

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA**  
**SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**MARINA FIDELIS**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE**  
**ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIPROLIFERATIVA DE SEMENTES DE**  
***Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh E *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg**

**PONTA GROSSA**  
**2019**

MARINA FIDELIS

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIPROLIFERATIVA DE SEMENTES DE  
*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh E *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos da Universidade Estadual de  
Ponta Grossa.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel Granato

PONTA GROSSA

2019

F451 Fidelis, Marina  
Otimização da extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa de sementes de *Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh e *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg/ Marina Fidelis. Ponta Grossa, 2019.  
111 f., il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Área de concentração – Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

1. Antioxidantes naturais. 2. Elagitaninos. 3. Metodologia de superfície de resposta. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Efeito citotóxico. I. Granato, Daniel. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa - Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

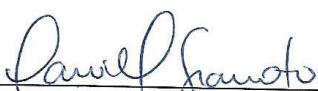
CDD : 664.8

## TERMO DE APROVAÇÃO

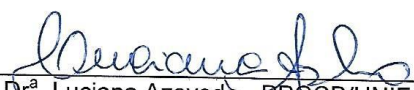
MARINA FIDELIS

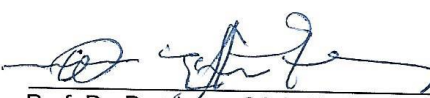
**Otimização da extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa de sementes de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh e *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:   
Prof. Dr. Daniel Granato - DEA/UEPG - PR

  
Prof. Dr. André Carlos Auler - DEFIS/UEPG - PR

  
Prof.ª Dr.ª Luciana Azevedo - PPGCB/UNIFAL - MG

  
Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes - DEQUIM/UEPG - PR

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, em primeiro lugar, sempre, pela oportunidade da vida, pela força, saúde, coragem e sabedoria.

Aos meus pais, Thais e Ricardo, a quem devo tudo, são meus maiores exemplos de amor, carinho, coragem, dedicação e profissionalismo. Os mais profundos agradecimentos pelas horas que estiveram ao meu lado, pela amizade, paciência, compreensão e apoio incondicional na superação dos obstáculos que surgiram ao longo da vida. Pelas palavras de carinho e conforto quando as coisas pareciam difíceis demais, pelas orações e ensinamentos que sempre me acompanharam. Sozinha nada disto seria possível e essa conquista nunca será somente minha. A eles dedico esse trabalho!

Aos meus irmãos, Thiago e Ricardo, meus melhores amigos e companheiros, pela amizade, carinho e amor sempre. Aos meus avós, pela eterna torcida.

Ao meu namorado, Lucas, pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro de todas as horas, com quem eu sei que passarei por muitos e muitos momentos de felicidade. Agradeço por todo amor e atenção, por me apoiar em todas as circunstâncias, pelo incentivo permanente, por me ajudar a ser uma pessoa melhor e me fazer muito feliz nesses quase seis anos que passamos juntos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Granato, a quem sinto imenso orgulho e admiração, agradeço profundamente por acreditar em meu potencial, pelas contribuições valiosas, por todo o suporte para conclusão desse trabalho, e também por estar presente em todas as etapas, me apoiando, motivando e aconselhando. Nossas conversas sempre foram pontos de partida para um desfecho de acontecimentos felizes. Mais que um orientador e incentivador, tornou-se um grande amigo.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos e CTA/UEPG por tornarem a execução do trabalho possível. Ao LABMU/UEPG pela disponibilização do uso de equipamentos para análises.

À Profa. Dra. Luciana Azevedo, pela grandiosa contribuição, sua recepção e parceria foram essenciais para o alcance dos objetivos do trabalho. Ao Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana, pelas contribuições prestadas no desenvolvimento do presente estudo.

Aos meus queridos colegas, Jânio, Graziela, Pablo e Mariana, pela paciência, disponibilidade e por estarem sempre dispostos a ajudar, pessoas que enriqueceram minha experiência e foram meus companheiros de laboratório, estudos, cafés e almoços.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de Mestrado.

À todos, muito obrigada!

