

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Amêndoa de pêssego: Atividade de β -glucosidases e composição físico-química e fitoquímica do óleo extraído por diferentes métodos

Roseane Farias D'Avila

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

D259a D'Avila, Roseane Farias

Amêndoa de pêssego : atividade de β -Glucosidases e composição físico-química e fitoquímica do óleo extraído por diferentes métodos / Roseane Farias D'Avila ; orientador Rui Carlos Zambiasi.- Pelotas,2013.-102f. : il. - Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

ROSEANE FARIAS D'AVILA

**AMÊNDOA DE PÊSSEGO: ATIVIDADE DE β -GLUCOSIDASES E COMPOSIÇÃO
FÍSICO-QUÍMICA E FITOQUÍMICA DO ÓLEO EXTRAÍDO POR DIFERENTES
MÉTODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

Pelotas, 2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi – UFPel (Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Ricardo Peraça Toralles - IFSUL

Prof^a. Dr^a. Carla Rosane Barboza Mendonça - UFPel

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força que sempre me inspirou.

À minha mãe, Maria Alda, por nunca ter me deixado perder a fé, por me dar todo o suporte que precisei, estando sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, Moacir, por sempre acreditar tanto em mim e tentar me entender.

Ao professor Rui Zambiasi pela orientação, pelas oportunidades concedidas e se fazer presente com conselhos e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de Cromatografia, em especial Cleonice Gonçalves da Rosa e Vanessa Pestana-Bauer pelos ensinamentos no início do mestrado e pela amizade; e à Josiane Kuhn Rutz, Michele Crizel-Cardozo, Francine Bueno-Costa, Fabiana Goularte-Dutra, Mariângela Bruscatto, Scharlise Diovarella, Alessandra Haertel e Suzan Freda pelo ótimo convívio, amizade e discussões sobre metodologias. Às estagiárias Naralice Hartwig, Fernanda Krumreich, Vanessa Einhardt, Suzane Luz e Tássia Nievierowski pela ajuda e companheirismo. E aos demais que já estiveram presentes no Laboratório de Cromatografia, pois todos contribuíram para meu crescimento.

Aos colegas e amigos do DCTA, amizades novas e antigas que continuaram e se aprofundaram neste período. Ao Diego Zeni, que me ajudou a obter o material de estudo.

Ao IFSUL, professor Ricardo Toralles e sua estagiária, Priscila Sá, pela ajuda nas análises de atividade enzimática.

Aos participantes da banca pela disponibilidade.

À UFPEL, CCQFA, DCTA pela oportunidade para a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

“E eu compreendi o que ele havia buscado! A água era mais que um alimento, nascera da caminhada sob as estrelas, do canto da roldana, do esforço do meu braço. Era boa para o coração, como um presente.”

Antoine de Saint-Exupéry – O Pequeno Príncipe (1946)

Resumo

D'AVILA, Roseane Farias. **Amêndoa de pêssego: Atividade de β -glucosidases e composição físico-química e fitoquímica do óleo extraído por diferentes métodos.** 2013. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O óleo presente em amêndoas de pêssego apresenta alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, principalmente monoinsaturados, além de diferentes fitoquímicos, que em sua maioria ainda não foram estudados, como compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis, fitosteróis e amigdalina. Se, por um lado, a presença dos primeiros é altamente desejável em alimentos devido aos potenciais benéficos à saúde, o último possui molécula de cianeto em sua composição, o qual exerce efeito tóxico ao organismo humano. Nas amêndoas também estão presentes enzimas β -glucosidases, que hidrolisam a amigdalina, liberando cianeto de hidrogênio, que é altamente volátil. Por isto estas enzimas podem ser utilizadas para detoxificar alimentos que possuem glucosídeos cianogênicos. Deste modo, o objetivo desse estudo foi caracterizar o óleo de amêndoas de pêssego, obtido por dois métodos diferentes de extração, quanto à sua composição físico-química e de fitoquímicos e avaliar as condições ótimas para atividade de β -glucosidases presentes nas amêndoas. Observou-se diferenças na composição dos óleos quanto à presença de ácidos graxos livres, gliceróis e fitoquímicos. Compostos fenólicos, principalmente quercetina, α -tocoferol e fitosteróis, foram os fitoquímicos encontrados em maiores quantidades. Amigadalina foi detectada em ambas amostras. As enzimas estudadas apresentaram-se ativas em faixa de pH consideravelmente ampla (4 a 8) e mesmo a temperaturas mais elevadas (até 70°C).

Palavras chaves: Amêndoa de pêssego. Óleo. Ácidos graxos. Fitoquímicos. β -glucosidase.

Abstract

D'AVILA, Roseane Farias. **Peach almond: β -glucosidases activity and phytochemical and physico-chemical composition of oil extracted by different methods**. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The peach almond oil show a high content of unsaturated fatty acids, particularly monounsaturated, and various phytochemicals, wich mostly have not been studied, such as phenol compounds, carotenoids, tocopherols, phytosterols and amygdalin. The presence of the first four compound classes is highly desirable in foods due to potencial health benefits; however, the latter one possesses cyanide molecule in its composition, which is toxic to the humans. Almonds also contain β -glucosidases enzymes, which hydrolyze amygdalin, releasing hydrogen cyanide, that is highly volatile. Therefore, these enzymes can be used to detoxify cyanogenic foods. Thus, the aim of this study was to characterize the peach almond oil, obtained by two different extraction methods, to its phytochemical and physic-chemical composition and study the optimal conditions for activity of β -glucosidases present in almonds. There were differences in the composition of the oils for the presence of free fatty acids, glycerol and phytochemicals. Phenolic compounds, particularly quercetin, α -tocoferol and phytosterols were the phytochemicals found in higher quantities. Amygdalin was detected in both samples. The enzymes studied had activity in considerably wide pH range (4 to 8) and even at higher temperatures tested (until 70°C).

Key-words: Peach almond. Oil. Fatty acids. Phytochemicals. β -glucosidase.

Lista de Figuras

Figura 1. Endocarpo e mesocarpo de pêssgo (<i>Prunus persica</i>).....	15
Figura 2. Reação de oxidação lipídica	18
Figura 3. Reação entre oxigênio singlete e ácido graxo insaturado	19
Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides. a) Quercetina (flavonol) b) catequina (flavanol).....	21
Figura 5. a) Grupamentos que reagem com radicais (A) (B) (C) e b) Estabilização do radical peroxil pela doação de próton e ressonância	22
Figura 6. Ácidos fenólicos a) Ácido benzoico e seus derivados; b) Ácido cinâmico e seus derivados	22
Figura 7. Estrutura dos carotenoides a) zeaxantina e b) luteína	24
Figura 8. Estrutura genérica dos tocoferóis e substituintes do anel cromanol de α -, β -, γ - e δ -tocoferol	25
Figura 9. Ação antioxidante dos tocoferóis	26
Figura 10. Estrutura das moléculas de a) stigmastrol e b) β -sitosterol.....	27
Figura 11. Hidrólise de amigdalina de modo a liberar HCN	29
Figura 12. Mecanismos SN2 propostos para a ação de glicosidases. (I) Grupamentos carboxílicos atuando como ácido e base e (II) Grupamentos carboxílicos atuando como base e nucleófilo	31
Figura 13. Representação de β -glucosidases como a) linamarase, obtida de trevo branco, b) dhrurrinase 1, de sorgo e c) sobreposição das estruturas	32

CAPÍTULO I - Atividade de β -glucosidases em extrato enzimático bruto obtido de amêndoas de pêssgo

Figura 1. Cromatograma típico de amigdalina em amostra de amêndoa de pêssgo, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de água ultra pura: metanol. Detecção UV-Vis a 220nm	39
---	----

Figura 2. Atividade enzimática (a) e atividade enzimática específica (b) de β -glucosidase presente em amêndoa de pêssego, determinadas a pH 6 e temperatura de 35°C, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS ..	41
Figura 3. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glucosidase extraída de amêndoa de pêssego, medida em mmol.L-1 de glicose, , determinada utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol.L-1 e temperatura de 35°C, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS.....	43
Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -glucosidase extraída de amêndoa de pêssego, medida em mmol.L-1 de glicose, determinada utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol.L-1 e pH 6, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS	44

CAPÍTULO II - Avaliação da qualidade de óleo de amêndoa de pêssego – Propriedades físico-químicas e composição de fitoquímicos

Figura 1. Cromatograma típico de separação de di- e tri-acilgliceróis em óleo de amêndoa de pêssego, utilizando cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com detector FID a 380°C e coluna Zebron ZB-HT Capillary à temperatura inicial de 50°C e final de 370°C	62
Figura 2. Cromatograma de separação dos ácidos graxos que constituem o óleo de amêndoa de pêssego, utilizando cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com detector FID a 250°C e coluna ID Carbowax 20M à temperatura inicial de 90°C e final de 230°C. Os picos correspondem a: 1) Ácido mirístico; 2) Palmítico; 3) Esteárico; 4) Oleico; 5) Linoleico e 6) Behênico.....	63
Figura 3. Cromatograma de separação de compostos fenólicos em óleo de amêndoa de pêssego, utilizando HPLC equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A técnica utilizou gradiente de ácido acético 1%: metanol e a detector UV-Vis a 280 nm. Os picos identificados correspondem a: 1) Catequina; 2) Ácido hidroxibenzoico; 3) Ácido hidroxicinâmico; 4) Quercetina; 5) Ácido ferúlico e 6) Ácido elágico	67
Figura 4. Cromatograma dos carotenoides individuais presentes em óleo de amêndoa de pêssego, obtidos por separação em HPLC utilizando coluna de fase reversa ODS-30, gradiente de solventes metanol:acetonitrila:acetato de etila, detecção UV-Vis a 450nm. Os picos 1, 2 e 3 não foram identificados; o número 4 corresponde à zeaxantina e o 5 à luteína	69

Figura 5. Cromatograma típico de separação de α , δ e γ - tocoferóis em óleo de amêndoa de pêssago por HPLC utilizando coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS, gradiente de metanol:acetonitrila:isopropanol e detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290nm para excitação e de 330nm para a emissão. Os picos correspondem a: 1) δ -tocoferol; 2) γ -tocoferol; 3) α -tocoferol	71
Figura 6. Cromatograma de separação de fitosteróis presentes em óleo de amêndoa de pêssago, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de metanol e a identificação por detector UV-Vis a 205nm. Os picos correspondem a: 1) Stigmasterol; 2) β -sitosterol.....	72
Figura 7. Cromatograma de identificação de amigdalina presente em óleo de amêndoa de pêssago, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de água ultra pura: metanol. O pico foi identificado por detecção UV-Vis a 220nm.....	74

Apêndices e Anexos

Figura 1. Curva de Calibração de Compostos Fenólicos Totais, expressos em mg de Quercetina, analisados pelo método de Folin-Ciocalteu	97
Figura 2. Curva de Calibração de Açúcares Redutores, expressos em ppm de glicose, analisados pelo método de ácido 3,5 – Dinitrosalicílico	97
Figura 3. Curva de Calibração Externa de Amigdalina.....	99
Figura 4. Curva de Calibração Externa dos Fitoesteróis Beta-Sitosterol e Stigmasterol	99
Figura 5. Curva de Calibração Externa de Quercetina.....	100
Figura 6. Curva de Calibração Externa de Catequina	100
Figura 7. Curvas de Calibração Externa dos Ácidos fenólicos elágico, Ferúlico e Hidroxibenzoico	101
Figura 8. Curvas de Calibração Externa dos Ácidos Fenólicos Cafeico e Hidroxicinâmico	101
Figura 9. Curva de Calibração Externa de Luteína	102
Figura 10. Curvas de Calibração Externa dos Tocoferóis	102

Lista de Tabelas

CAPÍTULO II - Avaliação da qualidade de óleo de amêndoa de pêssego – Propriedades físico-químicas e composição de fitoquímicos

Tabela 1. Avaliações de qualidade de óleo extraído de amêndoa de pêssego por diferentes métodos.....	59
Tabela 2. Perfil de glicerídeos de óleo extraído de amêndoa de pêssego por diferentes métodos.....	61
Tabela 3. Composição (% relativo) em ácidos graxos de óleo extraído de amêndoa de pêssego.....	64
Tabela 4. Conteúdo total de compostos fenólicos, e conteúdo de compostos individuais em óleo de amêndoa de pêssego, extraídos por diferentes métodos de extração	66
Tabela 5. Conteúdo total de carotenoides e de carotenóides individuais em óleo de amêndoa de pêssego extraído por diferentes métodos.....	68
Tabela 6. Tocoferóis presentes em óleo de amêndoa de pêssego obtido por diferentes métodos de extração	70
Tabela 7. Fitosteróis presentes em óleo de amêndoa de pêssego obtido por diferentes processos de extração.....	72

Apêndice B

Tabela 1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glucosidase, medida em mmol.L ⁻¹ de glicose, extraída de amêndoa de pêssego, determinado utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol.L ⁻¹ e temperatura de 35°C, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS.....	98
Tabela 2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -glucosidase, medida em mmol/L de glicose, extraída de amêndoa de pêssego, determinado utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol/L e pH 6, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS	98

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Óleo de pêssego.....	15
1.2 Compostos Bioativos.....	19
1.2.1 Compostos Fenólicos.....	20
1.2.2 Carotenoides.....	23
1.2.3 Tocoferóis.....	24
1.2.4 Fitosteróis.....	26
1.3 Glicosídeos cianogênicos.....	27
1.3.1 Toxicidez dos glicosídeos cianogênicos.....	29
1.3.2 β -glucosidase.....	30
2. CAPÍTULO I - Atividade de β -glucosidases em extrato enzimático bruto obtido de amêndoas de pêssego.....	34
Resumo.....	34
1. Introdução.....	35
2. Materiais e Métodos.....	36
2.1 Determinação do teor de amigdalina nas amêndoas.....	36
2.2 Extração da enzima.....	37
2.3 Determinação do teor de proteínas no extrato.....	37
2.4 Efeito da concentração do Substrato.....	38
2.5 Efeito do pH.....	38
2.6 Efeito da Temperatura.....	38
2.7 Estatística.....	39
3. Resultados e Discussão.....	39
3.1 Teor de amigdalina nas amêndoas.....	39
3.2 Efeito da Concentração do Substrato.....	40
3.3 Efeito do pH.....	43

3.4 Efeito da temperatura.....	44
4. Conclusão.....	45
5. Referências.....	46
3. CAPÍTULO II - Avaliação da qualidade de óleo de amêndoa de pêssego : características físico-químicas e composição de fitoquímicos.....	49
Resumo.....	50
1. Introdução.....	51
2. Materiais e Métodos.....	52
2.1 Extração do óleo.....	52
2.2 Teor de acidez.....	52
2.3 Índice de peróxidos.....	53
2.4 Índice de ácido tiobarbitúrico.....	53
2.5 Perfil de glicerídeos.....	53
2.6 Composição em ácidos graxos.....	54
2.7 Matéria Insaponificável e Índice de Saponificação.....	54
2.8 Conteúdo de compostos fenólicos.....	55
2.9 Conteúdo de carotenoides.....	56
2.10 Tocoferóis.....	57
2.11 Fitosteróis.....	58
2.12 Amigdalina.....	58
2.13 Análise Estatística.....	58
3. Resultados e Discussão.....	59
4. Conclusão.....	75
5. Referências.....	75
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	84
5. REFERÊNCIAS.....	85
Apêndice A – Curvas de Calibração das Análises Espectrofotométricas.....	97
Apêndice B – Tabelas de efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de β -glucosidases.....	98
Apêndice C – Curvas de Calibração Análises Cromatográficas de Amigdalina e Fitoesteróis.....	99
Anexo A – Curvas de Calibração das Análises Cromatográficas de Compostos Fenólicos, Carotenoides e Tocoferóis.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

O pêssego (*Prunus persica*) classifica-se como uma fruta do tipo drupa de endocarpo lenhoso, pertencente à família *Rosaceae* (PEREZ, 2006). No Brasil, é produzido principalmente nos estados do sul, devido ao clima mais frio. O Rio Grande do Sul destaca-se como principal produtor no país (EMBRAPA, 2003), sendo que grande parte das frutas colhidas são destinadas à industrialização, ao contrário de estados como São Paulo, onde são consumidos na forma “in natura” (SATO, 2001).

Durante o processamento de conservas, a fruta passa por operações de corte e descaroçamento. O caroço resultante é geralmente considerado como resíduo industrial, embora possa também ser utilizado como biomassa para produção de energia térmica (DINIZ et al., 2004), na alimentação animal ou como matéria-prima para obtenção de um material poroso que pode ser utilizado em filtros de tratamento de efluentes. A amêndoa presente no interior do caroço apresenta potencial para utilização como alimento, devido aos teores de proteínas e lipídios, de 21 e 25% respectivamente, sendo o restante representado pela umidade, superior a 25%, fibras e carboidratos, que totalizam 24% (MEZZOMO, 2008).

Os compostos bioativos, também denominados de fitoquímicos, estão presentes em sua maioria em frutas e hortaliças e possuem atividade biológica, e estão relacionados na prevenção da ocorrência de doenças ao ser humano (HORST, LAJOLO, 2011). Apesar de haverem estudos determinando os níveis de compostos fenólicos totais e individuais e composição de ácidos graxos em óleo de pêssego extraído por solventes (WU et al., 2011), além da composição relativa de esteróis de óleo obtido por prensagem (UL'CHENKO et al., 2009), não existem dados sobre outros fitoquímicos que possam estar presentes neste produto.

Porém, as amêndoas contidas nos caroços de pêssego contêm o glicosídeo cianogênico amigdalina, o qual é precursor do ácido cianídrico. Os cianetos são compostos que inibem a citocromo oxidase durante o processo de respiração

celular. O consumo constante desta substância pode levar ao envenenamento crônico por cianeto (TAIZ e ZEIGER, 2004). Deste modo, é importante determinar os níveis residuais deste componente presentes em óleos obtidos de amêndoas de pêssego.

Além deste glicosídeo, nas amêndoas também ocorre a presença de enzimas que atuam sobre a amigdalina. Quando ocorre a ruptura das células, as enzimas β -glucosidase e hidroxinitrilo liase entram em contato com a amigdalina, resultando na formação de ácido cianídrico (HCN) (RODRIGUEZ et al., 2009), o qual é um produto altamente volátil, que pode ser expelido por aquecimento do material ou através de contato da amêndoa com ar quente (SILEM et al., 2006).

Assim, este estudo teve como objetivos:

- Extrair o óleo da amêndoa de pêssego utilizando solvente apolar, através de técnica de Soxhlet, e uma mistura de solventes de polaridade intermediária, pela técnica de Bligh-Dyer, a fim de comparar a qualidade e composição destes óleos;
- Determinar a quantidade de proteínas em extrato enzimático bruto de amêndoas de pêssego, e o teor total de amigdalina presente na amêndoa, assim como as condições ideais de concentração do substrato, faixa de pH e temperatura para a atividade de β -glucosidase presente no extrato.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Óleo de pêssego

O gênero *Prunus* corresponde às frutas de caroço ou drupas, em que as sementes são cobertas por um endocarpo lignificado, que é formado durante o segundo de quatro estágios de desenvolvimento das frutas de caroço, além de mesocarpo suculento (LOMBARDO et al., 2011; PIAGGESI et al., 1991) (Fig. 1). Este gênero faz parte da família de frutas *Rosaceae*, que constituem importante fonte alimentar de fitoquímicos, como de compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitoestrogênios e ácido L-ascórbico (SHULAEV et al., 2008).

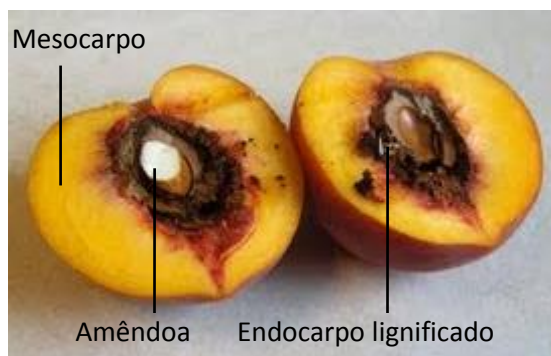


Figura 1. Endocarpo e mesocarpo de pêssego (*Prunus persica*)

Fonte: Adaptada de NATURAL NEWS, (2012).

A amêndoa de pêssego (*Prunus persica*) contém um percentual de óleo inferior à amêndoa de damasco, no qual os níveis chegam a 50% (SILEM et al., 2006; TUNÇEL et al., 1998). O material lipídico corresponde a 25 até 38% da composição da amêndoa de pêssego em base seca, dependendo do solvente de extração utilizado, segundo WU et al. (2011). Este mesmo autor observou que os percentuais de rendimento mais baixos foram os obtidos com os solventes éter de petróleo e hexano e os mais altos, com clorofórmio e éter etílico.

A extração do óleo por dióxido de carbono supercrítico, à temperatura de 40°C e 19,8 Mpa, resultou em uma predominância de ácido graxo oleico (73,0%) e linoleico (18,2%) na composição relativa de ácidos graxos, que não difere significativamente da composição encontrada para óleo extraído por Soxhlet, utilizando hexano como solvente (SÁNCHEZ-VICENTE et al., 2009). Dentre as extrações do óleo de pêssego por solventes analisadas por MEZZOMO et al. (2010), observou-se que a utilização de hexano, diclorometano, etanol ou acetato de etila durante extração por Soxhlet, não inferiu em alterações significativas na composição de ácidos graxos.

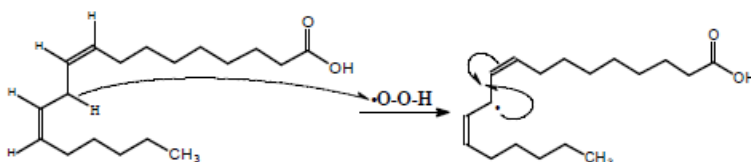
A extração de óleo de amêndoa de ameixa utilizando pectinases, celulasas e hemi-celulasas por método aquoso, inferiu em um produto que possui menor teor de fosfatídeos do que o obtido pelo método tradicional de Soxhlet, o que pode implicar em uma menor estabilidade oxidativa pela formação de ácidos voláteis em tempo inferior, que foi observado quando avaliados por *Rancimat* a 120°C (PICURIC-JOVANOVIC et al., 1999).

Os ácidos graxos são moléculas que se apresentam principalmente esterificadas com o glicerol nos óleos vegetais. Os triacilgliceróis são o modo predominante, com percentuais normalmente superiores a 95%, mas também se encontram quantidades de mono e diacilgliceróis e ácidos graxos livres. Os óleos possuem ácidos graxos com maior quantidade de insaturações, o que faz com que se apresentem líquidos à temperatura ambiente (REDA e CARNEIRO, 2007). Além disso, o comprimento da cadeia dos ácidos graxos e sua posição na molécula de glicerol também influencia no estado físico dos lipídios e em sua biodisponibilidade. A posição *sn-2* do triacilglicerol está mais sujeita à ação de lipases, e é onde encontram-se os ácidos graxos saturados de muitas gorduras (D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002). O aumento do percentual de glicerídeos tri-saturados e de di-saturados, onde uma das saturações está na posição *sn-3*, aumenta o índice de gordura sólida a diferentes temperaturas, mesmo que em concomitância sejam observados aumento de glicerídeos tri-insaturados (LIST et al., 1997).

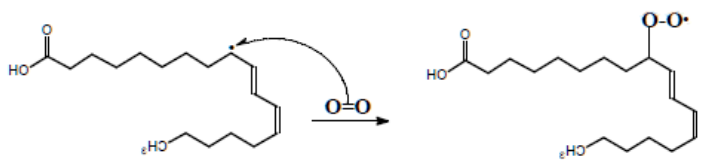
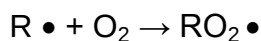
Um perfil de ácidos graxos com predominância de ácidos graxos insaturados é desejável do ponto de vista nutricional, uma vez que dietas ricas em ácidos graxos saturados afetam a adiposidade e comportamento dos macrófagos, além de causar inflamações e disfunção metabólica (ENOS et al., 2013; MASSIERA et al., 2010); porém, também faz com que o óleo torne-se mais susceptível à degradação, mesmo

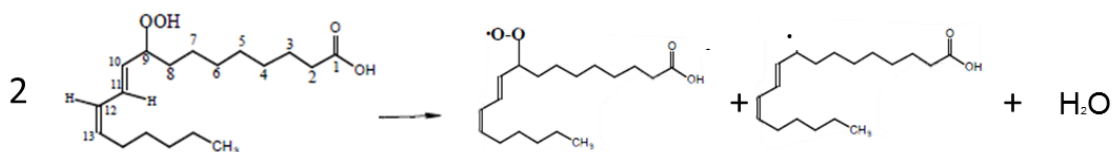
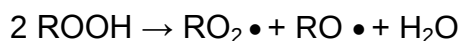
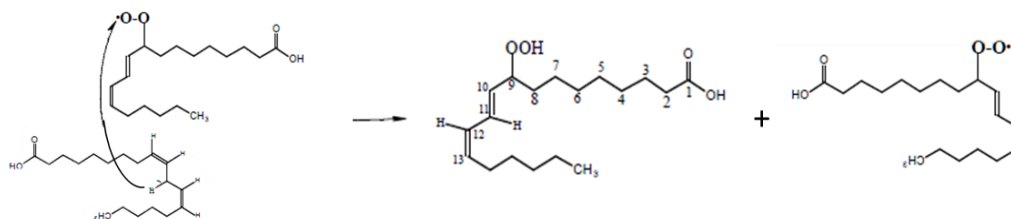
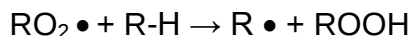
à temperatura ambiente. A auto-oxidação de ácidos graxos insaturados é um processo que origina uma mistura de compostos oriundos dos diferentes estágios de oxidação. Os produtos iniciais (primários) são normalmente analisados pelo valor do índice de peróxidos e perda de ácidos graxos insaturados; e os produtos oriundos da decomposição dos produtos iniciais da oxidação (secundários) são mensurados pelo valor de p-anisidina, teste de ácido tiobarbitúrico e técnicas cromatográficas para outros compostos específicos (CRAPISTE et al., 1999). A oxidação ocorre inicialmente pela adição de um elétron ao oxigênio molecular, o que resulta em um ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que pode reagir com diversas moléculas, entre elas com um próton H^+ , resultando no radical peroxil, extremamente oxidante, que, na presença de um ácido graxo insaturado, promove a retirada de hidrogênio ligado ao carbono entre os grupamentos insaturados (Fig. 2a). Esta molécula, então, passa a possuir um radical livre e pode reagir com outro oxigênio molecular, que se liga ao ácido graxo e forma o radical peroxila, que pode atuar sobre outro ácido graxo e formar os peróxidos, que são instáveis e reagem entre si, ou com outras moléculas instáveis, formando os produtos finais de oxidação, que são estáveis (FERRARI, 1998; KESZLER et al., 2000).

a) Iniciação: $R-H + \text{iniciador} \rightarrow R \bullet$



b) Propagação





c) Terminação

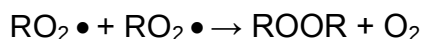


Figura 2. Reação de oxidação lipídica

Fonte: Adaptada de KESZLER et al., 2000.

