, seguido por incubação em banho a 40°C por 30 minutos, com agitações leves e periódicas. Após o período de incubação, 0,05mL das misturas foi transferida para outro tubo contendo 0,5mL do reagente DNS, seguido pela adição de 0,45mL de água e homogeneização em vórtex, e levado para aquecimento em banho a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram levados ao banho de gelo e 4 mL de água destilada foram adicionados. Diluições entre 1:500 a 1:9000 do extrato enzimático em tampão acetato foram utilizadas.

Para construção da curva de calibração 0,05 mL de solução de ácido galacturônico em tampão da reação, na concentração entre 0,450 e 5,6 µmol/mL, foi adicionado em tubos de ensaio e seguidas as etapas descritas acima, a partir da adição em DNS.

A leitura foi realizada em comprimento de onda de 540nm, em placa transparente de 96 poços em leitor de placas (KHB ST-360, China).

Os cálculos da atividade enzimática foram realizados utilizando-se as absorbâncias líquidas, descontando o branco de cada amostra. Para obtenção dos brancos das amostras a alíquota de 0,05mL foi transferida diretamente para o tubo com DNS, sem passar pela incubação. Enquanto que para o branco da curva de calibração a solução de ácido galacturônico foi substituída pelo tampão.

A atividade enzimática foi calculada em unidade por mililitro de extrato enzimático (U/mL), considerando 1U de atividade a capacidade de liberação de 1µmol de ácido galacturônico por minuto de reação, utilizando a Equação 2 (abaixo).

$$U/mL = \frac{\text{ácido galacturônico } (\mu\text{mol/mL})}{t \times V \times [d]} \quad (2)$$

Onde, U/mL é a unidade enzimática por mL de extrato, t é o tempo de reação em minutos, V é o volume de solução enzimática em mL e [d] é a diluição da solução enzimática.

4.4.3 Atividade de β -glicosidase

A determinação da atividade enzimática de β -glicosidase em naringinase de *Penicillium decumbers* da marca Sigma-Aldrich foi realizada conforme Matsuura, Sasaki e Murao (1995), adaptado por Ávila *et al.* (2018). O método baseia-se na clivagem do substrato p-nitrofenil- β -glicosídeo, promovendo a liberação do p-nitrofenol, com absorvância em 410nm.

Para o ensaio, 0,3 mL da solução de p-nitrofenil- β -glicosídeo 5mM em tampão acetato 0,1M (pH 5) foi adicionado em micro tubos de plástico e aclimatado à 40°C em banho por 10 minutos, seguido pela adição de 0,3mL da solução enzimática e incubação por 30 minutos a 40°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,3mL de carbonato de sódio 0,5M. Foram utilizadas soluções da enzima entre 0,1 e 0,01 mg/mL, em tampão acetato. Para controle da amostra, a solução de substrato foi substituída por tampão acetato.

Para construção da curva padrão foram adicionados em micro tubos 0,3mL tampão acetato, 0,3 mL de solução de p-nitrofenol (nas concentrações entre 0,009 e 0,216 μ mol/mL) e 0,3 mL de carbonato de sódio 0,5M.

A leitura foi realizada em comprimento de onda de 410nm, em placa transparente de 96 poços em leitor de placas (KHB ST-360, China).

Os cálculos da atividade enzimática foram realizados utilizando-se as absorvâncias líquidas, descontando o branco de cada amostra. Para obtenção dos brancos das amostras e da curva de calibração a solução enzimática e a solução do padrão, respectivamente, foram substituídas por tampão acetato.

A atividade enzimática foi calculada em unidade por grama do produto (U/g), considerando 1U de atividade a capacidade de liberação de 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto de reação, utilizando a Equação 3 (abaixo).

$$U/mg = \frac{\text{p-nitrofenol } (\mu\text{mol/mL})}{t \times V \times [e]} \quad (3)$$

Onde, U/mg é a unidade enzimática por mg do produto, t é o tempo de reação em minutos, V é o volume de solução enzimática em mL e [e] é a concentração da solução enzimática, em mg/mL.

4.4.4 Teor de proteínas solúveis totais nos extratos enzimáticos

A determinação do teor total de proteínas nos produtos Celluclast® 1.5 L, Pectinex® Ultra SP-L e naringinase de *Penicillium decumbers* foi feita conforme o método proposto por Bradford (1976), com adaptações. O método é baseado na formação de um complexo da proteína com o reagente Azul de Coomassie Brilhante G-250, conferindo coloração azul à solução. A intensidade da coloração é utilizada para calcular o teor de proteína, tendo como padrão a albumina de soro bovino (BSA). O reagente de Bradford foi preparado em balão volumétrico de 100 mL, dissolvendo-se 10 mg do reagente Azul de Coomassie Brilhante G-250 em 5 mL de etanol 95% e adicionando 10 mL de ácido fosfórico 85%, seguido da adição de água destilada até completar o volume. A solução foi filtrada e armazenada em frasco protegido da luz.

Para o ensaio, 20 µL da solução enzimática e 180 µL do reagente de Bradford foram adicionados em placa transparente de 96 poços, seguido por incubação por 10 minutos no escuro. Para os extratos enzimáticos de celulase e pectinase foi utilizada uma solução de 1% e para a naringinase uma solução de 0,2 mg/mL.

A curva padrão foi construída substituindo a amostra por solução de BSA em concentrações entre 0,010 e 0,3 mg/mL e para obtenção do branco a substituição foi por água destilada.

A leitura foi realizada em 595nm em fluorímetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Alemanha). Para o cálculo do teor de proteínas foi considerada absorbância líquida, descontado o branco. O resultado foi expresso em miligramas de proteína por mililitro de produto (mg/mL) para a celulase e pectinase e por grama para a naringinase (mg/g).

Os valores foram utilizados para cálculo da atividade específica das enzimas em unidade de atividade por mg de proteína (U/mg proteína).

4.5 Caracterização dos extratos

A caracterização dos extratos se deu pela determinação dos teores de fenólicos totais e de classes específicas de fenólicos, sendo esses: flavonoides totais e antocianinas monoméricas. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.5.1 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado conforme descrito por Singleton e Rossi (1965) pelo método Folin-Ciocalteu, com adaptações. Em uma placa transparente de 96 poços foram adicionados 15 μ L de solução dos extratos, 240 μ L de água destilada e 15 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu, deixando em repouso por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 30 μ L de solução de carbonato de sódio 10% e deixados em local escuro à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse tempo, a absorbância foi medida a 760nm em leitor de placas (KHB ST-360, China).

Para os extratos de uva tinta foram utilizadas soluções nas concentrações entre 0,5 e 5mg/mL, enquanto que para os extratos de pele de amendoim as concentrações variaram entre 0,375 e 3 mg/mL.

Para construção da curva padrão a amostra foi substituída por solução de ácido gálico nas concentrações entre 16 e 300 μ g/mL e o branco foi preparado substituindo a amostra por água destilada.

Os resultados foram calculados pela absorbância por meio da curva de calibração com o padrão e expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato liofilizado (mg GAE/g).

4.5.2 Determinação de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada pelo método Dowd, que consiste na formação de um complexo do íon de alumínio com os flavonoides, de cor amarela. O ensaio foi realizado conforme Meda *et al.* (2005), com adaptações propostas por Oboh *et al.* (2018). Em uma placa transparente de 96 poços foram adicionados 20 μ L da solução dos extratos em metanol 10%, 15 μ L de solução de acetato de sódio 1M, 15 μ L de solução de cloreto de alumínio 10% em metanol 10% e 250 μ L de água destilada. A incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida, a absorbância foi medida a 405nm em leitor de placas (KHB ST-360, China). Foram utilizadas soluções dos extratos nas

concentrações de 10 e 30mg/mL. O branco da amostra foi obtido substituindo a solução de cloreto de alumínio por metanol 10%.