## RESUMO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*), fruta originária da região Amazônica, e a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), fruta nativa em grande parte do Brasil, são consideradas fontes de compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas e minerais. As sementes de camu-camu e jabuticaba representam cerca de 25% dos frutos, no entanto, esse subproduto é, geralmente, descartado sem valorização e aproveitamento de seus constituintes químicos. Utilizar resíduos do processamento é uma forma de aproveitamento e conversão em coprodutos com maior valor agregado. Nesse cenário, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de solventes (água, álcool etílico e propanona) e maximizar a extração de compostos bioativos, caracterizar a composição fenólica de extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba, determinar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro*. Primeiramente, o planejamento de misturas simplex-centroide, aumentado com três pontos internos, foi utilizado para avaliar os efeitos isolados, misturas binárias e ternárias dos solventes. Para tanto, os extratos das sementes das duas frutas foram caracterizados com base em métodos de determinação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e inibição da peroxidação lipídica. Os resultados obtidos foram avaliados por regressão linear múltipla (RLM), de modo a estabelecer uma relação matemática entre os fatores (tipos de solventes) e as respostas. Nas proporções de 43,3% de propanona, 40,7% de água e 16% de EtOH para camu-camu, e 52% de água e 48% de propanona para jabuticaba foram encontrados valores elevados de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (TC). Da mesma forma, a atividade antioxidante *in vitro*, avaliada pelos métodos capacidade de captura do radical DPPH<sup>•</sup>, capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, inibição da peroxidação lipídica e capacidade de quelar Cu<sup>2+</sup>, também apresentaram valores elevados e mostrou estar correlacionada com o teor de CFT, FT e TC. Posteriormente, a identificação e quantificação de 16 e 13 compostos fenólicos nos extratos otimizados de sementes de camu-camu e jabuticaba, respectivamente, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os dois extratos testados foram capazes de inibir o crescimento de linhagens de células cancerosas A549 (IC<sub>50</sub> camu-camu=581,1 µg/mL e IC<sub>50</sub> jabuticaba=310,7 µg/mL) e HCT8 (IC<sub>50</sub> camu-camu=630,8 µg/mL e IC<sub>50</sub> jabuticaba=382,2 µg/mL), demonstrando efeitos citotóxicos e antiproliferativos. Foi constatada a ação antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*. De modo geral, o sistema de solvente em estudo foi responsável por modificar a polaridade do meio e proporcionar aumento no rendimento da extração de compostos bioativos. Maior solubilização e diferenciação da composição fenólica foi obtida uma vez que a água ficou responsável por dissolver compostos hidrofílicos, o EtOH, por dissolver substâncias polares e apolares, e propanona, capaz de quebrar ligações de hidrogênio formadas entre grupos fenólicos e carboxílicos de proteínas. Em termos tecnológicos, esse é o primeiro trabalho a reportar a otimização do sistema de solventes de semente de camu-camu.

**Palavras-chave:** antioxidantes naturais; elagitaninos; metodologia de superfície de resposta; atividade antimicrobiana; efeito citotóxico.

## ABSTRACT

Camu-camu (*Myrciaria dubia*), fruit native to the Amazon region, and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), native fruit in much of Brazil, are considered sources of phenolic compounds, carotenoids, vitamins and minerals. Seeds of camu-camu and jabuticaba represent about 25% of the fruits, however, this by-product is generally discarded without valorization and use of its chemical constituents. Using waste from the processing is a form of exploitation and conversion in coproducts with greater added value. In this scenario, the aim of this study was to evaluate the solvents effects (water, ethyl alcohol and propanone) and maximize the extraction of bioactive compounds, characterize the phenolic composition of camu-camu and jabuticaba seeds extracts, determine the antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative *in vitro* activities. Firstly, the simplex-centroid mixture design, increased with three internal points, was used to evaluate the isolated effects, binary and ternary solvents mixtures. For this, two fruits seeds extracts were characterized based on *in vitro* methods of total phenolic compounds, antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. The results were evaluated by multiple linear regression (RLM), in order to establish a mathematical relationship between the factors (solvents types) and the responses. In 43.3% of propanone, 40.7% of water and 16% of EtOH for camu-camu, and 52% of water and 48% of propanone for jabuticaba were found high values of total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF), and condensed tannins (CT). Likewise, the *in vitro* antioxidant activity, evaluated by the DPPH<sup>•</sup> radical capture ability, Folin-Ciocalteu reducing ability, inhibition of lipid peroxidation and Cu<sup>2+</sup> chelating ability, also showed high values and showed to be correlated with content of TPC, TF and CT. Subsequently, the identification and quantification of 17 and 13 phenolic compounds of camu-camu and jabuticaba seeds optimized extracts, respectively, were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The two extracts tested were able to inhibit the growth of A549 cancer cell lines (IC<sub>50</sub> camu-camu=581.1 µg/mL and IC<sub>50</sub> jabuticaba=310.7 µg/mL) and HCT8 (IC<sub>50</sub> camu-camu=630.8 µg/mL and IC<sub>50</sub> jabuticaba=382, 2 µg/mL), showing antiproliferative effects. It was found antimicrobial action against *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*. In general, the solvent system under study was responsible for modifying the extract polarity and providing increased extraction yield of bioactive compounds. Higher solubilization and differentiation of phenolic composition was obtained since the water was responsible for dissolving hydrophilic compounds, EtOH, by dissolving polar and apolar substances, and propanone, capable of breaking hydrogen bonds formed between phenolic and carboxylic groups of proteins. In technological terms, this is the first work to report the optimization of the camu-camu seed solvent system.