Os compostos secundários são aqueles formados a partir de hidroperóxidos, que podem se decompor em compostos de três diferentes formas: quebra da cadeia para produzir álcoois, cetonas, furanos, lactonas, alcanos e alquenos, além de aldeídos como o malonaldeído; rearranjo de monohidroperóxidos, seguido ou não de oxidação; e polimerização de duas ou mais moléculas de lipídio peroxidadas, resultando em compostos de alto peso molecular (ESTERBAUER, 1991). O malonaldeído, produto mensurado pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico, possui potencial mutagênico em células humanas, com mutações que ocorrem principalmente nos pares de bases guanina-citosina (NIEDERNHOFER et al., 2003).

A foto-oxidação também atua formando hidroperóxidos, através de captura de um próton alílico ou de outra espécie da cadeia carbônica insaturada por um oxigênio singlete, o que altera a ligação dupla para a posição adjacente, pela

ocorrência de impedimento estérico, e implica na formação de hidroperoxidos alílicos *trans* (Fig. 3) (VILJANEN et al., 2002).

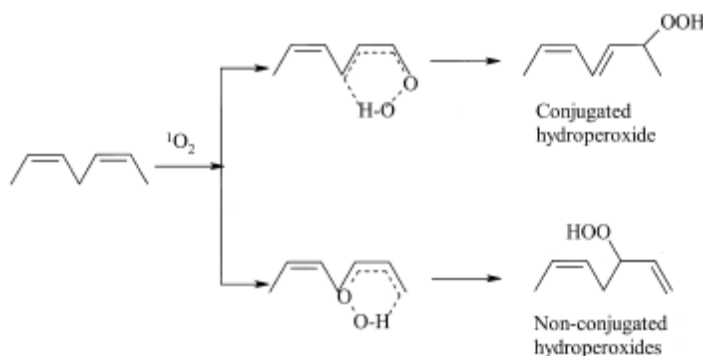


Figura 3. Reação entre oxigênio singlete e ácido graxo insaturado

Fonte: VILJANEN et al., 2002.

Os ácidos graxos oxidam-se mais rapidamente quando se encontram livres do que quando esterificados com a molécula de glicerol (TAPPEL et al., 1957). Os ácidos graxos livres são formados pela reação que ocorre pelo ataque de uma molécula de água, um nucleófilo fraco, à ligação éster do triacilglicerol, produzindo mono e di – acilgliceróis. A reação ocorre preferencialmente sobre ácidos graxos de cadeia curta e insaturados, pois estes são mais solúveis em água e, quanto maior a quantidade de água do alimento, mais rapidamente ocorre a hidrólise (CHOE e MIN, 2007).

1.2 Compostos Bioativos

Muitos dos compostos produzidos pelas plantas parecem não participar diretamente do crescimento e desenvolvimento celular, desempenhando funções específicas e, ao contrário dos metabólitos primários, como os fitosteróis, acil lipídios, nucleotídeos, amino ácidos e ácidos orgânicos, não são encontrados em todas as plantas (CROTEAU et al., 2000). Os compostos secundários, por outro lado, exercem interação entre a planta e seu meio ambiente (KUTCHAN, 2001), seja por meio de síntese de compostos de defesa contra insetos (HAMBERGER et al., 2011), herbívoros, estresse biótico (OH et al., 2012), ou para atrair polinizadores e dispersores (DONG et al., 2001).

Muitos dos compostos secundários agem como substâncias bioativas, que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades em alimentos, apresentam estrutura química diversa e possuem potenciais benefícios à saúde, como na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (KRIS-ETHERTON et al., 2002). A atividade antioxidante é uma das propriedades destes compostos, a qual resulta de um mecanismo de defesa das plantas, pois na natureza as plantas estão sujeitas a várias condições de estresse, o que proporciona o acúmulo de espécies reativas derivadas de oxigênio molecular que promovem a oxidação de componentes como proteínas, clorofilas e lipídios (ABBASI et al., 2007).

Muitos destes componentes, presentes em pequenas quantidades em alimentos, se comparados aos compostos majoritários como água, lipídios, proteínas e açúcares, estão presentes principalmente na matéria insaponificável de óleos, em que podem ser encontrados compostos como hidrocarbonetos, esteróis, álcoois terpênicos e alifáticos, tocoferóis e pigmentos (BAETEN et al., 2001), como carotenoides e compostos fenólicos (MOHAMED e AWATIF, 1997).

Normalmente, em óleos obtidos de matérias-primas pertencentes à classe das nozes verdadeiras e sementes comestíveis, os compostos fenólicos são encontrados em maiores quantidades do que os carotenoides, além de outros compostos bioativos, como tocoferóis e fitosteróis (COSTA e JORGE, 2011), substâncias ainda não quantificadas em óleo de pêssego.

1.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos, onde pelo menos um deles está ligado ao grupamento hidroxil, podendo ser classificados em ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, taninos e flavonoides, sendo que este último grupo subdivide-se em flavonols, flavonas, flavanols, flavononas, antocianidinas e isoflavonas. Estes compostos agem como compostos de defesa e contribuem para a coloração de plantas (LIU, 2004). As estruturas dos flavonoides (Fig. 4) são constituídas de 15 átomos de carbono, em configuração C6-C3-C6, com dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma ponte de carbono, geralmente em formato heterocíclico (anel C) (IGNAT, 2011). Os flavanóis não apresentam grupamentos cetônicos.



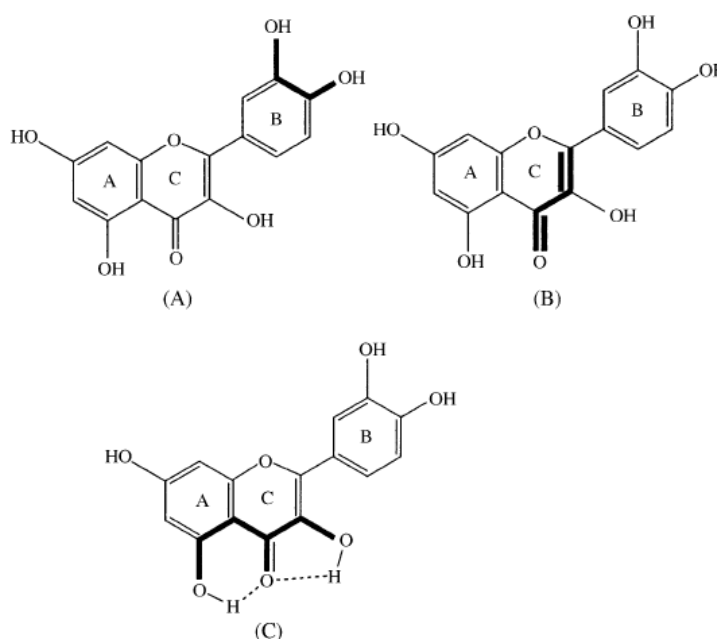
Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides. a) Quercetina (flavonol) b) catequina (flavanol)

Fonte: MEYER et al., 1998.

Os componentes da estrutura dos flavonoides, que são responsáveis pelo maior potencial de estabilização da molécula, incluem (Fig. 5a) (RICE-EVANS et al., 1996):

- (A) Estrutura orto-di-hidroxi no anel B, que confere maior estabilidade à forma radical e participa de ressonância. A estabilização de radical livre por doação de grupamento H^+ ao radical peroxila e estabilização por ressonância é demonstrada na Figura 5b.
- (B) A ligação dupla no anel C em conjugação com grupamento cetônico, responsável por possibilitar o deslocamento de elétrons até o anel B.
- (C) Os grupamentos OH dos anéis A e C e o grupamento cetônico do anel C, que possibilitam o maior poder de sequestro de radicais.

a)



b)

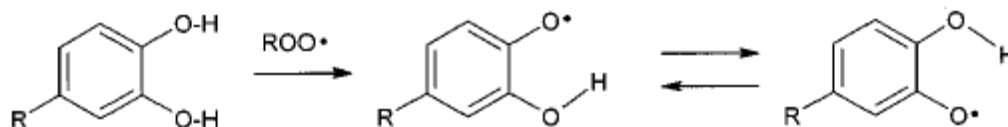
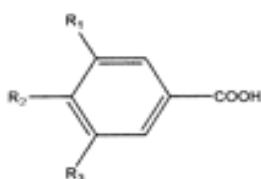


Figura 5. a) Grupamentos que reagem com radicais (A) (B) (C) e b) Estabilização do radical peroxil pela doação de próton e ressonância

Fonte: a) SOOBRATTE et al., 2005. b) PEDRIELLI et al., 2001.

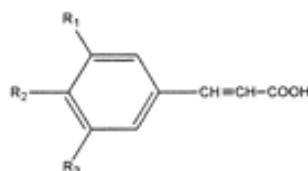
Os ácidos fenólicos (Fig. 6) fazem parte do grupo de dos fenóis não flavonoides. Dentre eles, os ácidos hidroxicinâmicos apresentam capacidade antioxidante superior do que os ácidos fenólicos simples, como o ácido hidroxibenzoico, devido a este possuir menos grupamentos OH doadores de elétrons. O ácido gálico possui a maior atividade antioxidante entre os ácidos fenólicos e, entre os ácidos hidroxicinâmicos, o maior potencial antioxidante segue a ordem cafeico>ferúlico>cumárico (SOOBRATTE et al., 2005).

(a) Benzoic acid



Benzoic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	H	OH	OH
Vannilic	CH ₃ O	OH	H
Syringic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallic	OH	OH	OH

(b) Cinnamic acid



Cinnamic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Coumaric	H	OH	H
Caffeic	OH	OH	H
Ferulic	CH ₃ O	OH	H
Sinapic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Figura 6. Ácidos fenólicos a) Ácido benzoico e seus derivados; b) Ácido cinâmico e seus derivados

Fonte: LIU, 2004.

Os ácidos fenólicos são sintetizados na rota metabólica dos fenilpropanoides, onde o chiquimato, precursor majoritário para a formação de aminoácidos aromáticos, dá origem à fenilalanina que é usada na produção de 4-coumaril-COA,

que pode ser combinado com malonil-CoA, precursor dos flavonoides com dois anéis fenil (MINTZ-ORON et al., 2008).

1.2.2 Carotenoides

Os carotenoides fazem parte dos isoprenoides, com estrutura possuindo 40 átomos de carbono e cuja cadeia pode possuir ciclizações, hidrogenações ou grupos funcionais que contêm oxigênio (LIU, 2004). Estes compostos são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarela nos vegetais, desempenhando papel de provitamina A, além de estarem presentes nos complexos fotossistemas I e II nos cloroplastos (BAROLI et al., 2004). Os carotenoides luteína e zeaxantina possuem átomos de oxigênio na cadeia de carbonos, pertencendo à classe das xantofilas. Os carotenoides que são constituídos apenas por hidrocarbonetos são denominados de carotenos (LI et al., 2012). Ambos possuem a propriedade de inativar eletronicamente moléculas excitadas, como o oxigênio singlete ($^1O_2^*$), que é produzido por reações fotoquímicas ou peroxidação lipídica (BAROLI, 2003); e a clorofilil triplete ($^3Chl^*$) (LI et al., 2012).

VILJANEN et al. (2002) propuseram um esquema do mecanismo de atividade antioxidante dos carotenoides, onde ocorre transferência de energia do oxigênio singlete ou de um triplete para o carotenoide, formando um oxigênio no estado fundamental (3O_2) e um carotenoide excitado triplete ($^3CAR^*$), que facilmente perde a energia para o ambiente e retorna à forma original.

IANNONE et al. (1998), demonstram a reação proposta para a reação de β -caroteno com um radical peroxil, mediada pela formação de um composto estabilizado por ressonância que une as duas moléculas, que pode ainda reagir com um segundo radical peroxil (eq. 1) ou, dependendo da pressão parcial de oxigênio do ambiente, pode formar radical peroxil β -caroteno (eq. 2), extremamente reativo, o que explica o efeito pro-oxidante do carotenoide.



Enquanto a molécula de zeaxantina é derivada do β - caroteno, a luteína provém do α -caroteno, compostos formados a partir da molécula de licopeno, que tem por sua vez o fitoeno como precursor (BAROLI et al., 2003). Esta bifurcação da rota metabólica é realizada pelas enzimas ε -licopeno cilase e β -licopeno cilase, que determinam a proporção entre moléculas de luteína versus β -caroteno e zeaxantina (WALTER e STRACK, 2011). Em sementes a biossíntese normalmente ocorre até a formação de xantofilas, o que foi observado em estudo com grãos de milho (YAN et al., 2010). Na Fig. 7 estão apresentadas as moléculas de luteína e zeaxantina.

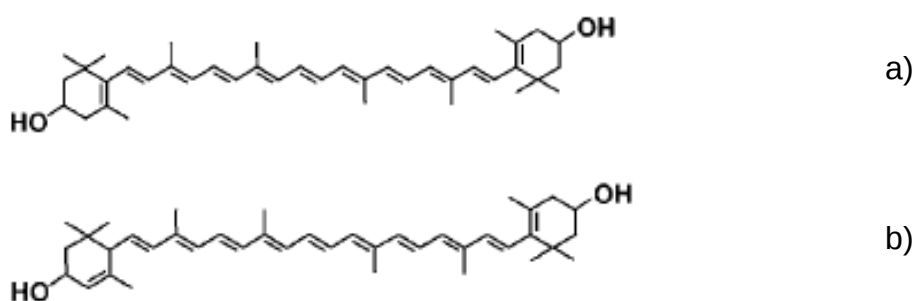


Figura 7. Estrutura dos carotenoides a) zeaxantina e b) luteína

Fonte: WALTER e STRACK, 2011.

1.2.3 Tocoferóis

Os tocoferóis constituem um grupo de compostos lipossolúveis que possuem propriedades antioxidantes, os quais possuem um anel cromanol e uma cadeia lateral fitil. O α -, β -, γ - e δ -tocoferol diferem entre si pelo número e posição de substituintes no anel cromanol (SCHWARTZ et al., 2008) (Fig. 8).

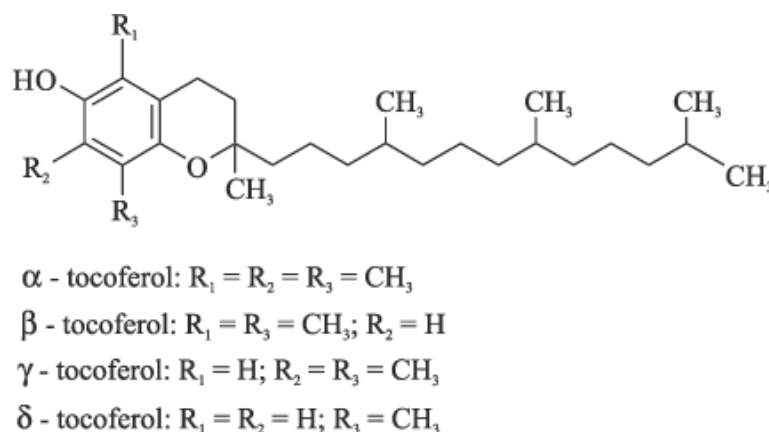


Figura 8. Estrutura genérica dos tocoferóis e substituintes do anel cromanol de α -, β -, γ - e δ -tocoferol

Fonte: RAMALHO e JORGE, 2006.

Estas moléculas, juntamente com os tocotrienóis, são também denominadas de vitamina E, sendo que o α -tocoferol é a forma mais abundante e que apresenta maior ação no organismo (MATRINGE et al., 2008). Estes compostos atuam como antioxidantes contra a peroxidação lipídica, sendo sintetizados por organismos fotossintéticos (ABBASI et al., 2007), os quais provém da rota do chiquimato, produzindo hidroxifenil piruvato que é oxirreduzido a homogentisato que, por sua vez, reage com a cadeia fitil, formando composto que se bifurca em duas vias, uma para gerar δ e posteriormente β -tocoferol e a outra que produz o γ seguido de α -tocoferol (KEGG PATHWAY, 2013; ABBASI, 2007). Os isoprenoides, estruturas que dão origem ao grupamento fitil dos tocoferóis além de serem precursores de carotenoides, podem ser produzidos a partir de compostos da via do mevalonato ou ser produzidos a partir da rota MEP (2-C-metil-D-eritriol-4-fostato), através do precursor geranilgeranildifosfato (GGDP) (ZHU et al., 2013).

As propriedades antioxidantes dos tocoferóis ocorrem principalmente pela ação sequestrante sobre os radicais peroxil, interrompendo a propagação da reação de oxidação (Fig. 9).

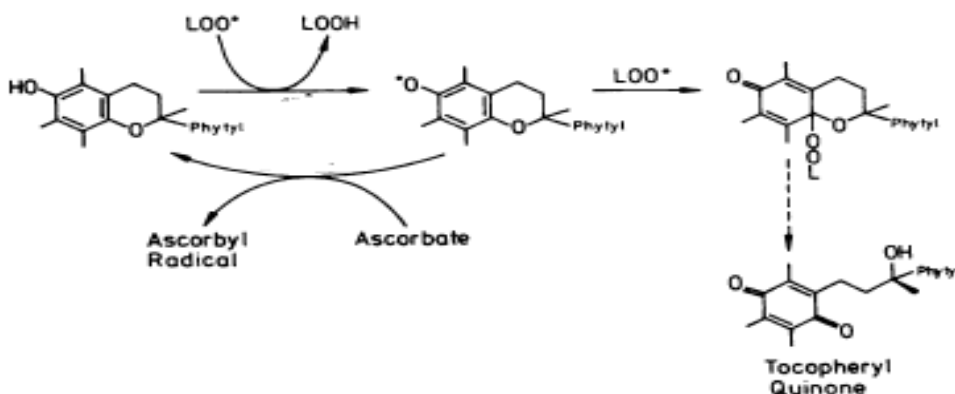


Figura 9. Ação antioxidante dos tocoferóis

Legenda: $\text{LOO}^\bullet$: radical peroxila; LOOH : hidroperóxido

Fonte: SIES e STAHL, 1995.

1.2.4 Fitosteróis

Os esteróis constituem-se em isoprenoides, os quais são derivados da rota do mevalonato. Grande parte dos esteróis presentes em plantas possuem uma dupla ligação no carbono 5 do núcleo esterol. Possuem interesse nutricional pela potencialidade de reduzirem a absorção de colesterol (SCHWARTZ et al., 2008; JAKULJ et al., 2005; OSTLUND et al., 2002; HOWELL et al., 1998). O campesterol, stigmasterol e sitosterol são os fitosteróis mais comuns em plantas, enquanto que em animais o colesterol e ergosterol são os compostos majoritariamente presentes (WEWER et al., 2011). Nas plantas, os fitosteróis podem ocorrer como: álcoois livres, ésteres de ácidos graxos, esteril glicosídeos e esteril glicosídeos acetilados, sendo estas três últimas formas denominadas de fitosteróis conjugados. Em algumas sementes, os fitosteróis podem estar conjugados com ácidos fenólicos, como na forma de fitosteril ésteres de ácidos hidroxicinâmicos. Para que ocorra a liberação da molécula, se requiere a hidrólise alcalina ou ácida (MOREAU et al., 2002).

Sua atividade antioxidante deve-se à formação de um radical livre alílico que se isomeriza em moléculas relativamente estáveis (WANG et al., 2002), porém apenas moléculas de Δ^5 -avenasterol e fucosterol (GORDON e MAGOS, 1983) parecem demonstrar atividade antioxidante capazes de reduzir a deterioração lipídica. Estudos demonstram que a adição de β -sitosterol (Fig. 10) puro não altera a taxa de degradação de óleos vegetais em relação ao controle (WHITE e

como pêssego, damasco, ameixa e nectarina possuem os glicosídeos cianogênicos amigdalina ou prunassina (BARCELOUX, 2009).

O óleo essencial obtido a partir de damascos contém o glicosídeo cianogênico amigdalina ($C_{20}H_{27}NO_{11}$) (SHARMA et al., 2010). Este composto também está presente em óleos de amêndoas amargas (*Amygdalus commynis* var. amara). DU et al. (2008) reportam a presença de glucosinolatos, em níveis aproximadamente de 5%, em resíduos oriundos de prensagem de colza. Estas substâncias, como os glicosídeos cianogênicos, são solúveis em água, sendo também sintetizadas a partir de aminoácidos e moléculas de açúcar; e igualmente agem como mecanismo de defesa de plantas (OH et al., 2012).

O calor e baixo teor de umidade facilitam a conversão espontânea dos glicosídeos cianogênicos a cianeto de hidrogênio, o qual é altamente volátil. O processamento inadequado de mandioca faz com que haja a permanência de quantidades residuais de linamarina e lotaustralina. Para que haja a perda de metade do conteúdo original de linamarina na farinha de mandioca, é necessário que esta seja estocada por 4 semanas e que tenha sido fermentada por pelo menos 4 dias anteriormente à estocagem (BARCELOUX, 2009; ONABOLU, 2002).

A legislação norte americana para alimentos (Food and Drug Administration - FDA) permite a utilização de óleo de amêndoa de pêssegos como agente natural de flavor, para a utilização em conjunto com flavorizantes (FDA, 2011a). Os limites permitidos de ácido cianídrico em alimentos cujos flavorizantes possuem compostos cianogênicos, como em folhas de pêssego e caroços de cereja, são de, no máximo, 25 ppm (FDA, 2011b).

Entretanto, a literatura científica carece de dados sobre as quantidades de glicosídeos cianogênicos em óleos. O óleo extraído de amêndoas amargas (*Amygdalus Communis*), pertencente ao gênero *Prunus* e subgênero *Amygdalus*, o mesmo ao qual pertence o pêssego, contém aproximadamente 50% de amigdalina e seus componentes de degradação, benzaldeído e ácido cianídrico, e os 50% restantes correspondem a ácidos graxos e outros componentes similares aos encontrados em amêndoas doces, ou seja, que não possuem componentes que podem gerar ácido cianídrico (ORGANIC FACTS, 2012). EL-ADAWY e EL-KADOUSY (1995), relatam que é possível eliminar o conteúdo de ácido cianídrico do material não lipídico de amêndoas de pêssego através da detoxificação, realizada pela mistura das amêndoas moídas com água destilada (1:10 p/v) a 47°C por 30h,

seguida de filtração e lavagem com álcool etílico a 70% anteriormente à secagem por ar forçado, sendo após extraído o óleo.

1.3.1 Toxidez dos glicosídeos cianogênicos

A dose letal de amigdalina em humanos é de aproximadamente 1,71g, sendo que a tolerância a esta substância é maior quando for injetada na corrente sanguínea do que quando é ingerida, provavelmente porque há a possibilidade de ocorrer a clivagem da molécula no intestino por ação enzimática (SILEM et al., 2006).

Estes compostos naturais possuem potencial toxidez por liberarem íons cianeto “in vivo”, que inativa o complexo citocromo oxidase da respiração celular (MORANT et al., 2008). A amigdalina, através da hidrólise da ligação glicosídica pela ação de glucosidases, libera 2 moléculas de glicose e 1 de mandelonitrila que é posteriormente transformada em benzaldeído e cianeto (ARAYA et al., 2005) (Fig. 11).

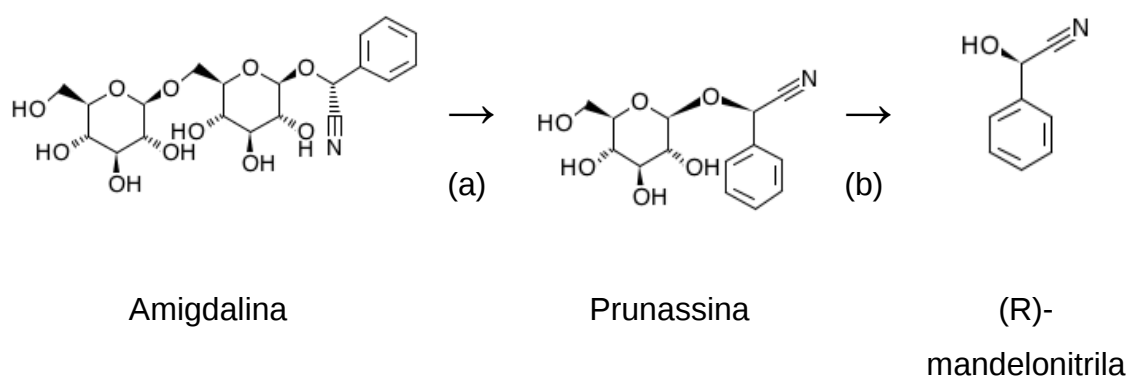


Figura 11. Hidrólise de amigdalina de modo a liberar HCN

Legenda: (a) Enzimas β -glucosidase (EC: 3.2.1.21) e amigdalina β -glucosidase (EC: 3.2.1.117); (b) Enzimas β -glucosidase (EC: 3.2.1.21) e prunassina β -glucosidase (EC: 3.2.1.118).

Fonte: KEGG PATHWAY, 2012.