Para construção da curva padrão a amostra foi substituída por solução de quercetina em metanol, nas concentrações entre 15 e 375 µg/mL, e o branco foi preparado substituindo o padrão por solução de metanol 10%.

O teor de flavonoides foi calculado utilizando a absorbância líquida, descontado o branco, e o resultado expresso em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato liofilizado (mg QUE/g).

4.5.3 Determinação de antocianinas monoméricas

O teor de antocianinas monoméricas foi determinado pelo método de pH diferencial, conforme proposto por Giusti e Wrolstad (2001), que consiste em um método colorimétrico baseado na diferença de cor das antocianinas em pH1 (colorido) e pH 4,5 (incolor).

Soluções iniciais na concentração de 25 mg/mL foram preparadas em água. A solução obtida foi diluída na proporção 1:10 em tampão de cloreto de potássio 0,025M com ácido clorídrico (pH 1) e em tampão acetato de sódio 0,4M com ácido clorídrico (pH 4,5) e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro. A leitura da absorbância foi realizada em 510 e 700nm em espectrofotômetro (UV-5100, Metash, China), sendo a absorbância em 700nm utilizada para correção de turbidez na amostra. As antocianinas monoméricas foram quantificadas considerando a diferença entre a absorbância no pH 1 e pH 4 (Equação 4).

$$Ab_{AM} = (Ab_{510} - Ab_{700})_{pH1} - (Ab_{510} - Ab_{700})_{pH4,5} \quad (4)$$

Onde Ab_{AM} é a absorbância das antocianinas monoméricas e Ab_{510}/Ab_{700} são as absorbâncias nos respectivos comprimentos de onda.

Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (C3G) por grama de extrato liofilizado (mg C3G/g) e calculados conforme a Equação 5, considerando a massa e absortividade molares dessa antocianina, sendo esses 449,2 g/mol e 26900 L/cm.mol (510nm), respectivamente.

$$AM \text{ (mg/L)} = \frac{Ab_{AM} \times MM \times FD \times 1000}{\epsilon \times 1} \quad (5)$$

Onde AM é a concentração de antocianinas monoméricas, Ab_{AM} é a absorbância obtida na Equação 4, MM é a massa molar da C3G, FD é o fator de diluição da amostra e ϵ é a absorvidade molar da C3G. A equação considerou o caminho ótico de 1 centímetro.

4.6 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos

A capacidade antioxidante dos extratos foi medida por ensaios de atividade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e poder antioxidante de redução férrica (FRAP). Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.6.1 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A análise da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) pelos compostos antioxidantes presentes nos extratos obtidos foi conduzida conforme proposto por Peschel *et al.* (2006), com adaptações de Macedo *et al.* (2011). O método é baseado na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), com redução à hidrazina, podendo ser identificado pela mudança da coloração de violeta a amarelo pálido.

Para o ensaio, 50 μ L de solução da amostra em metanol 70% e 150 μ L de radical DPPH 0,2 mM em metanol foram adicionados em microplacas transparentes de 96 poços. Para os extratos de uva tinta a concentração variou entre 60 e 500 μ g/mL, já para os extratos de pele de amendoim a concentração foi entre 9 e 75 μ g/mL. Para obter a absorbância do branco das amostras a solução de DPPH foi substituída pela solução de metanol 70%.

A curva de calibração foi obtida utilizando solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), preparadas em metanol 70% nas concentrações de 3,8 a 76 μ g/mL. Para branco foi utilizada somente a solução de metanol 70% e para o controle o padrão foi substituído por metanol 70%.

A leitura foi realizada em fluorímetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Alemanha), em comprimento de onda de 520nm. A alteração da absorbância foi acompanhada por 75 minutos e comparada ao branco.

A atividade redutora foi calculada utilizando a absorbância líquida, descontados os brancos, e atividade antioxidante expressa em miligrama equivalente de Trolox por grama de extrato liofilizado (mg TE/g).

4.6.2 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

A determinação da capacidade antioxidante pelo método ORAC é baseada na capacidade de evitar a oxidação por radicais peroxil resultantes da reação de AAPH ((2,2'-azobis-(2-amidinopropano))-dihidrocloreto) com oxigênio atmosférico, que reage com a fluoresceína, formando um composto não fluorescente. O ensaio foi realizado conforme método descrito por Ou *et al.* (2002), Davalos *et al.* (2004) e Macedo *et al.* (2011).

Para o ensaio, 120µL de fluoresceína 70nM e 20µL de solução da amostra foram adicionados em uma microplaca preta de fundo transparente, sendo adicionado 60µL de AAPH 12 mM imediatamente antes do início da leitura. Todas as soluções foram preparadas em tampão de fosfato de potássio 7,5mM (pH 7,4), no dia da análise e mantidas protegidas da luz. As concentrações para os extratos de uva tinta variaram entre 0,5 e 2,0 mg/mL, enquanto que para os extratos de pele de amendoim ficaram entre 0,25 e 1,0 mg/mL.

A curva padrão foi obtida substituindo-se a amostra por solução de Trolox em concentrações entre 0,95 e 950 µg/mL. Foram preparados ainda o controle, com substituição da amostra por tampão, o branco do tampão e o branco da fluoresceína.

A fluorescência foi medida imediatamente após a adição do AAPH, em fluorímetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Alemanha), utilizando filtros de excitação de 485nm e de emissão de 520nm, a 37°C e com nova medida a cada 75 segundos, durante 98 minutos e 45 segundos (80 ciclos).

Para construção da curva padrão e cálculo da capacidade antioxidante das amostras, foram consideradas as médias da área líquida sob a curva (AUC), descontada a fluorescência do controle, para cada concentração do padrão e da amostra. A atividade antioxidante foi expressa em miligramas de Trolox equivalente por grama de extrato liofilizado (mg TE/g).

4.6.3 Poder antioxidante de redução férrica

A determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes presentes no extrato para reduzir, em meio ácido, o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} e foi realizada conforme Benzie e Strain (1996), com modificações. O reagente FRAP foi preparado com 2,5mL de tampão acetato 0,3M (pH 3,6), 250 μ L de solução de TPTZ (tripiridiltriazina) 10mM em HCl 40mM e 250 μ L de solução de cloreto férrico 20mM.

O ensaio foi realizado em microplaca transparente de 96 poços. Foram adicionados 36 μ L da amostra seguido de 270 μ L do reagente FRAP. A preparação das amostras e reagentes foi realizada em ambiente escuro, bem como a montagem da placa. A leitura da absorbância foi realizada em fluorímetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Alemanha) a 595nm, com leitura em 7 ciclos de 88 segundos, durante 10 minutos de reação. Para os extratos de uva tinta foram utilizadas concentrações entre 30 e 250 μ g/mL, já para os extratos de pele de amendoim as concentrações ficaram entre 15 e 125 μ g/mL.

A curva de calibração foi construída com Trolox, nas concentrações entre 1,5 e 100 μ g/mL. Para obtenção do branco, a solução do padrão foi substituída por água destilada. O potencial antioxidante foi expresso em miligrama equivalente de Trolox por grama de extrato liofilizado (mg TE/g).