**Keywords:** ellagitannins; response surface methodology; natural antioxidants; antibacterial activity; cytotoxic effect.



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Camu-camu ( <i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K.) Mc Vaugh)                                                                                                                                                             | 18 |
| <b>Figura 2</b> - Jabuticaba "Paulista" ( <i>Myrciaria cauliflora</i> (Mart.) O. Berg)                                                                                                                                              | 25 |
| <b>Figura 3</b> – Subclassificação química dos flavonoides                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura química do ácido gálico e ácido elágico                                                                                                                                                                 | 33 |
| <b>Figura 5</b> - Classificação dos taninos                                                                                                                                                                                         | 34 |
| <b>Figura 6</b> - Elagitaninos C-glicosídeos.                                                                                                                                                                                       | 34 |
| <b>Figura 7</b> - Elagitaninos castalagina e vescalagina                                                                                                                                                                            | 36 |
| <b>Figura 8</b> - Delineamento simplex centroide com pontos axiais (triângulo de concentrações)                                                                                                                                     | 39 |
| <b>Figura 9</b> - Sementes de camu-camu secas                                                                                                                                                                                       | 42 |
| <b>Figura 10</b> – Sementes de camu-camu moídas                                                                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 11</b> - Sementes e farinha de semente de jabuticaba                                                                                                                                                                      | 43 |
| <b>Figura 12</b> - Obtenção de extratos de sementes de camu-camu ( <i>M. dubia</i> )                                                                                                                                                | 45 |
| <b>Figura 13</b> - Obtenção de extratos de sementes de jabuticaba ( <i>M. cauliflora</i> )                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Figura 14</b> - Efeitos do tipo de solvente sobre o CFT (A), FT (B), TC (C), Atividade quelante de $\text{Cu}^{2+}$ (D) CRFC (E), DPPH• (F) e IPL (G) em extratos de sementes de camu-camu representados por gráfico de contorno | 69 |
| <b>Figura 15</b> - Efeitos do tipo de solvente sobre o CFT (A), TC (B), Atividade quelante de $\text{Cu}^{2+}$ (C), CRFC (D), DPPH• (E) e IPL (F) em extratos de sementes de jabuticaba representados por gráfico de contorno.      | 79 |
| <b>Figura 16</b> - Inibição da peroxidação lipídica (IPL) <i>ex vivo</i> em extratos de semente de camu-camu e jabuticaba                                                                                                           | 86 |
| <b>Figura 17</b> - Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de sementes de camu-camu                                                                             | 90 |
| <b>Figura 18</b> - Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de sementes de jabuticaba                                                                            | 91 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Planejamento experimental simplex centroide para extração dos compostos fenólicos de sementes de camu-camu e jabuticaba. ....                                                                                                                    | 44 |
| <b>Tabela 2</b> - Condições de gradiente de eluição para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....                                                                                                                   | 55 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição química de extratos de semente de <i>Myrciaria dubia</i> de acordo com o delineamento experimental.....                                                                                                                               | 58 |
| <b>Tabela 4</b> - Atividade antioxidante, atividade quelante de metais e inibição da peroxidação lipídica de extratos de semente de <i>Myrciaria dubia</i> de acordo o delineamento experimental .....                                                             | 61 |
| <b>Tabela 5</b> - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de camu-camu .....  | 67 |
| <b>Tabela 6</b> - Valores preditos e experimentais para a mistura de 40,7 % água, 16 % álcool etílico e 43,3% propanona .....                                                                                                                                      | 71 |
| <b>Tabela 7</b> - Composição química de extratos de <i>Myrciaria cauliflora</i> de acordo com o delineamento experimental .....                                                                                                                                    | 72 |
| <b>Tabela 8</b> - Atividade antioxidante, quelante de metais e inibição da peroxidação lipídica de extratos de semente de <i>Myrciaria cauliflora</i> de acordo o delineamento experimental .....                                                                  | 74 |
| <b>Tabela 9</b> - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de jabuticaba ..... | 77 |
| <b>Tabela 10</b> - Valores preditos e experimentais para a mistura de 52% de água e 48% de propanona.....                                                                                                                                                          | 80 |
| <b>Tabela 11</b> - Composição química de extrato otimizado de sementes de camu-camu ( <i>Myrciaria dubia</i> ) e jabuticaba ( <i>Myrciaria cauliflora</i> ).....                                                                                                   | 82 |
| <b>Tabela 12</b> - Atividade antimicrobiana de extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba .....                                                                                                                                                                | 87 |