O cianeto é substrato para a enzima rodanese (EC 2.8.1.1) no organismo humano, porém o composto produzido, denominado tiocianato, ainda possui toxicidade, mesmo que em níveis inferiores. A hidrólise dos glicosídeos cianogênicos

pode ser catalisada enzimaticamente por β -glucosidase (EC: 3.2.1.21). Segundo BRIMER et al. (1998), a reação é possivelmente sequencial, constituída de duas etapas, com formação do intermediário prunassina, que pode permanecer temporariamente acumulada em amêndoas pertencentes ao gênero *Prunus*, uma vez que a primeira etapa da reação é muito mais rápida que a segunda. A emulsin ou amigdalase é a enzima envolvida na hidrólise da amigdalina (TATSUMA et al., 1998). Esta enzima ocorre em amêndoas e sementes de algumas frutas, juntamente com a amigdalina.

1.3.2 β -glucosidase

As glucosidases catalisam a quebra de ligações glicosídicas originando oligossacarídeos ou glicoconjugados, podendo ser específicas para moléculas de açúcares que possuem determinada configuração, posição e número de grupos hidroxílicos (MELO et al., 2006). Em frutas de caroço, que podem acumular altos níveis do dissacarídeo (R)-amigdalina (O- β -D-gentibiosídeo de (R)-mandelonitrila), ocorre a ação de duas β -glucosidases distintas, a amigdalina hidrolase, que hidrolisa a ligação glicosídica β -1,6, liberando uma molécula de D-glicose e uma de (R)-prunassina; e da enzima prunassina hidrolase que hidroliza a (R)-prunassina originando a mandelonitrila e D-glicose. A molécula de mandelonitrila pode se dissociar à cianeto de hidrogênio por vias não-enzimáticas ou pela ação da enzima mandelonitrila liase (Fig. 11)(KUROKI e POULTON, 1987).

Estas enzimas atuam no metabolismo de plantas como formadoras de intermediários em rotas bioquímicas que envolvem a degradação do endosperma durante a germinação, sendo ativadoras de hormônios vegetais e de compostos de defesa. As plantas possuem a capacidade de sintetizar metabólitos secundários armazenados em sua forma não ativa, que estão ligados a moléculas de glicose no vacúolo e, quando ocorre a ruptura da célula, ficam disponíveis para a ação de enzimas hidrolíticas (MORANT et al., 2008). A hidrólise da ligação β , catalisada por β -glucosidases, ocorre via dois mecanismos SN2 (Fig. 12), embora o primeiro seja normalmente observado apenas em glucoamilase (MELO e CARVALHO, 2006).

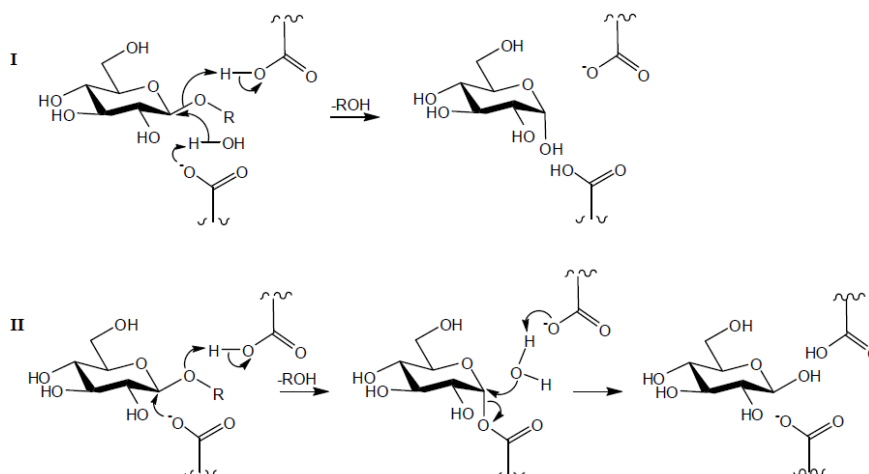


Figura 12. Mecanismos SN2 propostos para a ação de glicosidases. (I) Grupamentos carboxílicos atuando como ácido e base e (II) Grupamentos carboxílicos atuando como base e nucleófilo

Fonte: MELO e CARVALHO, 2006.

No primeiro mecanismo, o glicosídeo liga-se ao centro ativo da enzima, constituído por grupamentos carboxílicos dos aminoácidos aspartato, glutamato ou histidina, onde um destes atua como base e o outro como ácido. O açúcar resultante da reação deste mecanismo apresenta inversão estereoquímica. No segundo mecanismo, o glicosídeo também se liga ao centro ativo da enzima, e um dos grupamentos carboxílicos atua como base e o outro como nucleófilo. Assim, ocorre o ataque ao carbono anomérico do substrato por um dos grupamentos carboxílicos, formando um composto intermediário que possui configuração invertida e, ao mesmo tempo, há a transferência de próton pelo outro grupamento carboxílico ao oxigênio da porção da molécula do substrato onde ocorrerá a hidrólise. Esta porção da enzima fica então carregada negativamente (COO^-) e, para reconstituir-se, atua sobre um próton de água, o que aumenta a nucleofilicidade do oxigênio desta molécula, que ataca o carbono anomérico e provoca novamente a inversão da configuração da molécula à posição original (GOMES, 2008; MELO e CARVALHO, 2006).

Diversas β -glicosidases estão sendo estudadas devido à suas aplicações, como na formação de aroma em chás, vinhos e sucos; na conversão de componentes de celulose e; em mandioca, já foi utilizada para produção industrial de alquil- β -glicosídeos. A estrutura de linamarase e dhurinase 1, as quais são enzimas

que hidrolisam os glicosídeos linamarina e dhurrina, é demonstrada na Fig. 13. A sobreposição destas duas enzimas demonstra o grau de semelhança entre suas estruturas (MORANT et al., 2008).

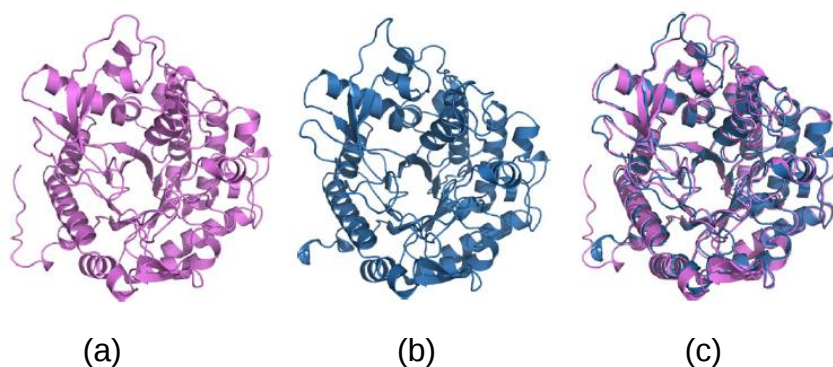


Figura 13. Representação de β -glucosidases como a) linamarase, obtida de trevo branco, b) dhrurrinase 1, de sorgo e c) sobreposição das estruturas

Fonte: MORANT et al., 2008.

GERARDI et al. (2001), purificaram e caracterizaram β -glucosidase presente em cerejas maduras, a qual foi precipitada com sulfato de amônio e submetida à cromatografia de exclusão de tamanho e troca iônica. A enzima apresentou massa molecular de aproximadamente 68 kDa, com ponto isoelétrico próximo a 4,6; e demonstrou possuir somente um sítio ativo pelo resultado do ensaio utilizando dois substratos misturados. Além disso, o efeito das enzimas sobre glicosídeos cianogênicos de amêndoa de damasco não demonstrou ser potencializado pela adição conjunta de enzimas pectinolíticas (TUNÇEL et al., 1998).

A utilização de enzimas permite processar alimentos em condições brandas de pH, temperatura e pressão, com controle da reação devido à especificidade de sua ação sobre os substratos (CANILHA et al., 2006). Devido a isto, é importante determinar as condições ideais de pH e temperatura para definir as condições operacionais de enzimas, assim como de sua estabilidade. A constante Michaeliana K_m é crítica quando se trabalha com enzimas, uma vez que concentrações elevadas de substrato levam à inibição da atividade enzimática (BURTON et al., 2002). A constante cinéticas K_m e V_{max} podem ser determinadas através da equação de Henri-Michaelis-Menten, em que V_{max} é a máxima velocidade de reação, V_0 é a velocidade inicial e $[S_0]$ é a concentração inicial do substrato (SCHNELL, 2003) (eq. 3).

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]} \quad (\text{eq. 3})$$

KUROKI e POULTON (1987) estudaram os parâmetros cinéticos ideais para a ação de prunassina hidrolase I, IIa e IIb de cerejas; e LI et al. (1992), estudaram os parâmetros para quatro isoenzimas de amigdalina hidrolase. TUNÇEL et al. (1998) estudaram o efeito de temperaturas elevadas sobre a atividade de β -glucosidase endógena presente em amêndoa de damasco. O estudo de hidrólise de amigdalina por enzimas produzidas por fungos foi avaliado por BRIMER et al. (1998), LEI et al. (1999) e PETRUCCIOLI et al. (1999). Porém, não há informações na literatura científica quanto a enzimas obtidas de amêndoas de pêssego.

2. CAPÍTULO I - Atividade de β -glucosidases em extrato enzimático bruto obtido de amêndoas de pêssego

Resumo

A presença dos glicosídeos cianogênicos amigdalina e prunassina, e de β -glucosidases, que hidrolisam estas moléculas, faz com que a amêndoa de pêssego apresente potencial tóxico pela possibilidade de liberação de cianeto de hidrogênio. Quando a amêndoa apresenta-se íntegra, não ocorre atividade das enzimas pela compartimentalização observada nas células; porém, com a maceração do tecido ocorre a desintegração celular com consequente contato do substrato com as enzimas, propiciando a reação com a respectiva liberação de moléculas de glicose e do cianeto. No entanto, até o presente, não há dados disponíveis na literatura sobre as condições de hidrólise das enzimas presentes em amêndoas de pêssegos. Assim, este trabalho visou mensurar o conteúdo de amigdalina, e as condições ideais de pH, temperatura e concentração do substrato de extrato bruto de β -glucosidases para a atuação enzimática, em amêndoas de pêssego. Os resultados demonstraram a presença do glicosídeo em níveis semelhantes aos encontrados na literatura para outras amêndoas. Quanto à atividade de β -glucosidase, a enzima apresentou K_m e V_{max} de $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de amigdalina e $0,1407 \text{ mmol de glicose.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente, valores que indicam menor afinidade pelo substrato amigdalina do que de enzimas purificadas que catalisam as mesmas reações. O pH ótimo da enzima foi o 7,0, porém entre 5,0, 6,0 e 8,0 ainda ocorre elevada atividade. A enzima demonstrou estabilidade nas temperaturas empregadas, apresentando máxima atividade a 60°C .

Palavras – chave: amigdalina, β -glucosidase, amêndoa de pêssego.

1. Introdução

As glucosidases catalisam a quebra de ligações glicosídicas em oligossacarídeos ou glicoconjugados, podendo ser específicas para moléculas de açúcares que possuem determinada configuração, posição e número de grupos hidroxílicos (MELO e CARVALHO, 2006). Em frutas de caroço, que podem acumular altos níveis do dissacarídeo (R)-amigdalina (O- β -D-gentibiosídeo de (R)-mandelonitrila), ocorre a ação de β -glucosidases (EC 3.2.1.21) distintas (KUROI e POULTON, 1987). Estas enzimas fazem parte do grupo de enzimas O-glicosídeo hidrolases, as quais hidrolisam a ligação glicosídica entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e outra molécula (VERDOUCQ et al., 2003).

A amigdalina, através da hidrólise da ligação glicosídica pela ação de glucosidases, libera 2 moléculas de glicose e 1 molécula de mandelonitrila, que é posteriormente transformada em benzaldeído e cianeto (ARAYA et al., 2005). O cianeto possui potencial tóxico porque inativa o complexo citocromo oxidase da respiração celular (MORANT et al., 2008a). Os glicosídeos cianogênicos são compostos de defesa das plantas, que estão na forma glicosilada e, assim, temporariamente inativos, até que ocorra a ação de enzimas que hidrolisam a molécula (FALK e RASK, 1995).

A hidrólise da amigdalina ocorre primeiramente pela ação de amigdalina hidrolase, que age sobre a ligação β 1-6 entre as duas glicoses. A molécula de prunassina liberada é substrato para a enzima prunassina hidrolase, produzindo uma molécula de glicose e uma de mandelonitrila, que pode ser dissociada espontaneamente ou pela enzima mandelonitrila liase (ZHOU et al., 2002; MORANT et al., 2008b). A especificidade das enzimas que agem apenas sobre determinados glicosídeos cianogênicos parece ocorrer por diferenças de composição dos aminoácidos terminais em relação a enzimas que hidrolisam um amplo espectro de substratos, o que foi observado em dhurrina hidrolase de sorgo (VERDOUCQ et al., 2003). Os aminoácidos N-terminais de isozimas amigdalina e prunassina hidrolases em cerejas pretas apresentam prolina nas posições 5 e 6, alanina na posição 10, leucina na 12 e arginina na 14. O grupo das amigdalina hidrolases apresenta, ainda, os mesmos aminoácidos nas posições 4, 7, 8, 11 e 15 e, as prunassina hidrolases, em 3, 4, 7, 8, 11, 15 e 16 (LI et al., 1992).

Dentre as enzimas que podem atuar sobre a molécula de (R)-amigdalina e seus produtos, SWAIN e POULTON (1994) relatam a atividade de amigdalina hidrolase, prunassina hidrolase, mandelonitrila liase, amigdalina diglucosidase (cataboliza a molécula de amigdalina à mandelonitrila e β -gentibiosídeo), β -gentibiosidase, β -cianoalanina sintase (que detoxifica cianeto de hidrogênio à β -cianoalanina) e geranil transferase tipo I (envolvida na síntese de novo de prunassina).

A enzima prunassina hidrolase, encontrada em amêndoas amargas e doces, está localizada em vesículas específicas observadas em células do endosperma, nucelo e tegumento (SÁNCHEZ-PEREZ et al., 2012). Os glicosídeos cianogênicos são translocados através de transporte apoplástico, o que não acontece com a grande maioria das β -glucosidases (VETTER, 1999), sendo estocados no vacúolo celular (MORANT et al., 2008a). Ocorrendo a ruptura celular, os glicosídeos cianogênicos entram em contato com β -glucosidases, sendo hidrolisadas pelas mesmas (MORANT et al., 2008b).

Assim, este estudo teve por objetivo caracterizar as amêndoas de pêssego quanto aos seus componentes que estão envolvidos na formação de cianeto de hidrogênio, mensurando a quantidade de amigdalina presente nas amêndoas, e avaliando as características ótimas de atividade enzimática, incluindo a concentração do substrato, temperatura e pH.

2. Materiais e Métodos

2.1 Determinação do teor de amigdalina nas amêndoas

O material de estudo foi obtido de indústrias produtoras de pêssego em calda (Oderich e iCalda), provenientes de frutas de cultivares precoces e tardias da safra 2011/2012. Primeiramente os caroços de pêssego foram secos por 24 h a aproximadamente 45°C, em estufa com circulação de ar. Após, foram quebrados para a remoção das amêndoas utilizando equipamento desenvolvido em laboratório, modelo de triturador de rolos canelados, com 1,29 kW de potência e capacidade de operação equivalente a 400 kg.h⁻¹. Os que permaneceram inteiros foram desintegrados manualmente com auxílio de um martelo. As amêndoas foram conservadas a -25°C até o momento das análises.

Pesou-se 2,5 g de amêndoa de pêssego triturada, que foi homogeneizada durante 2 horas com 15 mL de etanol grau HPLC. A amostra foi colocada em banho ultrassônico durante 30 minutos, após foi filtrada utilizando papel filtro qualitativo de 80 g.m⁻² de espessura, 205 µm de gramatura e poros de 14 µm, e transferida para balão volumétrico de 20 mL. Uma alíquota da amostra foi centrifugada em tubo de Eppendorf, a 7000 rpm durante 10 minutos (metodologia adaptada de ZHOU et al., 2007). O sobrenadante foi injetado, em quantidade de 10 µL, em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu, com injetor automático, detector UV-vis a 220 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 µm, 4,6 mm x 150 mm), com fase estacionária octadecil e coluna de guarda CLC-GODS, ambas localizadas em forno a 25°C. O fluxo empregado foi de 0,8 mL.min⁻¹, utilizando eluição isocrática de 80: 20 água ultrapura e metanol grau HPLC, segundo metodologia de DU et al. (2005) adaptada. A identificação da amigdalina foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção do pico da amostra e o do respectivo padrão; e a quantificação pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do padrão, previamente construída. Os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de amostra.

2.2 Extração da enzima

O procedimento para extração da enzima consistiu na homogeneização de 100g de amêndoas de pêssego trituradas em 300 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,1 mol.L⁻¹. O extrato permaneceu em banho-maria durante 24 horas a 40±2°C (adaptado de TIMERMAN, 2012). Após este período, foi resfriado a temperatura ambiente e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. Por meio de ensaios preliminares, observou-se que a atividade enzimática deste extrato bruto não diferiu significativamente da apresentada pelo extrato em diluição 1:9 (extrato bruto: água). Deste modo, o extrato diluído na proporção 1: 9 (extrato: água) foi utilizado para as análises.

2.3 Determinação do teor de proteínas no extrato

A determinação do teor de proteínas do extrato enzimático foi realizada de acordo com o método de biureto e albumina de sêrum bovino (BSA) para construção

de curva padrão (ROBINSON e HOGDEN, 1940). A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/VIS a 540 nm.

2.4 Efeito da concentração do Substrato

O método consistiu da adição em tubos de ensaio de 1 mL do extrato enzimático, 1 mL de tampão de McIlvaine pH 6,0, e 1 mL das soluções de amigdalina nas concentrações de 4,4; 8,7; 13,1; 17,5; 21,9; 26,2 e 30,6 mmol.L⁻¹. Em seguida, as amostras que constituíam-se de meio reacional com volume de 3 mL, foram incubadas em banho-maria durante 10 min a 35°C para que ocorresse a ação enzimática. Após este período, foi adicionado 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-DNS), o qual reage com os açúcares redutores presentes no meio durante reação em banho-maria fervente durante 5 minutos e, posteriormente, mais 6 mL de água foram adicionados. Devido à forte coloração vermelha apresentada na maioria dos tubos, foi necessária a diluição dos meios, que foi realizada por meio da adição de 1 mL da solução à 10 mL de água. A leitura de absorbância foi então realizada a 490 nm. A curva de calibração foi construída a partir de soluções de glicose com concentrações de até 5.000 ppm (Apêndice A). Assim como nos ensaios das enzimas, as soluções foram diluídas em 1: 10 de água.

2.5 Efeito do pH

O efeito do pH foi avaliado pela adição respectiva de 1 mL dos tampões de McIlvaine pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8 a 1 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de solução de amigdalina 10,9 mmol.L⁻¹ em tubo de ensaio, que foi levado a banho-maria a 35°C durante 10 minutos. Após a adição de 1 mL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico, as amostras permaneceram durante 5 minutos em banho-maria fervente e adicionou-se 6,5 mL de água (BERNFELD, 1955). Antes da leitura, ocorrida a 490 nm, houve a diluição da solução na proporção de 1: 10 (amostra: água).

2.6 Efeito da Temperatura

Foi avaliado pela adição de 1 mL de tampão de McIlvaine pH 6,0 em tubo de ensaio, juntamente com 0,5 mL de solução de amigdalina 10,9 mmol.L⁻¹ e 1 mL do

extrato enzimático. A partir de então, as amostras foram incubadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C durante 10 minutos e o mesmo procedimento descrito para o efeito do pH foi utilizado (BERNFELD, 1955).

2.7 Estatística

Os parâmetros K_m e V_{max} foram estimados através de Software SigmaPlot 10.0, utilizando modelo de Henri-Michaelis-Menten. O intervalo de confiança entre as repetições para efeito do substrato, pH e temperatura foi calculado utilizando o programa The Sas System for Windows Versão 8. Os gráficos foram construídos a partir do Software SigmaPlot 10.0.

3. Resultados e Discussão

3.1 Teor de amigdalina nas amêndoas

As amêndoas de pêssago apresentaram quantidades de $0,44 \pm 0,08 \text{ mg.g}^{-1}$ (base seca) de amigdalina. O cromatograma de identificação do componente pode ser visto na Fig. 1. A identificação foi realizada pela comparação com o tempo de retenção do padrão, com pico no tempo de retenção de 10,0 min.

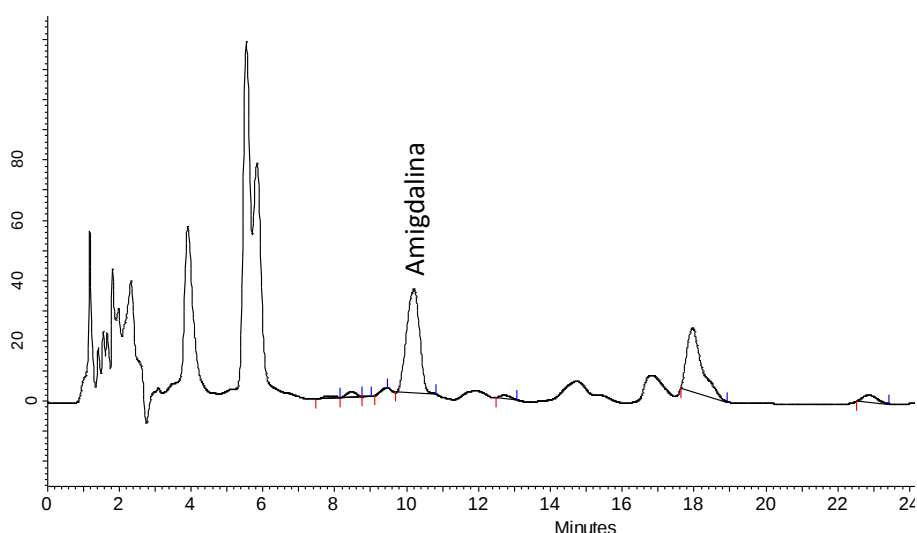


Figura 1. Cromatograma típico de amigdalina em amostra de amêndoa de pêssago, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de água ultra pura: metanol. Detecção UV-Vis a 220nm

As amêndoas de damasco contém cerca de 0,23 a 0,69 mg.g⁻¹, em base seca, de glicosídeos cianogênicos. Como o pêssego, os principais glicosídeos presentes no damasco são a amigdalina e prunassina (TUNÇEL et al., 1998). Os valores encontrados pelos autores são condizentes com os encontrados neste estudo. FEMENIA et al. (1995) relata níveis de 5,5g.100g⁻¹ de amigdalina em amêndoas amargas de damasco através de método titrimétrico. SWAIN et al. (1992) demonstraram que os níveis de prunassina e amigdalina apresentam alterações durante o grau de maturação de cerejas pretas. Inicialmente, não ocorre a presença de amigdalina, porém à medida que a maturação ocorre, o conteúdo do glicosídeo apresenta acentuado acréscimo, superior a 3 µmol.semente⁻¹ aos 76 dias de maturação; enquanto que o conteúdo deste glicosídeo na prunassina apresenta queda progressiva até teores próximos a zero. Em amêndoas amargas, após 160 dias de amadurecimento, a amigdalina perfaz mais de 90% dos compostos cianogênicos, cuja concentração chega a mais de 16 µmol de HCN potencial por fruta (FREHNER et al., 1990).

3.2 Efeito da Concentração do Substrato

A concentração do substrato utilizada foi de até 10,2 mmol.L⁻¹ de amigdalina no meio reacional. Porém, a partir de 7,3 mmol.L⁻¹, observou-se uma queda dos valores, possivelmente pela saturação das enimas com o substrato, atingindo-se nessa concentração a V_{max} (velocidade máxima), onde todas as enzimas estão combinadas com o substrato (WHITAKER, 1994). Na Fig. 2a estão os dados obtidos por mililitro de extrato enzimático (Atividade enzimática = mmol de glicose.min⁻¹), onde são mostrados todos os pontos testados para concentração do substrato, porém os pontos acima de 7,3 mmol.L⁻¹ foram ignorados para melhor ajuste dos dados ao modelo experimental. A Fig. 2b apresenta os dados de atividade enzimática específica (mmol de glicose.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína), calculados de acordo com o conteúdo de proteínas no extrato enzimático, onde observa-se uma concentração de 15,54 mg de proteínas por mL. O extrato bruto de β-glucosidases obtido a partir de cerejas doces possui teor de proteínas total de 2,63 mg de proteínas totais, mensurado pelo método de Bradford utilizando albumina como padrão (GERARDI et al., 2001). O extrato bruto obtido pelo autor utilizava pó-de-

acetona, que faz com que as amostras não contenham pigmentos que possam interferir em métodos colorimétricos. O maior teor encontrado neste estudo para o extrato bruto pode estar relacionado ao método de extração, à presença de diferentes componentes na amêndoa de pêssgo, ao alto teor de proteínas ou à presença de impurezas.