4.7 Avaliação do potencial para inibição da ECA

Este ensaio é baseado na hidrólise do N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) pela ECA, com formação do ácido hipúrico (AH), e foi realizado conforme Cushman e Cheung (1971), com modificações propostas por Sigma-Aldrich (1998). Em tubos de ensaio, 50 μ L de solução da amostra foi incubado com 50 μ L de solução de ECA (25mU/mL) a 37°C por 10 minutos e a reação enzimática foi iniciada pela adição de 150 μ L do substrato (HHL 4,15mM em tampão HEPES 50mM com 0,3M de cloreto de sódio, pH 8,3). Após incubação por 30 minutos a 37°C em banho termostatizado (SolidSteel SSD-5L, Brasil), com controle rigoroso de temperatura e leve agitação periódica, a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de HCl 1M. Para extração do AH foi adicionado 1,5mL de acetado de etila, levado ao vórtex por 1 minuto e deixado em repouso por 5 minutos. Foram coletados 800 μ L da camada de acetado de etila e levados para evaporação a 100°C em banho (Tecnal TE-056-MAG, Brasil)

na capela. O resíduo foi então reconstituído em 1mL de água destilada e a absorbância medida em espectrofotômetro (UV-5100, Metash, China) a 228nm.

Para o controle negativo (100% de atividade enzimática), o extrato foi substituído por água destilada. Para cada amostra e controle foi preparado o branco com a inativação da enzima com ácido clorídrico antes da adição do substrato. O controle positivo foi realizado com captopril, uma droga comercial anti-hipertensiva por inibição da ECA.

A capacidade de inibição da ECA foi expressa em porcentagem (%IECA) e calculada conforme a Equação 6.

$$\%IECA = \frac{(A_{CN} - A_{Am}) \times 100}{A_{CN}} \quad (6)$$

Onde, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_{Am} é a absorbância da amostra. O branco foi usado para correção da leitura para cada amostra, sendo utilizada a absorbância líquida na fórmula acima.

4.8 Análises estatísticas

Todas as medidas foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. A diferença estatística entre grupos foi analisadas pela análise de variância (ANOVA) e a comparação post hoc foi feita pelo teste de Tukey. A correlação entre a concentração de fenólicos e a atividade antioxidante foi analisada usando o teste de correlação de Pearson. Diferenças foram consideradas significantes quando maior ou igual a 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no software *jamovi* versão 1.6.23 (JAMOMI, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade das enzimas e rendimento dos extratos obtidos

O ensaio para determinação do teor total de proteínas nos extratos enzimáticos apresentaram resultados de $42,57 \pm 1,80$ e $26,58 \pm 1,17$ mg proteína/mL do produto para Celluclast® e Pectinex®, respectivamente, e $117,91 \pm 19,53$ mg proteína/g de naringinase. Os valores obtidos para atividade do produto (U/mL ou g) e atividade específica (U/mg proteína) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade enzimática obtida, expressas por mililitro ou grama do produto e por mg de proteína.

Atividade	Celulase	Pectinase	β -glicosidase
U/mL ou g produto	1972,10	2435,15	267,30
U/mg proteína	46,32	91,60	2,27

Foram utilizados 10 gramas de amostra para obtenção de cada um dos extratos e os valores de rendimento para cada extrato estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimento dos extratos nos diferentes processos de extração, em gramas.

Extrato	Aquoso	Etanólico (1h)	Etanólico (5h)
UT	2,090	3,787	2,451
UE	3,211	4,828	4,031
PA	1,312	2,670	2,030
PE	2,203	3,900	3,042

Número entre parênteses indica o tempo de incubação antes da adição do etanol. UT: uva tinta, UE: uva tinta com biotransformação, PA: pele de amendoim e PE: pele de amendoim com biotransformação.

Os rendimentos variaram entre 20,90% e 48,28% para os extratos do bagaço de uva tinta. Para os extratos da pele de amendoim os valores ficaram entre 13,12% e 39,0%. Sendo que, na comparação entre os mesmos métodos, os extratos de uva tinta apresentaram maior rendimento de extração nos processos testados. O método que apresentou menor rendimento foi a extração aquosa comum, enquanto que o maior valor foi obtido na extração com enzimas no tempo total de 1 hora seguido de extração com etanol.

Em todos os casos, o rendimento foi maior com a utilização das enzimas. Para os extratos do bagaço de uva tinta, a utilização do conjunto de enzimas aumentou o rendimento do extrato em até 64,47% (UEe5), enquanto que para os extratos da pele de amendoim esse aumento foi de até 67,91% (PEa). Esses valores

apontam para viabilidade da utilização das enzimas para aumentar o rendimento na produção dos extratos. É provável que o aumento de rendimento pode ser atribuído principalmente à atividade das enzimas celulase e pectinase. A celulase atua na catálise da hidrólise da celulose, enquanto a pectinase catalisa a hidrólise da pectina, a combinação dessas enzimas no processo de extração pode propiciar maior liberação dos compostos ligados à matriz, aumentando a extração. O maior rendimento encontrado para o extrato do bagaço de uva tinta pode ser associado à complexidade da matriz, que contém cascas, sementes e hastes da fruta, além de um maior teor de pectina.

Todavia, apenas o aumento do rendimento da extração não justificaria a utilização dessas enzimas. Espera-se que o tratamento enzimático apresente maior liberação dos compostos fenólicos da matriz, aumentando a concentração dos compostos bioativos nos extratos obtidos. A ausência do aumento na extração de compostos fenólicos representaria maior extração de compostos que não são de interesse a esse estudo, como lipídeos e carboidratos.

5.2 Teor de fenólicos nos extratos

A determinação de fenólicos totais foi feita para todos os 12 extratos obtidos e os valores estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Teor de fenólicos totais nos diferentes métodos de extração, em mg GAE/g extrato.

Extrato	Aquoso	Etanólico (1h)	Etanólico (5h)
UT	17,6±0,7 (a,1)	47,9±2,3 (e,2)	51,6±0,9 (g,2)
UE	20,4±0,9 (a,3)	52,8±1,4 (e,4)	54,1±2,1 (g,4)
PA	81,1±5,0 (c,5)	101,2±4,9 (f,6)	234,6±17,3 (h,7)
PE	51,4±4,7 (d,8)	129,3±6,1 (f,9)	175,3±7,1 (i,9)

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores com a mesma letra e mesma coluna ou mesmo número e mesma linha não apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). UT: uva tinta, UE: uva tinta com biotransformação, PA: pele de amendoim e PE: pele de amendoim com biotransformação.

O teor de fenólicos totais nos extratos de uva tinta variou entre 17,6 a 54,1 mg GAE/g, sendo o menor valor encontrado para o extrato aquoso sem biotransformação e o maior para o extrato alcoólico biotransformado com o maior tempo de extração. Para os extratos da pele de amendoim, os valores obtidos variaram entre 51,4 a 234,6 mg GAE/g, sendo o menor valor para o extrato aquoso biotransformado (PEa) e o maior para o extrato etanólico sem biotransformação e no maior tempo de extração (PAe5)

Para ambas as amostras, o método de extração aquosa apresentou menor capacidade de extração dos compostos fenólicos da matriz. Apesar do aumento no rendimento dos extratos, o tratamento enzimático não se mostrou eficiente para aumentar o teor de fenólicos nesses. Para os extratos aquosos do bagaço de uva tinta não houve diferença estatística entre o valor obtido para o extrato controle e o biotransformado, enquanto que, para os extratos da pele de amendoim, o valor foi menor no extrato biotransformado.

Os valores encontrados para os extratos aquosos de uva foram similares aos encontrados por Xu *et al.* (2014) para mesmo tempo de reação (aproximadamente 20 mg GAE/g).

O método de extração com etanol se mostrou mais eficaz para recuperação de fenólicos presentes na matriz. O valor encontrado nos extratos alcoólicos do bagaço de uva foi até 93% superior ao encontrado no extrato aquoso, demonstrando a eficiência do solvente na extração. Enquanto que, para os extratos da pele de amendoim, o teor de fenólicos totais foi até 140% superior no extrato etanólico. Nessa etapa deve ser considerada ainda a utilização do banho de ultrassom, que não esteve presente na extração aquosa e que pode representar um aumento do rendimento. Embora não houve diferença significativa entre os diferentes tempos de extração alcoólica para os extratos do bagaço de uva e o extrato biotransformado da pele de amendoim, para o extrato controle da pele de amendoim o valor encontrado foi cerca de duas vezes superior no tempo de reação de 5 horas.