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 13</b> – Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48h de exposição aos extratos otimizados liofilizados de sementes de camu-camu e jabuticaba ..... | 89 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

**(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>O** – Propanona

**AA** – Atividade antioxidante

**AAE** – Ácido ascórbico equivalente

**AGE** – Ácido gálico equivalente

**CAT** – catalase

**CE** – Catequina equivalente

**CFT** – Conteúdo fenólico total

**CLAE** – Cromatógrafo líquido de alta eficiência

**CRFC** – Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu

**DPPH<sup>•</sup>** – Radical livre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

**ERNs** – Espécies reativas de nitrogênio

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**ET** – Elagitaninos

**EtOH** - Álcool etílico

**FT** – Flavonoides totais

**GPx** – glutathione peroxidase

**IPL** – Inibição da peroxidação lipídica

**MSR** – Metodologia de superfície de resposta

**QE** – Quercetina equivalente

**RLM** – Regressão linear múltipla

**SOD** – superóxido dismutase

**TAH** – Transferência de átomos de hidrogênio

**TBA** – Ácido 2-tiobarbitúrico

**TC** – Taninos condensados

**TPTZ** – 2,4,6-tripyridyl-s-trizina

**TSE** – Transferência simples de elétrons

## SUMÁRIO

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                | 14 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                                                                 | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                                                 | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                          | 16 |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                     | 17 |
| 3.1 MERCADO MUNDIAL E BRASILEIRO DE FRUTAS                                                         | 17 |
| 3.2 CAMU-CAMU ( <i>Myrciaria dubia</i> )                                                           | 18 |
| 3.3 JABUTICABA ( <i>Myrciaria cauliflora</i> e <i>Myrciaria jaboticaba</i> )                       | 22 |
| 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES                                                         | 27 |
| <b>3.4.1 Flavonoides</b>                                                                           | 30 |
| <b>3.4.2 Ácidos fenólicos</b>                                                                      | 31 |
| <b>3.4.3 Taninos</b>                                                                               | 33 |
| 3.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS: SOLVENTES E MÉTODOS ESTATÍSTICOS                              | 36 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                        | 41 |
| 4.1 REAGENTES QUÍMICOS                                                                             | 41 |
| 4.2 SEMENTES DE CAMU-CAMU ( <i>Myrciaria dubia</i> ) E JABUTICABA ( <i>Myrciaria cauliflora</i> )  | 41 |
| <b>4.2.1 Coleta, preparo e secagem das sementes</b>                                                | 41 |
| <b>4.2.2 Planejamento experimental</b>                                                             | 43 |
| <b>4.2.3 Extração de compostos fenólicos de sementes de <i>M. dubia</i> e <i>M. cauliflora</i></b> | 45 |
| 4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA                                                                             | 47 |
| <b>4.3.1 Conteúdo fenólico total (CFT)</b>                                                         | 47 |
| <b>4.3.2 Flavonoides totais (FT)</b>                                                               | 47 |
| <b>4.3.3 Taninos condensados (TC)</b>                                                              | 48 |