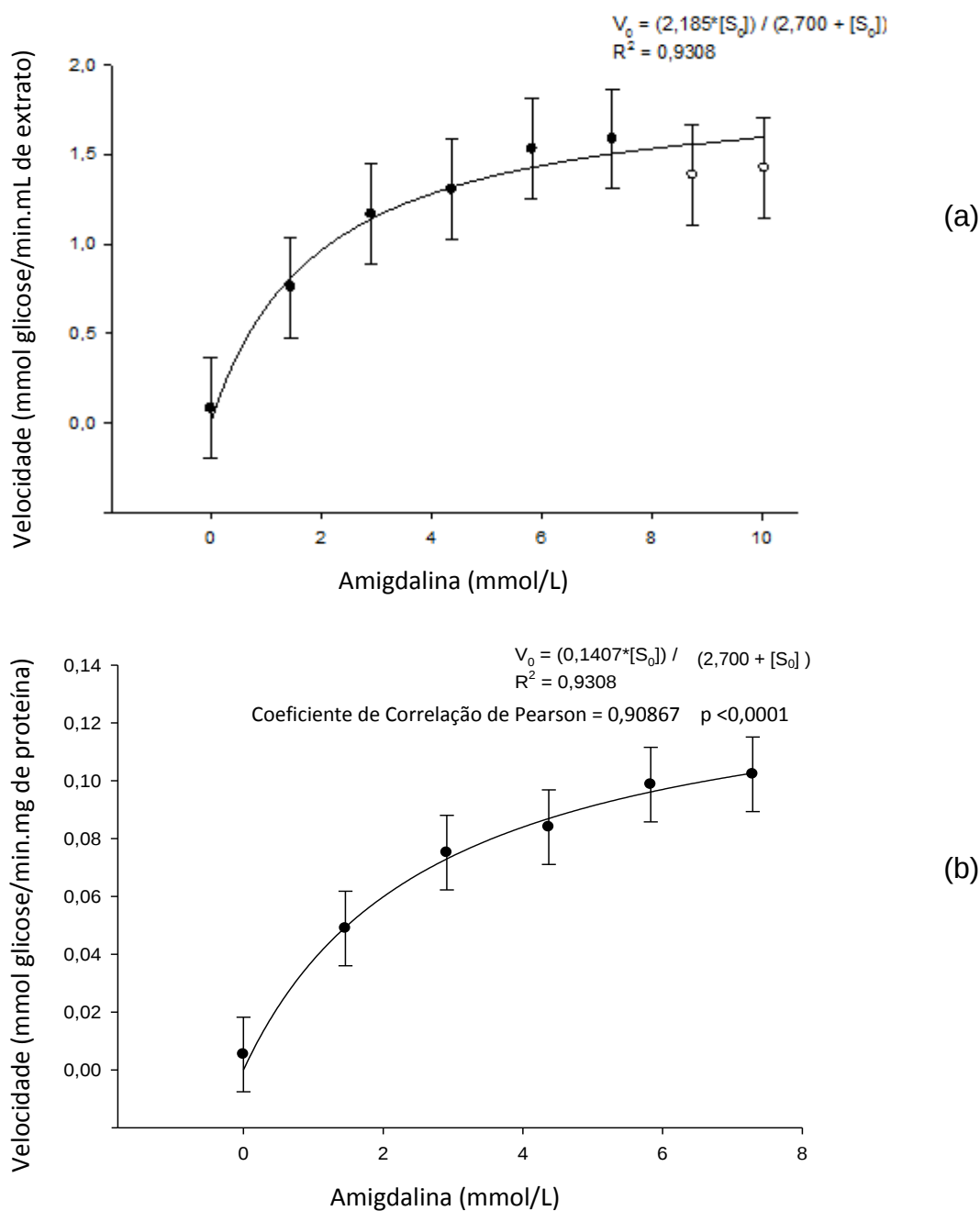


Figura 2. Atividade enzimática (a) e atividade enzimática específica (b) de β -glucosidase presente em amêndoa de pêssgo, determinadas a pH 6 e temperatura de 35°C, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS

Segundo o modelo, os parâmetros estimados para o extrato enzimático foram de $V_{\max} = 0,1407$ (mmol de glicose produzida. min^{-1} de reação. mg^{-1} de enzima) e $K_m = 2,700$ mmol. L^{-1} . As β -glucosidases extraídas de sementes de maçã e de amêndoas de pêssgo parecem possuir preferência por glicosídeos alquil de cadeia-média como substratos, com estabilidade semelhante à de glucosidades comerciais (YU et al., 2007).

KUROKI e POULTON (1987) estudaram as enzimas prunassina hidrolase I, IIa e IIb, e obtiveram valor de K_m entre 1,3-2,3 mM e $V_{\max}$ entre 13,9 e 54,2 (mmol de glicose. h^{-1} . mg^{-1} proteína), dependendo da enzima. As enzimas prunassina hidrolases apresentaram preferência de hidrólise pelo substrato (R)-prunassina e inativação frente aos demais glicosídeos cianogênicos como (R)-amigdalina, linustatina, neolinustatina, (S)-dhurrina e linamarina. Ensaio realizados por diversos autores demonstram que prunassinas hidrolases altamente purificadas exibem alta afinidade pelo substrato (R)-prunassina e são completamente inativas quando em presença de (R)-amigdalina (ZHOU et al., 2002).

As isozimas amigdalina hidrolases I', I, II e II' extraídas de cerejas pretas foram caracterizadas quanto aos seus parâmetros cinéticos à pH 5, e apresentaram K_m entre 1,65-2,20, velocidade máxima de reação entre 30,3 e 33,5 mmol glicose. h^{-1} . mg^{-1} e pontos isoelétricos de aproximadamente 5,8-6,4 (LI et al., 1992).

Valores baixos de k_m , em comparação com enzimas obtidas de outras fontes que agem sobre os mesmos substratos, indicam maior afinidade de ligação da enzima com o substrato (BINATE et al., 2008). Os valores das constantes cinéticas K_m e $V_{\max}$ encontrados neste estudo não são específicos para enzima alguma, mas representam um grupo de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas da molécula de amigdalina, podendo estar presentes no extrato obtido uma mistura de diferentes isozimas de amigdalina e prunassina hidrolase. Apesar de K_m e $V_{\max}$ estarem acima dos valores encontrados pelos autores, citados em trabalhos com cerejas pretas, as enzimas apresentaram boa afinidade pelo substrato, uma vez que não foram purificadas. O teor de proteínas em extratos brutos é muito superior do que em extratos purificados. À medida que GERARDI et al. (2001) purificaram o extrato bruto de β -glucosidase, o teor reduziu aproximadamente pela metade, após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; e foi 13 vezes menor após isolamento por cromatografia de troca iônica e, 25 vezes menor após separação por cromatografia de exclusão de tamanho.

3.3 Efeito do pH

As enzimas presentes nos extratos demonstraram-se estáveis a uma ampla faixa de pH (Fig. 3), com atividade máxima aos pH's de 5,0 a 7,0, sendo que a atividade ao pH 7 difere significativamente da observada em pH 8 (Apêndice B).

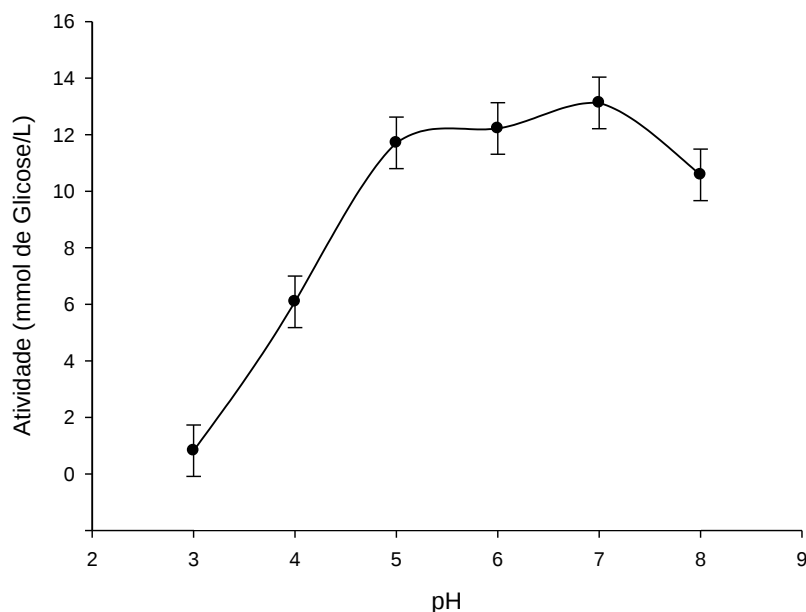


Figura 3. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glucosidase extraída de amêndoa de pêssogo, medida em mmol.L^{-1} de glicose, , determinada utilizando solução de amigdalina $10,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ e temperatura de 35°C , pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS

A atividade das enzimas prunassina hidrolase I, IIa e IIb, extraída de cerejas pretas atinge seu valor máximo ao valor de pH 5,0, em tampão citrato-fosfato (KUROKI e POULTON, 1987). Nas amigdalinas hidrolases, de mesma fonte, o pico da atividade enzimática apresenta-se entre os pHs 4,5-5,5 (LI et al., 1992). Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que as enzimas prunassina e amigdalina hidrolase de amêndoas de pêssogo possuem atividade enzimática em pH diferente dos encontrados em estudos similares com cerejas pretas, ou tal fato pode ser devido à presença de enzimas diferentes nas amêndoas de pêssogo que possam ter maior atividade nas faixas de pH citadas.

HAQUE e BRADBURY (2002), estudando um método de análise de cianeto total em plantas, cujo princípio é a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos por

enzimas endógenas, demonstraram que o pH ótimo para ação das enzimas e consequente liberação de cianeto em caroços de pêssgo é de 5-6. Em pH 7, 8 e 9, foram encontrados conteúdos de cerca de 20 % a menos cianeto de hidrogênio formado.

3.4 Efeito da temperatura

O efeito de diferentes temperaturas sobre a ação de β -glucosidases de amêndoas de pêssgo pode ser observado na Fig. 4.

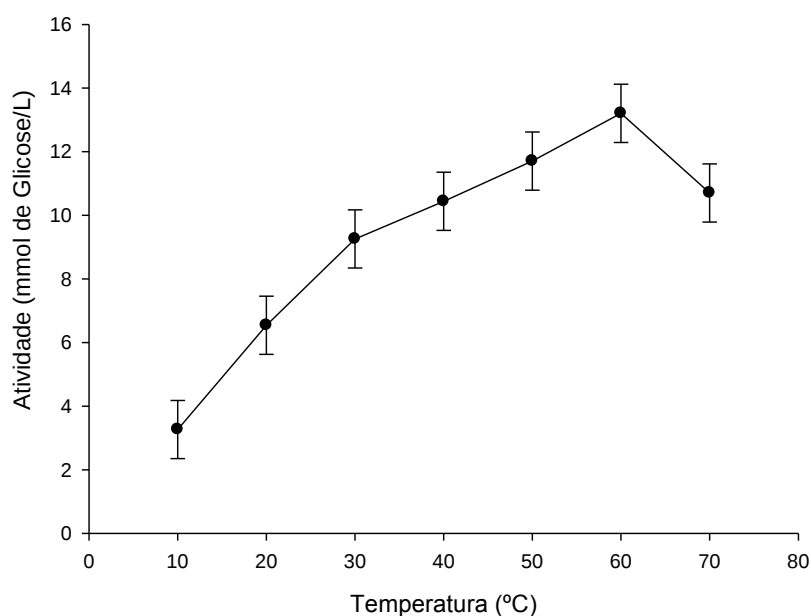


Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -glucosidase extraída de amêndoa de pêssgo, medida em mmol.L^{-1} de glicose, determinada utilizando solução de amigdalina $10,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ e pH 6, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS

Neste estudo, as enzimas demonstraram-se resistentes às temperaturas mais altas testadas, apresentando uma atividade máxima a 60°C e declínio após este ponto (Apêndice B). Este resultado é semelhante ao encontrado para β -glucosidases comerciais extraídas de amêndoas amargas, onde a temperatura máxima de ação é de 60°C , seguida por declínio a 70°C que se acentua a 80°C (YU

et al., 2007). ESEN e COKUMS (1991) atribuíram perdas acentuadas de atividade enzimática à desnaturação irreversível que ocorre pelo aumento de temperatura.

A atividade de β -glucosidases presentes em méis, mensurada com o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosidase, demonstrou completa ou parcial inativação das enzimas em ensaios a 60°C, indicando que neste produto a referida enzima é mais termolábil. Porém, as enzimas demonstraram ser mais estáveis em pH alcalino, com redução da atividade a partir de pH 9,0 (PONTOH e LOW, 2002). GERARDI et al. (2001), também utilizaram o substrato p-nitrofenil para mensurar a atividade de β -glucosidases presentes em cerejas pretas, uma vez que a atividade destas enzimas no substrato atinge níveis semelhantes à de atividade em prunassina, de 54 e 57%, em percentual de atividade relativo.

TUNÇEL et al. (1998) relatam que a enzima β -glucosidase endógena presente em amêndoa de damasco somente apresenta 100% de perda de atividade após tratamento realizado a 100°C por 20 minutos. Porém, utilizando o binômio 100°C e 10 minutos, a taxa de glicosídeos cianogênicos degradados após 2 horas de permanência em repouso a temperatura ambiente é 20 vezes inferior quando comparada com a amostra que não passou por branqueamento. Em estudo comparando a estabilidade de extratos brutos de glucosidases a 50°C, foi encontrado que as enzimas extraídas de amêndoas de pêssago foram as que possuíram maior estabilidade à temperatura por longos períodos. Apesar do comportamento desta enzima e das enzimas comerciais extraídas de amêndoas serem os mesmos após 48h de incubação, se observou preservação de aproximadamente 70% da atividade enzimática; em 72h este valor se reduziu para as enzimas comerciais e permaneceu para as enzimas presentes nas amêndoas de pêssago (YU et al., 2007).

4. Conclusão

A amêndoa de pêssago apresenta teores de amigdalina semelhante ao de outras amêndoas amargas. O seu extrato bruto de β -glucosidases apresentou relativamente boa afinidade pelo substrato, com valores de K_m de 2,7 mM de amigdalina e de V_{max} de 0,1407 mmol de glicose.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína e comportamento que se ajusta ao modelo de Henri-Michaelis e Menten até a concentração de substrato no meio reacional de 7,3 mM de amigdalina, além de

atividade a diferentes valores de pH, com atividade ótima na faixa de 5 a 7. O extrato demonstrou-se ativo mesmo às temperaturas mais elevadas testadas.

5. Referências

ARAYA, E.; RODRIGUEZ, A.; RUBIO, J.; SPADA, A.; JOGLAR, J.; LLEBARIA, A.; LAGUNAS, C.; FERNANDEZ, A. G.; SPISANI, S.; PEREZ, J. J. Synthesis and evaluation of diverse analogs of amygdalin as potential peptidomimetics of peptide T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, pp. 1493-1496, 2005.

BERNFELD, P. *Amylases, α and β* . *Methods in Enzymology*, v. 1, pp. 149-158, 1955.

BINATE, S.; N'DRI, D.; TOKA, M.; KOUAME, P. Purification and characterization of two beta-glucosidases from termite workers *Macrotermes bellicosus* (Termitidae: Macrotermitinae). *Journal of Applied Biosciences*, v. 10, pp. 461-470, 2008.

DU, Q.; JERZ, G.; HE, Y.; LI, L. XU, Y.; ZHANG, Q.; ZHENG, Q.; WINTERHALTER, P.; ITO, Y. Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, pp. 43-46, 2005.

ESEN, A.; COKUMS, C. pH and temperature-dependent β -glucosidase multiplicity in maize (*Zea mays* L.) is a proteolysis artifact. *Plant Science*, v. 74, pp. 17-26, 1991.

FALK, A.; RASK, L. Expression of a Zeatin-O-Glucoside-Degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, v. 108, pp. 1369-1377, 1995.

FEMENIA, A.; ROSSELÓ, C.; MULET, A.; CAÑELLAS, J. Chemical Composition of Bitter and Sweet Apricot Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, pp. 356-361, 1995.

FREHNER, M.; SCALET, M.; CONN, E. E. Pattern of the cyanide-potential in developing fruits – Implications for plants accumulating cyanogenic monoglucosides (*Phaseolus lunatus*) or cyanogenic diglucosides in their seeds (*Linum usitatissimum*, *Prunus amygdalus*). *Plant Physiology*, v. 94, pp. 28-34, 1994.

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science*, v. 160, pp. 795-805, 2001.

HAQUE, M. R.; BRADBURY, J. H. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry*, v. 77, pp. 107-114, 2002.

KUROKI, G. W.; POULTON, J. E. Isolation and characterization of multiple forms of prunasin hydrolase from black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 255, n. 1, pp. 19-26, 1987.

LI, C. P.; SWAIN, E.; POULTON, J. E. *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase. *Plant Physiology*, v. 100, pp. 282-290, 1992.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, pp. 840-843, 2006.

MORANT, A. V.; JORGENSE, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, B. L.; BAK, S. β -glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, v. 69, pp. 1795-1813, 2008a.

MORANT, A. V.; BJARNHOLDT, N.; KRAGH, M. E.; KJAERGAARD, C. H.; JORGENSEN, K.; PAQUETTE, S. M.; PIOTROWSKI, M.; IMBERTY, A.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L.; BAK, S. The β -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, v. 147, pp. 1072-1091, 2008b.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, pp. 679-690, 2002.

ROBINSON, H. W.; HOFGEN, C. G. The biuret reaction in the determination of serum proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 135, pp. 707-725, 1940.

SÁNCHEZ-PEREZ, R.; BELMONTE, F. S.; BORCH, J.; DICENTA, F.; MOLLER, B. L.; JORGENSEN, K. Prunasin hydrolases during fruit development in sweet and bitter almonds. *Plant Physiology*, v. 158, pp. 1916-1932, 2012.

SWAIN, E.; LI, C. P.; POULTON, J. E. Development of the potential for cyanogenesis in maturing black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) fruits. *Plant Physiology*, v. 98, pp. 1423-1428, 1992.

SWAIN, E.; POULTON, J. E. Utilization of amygdalin during seedling development of *Prunus serotina*. *Plant Physiology*, v. 106, pp. 437-445, 1994.

TIMERMAN, A. P. The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies. *In*: AHMAD, R. Protein Purification. Hard Cover, In Tech, 224p., 2012.

TUNÇEL, G.; NOUT, M. J. R.; BRIMER, L. Degradation of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chemistry*, v. 63, n. 1, pp. 65-69, 1998.

VERDOUCQ, L.; CZJEK, M.; MORINIERE, J.; BEVAN, D. R.; ESEN, A. Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β -glucosidases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, pp. 25055-25062, 2003.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, v. 38, pp. 11-36, 2000.

WHITAKER, J. R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York: Marcel Dekker Inc, 593p, 1994.

YU, H. L.; XU, J. H.; LU, W. Y.; LIN, G. Q. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, pp. 354-361, 2007.

ZHOU, J.; HARTMANN, S.; SHEPHERD, B. K.; POULTON, J. E. Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant Physiology*, v. 129, n. 3, pp. 1252-1264, 2002.

ZHOU, C.; CHEN, K.; SUN, C.; CHEN, Q.; ZHANG, W.; LI, X. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC. *Biomedical Chromatography*, v. 21, pp. 755-761, 2007.

3. CAPÍTULO II - Avaliação da qualidade de óleo de amêndoa de pêssego: características físico-químicas e composição de fitoquímicos

Resumo

O óleo de pêssego é obtido a partir da amêndoa da fruta, que se encontra no interior de seu endocarpo lignificado. Segundo trabalhos prévios, este óleo apresenta alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, porém pouco se sabe sobre o conteúdo de antioxidantes e de outros componentes minoritários que possam estar presentes. Deste modo, neste trabalho realizaram-se análises para verificar a qualidade do óleo obtido por duas técnicas de extração, que utilizam solventes de polaridades distintas a fim de avaliar os efeitos tanto na qualidade nutricional quanto de características físico-químicas. Como resultados, os óleos apresentaram em sua composição majoritariamente os ácidos graxos oleico e linoleico, com percentuais superiores a 55 e 30%, respectivamente. O óleo extraído pela técnica de Soxhlet apresentou ácidos graxos livres e diacilgliceróis em quantidade significativamente superior ao óleo extraído pela técnica de Bligh Dyer; porém, estes fatores não propiciaram maior ocorrência de reações oxidativas no produto. A composição de fitoquímicos dos óleos foi significativamente diferente em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitosteróis, apresentando teores mais elevados no óleo extraído por Soxhlet. Quanto à presença do glicosídeo cianogênico amigdalina, os óleos apresentaram $3,14 \text{ mg.g}^{-1}$ do composto, que não diferiu entre amostras testadas. As análises demonstraram que, se por um lado, o material de estudo apresenta alto teor de fitoquímicos desejáveis, como quercetina ($349,08 \text{ mg.100g}^{-1}$), α -tocoferol ($12,57 \text{ mg.100g}^{-1}$) e β -sitosterol ($5,79 \text{ mg.g}^{-1}$), em contrapartida sofre reações hidrolíticas e também mostra a presença de componente potencialmente tóxico.

Palavras-chave: óleo, pêssego, degradação, fitoquímicos.

1. Introdução

A amêndoa de pêssego (*Prunus persica*) contém percentual de óleo de aproximadamente 38% em base seca (WU et al., 2011), inferior à amêndoa de damasco (*Prunus armeniaca*), onde os níveis chegam a 50% (SILEM et al., 2006; TUNÇEL et al., 1998). Como nas demais frutas do gênero *Prunus*, que constituem importante fonte alimentar de fitoquímicos, como compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitoestrogênios e ácido L-ascórbico (SHULAEV et al., 2008), as sementes ou amêndoas de pêssego encontram-se envoltas por um endocarpo lignificado, o caroço (LOMBARDO et al., 2011).

Encontram-se na literatura dados sobre determinações de compostos fenólicos e atividade antioxidante de óleos obtidos de amêndoas de pêssego (WU et al., 2011; MEZZOMO et al., 2010), além da composição relativa de fitosteróis (UL'CHENKO et al., 2009), que muitas vezes são utilizados como marcadores para determinar a adulteração de óleos, juntamente com outros compostos presentes na fração insaponificável (ABIDI, 2001). Porém, dados de fitoquímicos como tocoferóis e carotenoides ainda não foram publicados. A atividade antioxidante destes compostos resulta de um mecanismo de defesa das plantas (ABBASI et al., 2007) onde, em maior ou menor grau, estes compostos atuam reduzindo a iniciação e/ou propagação de reações oxidativas em óleos vegetais (IANNONE et al., 1998; RICE-EVANS et al., 1996; SIES e STAHL, 1995; WHITE e ARMSTRONG, 1986). Porém, pode haver a presença de glicosídeos cianogênicos no óleo, uma vez que estes compostos estão presentes nas amêndoas (BARCELOUX, 2009).

Os métodos de Soxhlet e Bligh Dyer apresentam rendimento em lipídios que não diferem significativamente. A extração por Bligh Dyer utiliza ampla faixa de polaridade de solventes, em geral, mais polares do que éter de petróleo e hexano (BRUM et al., 2009). O solvente clorofórmio possui índice de polaridade de 4,1, enquanto o valor do metanol é de 5,1 e o da água é de 9,0. Já solventes utilizados na técnica de Soxhlet, como o éter de petróleo, constituído de mistura de hidrocarbonetos voláteis, possui índice de polaridade em torno de 0 (BRYERS, 2003).

Deste modo, teve-se por objetivo determinar as características físico-químicas e conteúdo de fitoquímicos presentes em óleos obtidos por duas técnicas que utilizam solventes com polaridades distintas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Extração do óleo

Os caroços de pêssego foram obtidos em indústrias processadoras de pêssegos em calda (Oderich e iCalda), provenientes de frutas da safra 2011/2012. Primeiramente os caroços de pêssego foram secos por 24 h a aproximadamente 45°C, em estufa com circulação de ar. Após, foram quebrados para a remoção da amêndoas utilizando equipamento desenvolvido em laboratório, modelo de triturador de rolos canelados, com 1,29 kW de potência e capacidade de operação equivalente a 400 kg.h⁻¹. Os que permaneceram inteiros foram desintegrados manualmente com auxílio de um martelo. As amêndoas contidas no interior dos caroços foram armazenadas íntegras a -25°C até o momento da extração de óleo. Antes da extração as amêndoas foram trituradas utilizando Mixer XION, modelo XI-GL50. Uma parte das amêndoas foi submetida à extração de óleo por Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente e refluxo durante 4 horas. De outra parte das amêndoas foi extraído óleo pela técnica de Bligh-Dyer, onde para cada grama de amostra foi adicionado 20 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1) em erlenmeyer de 500 mL. A amostra foi homogeneizada durante 30 minutos em agitador. Após, procedeu-se a filtração das amostras utilizando papel filtro qualitativo de 80g.m⁻² de espessura, 205 µm de gramatura e poros de 14 µm em funil de separação. Foi adicionado água ao filtrado, na mesma quantidade do metanol utilizado. A fase inferior foi coletada e evaporada em rota-evaporador a 45°C, e o óleo obtido foi estocado sob congelamento em recipientes de vidro.

2.2 Teor de acidez

Pesou-se aproximadamente 1g de amostra em erlenmeyer. A esta foi adicionada solução de éter etílico: álcool etílico (2: 1), sob agitação. Em seguida, foi titulada com hidróxido de potássio 0,1 N com indicador fenolftaleína 1% (AOCS Ca a-40, 1992).

2.3 Índice de peróxidos

Pesou-se 1g de amostra em Erlenmeyer com tampa esmerilhada, à qual foi adicionado 30 mL de solução ácido acético: clorofórmio (3:2 v/v). Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e a amostra foi colocada no escuro durante 1 minuto, sendo após adicionado 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido 1%. A amostra foi titulada com tiosulfato de sódio 0,1 N até desaparecimento da coloração azul (AOCS Cd 8-53, 1992).

2.4 Índice de ácido tiobarbitúrico

Pesou-se 50 mg de óleo, ao qual foi adicionado 1 mL de éter de petróleo. A amostra foi dissolvida com 1-butanol e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Após, transferiu-se 5 mL desta solução para tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico. A amostra permaneceu em banho-maria à temperatura de 95°C durante 2 horas. Após resfriado, a absorbância da solução foi mensurada ao comprimento de onda de 530nm em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/VIS (AOCS Cd 19-90, 1992).