Quanto à biotransformação, foi observada diferença significativa com os valores encontrados nos extratos controles apenas para o extrato biotransformado da pele de amendoim, que apresentou um valor aproximadamente 25% menor.

Os valores obtidos para os extratos etanólicos de uva tinta ficaram próximos aos obtidos por Martins *et al.* (2016) para a extração em bagaço de uva tinta, tanto sem enzimas, como com a utilização de celulase e pectinase, com metanol como solvente (50,9 e 51,8 mg GAE/g, respectivamente).

Christman *et al.* (2018) reportaram que o teor de fenólicos totais para extratos da pele de amendoim encontrados na literatura varia entre 90 e 160 mg/g, a depender da forma de extração. Os valores encontrados para os extratos etanólicos de pele de amendoim sem biotransformação ficaram próximos ao reportado por

Lewis *et al.* (2013) – 51,8 mg GAE/g de amostra – para extratos da pele de amendoim com extração em etanol 90%.

Os valores apresentados na Tabela 5 são referentes ao teor de fenólicos totais por grama de extrato liofilizado. É possível correlacionar ainda o teor de fenólicos totais com o rendimento obtido para os extratos e obter a quantidade total de fenólicos extraídos por grama de resíduo, sendo esses: 12,647 (UTe5), 21,807 (UEe5), 47,623 (PAe5) e 53,326 (PEe5) mg GAE/g de amostra. Diante disso, é possível verificar que a quantidade de fenólicos extraídos com as enzimas foi 72% maior para o extrato do bagaço de uva tinta e 12% maior para o extrato da pele de amendoim, quando comparados com o respectivo extrato controle. O menor teor de fenólicos totais nos extratos pode ser atribuído principalmente à ação das enzimas pectinase e celulase, cuja atividade pode propiciar a liberação de compostos fenólicos e, simultaneamente, a liberação de outros compostos da matriz, como macromoléculas de carboidratos e lipídeos, diluindo assim a concentração de fenólicos nos extratos liofilizados.

Em estudos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa, como o publicado por Martins *et al.* (2017), foi observado que o tratamento utilizando tanase produzida no laboratório apresentou resultados positivos para o aumento do teor de fenólicos em extrato do bagaço de uva tinta (39%), tornando-a mais eficaz para a obtenção de extratos com maior teor de fenólicos que as enzimas comerciais utilizadas neste trabalho. Esse resultado pode ser atribuído à forma de ação dessa enzima, que atua principalmente em ligações éster ou terminais em taninos e galatos de catequinas, promovendo maior liberação de fenólicos sem aumentar a liberação de outros compostos da matriz.

Considerando os valores apresentados e a correlação anteriormente discutida entre o teor de fenólicos totais e o potencial para inibição da ECA, optou-se pela utilização dos extratos etanólicos com tempo de reação de cinco horas (UTe5, UEe5, PAe5 e PEE5) para os demais testes deste trabalho. A escolha destes extratos foi motivada pelo maior valor de fenólicos totais, embora sem diferença significativa dos extratos com reação de uma hora para a maioria das amostras. Considerando ainda o melhor resultado para a amostra PAe5 nesse tempo de reação.

5.2.1 Teor de flavonoides e antocianinas monoméricas

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos para o teor de flavonoides totais e de antocianinas monoméricas.

Tabela 6: Teor de Flavonoides totais (mg QUE/g extrato) e de Antocianinas monoméricas (mg C3G/g extrato) nos extratos obtidos com extração alcoólica com tempo de reação de 5 horas.

Extrato	Flavonoides totais	Antocianinas monoméricas
UTe5	2,58±0,13 ^a	3,74±0,15 ^d
UEe5	1,86±0,13 ^b	0,42±0,02 ^e
PAe5	4,59±0,32 ^c	-
PEe5	2,60±0,10 ^{a,b}	-

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores com a mesma letra e mesma coluna não possuem diferença significativa ($p \leq 0,05$). UTe5: uva tinta, UEe5: uva tinta com biotransformação, PAe5: pele de amendoim e PEE5: pele de amendoim com biotransformação.

Conforme esperado, considerando o teor de fenólicos totais, o maior valor para o teor de flavonoides foi encontrado no extrato PAe5 (77% maior que o valor encontrado para UTe5). Em ambas as amostras os extratos biotransformados apresentaram menor teor de flavonoides, 27% e 43% para UEe5 e PEE5, respectivamente. Entretanto, apesar de ser empregado na literatura para quantificação e flavonoides totais, o método proposto possui certas limitações. Marcucci *et al.* (2021) destaca que métodos desse tipo são mais eficientes para comparação entre amostras que para quantificação exata da concentração dos compostos, sendo nesse caso mais recomendado métodos analíticos mais complexos. Os autores destacam ainda que a utilização da quercetina como padrão é mais bem aplicada para amostras com maior teor de flavonoides na forma aglicona, enquanto que a utilização da rutina, recomendada pela farmacopeia alemã, é mais adequada para flavonoides glicosilados. Isso condiz com o relatado por Dowd (1959), que afirma bons resultados encontrados para determinação de quercetina aglicona em alimentos.

As limitações encontradas para o método de determinação de flavonoides totais empregado podem justificar a divergência entre o valor obtido para esse e o valor para antocianinas totais, que foi superior.

Quanto ao teor de antocianinas monoméricas, só foi detectado nos extratos de uva tinta, sendo que o valor encontrado para o extrato biotransformado foi pouco mais de 10% do valor encontrado no extrato comum, o que pode indicar uma possível degradação desses compostos durante o tratamento enzimático. Kammerer *et al.* (2005), atribuíram essa degradação à hidrólise de glicosídeo ou

desesterificação de antocianinas aciladas, embora a degradação encontrada no referido trabalho tenha sido menor que a encontrada no presente.

O valor encontrado para o extrato UTe5 foi superior aos valores reportados por Deng, Penner e Zhao (2011), que variou entre 0,29 e 1,42 mg M3G/g (equivalentes em malvidina-3-glicose) e dentro da faixa de valores reportados por Rockenbach *et al.* (2011), que variou entre 2,89 e 9,34 mg C3R/g (equivalente em cianidina-3-rutinosídeo), ambos para amostras de uvas tintas.

5.3 Capacidade antioxidante

A tabela 7 apresenta os valores obtidos nos diferentes métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos extratos selecionados.

Tabela 7: Capacidade antioxidante encontrada nos extratos obtidos com extração alcoólica com tempo de reação de 5 horas, pelos diferentes métodos. Valores expressos em mg TE/g extrato.

Extrato	DPPH	ORAC	FRAP
UTe5	161±10,6 ^a	607±21,2 ^c	126±10,8 ^e
UEe5	175±15,6 ^a	649±1,27 ^c	121±8,72 ^e
PAe5	871±22,9 ^b	1844±78,4 ^d	550±23,5 ^f
PEe5	725±60,9 ^b	1469±89,2 ^d	432±19,4 ^g

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores com a mesma letra e mesma coluna não apresentam diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). UTe5: uva tinta, UEe5: uva tinta com biotransformação, PAe5: pele de amendoim e PEE5: pele de amendoim com biotransformação.