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> (AA).....                                                                        | 48        |
| 4.4.1 Atividade antioxidante de captura do radical DPPH• .....                                                              | 49        |
| 4.4.2 Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (CRFC) .....                                                          | 49        |
| 4.4.3 Inibição da peroxidação lipídica <i>in vitro</i> – gema de ovo .....                                                  | 50        |
| 4.4.4 Inibição da peroxidação lipídica <i>ex vivo</i> - homogenato de cérebro de rato Wistar .....                          | 51        |
| 4.4.5 Atividade quelante frente ao íon de transição Cu <sup>2+</sup> .....                                                  | 52        |
| 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE SEMENTES DE <i>Myrciaria dubia</i> e <i>Myrciaria cauliflora</i> .....           | 53        |
| 4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .. | 54        |
| 4.7 VIABILIDADE CELULAR.....                                                                                                | 55        |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA E OTIMIZAÇÃO .....                                                                                  | 56        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                       | <b>58</b> |
| 5.1 SEMENTES DE CAMU-CAMU ( <i>Myrciaria dubia</i> ) .....                                                                  | 58        |
| 5.1.1 Composição fenólica .....                                                                                             | 58        |
| 5.1.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....                                                                          | 60        |
| 5.1.3 Metodologia de superfície de resposta (MSR) .....                                                                     | 65        |
| 5.2 SEMENTES DE JABUTICABA ( <i>Myrciaria cauliflora</i> ) .....                                                            | 71        |
| 5.2.1 Composição fenólica .....                                                                                             | 71        |
| 5.2.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....                                                                          | 74        |
| 5.2.3 Metodologia de superfície de resposta (MSR) .....                                                                     | 76        |
| 5.3 EXTRATOS OTIMIZADOS DE SEMENTES DE CAMU-CAMU E JABUTICABA                                                               | 81        |
| 5.3.1 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....        | 81        |
| 5.3.2 Inibição da peroxidação lipídica utilizando cérebro de ratos Wistar .....                                             | 85        |
| 5.3.3 Atividade antimicrobiana.....                                                                                         | 87        |
| 5.3.4 Viabilidade celular .....                                                                                             | 89        |

|                                                 |            |
|-------------------------------------------------|------------|
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                        | <b>94</b>  |
| <b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b> | <b>95</b>  |
| <b>8 REFERÊNCIAS .....</b>                      | <b>96</b>  |
| <b>ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA.....</b>     | <b>111</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, em virtude de um aumento na consciência e interesse por parte dos consumidores no que diz respeito a uma alimentação e estilo de vida mais saudáveis, o desenvolvimento de novos produtos e o mercado de alimentos e ingredientes funcionais têm demonstrado um crescimento cada vez maior (GOMES et al., 2017).

Frutas e vegetais são reconhecidos por suas propriedades sensoriais, mas também por representarem excelentes fontes de compostos bioativos, que têm sido associados aos efeitos benéficos à saúde, inclusive redução do risco de diversas doenças crônicas não comunicáveis (LIU, 2003; BOIENG et al., 2012). Estudos revelam que, além de apresentar componentes alimentares nutritivos, como vitaminas, minerais, ácidos orgânicos, fibras dietéticas e gorduras insaturadas, as frutas classificadas como *berries*, dentre elas a jabuticaba e o camu-camu, são fontes de compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) (HORSWALD; ANDLAUER, 2011; FRACASSETI et al., 2013; WU et al., 2013).