2.5 Perfil de glicerídeos

O óleo foi analisado quanto à composição de glicerídeos em cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com uma coluna Zebron ZB-HT Capillary, de dimensões 15m x 0,32mm x 0,1µm, utilizando temperatura inicial no forno de 50°C, mantida durante 1 minuto, com aquecimento de 15°C.min⁻¹ até 180°C, ocorrendo incremento na temperatura de 7°C.min⁻¹ até 230°C e de 10°C.min⁻¹ até 370°C, temperatura mantida por 5 minutos, utilizando nitrogênio como gás de arraste a 1,5 mL.min⁻¹. As temperaturas no detector de ionização de chama (FID) e no injetor foram de 380°C. As amostras foram preparadas por derivatização de 50 mg de amostra utilizando o derivatizante *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) e adição de 10 mg de decanoato de etila como padrão interno. Os picos foram identificados pela comparação com o tempo de retenção dos padrões de mono-oleína, dioleína e trioleína (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA). A

quantificação dos gliceróis foi realizada fazendo-se relação entre a área do pico de interesse com a área do padrão interno (RUPPEL et al., 2008).

2.6 Composição em ácidos graxos

As amostras foram derivatizadas através de metodologia de HARTMAN e LAGO (1973), através da adição de 500 μL de KOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol à aproximadamente 30 mg de óleo. As amostras permaneceram em banho-maria a 60°C durante 1,5 horas, sendo após adicionados 1,5 mL de H_2SO_4 1 mol.L^{-1} e ocorrendo novo aquecimento a 60°C durante 1,5 horas. Após o período, as amostras foram resfriadas e adicionou-se 2 mL de n-hexano. Após agitação, deixou-se que se separassem as fases, quando se coletou a fase de n-hexano que contém os ésteres metílicos de ácidos graxos. A amostra foi injetada em cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com uma coluna ID Carbowax 20 M de $0,25 \mu\text{m}$ e dimensões 30 m x 0,25 mm, revestida com polietileno glicol. A temperatura inicial da coluna foi de 90°C , mantida por 1 minuto, com incremento linear de 12°C por minuto até atingir a temperatura de 160°C , mantida por 3,5 minutos, seguida de incremento linear de $1,2^{\circ}\text{C}$ por minuto até a temperatura de 190°C , ocorrendo então incremento linear de 15°C por minuto até a temperatura de 230°C , que foi mantida por 15 minutos. O injetor foi mantido na temperatura de 230°C e o detector em 250°C . Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste a $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos contendo os ácidos caproico, caprílico, cáprico, caproleico, láurico, dodecenoico, mirístico, miristoleico, palmítico, palmitoleico, margárico, heptadecenoico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, araquídico, gadoleico, eicosadienoico, eicosatrienoico, tetraenoico, lignocérico e nervônico (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos em percentual relativo de ácidos graxos.

2.7 Matéria Insaponificável e Índice de Saponificação

A determinação de matéria insaponificável foi realizada a saponificação de 1g de óleo com hidróxido de potássio $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em etanol, que ocorreu sob agitação durante a primeira hora. Após, as amostras permaneceram durante 18 horas na

ausência de luz e, em seguida, foram transferidas para funil de separação. Foram adicionados 40 mL de água e 40 mL de hexano. Após a separação das fases, as fases aquosa e orgânica foram adicionadas, respectivamente de mais 20 mL de hexano e água. As fases superiores foram coletadas em balão e evaporadas em evaporador à vácuo até completa remoção dos solventes. Determinou-se o percentual de matéria insaponificável pela relação entre o peso de amostra após a saponificação e o peso inicial utilizado na análise (ZAMBIAZI, 1997).

O índice de saponificação foi determinado para obter uma estimativa do peso molecular dos triacilgliceróis presentes no óleo. Sua determinação foi realizada através da saponificação de 2 g de óleo com 20 mL de KOH 4%, que ocorreu sob ebulição da amostra em sistema dotado de manta térmica, balão de fundo redondo e condensador, durante 30 minutos. Após, a amostra foi titulada com solução padrão de HCl 0,5 mol.L⁻¹ e indicador fenolftaleína. O equivalente de saponificação foi determinado pela equação $ES = 56108 / IS$, onde IS é o índice de saponificação. O peso molecular médio dos triacilgliceróis foi estimado como o valor do equivalente de saponificação multiplicado por três (AOCS Cd 3-25, 1992).

2.8 Conteúdo de compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo metodologia de KLEN e VODOPIVEC (2012), adaptada. Pesou-se 1 g de óleo em tubo de centrífuga, que foi dissolvida em 1 mL de n-hexano e 0,5 mL de metanol. As amostras foram sonicadas por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 5000 rpm por 4 minutos. O extrato metanólico foi transferido para frasco âmbar e a fração orgânica foi lavada por mais 2 vezes com 0,5 mL de metanol. Após, juntou-se os extratos metanólicos que foram armazenados a -25°C durante 3 horas para separação de eventuais residuais de gordura pela precipitação à baixa temperatura. A fração que permaneceu líquida foi separada e transferida para balão volumétrico de 5 mL, sendo o volume final aferido com metanol grau HPLC. Uma alíquota de 30 µL dessa amostra foi injetada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu com injetor automático, detector UV-visível a 280nm, coluna de fase reversa RP-18CLC-ODS (5µm, 4,6mm x 150mm), fase estacionária de octadecil e coluna de guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil, ambas localizadas em forno a 25°C, a fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, utilizando gradiente de eluição

constituído de ácido acético 1% em água ultra pura e metanol grau HPLC, com tempo de corrida de 44 minutos, segundo metodologia de ZAMBIAZI (1997). A fase inicial consistiu de 100% de ácido acético 1% em água, reduzindo a proporção desta mistura para 60% ao atingir 25 minutos, e aumentando novamente para 100 % ao atingir 37 minutos, permanecendo nesta proporção por mais 5 minutos. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção dos respectivos padrões. A quantificação foi realizada pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do respectivo padrão, previamente construída (Anexo A). Os resultados foram expressos em miligramas de composto fenólico por 100g de amostra.

A determinação do conteúdo total dos compostos fenólicos foi realizada pela reação colorimétrica descrita por SINGLETON e ROSSI (1965), onde 1 mL do extrato metanólico foi coletado e adicionado em tubo de centrífuga, com adição de 10 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau 2 N. A amostra permaneceu em repouso durante 3 minutos e, em seguida, acrescentou-se 1,5 mL de carbonato de sódio 20%. Após 2 horas de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/VIS, utilizando o comprimento de onda 765 nm. Para a quantificação, foi construída curva de concentração de padrão de quercetina, com leitura de absorbância a 765 nm (Apêndice A). Os resultados foram expressos em miligramas de quercetina por 100g de amostra.

2.9 Conteúdo de carotenoides

Pesou-se 1 g de amostra em balão de 5 mL, que foi diluída em solução de iso-octano:etanol (3:1, v/v). Uma alíquota da amostra foi centrifugada e transferida para um vial, e injetada em cromatógrafo líquido, sistema HPLC-Shimadzu, idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos, porém utilizando uma coluna Ultracarb 30-ODS (5µm x 4,6mm x 150mm). A separação foi realizada utilizando gradiente dos solventes metanol, acetonitrila e acetato de etila, com fase inicial constituída de 30 % de metanol e 70% de acetonitrila, aumentando-se a proporção de acetonitrila para 80% aos 10 minutos de análise e adicionando-se 10% de acetato de etila. Após foi reduzida a proporção de metanol para 5% ao atingir 35 minutos ao mesmo tempo que aumentou-se a proporção de acetato de etila para 15%. Aos 40 minutos, a proporção dos solventes voltou à proporção inicial. Foi

utilizado fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detector UV-Vis ao comprimento de onda de 450 nm (ZAMBIAZI, 1997). Os carotenoides foram identificados pela comparação entre o tempo de retenção dos respectivos padrões; e a quantificação foi realizada pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do respectivo padrão, previamente construída (Anexo A). Os resultados foram expressos em µg.100g⁻¹ de amostra.

Para a análise do total de carotenoides, o restante da amostra contida no balão foi utilizada para leitura em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/VIS, utilizando comprimento de onda 450 nm. Para a quantificação, foi utilizada a equação 1:

$$\text{Carotenóides Totais (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)} = \frac{A \times X \text{ (mL)} \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times Y \text{ (g)}} \quad (\text{eq.1})$$

Em que: A = absorvância; X = volume da solução (5 mL); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absorção (2480, equivalente ao carotenoide majoritário zeaxantina no solvente etanol) e Y = ao peso da amostra diluído no volume X, conforme sugerido por RODRIGUEZ-AMAYA (1999), com resultados expressos em mg de zeaxantina por grama de amostra.

2.10 Tocoferóis

150 mg de amostra foram pesadas em balão de 5 mL, completando-se o volume com isopropanol:acetonitrila grau HPLC (7:3 v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi injetado em cromatógrafo HPLC-Shimadzu, em sistema descrito previamente, equipado com detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290nm para excitação e de 330nm para a emissão. A separação foi efetuada ao fluxo de 1 mL.min⁻¹, utilizando sistema de eluição por gradiente, com metanol, acetonitrila e isopropanol como fases móveis, com fase inicial de 40:50:10, respectivamente, alterando-se a proporção aos 10 minutos para 65:30:5. Aos 12 minutos, retornou-se à proporção inicial dos solventes, com um tempo total da análise de 15 minutos, segundo a metodologia descrita por ZAMBIAZI (1997). A identificação dos tocoferóis foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção dos respectivos padrões; e a quantificação foi realizada pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do respectivo padrão, previamente construída (Anexo A). Os resultados foram expressos em miligramas de tocoferol por 100 g de amostra.

2.11 Fitosteróis

As amostras foram primeiramente saponificadas, conforme técnica descrita na quantificação da matéria insaponificável. Após a evaporação do solvente sob vácuo a 40°C, o resíduo do balão foi dissolvido em 5 mL de metanol:etanol (1:1 v/v). A separação dos fitosteróis foi realizada em sistema cromatográfico HPLC-Shimadzu, conforme descrito anteriormente, utilizando eluição isocrática de metanol grau HPLC, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, utilizando o detector UV-Vis ajustado para o comprimento de onda de 205 nm (ZAMBIAZI, 1997). A identificação dos fitosteróis foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção dos respectivos padrões; e a quantificação foi realizada pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do respectivo padrão, previamente construída (Apêndice C). Os resultados foram expressos em mg de fitosteróis por grama de amostra.

2.12 Amigdalina

Pesou-se 500 mg de óleo em tubo de centrífuga e adicionou-se aproximadamente 3 mL de etanol grau HPLC. A amostra então foi levada ao banho ultrassônico durante 30 minutos, após foi transferida para balão de 5 mL e o volume final foi aferido com etanol. Transferiu-se uma alíquota da amostra para tubo de Eppendorf, que foi centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi injetado, em quantidade de 10 µL, em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu e coluna fase reversa RP-18CLC-ODS, como já descrito anteriormente, utilizando detector UV-visível a 220 nm, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e eluição isocrática de água ultrapura e metanol HPLC 80:20 (v/v) (DU et al., 2005, adaptada). A identificação da amigdalina foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção do pico da amostra e o do respectivo padrão; e a quantificação pela relação entre a área do pico de interesse e a curva de calibração do padrão, previamente construída (Apêndice C). Os resultados foram expressos em mg de amigdalina por grama de amostra.

2.13 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados dos óleos foram comparados entre si através de teste *t* ($p < 0,05$), separadamente por experimento, utilizando o software The SAS System for Windows Versão 8 (2002).

3. Resultados e Discussão

Os resultados dos testes de qualidade de óleos de amêndoa de pêssego extraído por técnica de Soxhlet e de Bligh-Dyer estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Avaliações de qualidade de óleo extraído de amêndoa de pêssego por diferentes métodos

Determinações	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
Teor de acidez (% de ácido oleico)	1,557 a	0,0201	0,954 b	0,0072
Índice de peróxidos (meq.kg ⁻¹)	15,85 a	0,0027	15,69 a	0,0013
Índice de ácido tiobarbitúrico	0,0045 b	0,0225	0,013 a	0,1664
Matéria Insaponificável (%)	0,90 a	0,2644	1,15 a	0,0408

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação

Em óleos extraídos de amêndoas pertencentes à família *Rosaceae*, espécie *Prunus*, foram observados teores de acidez e índice de peróxidos variaram de 1,389 a 3,559 % e de 7,586 a 15,590 meq.kg⁻¹, respectivamente (ÖZCAN et al., 2011). Os óleos analisados no presente estudo apresentaram valores dentro da faixa descrita, porém há um alto percentual de ácidos graxos livres, comparado com estudos de WANG e YU (2012), que encontraram teores de acidez de 0,46 mg KOH. g⁻¹ em óleo extraído de amêndoas de damasco. WU et al. (2011), encontraram valores de acidez, em mg de KOH.g⁻¹ de óleo de amêndoa de pêssego, que variaram de 0,7 a 1,1, dependendo do solvente utilizado na extração pelo método de Soxhlet. Os valores encontrados no presente estudo, quando convertidos para as mesmas unidades, são de 1,9 e 3,1 mg KOH. g⁻¹ de óleo, para o óleo obtido por Soxhlet e Bligh-Dyer, respectivamente.

Observou-se diferença significativa entre as amostras, com valores de acidez superiores no óleo extraído por Soxhlet, o que indica maior ocorrência de degradação hidrolítica. A extração por Soxhlet também originou óleo de semente de *Moringa oleifera* com maior percentual de ácidos graxos livres do óleo obtido pelo método enzimático utilizando água (ABDULKARIM et al., 2005). KUMAR et al. (2009), explicou em função que solventes mais polares tendem a remover porções de água presentes em óleos, necessárias para a atividade de lipase, o que inativa essas enzimas, enquanto o emprego de hexano e solventes hidrofóbicos preservam maiores percentuais de atividade enzimática.

BRUM et al. (2009), também encontraram percentual de ácidos graxos livres significativamente superior em óleos extraídos pela técnica de Soxhlet, e explicaram a diferença pelo favorecimento da hidrólise dos triacilgliceróis durante o aquecimento das misturas por tempos de 4 a 8h. Os ácidos graxos livres aumentam a susceptibilidade de óleos vegetais à reações de termo-oxidação (FREGA et al., 1999). Para reduzir a acidez e melhorar a qualidade de óleos vegetais, estes são submetidos ao refino químico ou físico. Entretanto, durante esta operação, componentes como os esteróis e compostos fenólicos são também removidos, aumentando a susceptibilidade dos ácidos graxos à oxidação (ZEB e MURKOVIC, 2011a).

Valores de 0,9% de matéria insaponificável já foram descritos para óleo de damasco selvagem (GANDHI et al., 1997), e estudos já demonstraram que óleos de pêssgo obtidos por prensagem apresentam altos teores de compostos insaponificáveis, de até 1,3% (UL'CHENKO et al., 2009).

Os autores BRUM et al. (2009), detectaram que a técnica de Soxhlet foi o único método de extração que apresentou óleos que possuíam valores para o índice de peróxidos, enquanto em outras metodologias como o Bligh Dyer, o composto não foi detectável. Com relação à análise de índice de peróxidos, não foi encontrada diferença significativa entre as amostras, que se aproximaram dos valores descritos por ÖZCAN et al. (2011), para óleos de diferentes amêndoas. O alto valor encontrado é indicativo de ocorrência de oxidação em estágio avançado, que pode ter se desencadeado anteriormente à extração do óleo, uma vez que óleos extraídos de sementes por MOGHADDAM et al. (2012), também apresentaram alto índice de peróxidos, ainda que a presença de ácidos graxos livres, que em níveis mais elevados podem contribuir para a ocorrência de oxidação, fosse baixa, próxima a

0,3%. Neste estudo, entretanto, apesar da presença de peróxidos, houve baixa formação de malonaldeído, produto secundário resultante da decomposição de peróxidos formados na oxidação, com menor ocorrência no óleo obtido por Soxhlet. Estes resultados demonstram que as reações oxidativas que ocorreram nos óleos não se encontravam em estágio muito avançado do processo oxidativo, onde os peróxidos se decompõem a produtos voláteis ou se rearranjam na forma de polímeros (MENDONÇA et al., 2008). Segundo DURMAZ et al. (2010), óleos obtidos de amêndoas torradas contém níveis mais baixos de produtos primários e secundários de oxidação do que aqueles de amêndoas não tostadas, possuindo maior estabilidade.

Os óleos foram submetidos a análises cromatográficas de perfil de glicerídeos, para melhor explicar a alta acidez das amostras, e composição de ácidos graxos (tab. 2).

Tabela 2. Perfil de glicerídeos de óleo extraído de amêndoa de pêssego por diferentes métodos

Perfil de Glicerídeos (%)	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.*
Monoacilgliceróis	n. d.**	-	n. d.	-
Diacilgliceróis	12,85 a	0,0054	8,57 b	0,0023
Triacilgliceróis	87,15 b	0,0008	91,43 a	0,0002

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação; **n. d. = não detectável

Devido ao alto teor de acidez, resultante de reações hidrolíticas, também foram observados altos conteúdos de diacilgliceróis em ambos óleos. Os valores superiores na análise de acidez do óleo extraído por Soxhlet foram comprovados pelos maiores percentuais de diacilgliceróis, que foram significativamente superiores no óleo obtido pela metodologia de Soxhlet. Não foi detectada a presença de monoacilgliceróis (Fig. 1).

Através da análise do índice de saponificação encontrou-se como valor para o equivalente de saponificação 807,2 g e peso molecular dos triacilgliceróis de 2422 g, o que indica a formação de compostos de alto peso molecular. Segundo HOPIA (1993), a autooxidação dos lipídios origina compostos de alto peso molecular tais

como triacilgliceróis oxidados e compostos diméricos de triacilgliceróis, o que pode ter ocorrido no óleo analisado, uma vez que os teores de peróxidos indicam estado de degradação oxidativo avançado e não foram encontrados níveis elevados de malonaldeído, que poderia indicar a degradação dos compostos formados a outros volatizáveis, de baixo peso molecular. Estequiometricamente, infere-se que pelo resultado encontrado o peso molecular dos diacilgliceróis presentes neste óleo seria igual ao peso do triacilglicerol menos um ácido graxo livre, o que resultaria em aproximadamente 1615 g. Desse modo, se em uma alíquota de óleo onde houvesse 100% de triacilgliceróis fossem observadas 0,041 moléculas de triacilgliceróis (100/ 2422 g), em outra onde o conteúdo fosse 87,15% de triacilgliceróis e 12,85% de diacilgliceróis, haveria 0,036 (87,15/ 2422 g) e 0,008 (12,85/ 1615 g) moléculas destes componentes, respectivamente. Como a acidez em ácido oleico do mesmo óleo foi de 1,56, isso resultaria em 0,006 (1,56/ 282g de ácido oleico) moléculas de ácidos graxos livres, o que estaria próximo ao valor de diacilglicerídeos encontrado, podendo estes ácidos graxos serem considerados produtos de hidrólise dos triacilgliceróis.

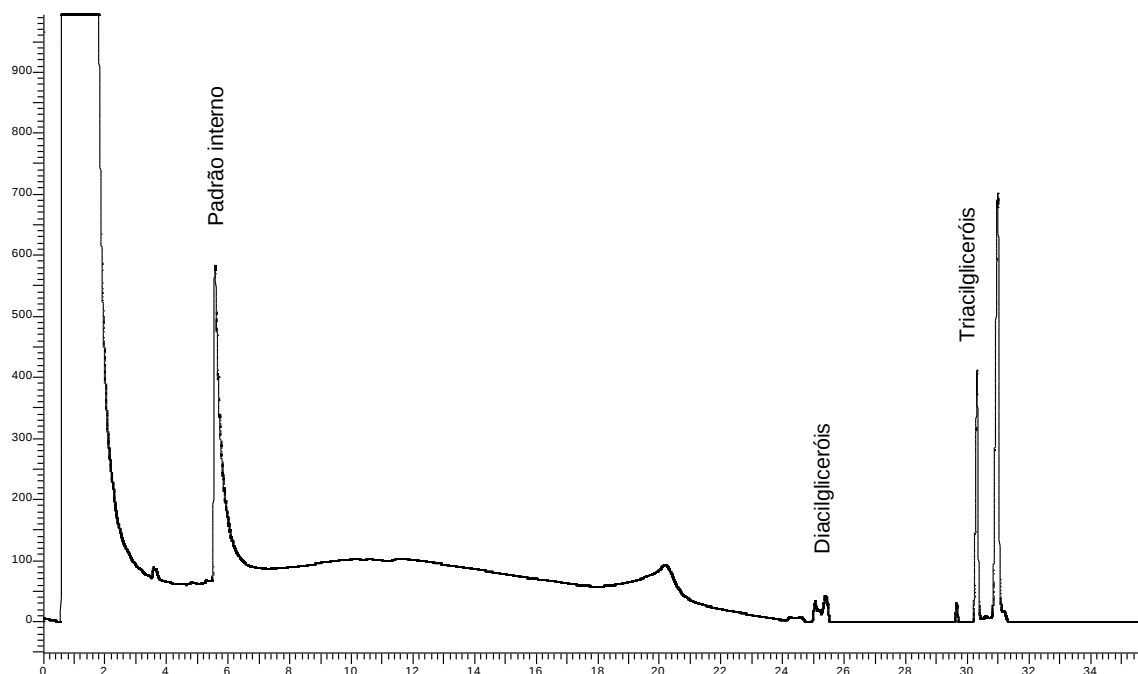


Figura 1. Cromatograma típico de separação de di- e tri-acilgliceróis em óleo de amêndoa de pêsego, utilizando cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com detector FID a 380°C e coluna Zebron ZB-HT Capillary à temperatura inicial de 50°C e final de 370°C

O perfil de ácidos graxos das amostras apresentou como ácidos graxos majoritários os ácidos oleico e linoleico, identificados aos 15,6 e 16,8 min, respectivamente, no cromatograma de separação (Fig. 2).

Níveis mais elevados de ácido oleico em relação ao conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados são determinantes para manter a estabilidade de óleos vegetais, juntamente com tocoferóis e compostos fenólicos. No entanto, a presença de carotenoides, como da astaxantina e β -caroteno, podem estar envolvidos no aumento do valor de peróxidos pela formação de OO-hidroxil hidroperóxidos (ZEB e MURKOVIC, 2011a), porém este efeito é observado apenas em óleos mantidos sob aquecimento (ZEB e MURKOVIC, 2011b).

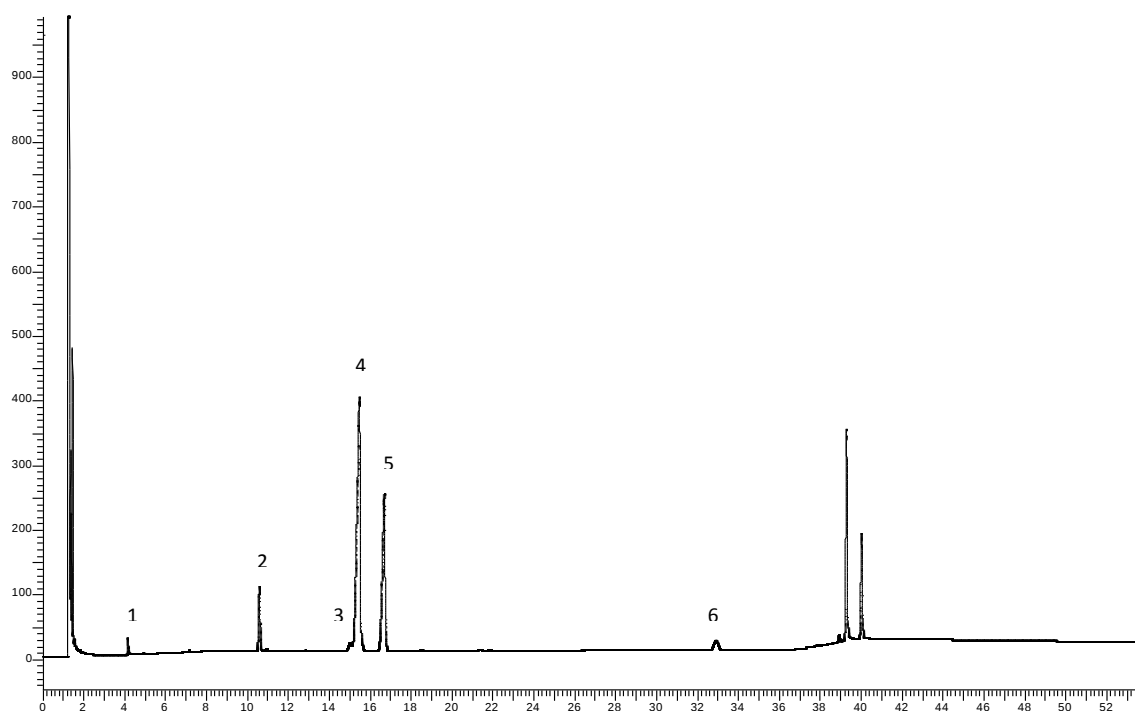


Figura 2. Cromatograma de separação dos ácidos graxos que constituem o óleo de amêndoa de pêssego, utilizando cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado com detector FID a 250°C e coluna ID Carbowax 20M à temperatura inicial de 90°C e final de 230°C. Os picos correspondem a: 1) Ácido mirístico; 2) Palmítico; 3) Esteárico; 4) Oleico; 5) Linoleico e 6) Behênico

A soma dos ácidos graxos oleico e linoleico resultou em percentuais de 87,42 e 89,19% para os óleos obtidos por Soxhlet e Bligh-Dyer, respectivamente, não diferindo significativamente entre si. O total de ácidos graxos saturados não

apresentou alterações significantes pela alteração da técnica, com teores presentes em ambos os óleos entre 10,60% para o óleo extraído por Bligh-Dyer e 12,35% para o obtido por técnica Soxhlet. Em diferentes óleos vegetais são comuns perfis de ácidos graxos compostos por 6 a 15% de ácidos graxos saturados. Os teores de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, como linoleico e linolênico apresentam maior variação (REDA e CARNEIRO, 2007).

Os percentuais relativos dos ácidos graxos presentes nos óleos (tab. 3) divergem dos do estudo de MEZZOMO et al. (2010). Estes autores relatam percentuais superiores a 70% de ácido oleico em óleos extraídos por método de Soxhlet e valores próximos a 60% em óleos obtidos pela maceração das amêndoas seguido de extração a frio por 7 dias com etanol e água e posterior partição do material com os solventes diclorometano e hexano. A diferença na proporção dos ácidos graxos dependendo da técnica utilizada para obtenção de óleo foi explicada pela possibilidade de ocorrência de esterificação natural anteriormente à análise durante o preparo das amostras, além da influência da polaridade dos solventes.