Para a capacidade antioxidante pelo método DPPH, o maior valor obtido foi de 871 mg TE/g (PAe5) e o menor foi de 161 mg TE/g (UTe5). Os valores encontrados para os extratos de uva tinta (161 e 175 mg TE/g) foram inferiores aos valores encontrados por Martins *et al.* (2017), que variaram entre 846,67 e 1328,81 mg TE/g para o extrato sem e com a utilização de tanase, respectivamente. Os valores encontrados para os extratos da pele do amendoim (725 e 871 mg TE/g) foram superiores aos reportados por Kim *et al.* (2021), que avaliaram o teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos obtidos de diferentes espécies da leguminosa e encontraram valores máximos entre 178,8 e 228,9 mg TE/g para os diferentes métodos de extração utilizados.

Os valores obtidos para a capacidade antioxidante pelo método ORAC variaram entre 607 (UTe5) e 1844 (PAe5) mg TE/g, sem diferença significativa entre os valores obtidos para os extratos comuns e os respectivos extratos enzimáticos. Para os extratos do bagaço de uva tinta os valores encontrados (607 e 649 mg TE/g) foram superiores ao encontrado por Martins *et al.* (2017) para o extrato sem

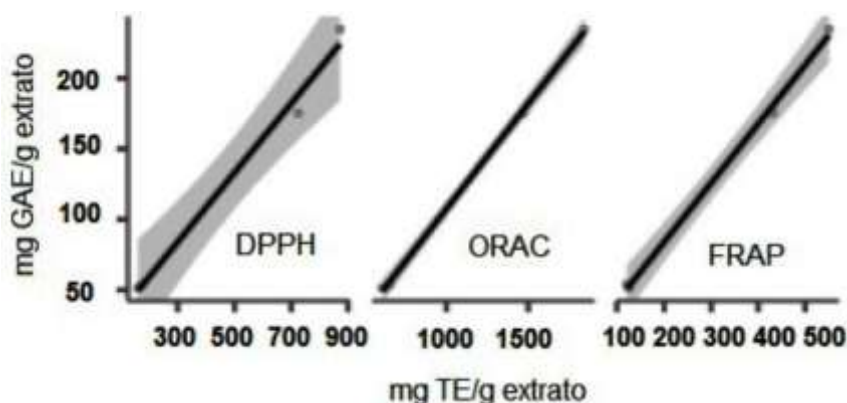
biotransformação (333,76 mg TE/g), porém inferiores ao valor obtido para o extrato biotransformado com a enzima tanase (1049,9 mg TE/g). Rasines-Perea *et al.* (2018) encontraram valores entre 407 e 518 mg TE/g para os extratos obtidos do bagaço de diferentes uvas tintas com etanol 70%. Já para os extratos da pele do amendoim, os valores obtidos (1469 e 1844 mg TE/g de extrato), quando expressos em miligrama por grama de amostra (446 e 424 mg TE/g de amostra, respectivamente), ficam próximos ao reportado por Lewis *et al.* (2013) (458 mg TE/g amostra).

O método FRAP apresentou valores de capacidade antioxidante entre 121 e 550 mg TE/g, correspondente aos extratos UEe5 e PAe5, respectivamente. Para os extratos do bagaço de uva não houve diferença significativa entre os valores encontrados no extrato controle e no biotransformado, enquanto que para os extratos da pele de amendoim houve diferença, com um menor valor para o extrato biotransformado. Os valores obtidos para os extratos de uva tinta (121 e 126 mg TE/g) foram inferiores aos reportados por Martins *et al.* (2017), que foram de aproximadamente 267,5 e 298,8 mg TE/g para o extrato controle e o extrato tratado com a enzima tanase, respectivamente.

Conforme Figura 6, o teste de correlação de Pearson apresentou correlação positiva e significativa entre o teor de fenólicos totais e os valores para capacidade antioxidantes para todos os métodos (DPPH: $r=0,994$, $p<0,01$; ORAC: $r=1,000$, $p<0,001$; FRAP: $r=0,999$, $p<0,05$).

A alta correlação encontrada indica que o método de extração empregado para as amostras se mostra eficaz na extração de fenólicos com alta capacidade antioxidante frente a radicais de natureza diversa e utilizando métodos de sequestro diferentes.

Figura 6: Correlação entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante pelo método de Pearson.



A alta capacidade antioxidante pode ainda contribuir beneficamente no auxílio do controle da hipertensão arterial por meio da redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) circulantes.

EROs são geradas de diferentes formas no organismo, como a respiração celular, ação de enzimas, ou produtos de cascatas de reações como o SRAA. O estresse oxidativo é o desbalanço entre a produção desses compostos e a capacidade do corpo em neutralizá-los, levando ao aumento de EROs no organismo. Há indícios de correlação entre o estado de estresse oxidativo e a hipertensão arterial e arteriosclerose, dentre eles a redução da biodisponibilidade de vasodilatadores, inflamação vascular e aumento na liberação da ECA (AHMAD; YUAN YUAN; NAWAZ; ZE *et al.*, 2017; SINHA; DABLA, 2015; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Siti, Kamisah e Kamsiah (2015) afirma que estudos maiores para o tratamento clínico com antioxidantes não apresentaram resultados significativos para a prevenção de doenças cardiovasculares. Todavia, os autores destacam que o efeito antioxidante e anti-inflamatório encontrado em medicamentos anti-hipertensivos e estatinas podem motivar maiores estudos na utilização de compostos antioxidantes no suporte ao tratamento dessas doenças.

Estudo realizado por da Costa *et al.* (2012) encontrou efeito anti-hipertensivo para o extrato fenólico de *Euterpe oleracea Mart.* em ratos. Um dos mecanismos de ação indicado pelos autores é o efeito antioxidante do extrato. Já Ahmad *et al.* (2017) sugere que o possível efeito anti-hipertensivo dos polifenóis pode ser atribuído à sua ação como quelante de metais, à sua capacidade de

sequestro de radicais livres ou ao estímulo de enzimas endógenas de ação antioxidantes.

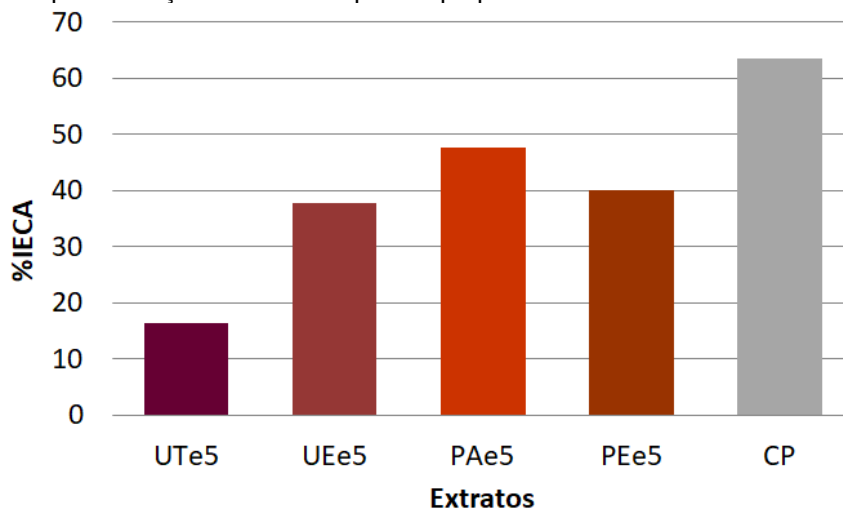
De forma geral, os extratos da pele de amendoim apresentaram resultados muito superiores aos obtidos para os extratos de uva tinta para a capacidade antioxidante, conforme o esperado, considerando o maior teor de fenólicos totais. Para os ensaios de DPPH e ORAC não foi encontrada diferença significativa entre os extratos comuns e seus respectivos extratos biotransformados, para ambas as amostras. Enquanto que para o ensaio pelo método FRAP houve diferença significativa entre os extratos da pele de amendoim, com menor valor apresentado pelo extrato biotransformado (PEe5).