Embora sementes e cascas de jabuticaba e camu-camu representem cerca de 50% dos frutos, esses subprodutos são, normalmente, descartados sem aproveitamento de seus constituintes. Em muitos casos, essas partes da fruta podem apresentar maior atividade antioxidante em comparação à polpa, um interesse tecnológico para a indústria alimentícia e farmacêutica. Ressalta-se que não há registros (pesquisa em 26/08/2018) na *Web of Science* e no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) do uso das sementes de jabuticaba e camu-camu no desenvolvimento de alimentos. Foi registrado o depósito de duas patentes brasileiras utilizando os subprodutos da jabuticaba e nenhuma de patente brasileira utilizando os subprodutos de camu-camu:- PI 1106607-5 A2 (2011): extratos secos padronizados de semente de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) obtidos por maceração, percloração e concentração do extrato de semente, sem qualquer aplicação tecnológica em alimentos, muito menos a avaliação de funcionalidade *in vitro* e *in vivo*;- PI 1015496-5 A2 (2010): farinha e extrato antociânico da casca de jabuticaba utilizado como aditivos de alimentos, no qual os autores avaliaram o teor de ácido ascórbico, fibras e atividade antioxidante *in vitro*. Entretanto, não há aplicação tecnológica da farinha e de casca em matriz láctea. Conhecer os constituintes químicos das frações desses



frutos contribui para melhor aproveitamento, permitindo sua valorização econômica e redução de danos ao meio ambiente em consequência da diminuição do descarte de resíduos (RODRIGUES et al., 2001; GUO et al., 2003; LIMA et al., 2008; BORGES et al., 2015; HACKE et al., 2016).

Diversas variáveis de um processo exigem direcionamento e consideração individual, principalmente referente à natureza intrínseca e à estabilidade dos compostos químicos. Para otimizar um sistema, se faz necessário identificar as variáveis envolvidas a fim maximizar (vitaminas, antioxidantes) ou minimizar (oxidação, extração de compostos tóxicos) as respostas, utilizando menor tempo, consumo de energia e solvente extrator (DAI; MUMPER, 2010). Além disso, o processo de extração assegura que um extrato bruto apresente o maior potencial funcional. Visto que a funcionalidade do extrato depende da composição química, o estudo do uso de diferentes solventes extratores apresenta-se como fator relevante. Essa variável influencia o rendimento da extração dos compostos fenólicos, interferindo diretamente em funcionalidades apresentadas pelo extrato, como as atividades antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

A valorização de frutas nativas brasileiras por meio de estudos químicos, desenvolvimento e inovação tecnológica é uma forma de estimular o plantio e consumo, além de preservar a biodiversidade. Por promover o uso sustentável da biodiversidade (uso das sementes) e inclusão da agricultura familiar nos arranjos produtivos, os resultados apresentados nessa dissertação servem como base científica para incorporação de extratos bioativos de sementes de camu-camu e jabuticaba em alimentos potencialmente funcionais.

Ainda não se sabe como misturas de diferentes solventes podem afetar a composição química e, portanto, a funcionalidade de extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba. Além disso, não foram encontrados estudos sobre a modelagem matemática dos efeitos de diferentes solventes sobre a composição fenólica e atividade antioxidante desses extratos vegetais. Considerando o potencial socioeconômico e nutricional dessas frutas e tendo em vista a importância de novas fontes naturais de compostos bioativos aplicadas em produtos, o objetivo geral do presente estudo foi identificar e otimizar a extração de compostos fenólicos de sementes de camu-camu e jabuticaba, determinar a atividade antioxidante, antimicrobiana e testar extratos em relação à sua atividade citotóxica e antiproliferativa *in vitro* em relação a linhagens de células tumorais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de solventes e maximizar a extração, caracterizar a composição fenólica de extratos de semente de camu-camu (*Myrciaria dubia*) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e testar os extratos em relação às suas atividades biológicas *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os compostos fenólicos a partir de um planejamento experimental, utilizando água, álcool etílico e propanona como solventes extratores;
- Modelar e avaliar os efeitos da água, álcool etílico e propanona sobre os compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba, com base na metodologia de superfície de resposta (MSR);
- Otimizar o sistema de solventes visando maximizar o rendimento da extração de compostos bioativos nos extratos de sementes;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* e atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos otimizados;
- Identificar e quantificar a composição fenólica dos extratos otimizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Correlacionar a atividade antioxidante com a composição química dos extratos;
- Testar os efeitos citotóxicos e atividade antiproliferativa *in vitro* frente às linhagens de células HCT8, A549 e IMR90.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MERCADO MUNDIAL E BRASILEIRO DE FRUTAS