Tabela 3. Composição (% relativo) em ácidos graxos de óleo extraído de amêndoa de pêssego

Ácidos graxos/ Composição em ácidos graxos (%)	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
C 10:0 Cáprico	0,12 a	0,514	0,13 a	0,209
C 14:0 Mirístico	0,29 a	0,041	n. d.**	-
C 16:0 Palmítico	6,57 a	0,058	6,42 a	0,025
C 16:1 Palmitoleico	0,23 a	0,244	0,21 a	0,175
C 18:0 Esteárico	1,57 a	0,046	1,63 a	0,132
C 18:1 Oleico	55,35 b	0,045	58,48 a	0,027
C 18:2 Linoleico	32,07 a	0,046	30,71 b	0,071
C 22:0 Behênico	3,00 a	0,079	2,42 a	0,141
C 24:0 Lignocérico	0,80 a	0,080	n. d.**	-

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação; **n. d. = não detectável

Outros estudos mostraram que em amêndoa de pêssego o ácido graxo linoleico foi o segundo majoritário em diferentes tipos de extrações, seguido do palmítico, esteárico, palmitoleico e traços de mirístico, araquidônico e linolênico (MEZZOMO et al., 2010), além de percentuais de ácidos graxos oleico e linoleico de 58,5 e 32,8%, respectivamente, em óleos de amêndoa de pêssego obtidos pela extração com os solventes clorofórmio:metanol e de 74,6 e 15,7%, utilizando hexano, no qual também se identificou traços dos ácidos eicosaenóico e lignocérico (SÁNCHEZ-VICENTE et al., 2009). Os resultados do presente estudo também se assemelham aos obtidos na caracterização de óleo de amêndoas de pêssego obtido por prensagem, que mostraram percentuais dos ácidos graxos oleico e linoleico de 53,4 e 28,9%, respectivamente (UL'CHENKO et al., 2009).

Com relação à análise de compostos fenólicos, foram encontradas diferenças significativas em relação ao método de extração, tanto no conteúdo total quanto nos componentes majoritários (tab. 4). A técnica de Soxhlet originou óleo com percentual de fenóis 46% superior à técnica de Bligh-Dyer. O primeiro método é constituído de duas fases, a amostra e um solvente orgânico, enquanto a técnica de Bligh-Dyer envolve três fases, a amostra, uma fase polar de água e metanol e uma fase apolar, o clorofórmio, ocorrendo a partição dos compostos com baixa solubilidade em água para a fase de clorofórmio via a fase polar (EWALD et al., 1998). Compostos polares são removidos para a fase polar quando utilizada esta técnica, segundo OPPEL et al. (2010).

Dentre os compostos extraídos, apenas os ácidos hidroxibenzóico e elágico não apresentaram diferenças significativas de conteúdo nas duas amostras. Os ácidos derivados de ácido cinâmico, ou seja, hidroxicinâmico, cafeico e ferúlico, foram detectados em maiores quantidades no óleo obtido por técnica de Soxhlet. A estrutura básica da molécula de ácido cinâmico, não incluindo os substituintes que são os diferenciais entre os ácidos derivados, possui dois átomos de carbono a mais do que a estrutura básica dos ácidos benzoicos. Segundo FERRI et al. (2011), os quais estimaram a polaridade dos compostos fenólicos com base em seus tempos de retenção em análise de HPLC, o ácido cinâmico apresenta maior polaridade do que o ácido hidroxibenzoico. O flavonoide agliconado quercetina possui baixa polaridade e dissolve-se melhor em solventes mais apolares (XU et al., 2006); porém, quando ligada à moléculas de glucose possui maior polaridade, o que aumenta a solubidade em água (BONILLA et al., 1999). Desta forma, a diferença de

conteúdo na extração de compostos fenólicos observada entre os dois óleos pode ter ocorrido, pelo menos em parte, pela remoção parcial dos compostos fenólicos mais polares para a fase aquosa da extração por Bligh-Dyer ou pela presença de fenóis mais apolares na amostra analisada.

Tabela 4. Conteúdo total de compostos fenólicos, e conteúdo de compostos individuais em óleo de amêndoa de pêssego, extraídos por diferentes métodos de extração

Compostos fenólicos (mg.100g ⁻¹)	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
Total de compostos fenólicos	603,1 a	0,019	323,3 b	0,025
Catequina	n. d.**	-	<0,5 a	0,018
Ácido hidroxibenzoico	3,58 a	0,432	2,74 a	0,579
Ácido cafeico	0,81 a	0,027	n. d.	-
Ácido hidroxicinâmico	0,73 a	0,055	<0,5 b	0,256
Quercetina	349,08 a	0,049	156,58 b	0,047
Ácido Ferúlico	73,62 a	0,185	24,28 b	0,069
Ácido Elágico	4,53 a	0,067	4,70 a	0,052

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação; **n. d.= não detectável

WU et al. (2011), encontraram diferenças de extração de compostos fenólicos dependendo do solvente utilizado para extração de óleo de pêssego, atribuindo estas diferenças ao impacto térmico da extração e da insolubilidade destes componentes no óleo. MEZZOMO et al. (2010), analisando os teores de compostos fenólicos de óleo obtido de amêndoa de pêssego, relatam que óleos obtidos pela maceração utilizando os solventes hexano e etanol possibilitariam a extração de maiores teores de compostos fenólicos, de 930 e 830 mg de ácido gálico por 100g de amostra, respectivamente. Além disso, os autores salientam que a extração por Soxhlet, utilizando hexano como solvente, acarretaria em produto com teor de compostos fenólicos de 500 mg. 100g⁻¹. A título de comparação, convertendo o conteúdo de compostos fenólicos do óleo extraído por Soxhlet, apresentado na tabela 4, para expressão em ácido gálico, encontrar-se-ia valor semelhante ao de seu estudo, de aproximadamente 450 mg. 100g⁻¹. No presente

estudo, os resultados foram expressos em mg de quercetina, que foi o composto fenólico majoritário presente no óleo de pêsego.

Os compostos fenólicos encontrados em menor proporção, catequina, ácidos hidroxibenzoico, cafeico, hidroxicinâmico e elágico, também foram reportados por WU et al. (2011) em óleos extraídos de amêndoa de pêsego utilizando diversos solventes; sendo que, no estudo destes autores, ditiotreitol, rutina e ácido caféico foram os compostos fenólicos majoritários. Estes dados divergem dos encontrados neste estudo, uma vez que o cromatograma (Fig. 3) demonstra apenas dois picos em concentração superior aos demais, correspondentes à quercetina e ácido ferúlico, o que pode ter ocorrido devido a diferenças de cultivar entre as frutas e condições ambientais.

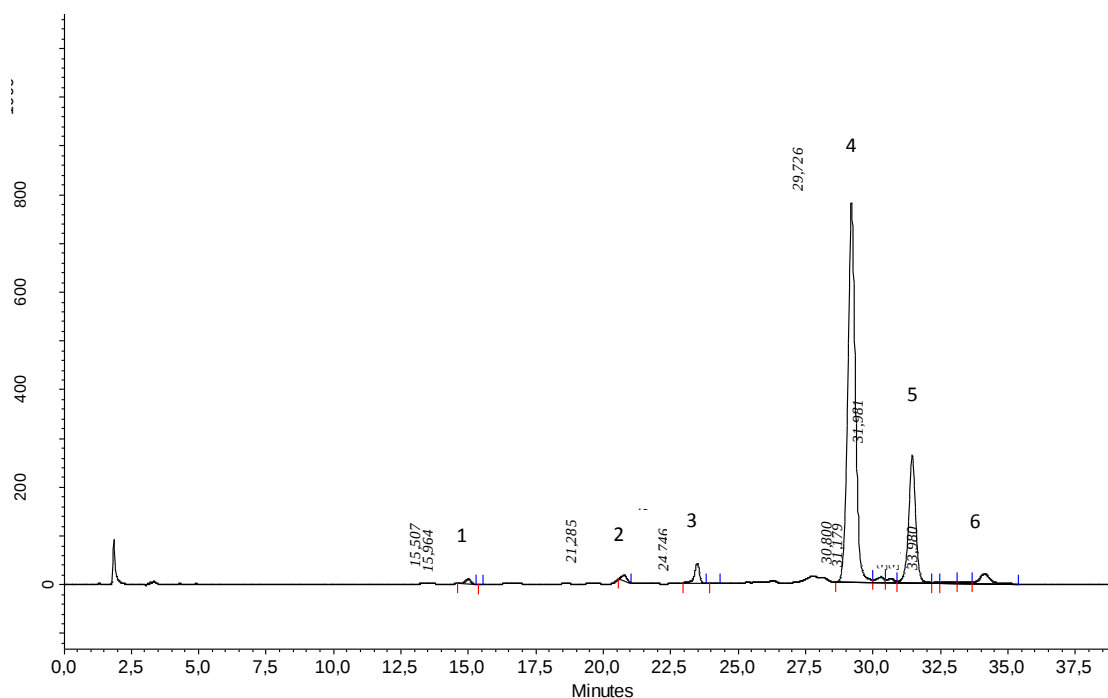


Figura 3. Cromatograma de separação de compostos fenólicos em óleo de amêndoa de pêsego, utilizando HPLC equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A técnica utilizou gradiente de ácido acético 1%: metanol e a detector UV-Vis a 280 nm. Os picos identificados correspondem a: 1) Catequina; 2) Ácido hidroxibenzoico; 3) Ácido hidroxicinâmico; 4) Quercetina; 5) Ácido ferúlico e 6) Ácido elágico

O flavonol quercetina também foi detectado em damasco, em teores de 25 mg.kg⁻¹, conteúdo superior ao encontrado na maioria das frutas (HOLLMAN e ARTS,

2000). A ação antioxidante de quercetina, que se deve à sua reação com os radicais livres e como quelante de metais, é superior em óleos que não possuem a adição de outros antioxidantes, sendo nula quando há a presença de tocoferóis e ácido cítrico (ROEDIG-PENMAN e GORDON, 1998; DAS e PEREIRA, 1990).

Normalmente, em óleos obtidos de matérias-primas pertencentes à classe das nozes verdadeiras e sementes comestíveis, os compostos fenólicos são encontrados em quantidades superiores ao conteúdo de carotenoides (COSTA e JORGE, 2011), o que pode também ser observado neste estudo (tab. 5).

Comparando os métodos de extração, o total de carotenoides também apresentou teores superiores no óleo extraído pela técnica de Soxhlet; o que também foi observado quando analisados os teores dos carotenoides individuais, luteína e zeaxantina. MOREAU et al. (2007) observaram que o teor de carotenoides totais, luteína e zeaxantina foi superior em óleos extraídos utilizando etanol em relação aos óleos extraídos com hexano, porém ambas extrações analisadas pelos autores foram conduzidas utilizando extração por Soxhlet. EWALD et al. (1998) analisando diferenças de extração entre as técnicas de Bligh-Dyer e Soxhlet, demonstram que bifênis policlorados, que são compostos majoritariamente lipofílicos, apresentaram teores mais altos em amostras de óleo extraído de peixes quando a técnica de extração empregada foi o método de Soxhlet.

Tabela 5. Conteúdo total de carotenoides e de carotenóides individuais em óleo de amêndoa de pêssego extraído por diferentes métodos

Componentes	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
Carotenoides Totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	12,05 a	0,009	11,34 b	0,023
Zeaxantina ($\mu\text{g.100 g}^{-1}$)	131,88 a	0,127	80,66 b	0,161
Luteína ($\mu\text{g.100 g}^{-1}$)	22,48 a	0,030	7,67 b	0,009

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação

Os carotenoides luteína e zeaxantina também foram identificados em folhas de plantas. Estes compostos são constituintes de grãos de milho e são responsáveis pela coloração amarela de amêndoas (WALTER e STRACK, 2011) e de óleo de milho, onde os teores destes dois compostos alcançam $2,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo de germen

de milho, extraído com hexano (MOREAU et al., 2007). Em óleo extra-virgem de abacate, o carotenoide predominante foi a luteína, com concentrações de aproximadamente $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (WONG et al., 2008). Em óleo de amendoim, a luteína também foi identificada como o carotenoide majoritário, porém é encontrado em menores concentrações, de $13,8 \mu\text{g.100 mL}^{-1}$; neste óleo, também foi relatado a presença de β -caroteno, zeaxantina, flavoxantina e outros (PATTE e PURCELL, 1967).

O cromatograma de separação dos carotenoides individuais é demonstrado na Figura 4.

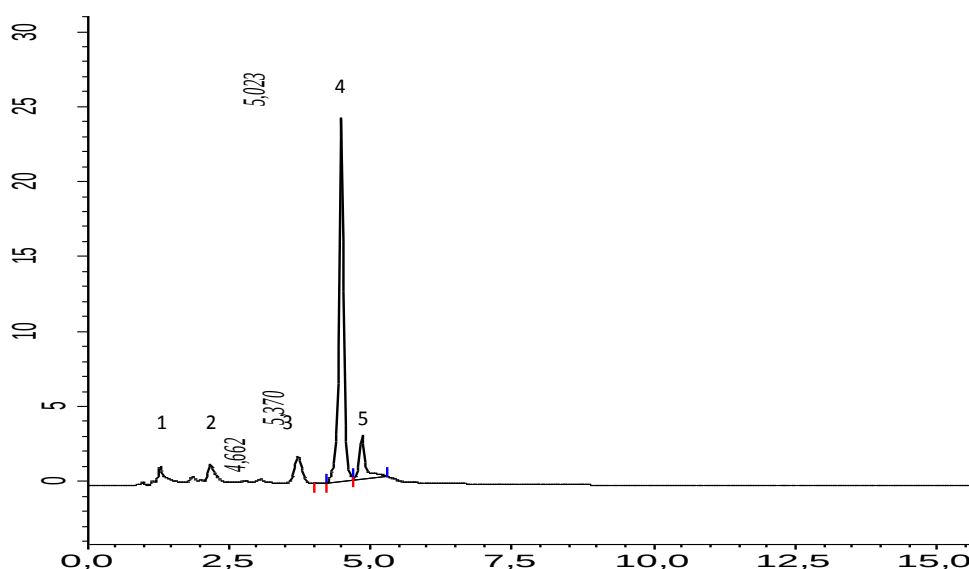


Figura 4. Cromatograma dos carotenoides individuais presentes em óleo de amêndoa de pêssgo, obtidos por separação em HPLC utilizando coluna de fase reversa ODS-30, gradiente de solventes metanol:acetonitrila:acetato de etila, detecção UV-Vis a 450nm. Os picos 1, 2 e 3 não foram identificados; o número 4 corresponde à zeaxantina e o 5 à luteína

MAZZA e COTTRELL (2008) relatam que estes compostos também são os carotenóides majoritários encontrados em *saskatoon*, uma pequena fruta com caroço, nativa de territórios nórdicos do continente americano, os quais também apresentam de 43 a 129mg.kg^{-1} de amigdalina em base seca. Em folhas de plantas, muitas vezes estes carotenoides encontram-se ligados à proteínas e, em frutas, esterificados e solubilizados em membranas (KRINSKY et al., 2003). Em estudo de FAROMBI e BRITTON (1999), os carotenos foram oxidados mais rapidamente do

que as xantofilas luteína e zeaxantina. A combinação de zeaxantina com α -tocoferol parece possuir efeito sinérgico para prevenção da peroxidação lipídica (JOHNSON et al., 2007).

Diferentemente do óleo obtido de amêndoas de damasco, onde o γ -tocoferol é o tocoferol predominante, com teores de até 45,2 mg. 100g⁻¹ de óleo (DURMAZ et al., 2010; TURAN et al., 2007), o óleo de amêndoa de pêssego obtido pelo método de Soxhlet apresentou quantidades superiores de α - tocoferol (tab. 6). No óleo de amêndoa obtido por Bligh-Dyer, a concentração do α - tocoferol foi inferior à menor concentração utilizada na construção da curva, de 0,156 μ g. mL⁻¹.

Tabela 6. Tocoferóis presentes em óleo de amêndoa de pêssego obtido por diferentes métodos de extração

Tocoferóis (mg.100 g ⁻¹)	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
α - tocoferol	12,57 a	0,077	Tr.** b	-
δ - tocoferol	1,30 a	0,127	1,54 a	0,043
γ - tocoferol	2,17 a	0,016	1,79 b	0,038

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação; **Tr. = traços

PARCERISA et al. (2000) relatam teores de α - tocoferol em azeites de oliva de 11,14 mg.100g⁻¹, inferior ao encontrado em óleo de avelã, onde foi detectado 33,35 mg.100g⁻¹. Em ambos os óleos, este foi o tocoferol majoritário, resultado semelhante ao do presente estudo (Fig. 5). As amêndoas são consideradas as fontes que possuem altos teores deste tocoferol, com quantidades reportadas pela literatura de 8,5 a 19 mg. 100g⁻¹.

O cromatograma de típico de separação de tocoferóis em óleo extraído utilizando éter de petróleo é apresentado na Figura 5.

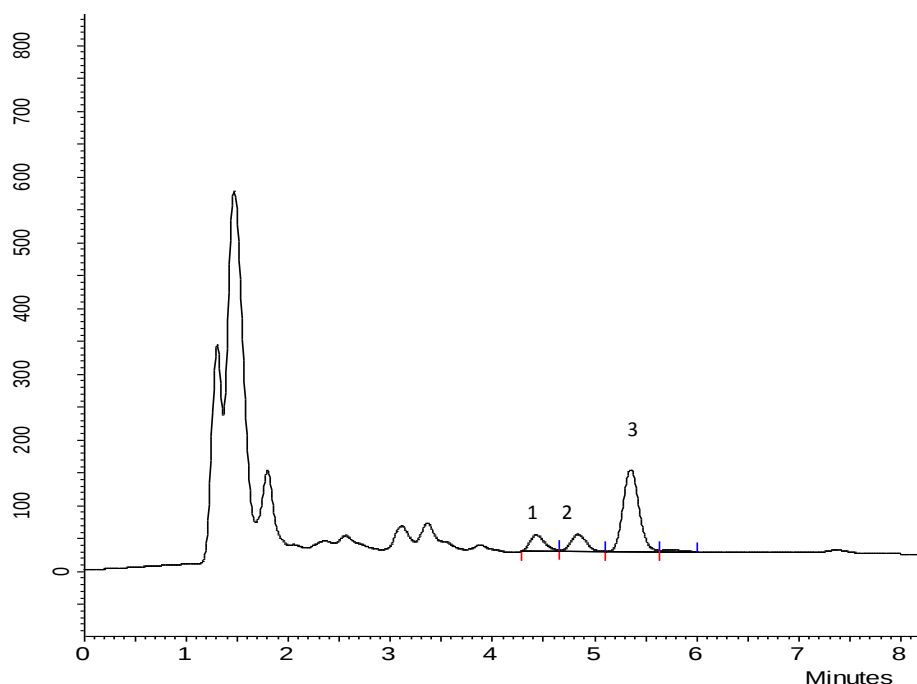


Figura 5. Cromatograma típico de separação de α , δ e γ - tocoferóis em óleo de amêndoa de pêssgo por HPLC utilizando coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS, gradiente de metanol:acetonitrila:isopropanol e detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290nm para excitação e de 330nm para a emissão. Os picos correspondem a: 1) δ -tocoferol; 2) γ -tocoferol; 3) α -tocoferol

PICURIC-JOVANOVIC et al. (1999) encontraram teores menores de carotenoides e tocoferóis em óleo extraído por método aquoso enzimático em comparação ao produto extraído por técnica de Soxhlet. KUS et al. (2009) afirmam que o solvente utilizado influencia na capacidade de extração de vários componentes presentes em alimentos, sendo que solventes mais polares, como clorofórmio/metanol, teriam maior capacidade de extrair fosfolipídios, esteróis e terpenóides. Como mostrado até o momento, a técnica que utiliza solventes mais polares não apresentou maior capacidade de extração de óleos com maiores teores de compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis. Com relação à análise de fitosteróis, foram encontrados apenas dois componentes, identificados como stigmasterol e β -sitosterol (Fig. 6). A técnica de Bligh-Dyer demonstrou ser apenas mais eficiente para a extração de stigmasterol (tab. 7).

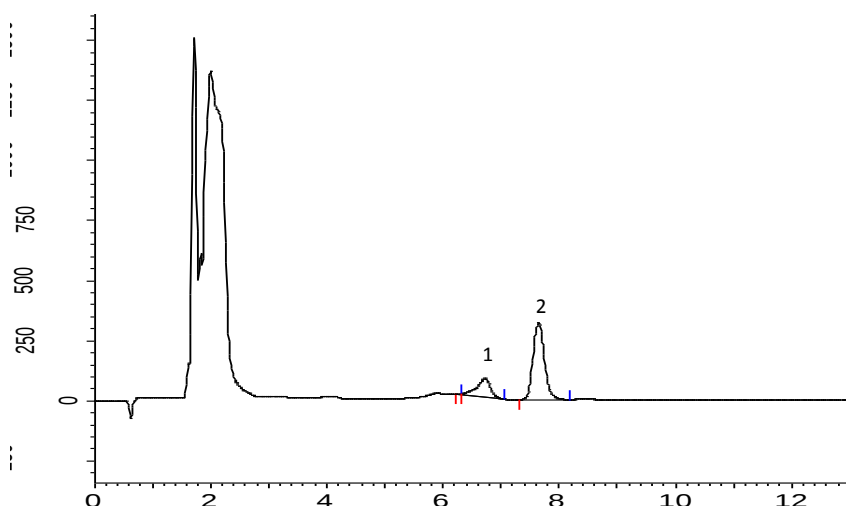


Figura 6. Cromatograma de separação de fitosteróis presentes em óleo de amêndoa de pêssgo, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de metanol e a identificação por detector UV-Vis a 205nm. Os picos correspondem a: 1) Stigmasterol; 2) β -sitosterol

Os teores de stigmasterol presentes no óleo de pêssgo (tab. 7) podem ser considerados semelhantes aos presentes em azeite de oliva e avelãs, os quais apresentam aproximadamente 1,5 e 2,1 mg.100g⁻¹ respectivamente; porém, foram encontrados em níveis superiores aos de β -sitosterol, de 1,16 e 1,56 mg.g⁻¹ respectivamente. No entanto, tanto na oliva quanto na avelã também foram identificados o campesterol, Δ^5 -avenasterol e obtusifoliol (PARCERISA, 2000). Em óleo de amêndoas de damasco, foram detectados teores de 2,73 mg. g⁻¹ de β -sitosterol, que é o fitosterol predominante (TURAN et al., 2007).

Tabela 7. Fitosteróis presentes em óleo de amêndoa de pêssgo obtido por diferentes processos de extração

Fitosteróis (mg.g ⁻¹)	Soxhlet	C. V.*	Bligh-Dyer	C. V.
Stigmasterol	1,67 b	0,070	2,21 a	0,028
β -sitosterol	5,79 a	0,011	2,92 b	0,125

Valores acompanhados de letras diferentes diferem significativamente na linha ao nível de 5% pelo teste *t*, comparando os óleos obtidos pelas duas técnicas de extração. * C. V. = Coeficiente de Variação

O valor de aproximadamente $7,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de fitosteróis no óleo de pêssego extraído pelo método de Soxhlet apresentou-se inferior ao conteúdo de fitosteróis obtido por SCHWARTZ et al. (2008) em óleo de colza (aproximadamente $8,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de fitosteróis), milho ($8,7 \text{ mg.g}^{-1}$) e no gérmen de trigo ($42,40 \text{ mg.g}^{-1}$); e superior ao conteúdo em azeite de oliva refinado e extra-virgem, girassol, coco e linhaça, determinados pelos mesmos autores.

Dentre os fitosteróis identificados no óleo de amêndoa de pêssego, obteve-se 76,39% de β -sitosterol e 23,61% de stigmasterol, o que diverge dos dados de UL'CHENKO et al. (2009), para o mesmo tipo de óleo, entretanto por prensagem, em que os percentuais são, respectivamente, 40,7% e 2,8%, além da presença de 1,3% de campesterol.

As amêndoas de frutas pertencentes ao gênero *Prunus*, como pêssego e damasco apresentam, ainda, o glicosídeo cianogênico amigdalina, que atua como forma de armazenamento de cianeto. Quando íntegras, as amêndoas não apresentam teores detectáveis do composto em formas não glicosídicas (TUNÇEL et al., 1998). AGUERREBERE et al. (2011) relatam a ausência de amigdalina e prunassina em óleos extraídos de amêndoa de *Prunus serotina*, através de análise por cromatografia de camada fina (TLC); porém, as amêndoas foram tostadas anteriormente à extração do óleo. O espectro de fluorescência desta amostra apresentou picos de fluorescência a 440 nm, indicativos de produtos da oxidação dos ácidos graxos.

No presente estudo, foram encontrados teores de $3,14 \pm 0,57 \text{ mg.g}^{-1}$ de amigdalina, tanto nos óleos extraídos por Soxhlet quanto por Bligh-Dyer, não apresentando diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% utilizando teste *t*. O cromatograma correspondente a análise deste componente está apresentado na Figura 7.