Os resultados apresentados indicam que a utilização das enzimas comerciais não se mostrou eficiente para obtenção de extratos com maior concentração de compostos fenólicos, que apresentem maior atividade antioxidante. Resultados diferentes foram encontrados por Christofolletti (2021) e Martins *et al.* (2017; 2016), que obtiveram extratos do bagaço de uva tinta biotransformados por tanase produzida no laboratório e reportaram aumento do teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante. O objetivo da substituição da tanase produzida no laboratório por enzimas comerciais para obtenção dos extratos biotransformados foi possibilitar a produção desses em escala maior, porém essas não apresentaram os mesmos benefícios no que diz respeito ao aumento do teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante para os resíduos avaliados.

5.4 Potencial para inibição da ECA

Para realização do ensaio de inibição da enzima conversora de angiotensina I foram utilizadas soluções de 100 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos do bagaço de uva tinta e 50 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos da pele de amendoim, os resultados estão apresentados na Figura 7. Optou-se pela utilização de concentrações diferentes para os extratos considerando-se o teor de fenólicos totais encontrado nesses e os estudos anteriormente citados que correlacionam esse teor à capacidade na inibição da ECA.

Figura 7: Valores percentuais relativos de inibição da atividade da ECA pelos extratos alcoólicos com tempo de reação e 5 horas e pelo captopril.



UTe5 e UEe5: extratos de uva tinta, concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. PAe5 e PEe5: extratos de pele de amendoim, concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. CP: captopril, concentração de 50 ng/mL .

O maior valor para %IECA foi obtido com o extrato PAe5 (47,52%), seguido por PEe5 (39,95%), UEe5 (37,86%) e UTe5 (16,45%), indicando um possível potencial anti-hipertensivo para os extratos avaliados. Para o controle positivo, foi utilizada solução de captopril na concentração de 50 ng/mL , e obtido inibição de 63,45% da atividade enzimática.

O valor de inibição encontrado para UEe5 foi superior a 2 vezes o encontrado para UTe5, sugerindo que, embora o processo de biotransformação enzimática não tenha apresentado diferença significativa no teor de fenólicos totais e potencial antioxidante dos extratos, houve alteração na capacidade de interação dos compostos do extrato biotransformado e a ECA. Para o extrato de amendoim, essa alteração também pode ser observada, embora em menor proporção, considerando

que o teor de fenólicos totais em PEE5 é cerca de 25% menor que em PAe5, enquanto que a diferença de %IECA entre esses extratos foi de 15%.

Isso indica que o potencial para inibição da ECA não está correlacionado apenas com a quantidade de fenólicos, mas também com sua disponibilidade para interação com a enzima, e condiz com o que foi encontrado por Eriz *et al.* (2011). Os autores estudaram o potencial para inibição da ECA de proantocianidinas extraídas de pele e semente de uva preta chilena, tendo como resultado uma maior inibição para o extrato da casca da uva, embora o extrato da semente apresentasse maior concentração do composto. Esse resultado foi atribuído à maior quantidade de grupos hidroxilas, à maior ocorrência de epigallocatequinas e ao menor grau de polimerização das proantocianidinas encontrados no extrato da casca.

Resultado similar foi encontrado por Nwanna *et al.* (2014) em estudo realizado para identificar o potencial de inibição da enzima por extratos de diferentes frutos da espécie *Solanun aethiopium*, encontrando maior inibição para o extrato de jurubeba, que apresentou o menor teor de fenólicos totais. Esse resultado foi atribuído à quantidade maior de determinados tipos de fenólicos presentes no extrato, em relação aos demais.

Para o captopril, os valores de inibição encontrados na literatura são variáveis. Xie e Zhang (2012) relataram inibição de 50% da atividade de ECA (IC₅₀) na concentração de 15,16 ng/mL para essa droga, enquanto que o valor de IC₅₀ encontrado por Mao *et al.* (2015) foi de 11,69 ng/mL.

6 CONCLUSÃO

O processo de extração enzimática não apresentou diferença significativa no teor de fenólicos totais entre os extratos do bagaço de uva e um teor menor no extrato biotransformado de amendoim, em comparação ao respectivo controle. Isso pode ser atribuído à ação das enzimas no aumento da extração de outros compostos presentes na matriz, diluindo a concentração de fenólicos totais nos extratos.

A extração com etanol na concentração final de 50% se mostrou mais adequada para obtenção de compostos bioativos nessas matrizes.

Entre as duas fontes estudadas, a pele de amendoim apresentou resultados superiores aos obtidos para o bagaço de uva, demonstrando seu potencial como fonte de compostos para uso como ingredientes funcionais.

Os extratos apresentaram correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, indicando que as amostras podem ser consideradas boas fontes de compostos fenólicos com alta capacidade antioxidante.

Para o potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina I, os extratos de amendoim apresentaram melhores resultados. O extrato do bagaço de uva tinta biotransformado (UEe5) apresentou inibição da ECA superior ao extrato controle, na mesma concentração.

Os resultados de inibição da ECA apontam que o teor de fenólicos presentes nos extratos tem relação direta com essa atividade, porém, também indicam que os tipos e a disponibilidade desses compostos influenciam positivamente na inibição.

Os resultados encontrados apontam para a viabilidade de utilização dos resíduos industriais oriundos da vinificação e da produção de produtos de amendoim para obtenção de compostos bioativos de interesse, melhorando o aproveitamento e agregando valor aos subprodutos dessas atividades. A biotransformação enzimática se mostrou mais eficaz para o aumento do potencial de inibição da ECA pelo extrato de uva tinta, cujo extrato biotransformado apresentou o dobro dessa atividade, em relação ao controle.

Dentre os extratos obtidos e avaliados neste trabalho, o extrato etanólico da pele de amendoim sem a utilização de enzimas e com tempo de reação de 5h (PAe5) apresentou os melhores resultados em todos os ensaios realizados.

7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Estudo de melhorias do processo de extração enzimática utilizado pode ser realizado, conforme proposto por Kammerer *et al.* (2005), que utilizaram o tratamento enzimático na segunda etapa da extração sequencial, de forma a extrair parte dos fenólicos antes da adição das enzimas, e obtiveram melhores resultados no processo.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser realizada para identificação do perfil fenólico em cada um dos extratos e identificar as alterações provocadas pelo tratamento enzimático que podem explicar a alteração do potencial de inibição da ECA pelo extrato biotransformado do bagaço de uva.

Adicionalmente, os resultados encontrados podem ser utilizados como base para a realização de mais estudos do potencial anti-hipertensivo dos extratos do bagaço de uva tinta e pele de amendoim. Dentre eles, a identificação do IC₅₀ para esses extratos e a realização de ensaios *ex vivo* e *in vivo*, conforme proposto por Mao *et al.* (2015).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEFEGHA, S. A.; OYELEYE, S. I.; OBOH, G. Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts In Vitro. **Biochem Res Int**, 2015, p. 1-8, 2015.

AGUNLOYE, O. M.; OBOH, G. Effect of Different Processing Methods on Antihypertensive Property and Antioxidant Activity of Sandpaper Leaf (*Ficus exasperata*) Extracts. **J Diet Suppl**, 15, n. 6, p. 871-883, 2018.

AHA. **Understanding Blood Pressure Readings**. American Heart Association, www.heart.org, 2021. Disponível em: <https://www.heart.org/en/health-topics/high-blood-pressure/understanding-blood-pressure-readings>. Acesso em: 01 out 2021.

AHMAD, K. A.; YUAN YUAN, D.; NAWAZ, W.; ZE, H. *et al.* Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. **Free Radic Res**, 51, n. 4, p. 428-438, Apr 2017.