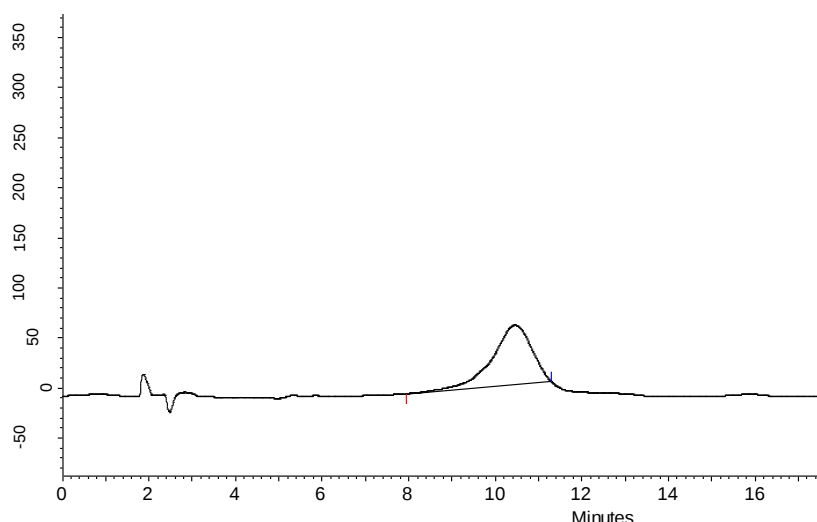


Figura 7. Cromatograma de identificação de amigdalina presente em óleo de amêndoa de pêssego, utilizando HPLC, equipado com coluna de fase reversa RP-18CLS-ODS. A separação foi realizada por eluição isocrática de água ultra pura: metanol. O pico foi identificado por detecção UV-Vis a 220nm

EL-ADAWY e EL-KADOUSY (1995), encontraram teores de aproximadamente $183 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de ácido cianídrico em resíduo de extração de óleo de pêssego. GANDHI et al. (1997) relatam que não encontraram glucosídeos cianogênicos através de teste qualitativo colorimétrico em óleo de damasco selvagem obtido por extração em Soxhlet durante 18h. MEZZOMO et al. (2010), analisando o perfil de voláteis de óleo de amêndoa de pêssego, identificaram benzaldeído, no óleo obtido por maceração utilizando etanol, e proporções de 44% no óleo obtido em extração por Soxhlet. O benzaldeído é um dos componentes resultantes da hidrólise enzimática de amigdalina, que ocorre com a liberação de cianeto de hidrogênio e duas moléculas de glicose (TATSUMA et al., 1998). Além disto, o benzaldeído é um dos principais componentes responsáveis pelo odor do óleo essencial obtido de amêndoas amargas e de damascos (SHARMA et al., 2010; ERDOGAN-ORHAN e KARTAL, 2011). Pela sua composição, rica em fitoquímicos, como compostos fenólicos e fitosteróis, o óleo de amêndoa de pêssego possui potencial aplicação como nutracêutico. O isolamento destes fitoquímicos poderia separá-los do composto tóxico identificado no óleo, e dos demais componentes oriundos da degradação a que a amostra demonstrou-se propensa.

4. Conclusão

Os óleos de pêssegos obtidos pelos métodos de Soxhlet e Bligh-Dyer apresentaram em sua composição produtos de degradação oxidativa, sendo que os peróxidos foram encontrados em níveis que não diferiram entre si nas amostras e os compostos secundários de oxidação foram encontrados em baixas quantidades. A composição relativa de ácidos graxos apresentou maiores percentuais dos ácidos oleico e linoleico em ambas amostras, e as proporções destes ácidos graxos diferiram significativamente dependendo da técnica de extração. O óleo extraído por Soxhlet apresentou teores significativamente mais elevados de compostos fenólicos, tocoferóis, carotenoides e de β -sitosterol, do que o óleo obtido por técnica de Bligh-Dyer, entretanto a ocorrência de ácidos graxos livres e diacilgliceróis foi significativamente superior. Os compostos fenólicos majoritários encontrados em ambos os óleos foram quercetina e ácido ferúlico e, entre os carotenoides, zeaxantina foi o principal encontrado, estando em maior quantidade no óleo extraído utilizando solvente apolar. O α - tocoferol foi mensurável apenas no óleo obtido por Soxhlet. Não houve diferença significativa quanto ao conteúdo de amigdalina presente em ambas amostras de óleos. Deste modo, o trabalho evidenciou que a utilização de solvente mais apolar pode resultar em óleo de melhor qualidade do ponto de vista de extração de compostos bioativos, sendo necessário desenvolver técnicas visando diminuir a ocorrência de degradação no produto final, assim como evitar a extração de compostos potencialmente tóxicos.

5. Referências

ABBASI, A. R.; HAJIREZAEI, M.; HOFIUS, D.; SONNEWALD, U.; VOLL, L. M. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*, v. 143, n. 4, pp. 1720-1738, 2007.

ABDULKARIM, S. M.; LONG, K.; LAI, O. M.; MUHAMMAD, S. K. S.; GHAZALI, H. M. Some physic-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry*, v. 93, pp. 253-263, 2005.

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, v. 935, pp. 173-201, 2001.

AGUERREBERE, I. A.; MOLINA, A. R.; OOMAH, B. D.; DROVER, J. C. G. Characteristics of *Prunus serotina* seed oil. *Food Chemistry*, v. 124, pp. 983-990, 2011.

AOCS. American Oil Chemists' Society. *Official and tentative methods of the American Oils Chemists' Society*, Champaign, IL., 1992.

BARCELOUX, D. G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 44-53, 2009.

BONILLA, F.; MAYEM, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, v. 66, n. 2, pp. 209-215, 1999.

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

BRYERS, J. A. Table values from Phenomenex catalog. 2003. Disponível em: <<http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>>. Acesso em 23 jan 2013.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes. *UNOPAR Científica - Ciências biológicas e da saúde*, v. 13, n. 3, pp. 195-203, 2011.

DAS, N. P.; PEREIRA, T. A. Effects of flavonoids on termal autoxidation of palm oil: Structure activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 4, pp. 255-258, 1990.

DU, Q.; JERZ, G.; HE, Y.; LI, L. XU, Y.; ZHANG, Q.; ZHENG, Q.; WINTERHALTER, P.; ITO, Y. Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, pp. 43-46, 2005.

DURMAZ, G.; KARABULUT, I.; TOPÇU, A.; ASILTÜRK, M.; KUTLU, T. Roasting-related changes in oxidative stability and antioxidant capacity of apricot kernel oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, pp. 401-409, 2010.

EL-ADAWY, T. A.; EL-KADOUSY, S. A. Changes in chemical composition, nutritional quality, physic-chemical and functional properties of peach kernel meal during detoxification. *Food Chemistry*, v. 52, pp. 143-148, 1995.

ERDOGAN-ORHAN, I.; KARTAL, M. Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot). *Food Research International*, v. 44, pp. 1238-1243, 2011.

EWALD, G.; BREMLE, G.; KARLSSON, A. Differences between Bligh and Dyer and Soxhlet Extractions of PCBs and lipids from fat and lean fish muscle: implications for data evaluation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 36, n. 3, pp. 222-230, 1998.

FAROMBI, E. O.; BRITTON, G. Antioxidant activity of palm oil carotenes in organic solution: effects of structure and chemical reactivity. *Food Chemistry*, v. 64, n. 3, pp. 315-321, 1999.

FERRI, F.; BERTIN, L.; SCOMA, A.; MARCHETTI, L.; FAVA, F. Recovery of low molecular weight phenols through solid-phase extraction. *Chemical Engineering Journal*, v. 166, n. 3, pp. 994-1001, 2011.

FREGA, N.; MOZZON, M.; LERCKER, G. Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 3, pp. 325-329, 1999.

GANDHI, V. M.; MULKY, M. J.; MUKERJI, B.; IYER, V. J.; CHERIAN, K. M. Safety evaluation of wild apricot oil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 35, pp. 583-587, 1997.

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

HOPIA, A. Analysis of high molecular weight autoxidation products using high performance size exclusion chromatography: II. Changes during processing. *LWT – Food Science and Technology*, v. 22, n. 6, pp. 568-571, 1993.

IANNONE, A.; ROTA, C.; BERGAMINI, S.; TOMASE, A.; CANFIELD, L. M. Antioxidant activity of carotenoids: na électron-spin resonance study on β -carotene and lutein interaction with free radicals generates in a chemical system. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 12, n. 3, 1998.

JOHNSON, M. P.; HAVAUX, M.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; KSAS, B.; PASCAL, A. A.; ROBERT, B.; DAVISON, P. A.; RUBAN, A. V.; HORTON, P. Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of *Arabidopsis* to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 31, pp. 22605-22618, 2007.

KLEN, T. J.; VODOPIVEC, B. M. Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food Chemistry*, v. 134, pp. 2481-2488, 2012.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxhanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition*, v. 23, pp. 171-201, 2003.

KUMAR, S. S.; ARORA, N.; BHATNAGAR, R.; GUPTA, R. Kinetic modulation of *Trichosporon asahii* MSR 54 lipase in presence of organic solvents:

Altered fatty acid specificity and reversal of enantio selectivity during hydrolytic reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, n. 1-3, pp. 41-46, 2009.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 68, n. 1, pp. 12-20, 2009.

LOMBARDO, V. A.; OSORIO, S.; BORSANI, J.; LAUXMANN, M. A.; BUSTAMANTE, C. A.; BUDDE, C. O.; ANDREO, C. S.; LARA, M. V.; FERNIE, A. R.; DRINCOVICH, M. F. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*, v. 157, pp. 1696-1710, 2011.

MAZZA, G.; COTTRELL, T. Carotenoids and cyanogenic glucosides in saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, pp. 249-254, 2008.

MENDONÇA, M. A.; BORGIO, L. A.; ARAÚJO, W. M. C.; NOVAES, M. R. C. G. Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidades de produção de refeição no Distrito Federal. *Comunicação em Ciências da Saúde*, v. 19, n. 2, pp. 115-122, 2008.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, v. 101, pp. 5622-5632, 2010.

MOGHADDAM, G.; HEYDEN, Y. V.; RABIEI, Z.; SADEGHI, N.; OVEISI, M. R.; JANNAT, B.; ARAGHI, V.; HASSANI, S.; BEHZAD, M.; HAJIMAHMOODI, M. Characterization of different olive pulp and kernel oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 28, n.1, pp. 54-60, 2012.

MOREAU, R. A.; JOHNSTON, D. B.; HICKS, K. B. A comparison of the levels of lutein and zeaxanthin in corn germ oil, corn fiber oil and corn kernel oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 11, pp. 1039-1044, 2007.

OPPEL, S.; FEDERER, R. N.; O'BRIEN, D. M.; POWELL, A. N.; HOLLMÉN, T. E. Effects of lipid extraction on stable isotope ratios in avian egg yolk: is arithmetic correction a reliable alternative?. *The Auk*, v. 1, pp. 72-78, 2010.

ÖZCAN, M. M.; ÜNVER, A.; ERKAN, E.; ARSLAN, D. Characteristics of some almond kernel and oils. *Scientia Horticulturae*, v. 127, pp. 220-333, 2011.

PARCERISA, J.; CASALS, I.; BOATELLA, J.; CODONY, R.; RAFECAS, M. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A*, v. 881, pp. 149-158, 2000.

PATTEE, H. E.; PURCELL, A. E. Carotenoid pigments of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 44, n. 5, pp. 328-330, 1967.

PICURIC-JOVANOVIC, K.; VRBASKI, Z.; MILOVANOVIC, M. Influence of the aqueous-enzymatic method on the oxidative stability of plum kernel oil. *Fett/Lipid*, v. 101, n. 3, pp. 109-112, 1999.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: Aplicações e implicações. *Revista Analytica*, n. 27, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, n. 7, pp. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A guide to carotenoids analysis in foods*. ILSI Press: Washington, 1999, 64p.

ROEDIG-PENMAN, A.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 2, pp. 169-180, 1998.

RUPPEL, T.; HALL, G.; HUYBRIGHS, T.; GOODMAN, W. Free and total glycerol in B100 biodiesel by gas chromatography according to methods EN 14105 and ASTM D6584. *PerkinElmer – Application note 008387_01*, 5p., 2008.

SÁNCHEZ-VICENTE, Y; CABAÑAS, A.; RENUNCIO, A. R.; PANDO, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, pp. 167-173. 2009.

SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHWARTZ, H.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEN, V.; LAMPI, A. M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, pp. 152-161, 2008.

SHARMA, P. C.; TILAKRATNE, B. M. K. S.; GUPTA, A. Utilization of wild apricot kernel press cake for extraction of protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, v. 47, n. 6, pp. 682-685, 2010.

SHULAEV, V.; KORBAN, S. S.; SOSINSKI, B.; ABBOTT, A. G.; ALDWINCKLE, H. S.; FOLTA, K. M.; IEZZONI, A.; MAIN, D.; ARÚS, P.; DANDEKAR, A. M.; LEWERS, K.; BROWN, S. K.; DAVIS, T. M.; GARDINER, S. E.; POTTER, D.; VEILLEUS, R. E. Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiology*, v. 147, pp. 985-1003, 2008.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, pp. 1315S-1321S, 1995.

SILEM, A.; GÜNTHER, H.O.; EINFELDT, J.; BOUALIA, A. The occurrence of mass transport processes during the leaching of amygdalin from bitter apricot

kernels: detoxification and flavor improvement. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, pp. 201-213. 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, pp.144-158, 1965.

TATSUMA, T.; TANI, K.; OGAWA, T.; OYAMA, N. Interference-based amygdalin sensor with emulsin and peroxidase. *Sensors and Actuators B*, v. 49, pp. 268-272, 1998.

TUNÇEL, G.; NOUT, M. J. R.; BRIMER, L. Degradation of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chemistry*, v. 63, n. 1, pp. 65-69, 1998.

TURAN, S.; TOPCU, A.; KARABULUT, I.; VURAL, H.; HAYALOGLU, A. A. Fatty acid, triacylglycerol, phytosterol and tocopherol variations in kernel oil of Malatya apricots from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 26, pp. 10787-10794, 2007.

UL'CHENKO, N. T.; BEKKER, N. P.; YUNUSOV, O.; YULDASHEVA, N. K.; CHERNENKO, T. V.; GLUSHENKOVA, A. I. Lipids and lipophilic components from seeds of some fruit plants. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 3, pp. 314-317, 2009.

WALTER, M. H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, v. 28, pp. 663-692, 2011.

WANG, L.; YU, H. Biodiesel from Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) seed kernel oil. *Bioresource Technology*, v. 112, pp. 355-358, 2012.

WHITE, P. J.; ARMSTRONG, L. S.; Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 63, n. 4, 1986.

WONG, M.; ASHTON, O.; REQUEJO-JACKMAN, C.; MCGHIE, T.; WHITE, A.; EYRES, L.; SHERPA, N.; WOOLF, A. *Avocado oil: the color of quality*. In: Color Quality of Fresh and Processed Foods, cap. 24, pp. 328-349, 2008.

WU, H.; SHI, J.; XUE, S.; KAKUDA, Y.; WANG, D.; JIANG, Y.; XINGQIAN, Y.; LI, Y.; SUBRAMANIAN, J. Essential oil extracted from peach (*Prunus pérsica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *LWT – Food Science and Technology*. Disponível on-line. pp. 1-8. 2011.

XU, M. S.; LUO, M. F.; XING, X. H.; CHEN, H. Z. Characteristics of quercetin transglycosidation catalyzed by *Penicillium decumbens* glycosidase. *Foods and Bioproducts Processing*, v. 84, n. C3, pp. 237-241, 2006.

YADA, S.; LAPSLEY, K.; HUANG, G. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, pp. 469-480, 2011.

ZAMBIAZI, R. C. *The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability*. Thesis (Doctor of Philosophy), Food and Nutritional Sciences Interdepartmental Program, University of Manitoba. 304 f., 1997.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. *Food Chemistry*, v. 127, pp. 1584-1593, 2011a.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of β -carotene in corn oil triacylglycerols. *Food Research International*, Disponível on-line. 2011b.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os óleos de amêndoas de pêssego apresentaram diferentes características físico-químicas e composição fitoquímica, dependendo da técnica de extração utilizada. A utilização de técnica de Soxhlet com solvente mais apolar do que os utilizados pela técnica de Bligh-Dyer, demonstrou ser mais eficiente na extração dos fitoquímicos. A composição relativa de ácidos graxos apresentou-se semelhante aos dados encontrados na literatura. Foram encontradas quantidades mensuráveis de carotenoides, tocoferóis e fitosteróis, que foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência, muitos destes compostos que eram, até o presente momento, desconhecidos no material estudado. Nas condições experimentais aplicadas detectou-se a presença do glucosídeo cianogênico amigdalina nos óleos ($3,14 \pm 0,57 \text{ mg.g}^{-1}$), divergindo de dados da literatura. Estudos de aplicação de diferentes temperaturas ao óleo para favorecer a conversão natural do componente à forma volatizável poderiam ser realizados, assim como da aplicação ao produto de enzimas que atuam realizando esta mesma reação. O estudo de atividade de β -glucosidase nos extratos brutos enzimáticos obtidos das amêndoas demonstrou boa afinidade pelo glicosídeo amigdalina, além de estabilidade a faixas mais amplas de pH e mais elevadas de temperatura do que a de enzimas purificadas extraídas de amêndoas de outras frutas, o que pode ser indicativo que a purificação de β -glucosidases de amêndoa de pêssego acarrete em enzimas com estabilidade diferente das conhecidas até o momento.

5. REFERÊNCIAS

ABBASI, A. R.; HAJIREZAEI, M.; HOFIUS, D.; SONNEWALD, U.; VOLL, L. M. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*, v. 143, n. 4, pp. 1720-1738, 2007.

ARAYA, E.; RODRIGUEZ, A.; RUBIO, J.; SPADA, A.; JOGLAR, J.; LLEBARIA, A.; LAGUNAS, C.; FERNANDEZ, A. G.; SPISANI, S.; PEREZ, J. J. Synthesis and evaluation of diverse analogs of amygdalin as potential peptidomimetics of peptide T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, pp. 1493-1496, 2005.

BAETEN, V.; DARDENNE, P.; APARICIO, R. Interpretation of Fourier transform raman spectra of the unsaponifiable matter in a selection of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, pp. 5098-5107, 2001.

BARCELOUX, D. G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 44-53, 2009.

BAROLI, I.; DO, A. D.; YAMANE, T.; NIYOGI, K. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *The Plant Cell*, v. 15, n. 4, pp. 992-1008, 2003.

BAROLI, I.; GUTMAN, B. L.; LEDFORD, H. K.; SHIN, J. W.; CHIN, B. L.; HAVAUX, M.; NIYOGI, K. K. Photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, pp. 6337-6344, 2004.

BOT, A.; AGTEROF, W. G. M. Structuring of edible oils by mixtures of γ -orizanol with β -sitosterol or related phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 83, n. 6, 2006.

BRIMER, L; CICALINI, A. R.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOOLI, M. Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. *Archives of Microbiology*, v. 169, pp. 106-112, 1998.

BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; WOODLEY, J. M. The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology*, v. 20, pp. 35-46, 2002.

CAMPA, C.; SCHMITT-KOPPLIN, PH.; CATALDI, T. R. I.; BUFO, S. A.; FREITAG, D.; KETTRUP, A. Analysis of cyanogenic glycosides by micellar capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B.*, v. 739, pp. 95-100, 2000.

CANILHA, L.; SILVA, D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa, parte 3: Polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica*, n. 20, 2006.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 5, pp. R77-R86, 2007.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes. *UNOPAR Científica - Ciências biológicas e da saúde*, v. 13, n. 3, pp. 195-203, 2011.

CRAPISTE, G. H.; BREVEDAN, M. I. V.; CARELLI, A. A. Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 12, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Eds. American Society of Plant Physiologists, 2000.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 3, pp. 345-354, 2002.

DINIZ, J.; CARDOSO, A. L.; STAHL, J.A.; VILLETTI, M. A.; MARTINS, A. F. Poder calorífico da casca de arroz, caroço de pêsego, serragem de eucalipto e de seus produtos de pirólise. *Ciência e Natura*, UFSM, v. 26, 2, pp. 25 - 32, 2004.

DONG, X.; BRAUN, E. L.; GROTEWOLD, E. Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology*, v. 127, n. 1, pp. 46-57, 2001.

DU, Q.; FANG, J.; GAO, S.; ZENG, Q.; MO, C. A gram-scale separation of glucosinolates from an oil-pressed residue of rapeseeds using slow Rotary countercurrent chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 59, pp. 294-298, 2008.

EL-ADAWY, T. A.; EL-KADOUSY, S. A. Changes in chemical composition, nutritional quality, physic-chemical and functional properties of peach kernel meal during detoxification. *Food Chemistry*, v. 52, pp. 143-148, 1995.

EMBRAPA. Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessego/cap16.htm>>. Acesso em 16 jul 2011.

ENOS, T. T.; DAVID, J. M.; VELÁZQUEZ, K. T.; MCCLELLAN, J. L.; DAY, S. D.; CARNEVALE, K. A.; MURPHY, E. A. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. *Journal of Lipid Research*, v. 54, pp. 152-163, 2013.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 57, pp. 779S-86S, 1993.

FDA. Listing of Food Additive Status Part II. 2011a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm>>. Acesso em: 3 ago 2011.

FDA. Flavoring Agents and Related Substances. 2011b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/DOCKETS/95s0316/95s-0316-rpt0354-32-Ref-CFR-vol273.pdf>>. Acesso em: 3 ago 2011.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista de Nutrição*, v. 11, n. 1, pp. 3-14, 1998.

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science*, v. 160, pp. 795-805, 2001.

GOMES, A. S. *Síntese e modelagem molecular de carboidratos com potencial atividade anti-glucosidase*. 2008. 222p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GORDON, M. H.; MAGOS, P. The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry*, v. 10, n. 2, pp. 141-147, 1983.

HAMBERGER, B.; OHNISHI, T.; HAMBERGER, B.; SÉGUIN, A.; BOHLMANN, J. Evolution of diterpene metabolism: Sitka Spruce CYP720B4 catalyzes multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant Physiology*, v. 157, n. 4, pp. 1677-1695, 2011.

HAQUE, M. R.; BRADBURY, J. H. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry*, v. 77, pp. 107-114, 2002.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. FCF – USP, 2011. Disponível em: <

<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Biodisponibilidade.pdf>>. Acesso em 5 ago 2011.

HOWELL, T. J.; MACDOUGALL, D. E.; JONES, P. J. H. Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding. *Journal of Lipid Research*, v. 39, pp. 892-900, 1998.

IANNONE, A.; ROTA, C.; BERGAMINI, S.; TOMASE, A.; CANFIELD, L. M. Antioxidant activity of carotenoids: na elétron-spin resonance study on β -carotene and lutein interaction with free radicals generates in a chemical system. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 12, n. 3, 1998.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, pp. 1821-1835, 2011.

JAKULJ, L.; TRIP, M. D.; SUDHOP, T.; BERGMANN, K.; KASTELEIN, J. J. P.; VISSERS, M. N. Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe. *Journal of Lipid Research*, v. 46, pp. 2692-2698, 2005.

KEGG PATHWAY. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00460+C08325>. Acesso em 22 out. 2012.

KEGG PATHWAY. Disponível em: < http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00130>. Acesso em 10 jan. 2013.

KESLER, A.; KRISKA, T.; NÉMETH, A. Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 12, pp. 5981-5985, 2000.

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

KUROKI, G. W.; POULTON, J. E. Isolation and characterization of multiple forms of prunasin hydrolase from black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 255, n. 1, pp. 19-26, 1987.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, v. 125, pp. 58-60, 2001.

LEI, V.; AMOA-AWUA, W. K. A.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, pp. 169-184, 1999.

LI, C. P.; SWAIN, E.; POULTON, J. E. *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase. *Plant Physiology*, v. 100, pp. 282-190, 1992.

LI, Z.; KEASLING, J. D.; NIYOGI, K. K. Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, v. 158, n. 1, pp. 313-323, 2012.

LIST, G. R.; MOUNTS, T. L.; ORTHOEFER, F.; NEFF, W. E. Effect of Interesterification on the structure and physical properties of high-stearic acid soybean oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, n. 3, pp. 327-328, 1997.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 12, pp. 3479S-3485S, 2004.

LOMBARDO, V. A.; OSORIO, S.; BORSANI, J.; LAUXMANN, M. A.; BUSTAMANTE, C. A.; BUDDE, C. O.; ANDREO, C. S.; LARA, M. V.; FERNIE, A. R.; DRINCOVICH, M. F. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*, v. 157, pp. 1696-1710, 2011.

MASSIERA, F.; BARBRY, P.; GUESNET, P.; JOLY, A.; LUQUET, S.; MOREILHON-BREST, C.; MOHSEN-KANSON, T.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G. A western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *Journal of Lipid Research*, v. 51, pp. 2352-2361, 2010.

MATRINGE, M.; KSAS, B.; REY, P.; HAVAUX, M. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 147, n. 2, pp. 764-778, 2008.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, pp. 840-843, 2006.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, v. 61, n. 1/2, pp. 71-75, 1998.

MEZZOMO, N. *Óleo de amêndoa de pêssgo: Avaliação técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala*. 2008. 136p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J. FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, v. 101, pp 5622-5632. 2010.

MINTZ-ORON, S.; MANDEL, T.; ROGACHEV, I.; FELDBERG, L.; LOTAN, O.; YATIV, M.; WANG, Z.; JETTER, R.; VENGHER, I.; ADATO, A.; AHARONI, A. Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiology*, v. 147, pp. 823-851, 2008.

MOHAMED, H. M. A.; AWATIF, I. I. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. *Food Chemistry*, v. 62, n. 3, pp. 269-276, 1998

MORANT, A. V.; JORGENSE, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, B. L.; BAK, S. β -glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, v. 69, pp. 1795-1813, 2008.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytstanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, v. 41, pp. 457-500, 2002.

NATURAL NEWS. Amazing food facts: The seed of a peach contains an almond-like nut containing the anti-cancer medicine laetrile. Disponível em: <http://www.naturalnews.com/033123_laetrile_vitamin_B17.html#ixzz2I1ybGOJl>. Acesso em: 22 out. 2012.

NIERDERNHOFER, L. J.; DANIELS, J. S.; ROUZER, C. A.; GREENE, R. E.; MARNETT, L. J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, pp. 31426-31433, 2003.

OH, Y.; DALDWIN, I. T.; GÁLIS, I. NaJAZh regulates a subset of defense responses against herbivores and spontaneous leaf necrosis in *Nicotiana attenuata* plants. *Plant Physiology*, v. 159, n. 2, pp. 769-788, 2012.

ORGANIC FACTS. Health Benefits of Bitter Almond Essential Oil. Disponível em: <<http://www.organicfacts.net/health-benefits/essential-oils/health-benefits-of-bitter-almond-essential-oil.html>>. Acesso em: 24 nov 2012.

OSTLUND, R. E.; RACETTE, S. B.; OKEKE, A.; STENSON, W. F. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, n. 6, pp. 1000-1004, 2002.

ONABOLU, A.O; OLUWOLE, O. S., BOKANGA, M. Loss of residual cyanogens in a cassava food during short-term storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 53, n. 4, pp. 342-349, 2002.

PEDRIELLI, P.; PEDULLI, G. F.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, pp. 3034-3040, 2001.

PEREZ, L. H. *Frutas de caroço: produção e importação em 1996-2005*. Informações Econômicas, São Paulo, v.36, n.11, nov. 2006.

PETRUCCIOLI, M.; BRIMER, L.; CICALINI, A. R.; PULCI, V.; FREDERICI, F. Production and properties of the linamarase and amygdalase activities of *Penicillium aurantiogriseum* P35. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, pp. 805-812, 1999.

PIAGGESI, A.; PERATA, P.; VITAGLIANO, C.; ALPI, A. Level os abscisic acid in integuments, nucellus, endosperm, and embryo of peach seeds (*Prunus persica* L. cv Springcrest) during development. *Plant Physiology*, v. 97, pp. 793-797, 1991.

PICURIC-JOVANOVIC, K.; VRBASKI, Z.; MILOVANOVIC, M. Influence of the aqueous-enzymatic method on the oxidative stability of plum kernel oil. *Fett/ Lipid*, v. 101, n. 3, pp. 109-112, 1999.

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

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: Aplicações e implicações. *Revista Analytica*, n. 27, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, n. 7, pp. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ, A. G.; TEIXEIRA, O. M.; SALLES, F. G.; VITAL, J. P. PEIXOTO, D. S. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. *Estudos*, Goiânia, v. 36, n. 5/6, p. 795-808, 2009.

SÁNCHEZ-VICENTE, Y; CABAÑAS, A.; RENUNCIO, A. R.; PANDO, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) seed oil using carbon dioxide and etanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, pp. 167-173. 2009.

SATO, G. S. Produção de pêssegos de mesa e para indústria no Brasil. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.31, n. 6, p. 61-63, 2001.

SCHNELL, S. A century of enzyme kinetics: reliaviliry of the K_m and V_{max} estimates. *Comments on Theoretical Biology*, v. 8, pp. 169-187, 2003.

SCHWARTZ, H.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEN, V.; LAMPI, A. M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, pp. 152-161, 2008.

SHARMA, P. C.; TILAKRATNE, B. M. K. S.; GUPTA, A. Utilization of wild apricot kernel press cake for extraction of protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, v. 47, n. 6, pp. 682-685, 2010.

SHULAEV, V.; KORBAN, S. S.; SOSINSKI, B.; ABBOTT, A. G.; ALDWINCKLE, H. S.; FOLTA, K. M.; IEZZONI, A.; MAIN, D.; ARÚS, P.; DANDEKAR, A. M.; LEWERS, K.; BROWN, S. K.; DAVIS, T. M.; GARDINER, S. E.; POTTER, D.; VEILLEUS, R. E. Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiology*, v. 147, pp. 985-1003, 2008.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, pp. 1315S-1321S, 1995.

SILEM, A.; GÜNTER, H.O.; EINFELDT, J.; BOUALIA, A. The occurrence of mass transport processes during the leaching of amygdalin from bitter apricot

kernels: detoxification and flavor improvement. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, pp. 201-213. 2006.

SOOB RATTE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A. L.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, v. 579, pp. 200-213, 2005.

TAIZ, L; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAPPEL, A. L.; KNAPP, F. W.; URS, K. Oxidative fat rancidity in food products. II. Walnuts and other nut means. *Journal of Food Science*, v. 22, n. 3, pp. 287-295, 1957.

TATSUMA, T.; TANI, K.; OGAWA, T.; OYAMA, N. Interference-based amygdalin sensor with emulsin and peroxidase. *Sensors and Actuators B*, v. 49, pp. 268-272, 1998.

TUNÇEL, G.; NOUT, M. J. R.; BRIMER, L. Degradation of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chemistry*, v. 63, n. 1, pp. 65-69, 1998.

UL'CHENKO, N. T.; BEKKER, N. P.; YUNUSOV, O.; YULDASHEVA, N. K.; CHERNENKO, T. V.; GLUSHENKOVA, A. I. Lipids and lipophilic components from seeds of some fruit plants. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 3, pp. 314-317, 2009.

VILJANEN, K.; SUNDBERG, S.; OHSHIMA, T.; HEINONEN, M. Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 104, pp. 353-359, 2002.

WALTER, M. H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, v. 28, pp. 663-692, 2011.

WANG, T.; HICKS, K. B.; MOREAU, R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol and other phytosterol conjugates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, n. 12, pp. 1201-1206, 2002.

WEWER, V.; DOMBRINK, I.; DORP, K.; DÖRMANN, P. Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, v. 52, pp. 1039-1054, 2011.

WHITE, P. J.; ARMSTRONG, L. S.; Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 63, n. 4, 1986.

WU, H.; SHI, J.; XUE, S.; KAKUDA, Y.; WANG, D.; JIANG, Y.; XINGQIAN, Y.; LI, Y.; SUBRAMANIAN, J. Essential oil extracted from peach (*Prunus pérsica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *LWT – Food Science and Technology*. Disponível on-line. 2011.

YAN, J. B.; KANDIANIS, C. B.; HARJES, C. E.; BAI, L.; KIM, E. H.; YANG, X. H.; SKINNER, D. J.; FU, Z. Y.; MITCHELL, S.; LI, Q.; FERNANDEZ, M. G. S.; ZAHARIEVA, M.; BABU, R.; FU, Y.; PALACIOS, N.; LI, J. S. DELLAPENNA, D.; BRUTNELL, T.; BUCKLER, E. S.; WARBURTON, M. L.; ROCHEFORD, T. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta-carotene in maize grain. *Nature Genetics*, v. 42, pp. 322–374, 2010.

ZHU, C.; SANAHUJA, G.; YUAN, D.; FARRÉ, G.; ARJÓ, G.; BERMAN, J.; ZORRILLA-LÓPEZ, U.; BANAKAR, R.; BAI, C.; PÉREZ-MASSOT, E.; BASSIE, L.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, n. 2, pp. 129-141, 2013.

Apêndice A – Curvas de Calibração das Análises Espectrofotométricas

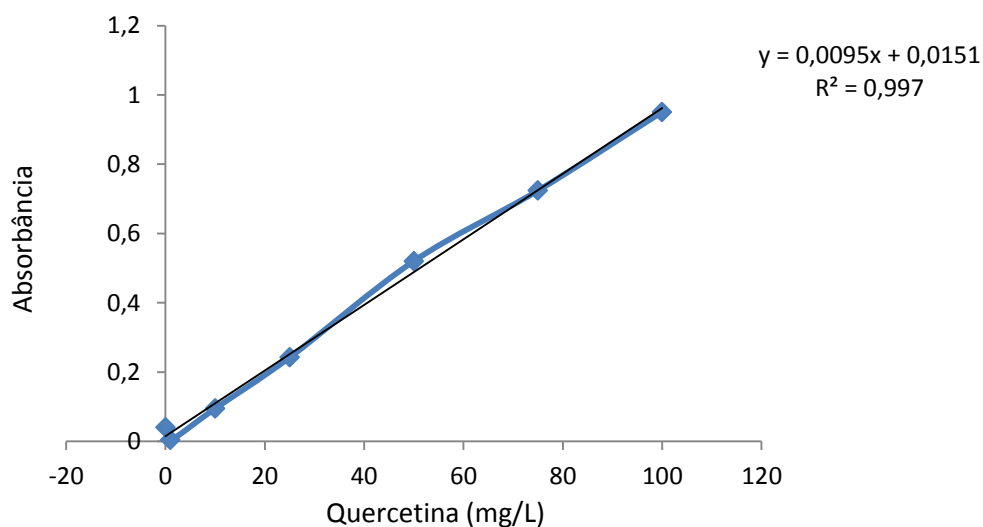


Figura 1. Curva de Calibração de Compostos Fenólicos Totais, expressos em mg de Quercetina, analisados pelo método de Folin-Ciocalteu

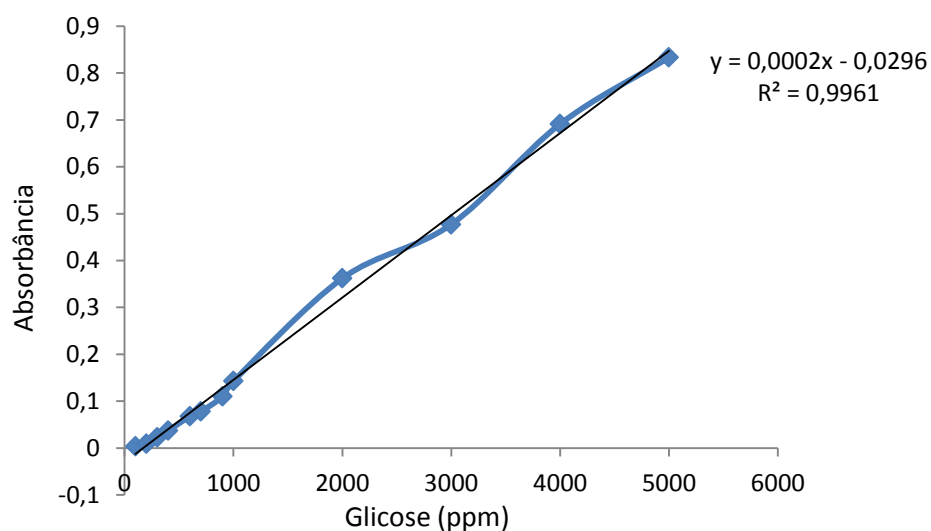


Figura 2. Curva de Calibração de Açúcares Redutores, expressos em ppm de glicose, analisados pelo método de ácido 3,5 – Dinitrosalicílico

Apêndice B – Tabelas de efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de β -glucosidases

Tabela 1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glucosidase, medida em mmol.L⁻¹ de glicose, extraída de amêndoa de pêssego, determinado utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol.L⁻¹ e temperatura de 35°C, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS

pH	Atividade (mmol de Glicose.L ⁻¹)	Coeficiente de Variação
3	0,82 d	0
4	6,09 c	0,09
5	11,71 ab	0,02
6	12,22 ab	0,04
7	13,13 a	0,11
8	10,58 b	0,04

Médias acompanhados de letras diferentes, comparando a atividade da enzima a pH de 3 a 8, diferem significativamente na coluna ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -glucosidase, medida em mmol/L de glicose, extraída de amêndoa de pêssego, determinado utilizando solução de amigdalina 10,9 mmol/L e pH 6, pela reação dos açúcares redutores liberados com o reagente 3,5-DNS

Temperatura (°C)	Atividade (mmol de Glicose.L ⁻¹)	Coeficiente de Variação
10	3,27 e	0,03
20	6,54 d	0,06
30	9,26 c	0,08
40	10,44 bc	0,04
50	11,71 ab	0,05
60	13,21 a	0,09
70	10,70 bc	0,10

Médias acompanhados de letras diferentes, comparando a atividade da enzima a temperaturas de 10 a 70°C, diferem significativamente na coluna ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Apêndice C – Curvas de Calibração Análises Cromatográficas de Amigdalina e Fitoesteróis

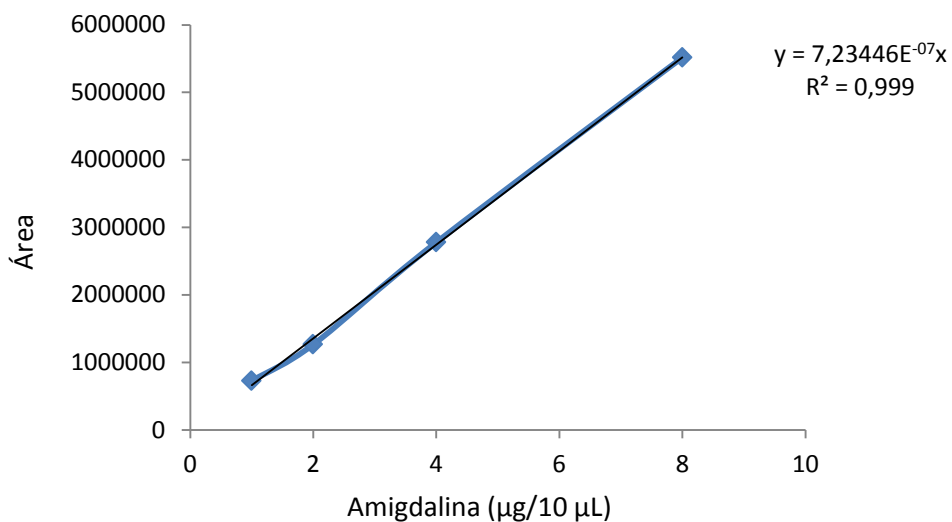


Figura 3. Curva de Calibração Externa de Amigdalina

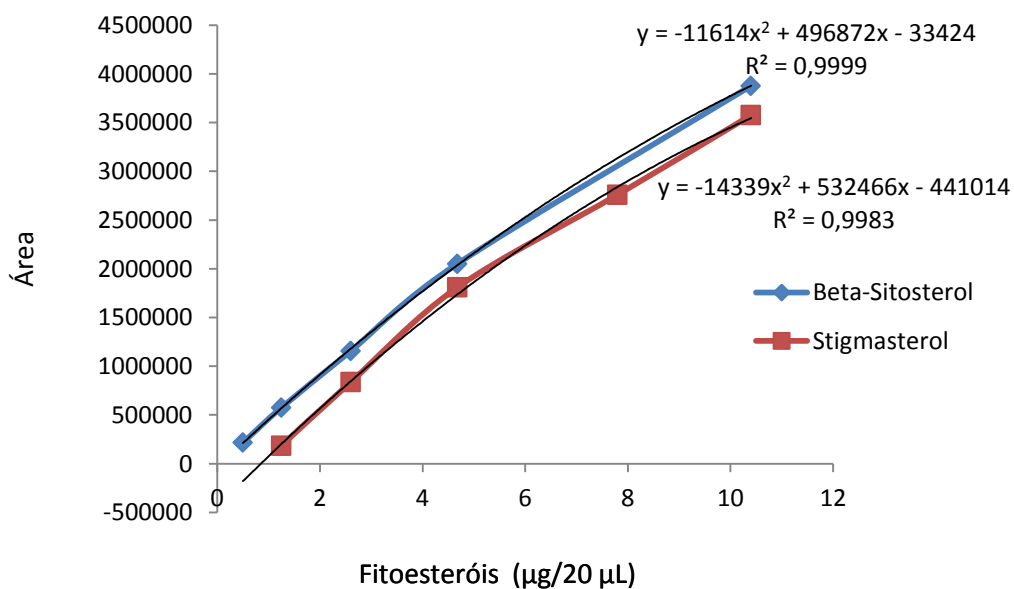


Figura 4. Curva de Calibração Externa dos Fitoesteróis Beta-Sitosterol e Stigmasterol

Anexo A – Curvas de Calibração das Análises Cromatográficas de Compostos Fenólicos, Carotenoides e Tocoferóis

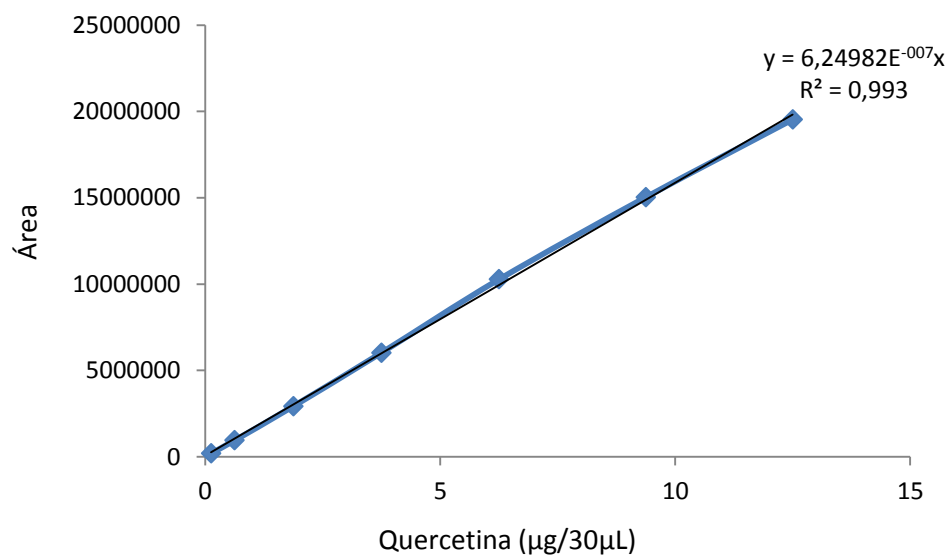


Figura 5. Curva de Calibração Externa de Quercetina

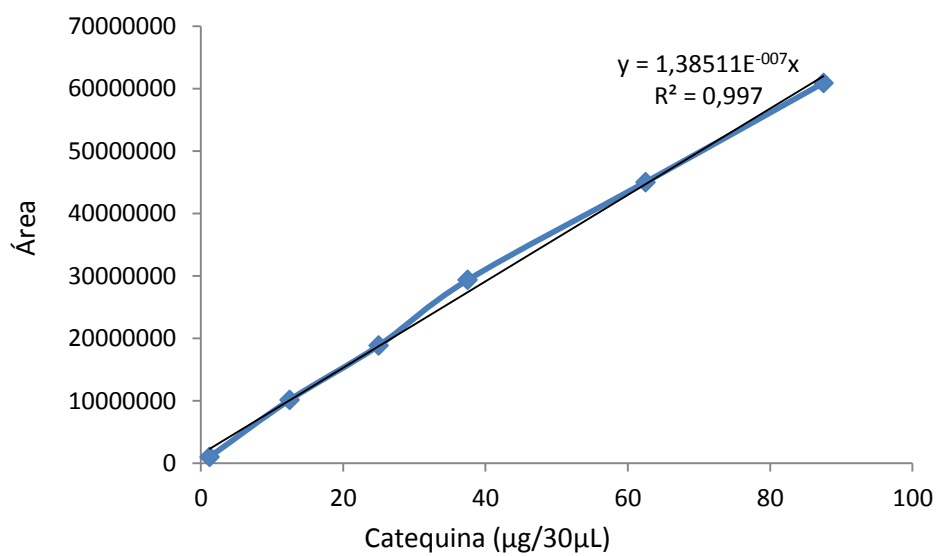


Figura 6. Curva de Calibração Externa de Catequina

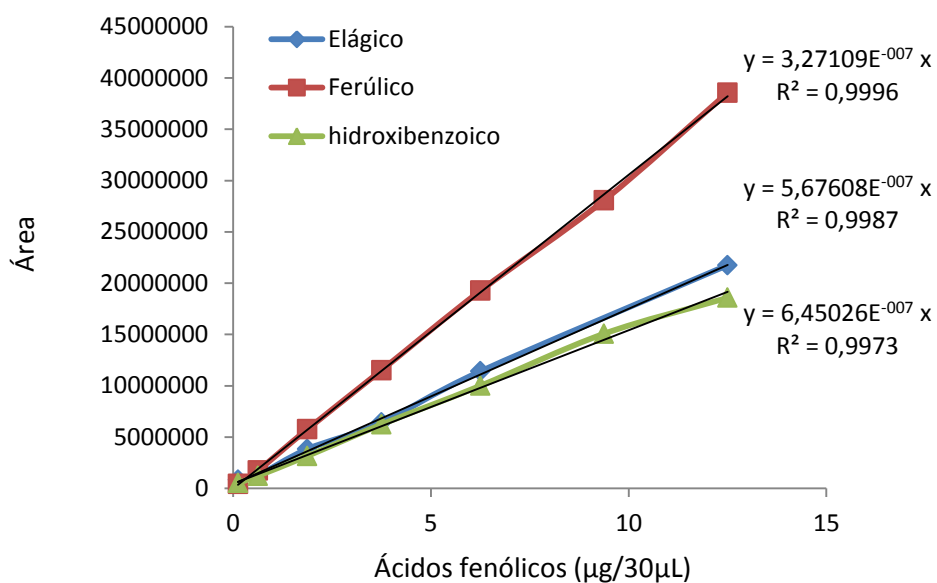


Figura 7. Curvas de Calibração Externa dos Ácidos fenólicos elágico, Ferúlico e Hidroxibenzoico

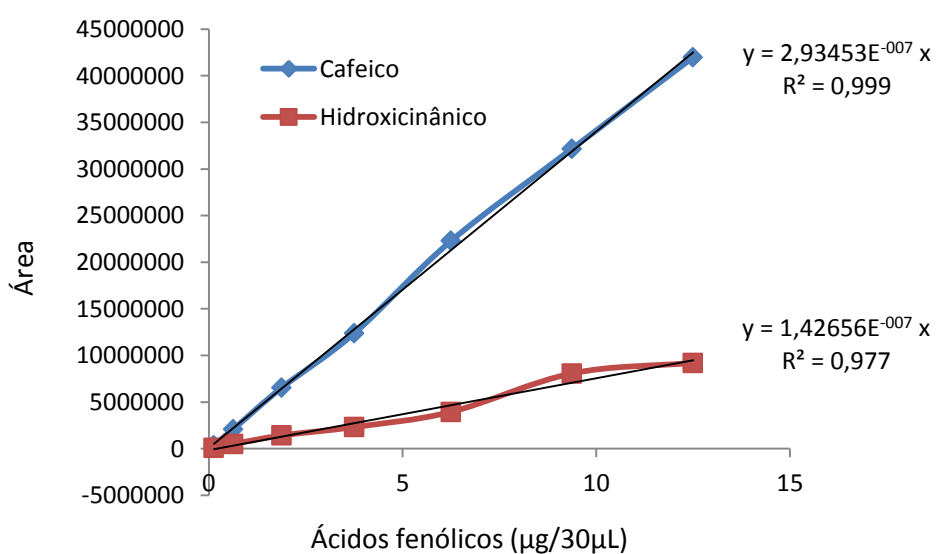


Figura 8. Curvas de Calibração Externa dos Ácidos Fenólicos Cafeico e Hidroxicinâmico

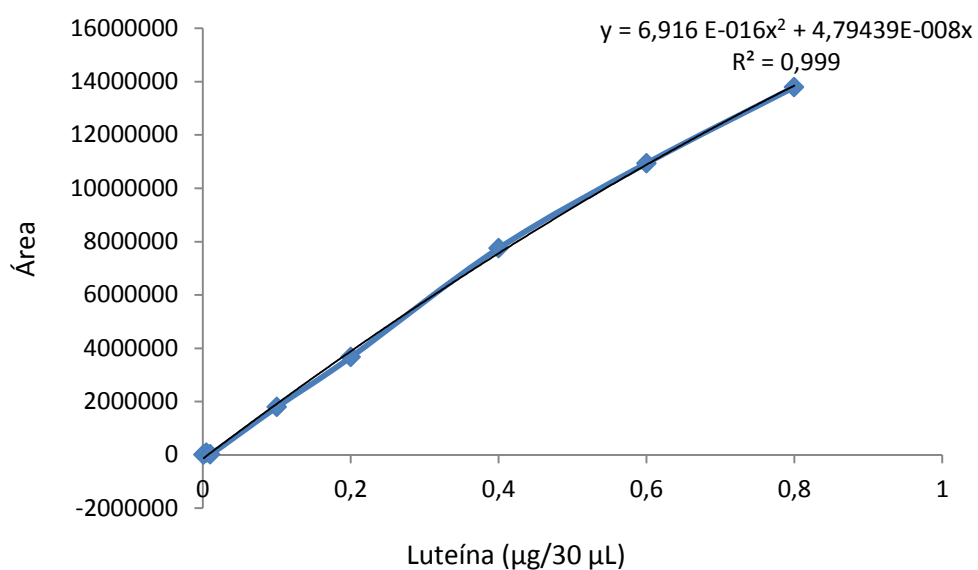


Figura 9. Curva de Calibração Externa de Luteína

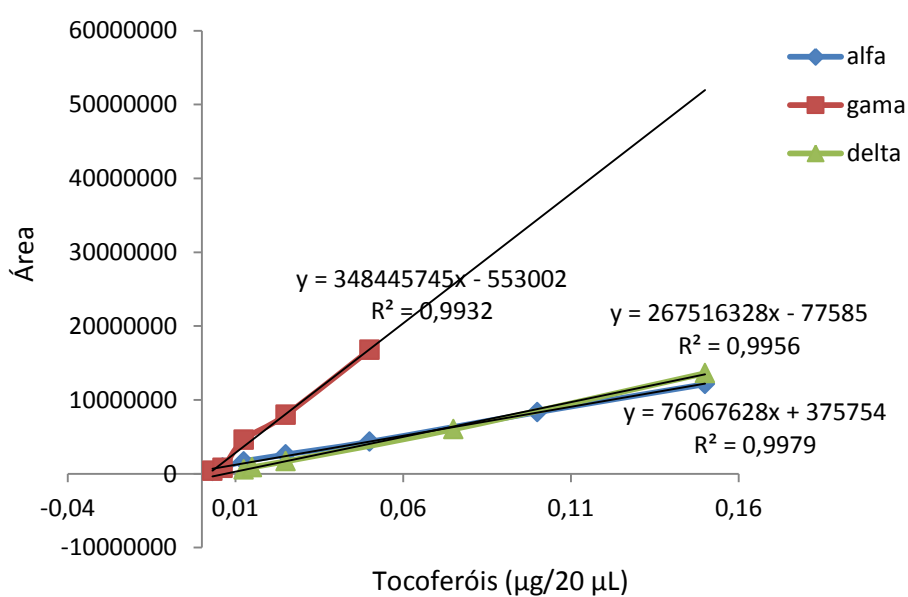


Figura 10. Curvas de Calibração Externa dos Tocoferóis