AJEBLI, M.; EDDOUKS, M. Phytotherapy of Hypertension: An Updated Overview. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, 20, n. 6, p. 812-839, 2020.

AKYOL, H.; RICIPUTI, Y.; CAPANOGLU, E.; CABONI, M. F. *et al.* Phenolic Compounds in the Potato and Its Byproducts: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, n. 6, 2016.

AMBIGAIPALAN, P.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F. Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, n. 34, p. 6584-6604, 2016.

ANDRÉS-LACUEVA, C.; MEDINA-RAMON, A.; LLORACH, R.; URPI-SARDA, M. *et al.* Phenolic compounds: Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *In*: DE LA ROSA, L. A.; ALVEREZ-PARRILHA, E., *et al.* (Ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 2, p. 53-88.

ARYA, S. S.; SALVE, A. R.; CHAUHAN, S. Peanuts as functional food: a review. **J Food Sci Technol**, 53, n. 1, p. 31-41, 2016.

AVILA, A. R. A.; QUEIRÓS, L. D.; LOPES, D. B.; BARIN, C. G. *et al.* Enhanced estrogenic effects of biotransformed soy extracts. **Journal of Functional Foods**, 48, p. 117-124, 2018.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Fruit and fruit products. *In: Food chemistry*. 4th rev. and extended ed. ed. Berlin: Springer, 2009. cap. 18, p. 807-861.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERES, C.; COSTA, G. N. S.; CABEZUDO, I.; DA SILVA-JAMES, N. K. *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, 68, p. 581-594, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

CAMARGO, A. C. D.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Low Molecular Weight Phenolics of Grape Juice and Winemaking Byproducts: Antioxidant Activities and Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein Cholesterol and DNA Strand Breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, n. 50, p. 12159-12171, 2014.

CARIBE, J.; CAMPOS, J. M. **Plantas que ajudam o homem: guia prático para a época atual**. 5ª ed. ed. São Paulo: Pensamento-Cultrix, 1997. 321 p. p., Non-fiction. 8531505135.

CHAMORRO, S.; VIVEROS, A.; ALVAREZ, I.; VEGA, E. *et al.* Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. **Food Chemistry**, 133, n. 2, p. 308-314, 2012.

CHRISTMAN, L. M.; DEAN, L. L.; ALLEN, J. C.; GODINEZ, S. F. *et al.* Peanut skin phenolic extract attenuates hyperglycemic responses in vivo and in vitro. **PLoS One**, 14, n. 3, p. e0214591, 2019.

CHRISTMAN, L. M.; DEAN, L. L.; BUENO ALMEIDA, C.; WEISSBURG, J. R. Acceptability of Peanut Skins as a Natural Antioxidant in Flavored Coated Peanuts. **J Food Sci**, 83, n. 10, p. 2571-2577, Oct 2018.

CHRISTOFOLETTI, C. R. **Avaliação do potencial antiobesogênico e anti-inflamatório de extratos fenólicos biotransformados de resíduos de uvas**. 2021. 150 f. (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/2151>. Acesso em: 16 jan. 2022.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. (Doutorado) -, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

DA COSTA, C. A.; DE OLIVEIRA, P. R. B.; DE BEM, G. F.; DE CAVALHO, L. C. R. M. *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 385, n. 12, p. 1199-1209, 2012.

DAVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **J Agric Food Chem**, 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, 44, n. 9, p. 2712-2720, 2011.

DOSHI, P.; ADSULE, P.; BANERJEE, K.; OULKAR, D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. **Journal of Food Science and Technology**, 52, n. 1, p. 181-190, 2015.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959.

DUKE, J. A. **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. Boca Rato, FL: CRC Press, 1987. 677 p. p. 0-8493-3630-9.

ERIZ, G.; SANHUEZA, V.; ROECKEL, M.; FERNÁNDEZ, K. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinifera* L. cv. País. **LWT - Food Science and Technology**, 44, n. 4, p. 860-865, 2011.

FAO. **FAOSTAT: production quantity**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 04 out 2021.

FERREIRA, L. R.; MACEDO, J. A.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Food Research International**, 51, n. 2, p. 526-535, 2013.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 00, n. 1, p. F1.2.1-F1.2.13, 2021/12/05 2001.

HO, C.-T.; RAFI, M. M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. *In*: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L., *et al* (Ed.). **Química de alimentos de Fennema**. 4ª ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 12, p. 585 - 608.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais. *In*: **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. cap. 1, p. 9-42. (Série de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV).

HUNG, W. C.; LING, X. H.; CHANG, C. C.; HSU, H. F. *et al*. Inhibitory Effects of Siegesbeckia orientalis Extracts on Advanced Glycation End Product Formation and Key Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Molecules**, 22, n. 10, p. 1785-1803, 2017.

IRONDI, E. A.; AGBOOLA, S. O.; OBOH, G.; BOLIGON, A. A. *et al*. Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro. **J Intercult Ethnopharmacol**, 5, n. 2, p. 122-130, 2016.

JAMOVI. **The jamovi project. jamovi**. Versão 1.6.23. <https://www.jamovi.org/>: 2021.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **J Agric Food Chem**, 52, n. 14, p. 4360-4367, 2004.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. A Novel Process for the Recovery of Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace. **Journal of Food Science**, 70, n. 2, p. C157-C163, 2021/12/14 2005.

KESSY, H. N. E.; WANG, K.; ZHAO, L.; ZHOU, M. *et al*. Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity. **LWT - Food Science and Technology**, 87, p. 301-309, 2018.

KIM, M. Y.; KIM, H. J.; LEE, Y. Y.; KIM, M. H. *et al*. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extracts of various cultivars in oxidative-damaged HepG2 cells and LPS-induced raw 264.7 macrophages. **Food Sci Nutr**, 9, n. 2, p. 973-984, Feb 2021.

KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Genética na hipertensão arterial. *In*: BRANDÃO, A.; AMODEO, C., *et al* (Ed.). **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 2, p. 17-23.

LEWIS, W. E.; HARRIS, G. K.; SANDERS, T. H.; WHITE, B. L. *et al*. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Peanut Skin Extracts. **Food and Nutrition Sciences**, 4, n. 8, p. 22, 2013-07-26 2013. Article.

LOPES, D. B.; DE QUEIRÓS, L. D.; DE ÁVILA, A. R. A.; MONTEIRO, N. E. S. *et al*. Chapter 2 - The Importance of Microbial and Enzymatic Bioconversions of Isoflavones in Bioactive Compounds. *In*: GRUMEZESCU, A. e HOLBAN, A. M. (Ed.). **Food Bioconversion**: Academic Press, 2017. p. 55-93.

MA, Y.; KERR, W. L.; SWANSON, R. B.; HARGROVE, J. L. *et al*. Peanut skins-fortified peanut butters: effect of processing on the phenolics content, fibre content and antioxidant activity. **Food Chem**, 145, p. 883-891, Feb 15 2014.

MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, 126, n. 2, p. 491-497, 2011.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, 112, n. 3, p. 551-559, 2009.

MAO, L. M.; QI, X. W.; HAO, J. H.; LIU, H. F. *et al*. In vitro, ex vivo and in vivo anti-hypertensive activity of *Chrysophyllum cainito* L. extract. **Int J Clin Exp Med**, 8, n. 10, p. 17912-17921, 2015.

MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; OLIVEIRA, L. F. A. M.; GONÇALVES, C. P. Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis

Totais em Própolis. **Rev. Virtual Quim.**, 13, n. 1, p. 1 - 13, 2021.

MARTINS, I. M.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; ROBERTO, B. S. *et al*. Tannase enhances the anti-inflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1 β . **Journal of Functional Foods**, 29, p. 69-76, 2017.

MARTINS, I. M.; ROBERTO, B. S.; BLUMBERG, J. B.; CHEN, C. Y. O. *et al*. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. **Food Research International**, 89, p. 533-539, 2016.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -Glucosidases from Soybeans That Hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 59, n. 9, p. 1623-1627, 1995.

MCDONALD, A. G.; BOYCE, S.; TIPTON, K. F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. **ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list**, 37, p. D593-D597, 2009.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J. *et al.* Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M. *et al.* Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, n. 6, p. 687-693, 2006.

MUGABO, P.; RAJI, I. A. Effects of aqueous leaf extract of *Asystasia gangetica* on the blood pressure and heart rate in male spontaneously hypertensive Wistar rats. **BMC Complement Altern Med**, 13, p. 283-289, 2013.

NWANNA, E. E.; IBUKUN, E. O.; OBOH, G.; ADEMOSUN, A. O. *et al.* HPLC-DAD Analysis and In-Vitro Property of Polyphenols Extracts from (*Solanum Aethiopium*) Fruits on alpha -Amylase, alpha -Glucosidase and Angiotensin - 1- Converting Enzyme Activities. **Int J Biomed Sci**, 10, n. 4, p. 272-281, 2014.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; AGUNLOYE, O. M.; ADEMOSUN, A. O. *et al.* Inhibitory Effect of Garlic, Purple Onion, and White Onion on Key Enzymes Linked with Type 2 Diabetes and Hypertension. **J Diet Suppl**, p. 1-14, 09 mar 2018.

OBOH, G.; ADEMOSUN, A. O.; ADEMILUYI, A. O.; OMOJOKUN, O. S. *et al.* In Vitro Studies on the Antioxidant Property and Inhibition of alpha-Amylase, alpha-Glucosidase, and Angiotensin I-Converting Enzyme by Polyphenol-Rich Extracts from Cocoa (*Theobroma cacao*) Bean. **Patholog Res Int**, 2014, p. 6p., 2014.

OGEDEGBE, G.; PICKERING, T. G. Epidemiology of hypertension. *In*: FUSTER, V.; WALSH, R. A., *et al* (Ed.). **Hurst's the heart**. 13^a ed ed. New York: McGrawHill, 2011. v. 2, cap. 68, p. 1533-1605.

OLDONI, T. L.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; MORENO, I. A. *et al.* Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chem**, 192, p. 306-312, Feb 1 2016.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A. *et al.* Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J Agric Food Chem**, 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A. *et al.* An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

RAMOS, P. A. B.; MOREIRINHA, C.; SILVA, S.; COSTA, E. M. *et al.* The Health-Promoting Potential of *Salix* spp. Bark Polar Extracts: Key Insights on Phenolic Composition and In Vitro Bioactivity and Biocompatibility. **Antioxidants (Basel)**, 8, n. 12, p. 609-634, Nov 30 2019.

RASINES-PEREA, Z.; KY, I.; CROS, G.; CROZIER, A. *et al.* Grape Pomace: Antioxidant Activity, Potential Effect Against Hypertension and Metabolites Characterization after Intake. **Diseases**, 6, n. 3, Jul 6 2018.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. D. S. S. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, 44, n. 4, p. 897-901, 2011.

RUVIARO, A. R.; BARBOSA, P. D. P. M.; MACEDO, G. A. Enzyme-assisted biotransformation increases hesperetin content in citrus juice by-products. **Food Research International**, 04 mai 2018.

RUVIARO, A. R.; BARBOSA, P. D. P. M.; MARTINS, I. M.; DE ÁVILA, A. R. A. *et al.* Flavanones biotransformation of citrus by-products improves antioxidant and ACE inhibitory activities in vitro. **Food Bioscience**, 38, p. 100787, 2020.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V. B. Papel do sistema renina-angiotensina. *In*: BRANDÃO, A.; AMODEO, C., *et al* (Ed.). **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 3.6, p. 66-75.

SCHMIDT, T. J. Bioquímica dos hormônios. *In*: DEVLIN, T. M. (Ed.). **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 7. ed. trad. americana. ed. São Paulo: Blucher, 2011. p. 908-960.

SHAFAEI, A.; SULTAN KHAN, M. S.; A, F. A. A.; ABDUL MAJID, A. M. *et al.* Flavonoids-Rich *Orthosiphon stamineus* Extract as New Candidate for Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition: A Molecular Docking Study. **Molecules**, 21, n. 11, p. 1500-1516, 2016.

SHARIFI, N.; SOURI, E.; ZIAI, S. A.; AMIN, G. *et al.* Isolation, identification and molecular docking studies of a new isolated compound, from *Onopordon acanthium*: a novel angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. **J Ethnopharmacol**, 148, n. 3, p. 934-939, 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Enzymatic Assay of Angiotensin Converting Enzyme**. SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE, Saint Louis, EUA., 1998. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/122/795/a6778enz.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2021.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am J Enol Vitic**, 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SINHA, N.; DABLA, P. K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. **Curr Hypertens Rev**, 11, n. 2, p. 132-142, 2015.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascul Pharmacol**, 71, p. 40-56, Aug 2015.

SULTANA, R.; ALASHI, A. M.; ISLAM, K.; SAIFULLAH, M. *et al.* Inhibitory Activities of Polyphenolic Extracts of Bangladeshi Vegetables against α -Amylase, α -Glucosidase, Pancreatic Lipase, Renin, and Angiotensin-Converting Enzyme. **Foods**, 9, n. 7, p. 844-857, Jun 29 2020.

TANG, Y.-Y.; HE, X.-M.; SUN, J.; LI, C.-B. *et al.* Polyphenols and Alkaloids in Byproducts of Longan Fruits (*Dimocarpus Longan* Lour.) and Their Bioactivities. **Molecules**, 24, n. 6, 2019.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D.; KUDDUS, M. Chapter 3 - Enzymes in the Beverage Industry. *In: Enzymes in Food Biotechnology*: Academic Press, 2019. p. 29-43.

VALDEZ-MORALES, M.; ESPINOSA-ALONSO, L. G.; ESPINOZA-TORRES, L. C.; DELGADO-VARGAS, F. *et al.* Phenolic Content and Antioxidant and Antimutagenic Activities in Tomato Peel, Seeds, and Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, n. 23, p. 5281-5289, 2014.

VICTOR, R. G.; KAPLAN, N. M. Hipertensão Sistêmica: mecanismos e diagnósticos. *In: LIBBY, P.; BONOW, R., et al (Ed.). Braunwald: tratado de medicina cardiovascular*. 8ª ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. v. 1, cap. 40, p. 1027-1048.

WHO. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO Graphics, 1999. 289 p. p. 92-4-154517-8.

WHO. **A global brief on hypertension**. Geneva: WHO Press, 2013. DOI /entity/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/index.html. 40 p. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/. Acesso em: 2013-11-25 11:54:13.

WHO. Blood Pressure. **Global Health Observatory data**, 2015.

WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, 1, n. 2, p. 147-161, 1990.

XIE, Y.; ZHANG, W. Antihypertensive activity of Rosa rugosa Thunb. flowers: angiotensin I converting enzyme inhibitor. **J Ethnopharmacol**, 144, n. 3, p. 562-566, 2012.

XU, C.; YAGIZ, Y.; BOREJSZA-WYSOCKI, W.; LU, J. *et al.* Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) skins and seeds. **Food Chem**, 157, p. 20-29, Aug 14 2014.

YEON, S. J.; KIM, J. H.; CHO, W. Y.; KIM, S. K. *et al.* In Vitro Studies of Fermented Korean Chung-Yang Hot Pepper Phenolics as Inhibitors of Key Enzymes Relevant to Hypertension and Diabetes. **Foods**, 8, n. 10, p. 498-506, Oct 14 2019.