De acordo com o panorama mundial, a produção e o consumo de frutas apresentam crescimento contínuo. Em 2014, colheu-se um volume de 830 milhões de toneladas. A China ocupa o primeiro lugar no *ranking*, cuja colheita, nesse mesmo ano, foi de 250 milhões de toneladas, representando 30,2% de toda a produção. O segundo produtor é a Índia, que alcançou a faixa de 89,9 milhões de toneladas, conferindo 10,8%; já o Brasil, terceiro maior produtor, é responsável por 4,8% do volume colhido, com 40,2 milhões de toneladas (FAO, 2014; SEAB, 2017).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, no Brasil, a produção, largamente absorvida pelo mercado interno, apresenta como principais frutos as bananas, maçãs, uvas, melões e frutas tropicais, como manga, abacate, abacaxi e mamão (FAO, 2015). A fruticultura, um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro, conquista resultados expressivos e também é capaz de gerar oportunidade para os pequenos negócios. No ano de 2013, o Brasil apresentou uma produção de 43,6 milhões de toneladas de frutas, sendo que cerca de 23,8 milhões de toneladas foram destinadas à produção de sucos, néctares e polpas (AIJN, 2014). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2015 foram produzidas mais de 40 milhões de toneladas das 22 principais frutíferas, o que apresentou um valor da produção avaliado em R\$ 26,5 bilhões, obtendo-se um acréscimo de 3,4% em comparação com o ano anterior. Dentre as frutíferas, a banana, laranja, uva, abacaxi, maçã e melancia concentram 70% do valor da produção. O maior estado produtor, São Paulo, compreende 24,9% do valor de produção, gerando uma receita de R\$ 6,6 bilhões (IBGE, 2015).

Entre as frutas brasileiras com baixa produção e sem estatísticas sobre volume colhido e receita gerada, a jabuticaba e camu-camu, ambas do gênero *Myrciaria*, podem ser destacadas por serem endêmicas do Brasil e serem produzidas por pequenos produtores. O estudo químico e de potencial funcional de tais frutas serve como um incentivo para que sejam mais exploradas comercialmente e seu cultivo seja difundido no Brasil.

### 3.2 CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)

Identificado em 1958 por Mc Vaugh, o camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] Mc Vaugh), Figura 1, também conhecido como “caçari” ou “araçá d’água”, é uma espécie frutífera, pertencente à família Myrtaceae, que ocorre espontaneamente nas margens dos rios e lagos da bacia Amazônica, entre as regiões do Peru e Brasil (ZAPATA; DUFOUR, 1993; SILVA; ANDRADE, 1997). No Brasil, a Amazônia se espalha pelos estados Pará, Amazonas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Acre, Amapá, Rondônia e Roraima. Esses estados representam uma região rica em árvores frutíferas nativas, dentre elas, destaca-se o camu-camuzeiro (RODRIGUES et al., 2001). Além disso, foi observado que alguns genótipos se adaptam normalmente nas regiões de Minas Gerais e São Paulo, onde a produção já foi iniciada (YUYAMA, 2011).

**Figura 1** - Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh)



Fonte: Adaptado de Aguiar e Souza (2016)

O camu-camuzeiro é um arbusto de 3 m, podendo alcançar até 8 m de altura, com muitas ramificações, tronco liso de até 15 cm de diâmetro. As folhas, oval-elípticas a lanceoladas, variam de 4,5 a 12 cm de comprimento e 1,5 a 4,5 cm de largura. A floração é axial, com flores de 6 a 10 mm de comprimento e pequenas pétalas brancas. Seus frutos são globosos, com 10 a 32 mm de diâmetro e peso médio de 8,4 g, com mesocarpo carnoso, gelatinoso e esbranquiçado, de sabor adstringente. Pode variar de 1 a 4 sementes por fruto, com fibrilas na superfície. Apresenta coloração verde quando imaturo e variação de vermelho a roxo nos estádios finais de maturação (VILLACHICA, 1996; SILVA e ANDRADE, 1997; SUGUINO; ARAÚJO; SIMÃO, 2001; RODRIGUES et al., 2001).

A frutificação é influenciada pela nutrição do solo. Em solos de terras altas, onde a água e os nutrientes são controladas, o camu-camuzeiro pode produzir mais de duas colheitas por ano, o mesmo acontece com a jabuticaba (YUYAMA, 2011). A colheita de frutos plantados em áreas de inundação ocorre entre os meses de dezembro e março; enquanto a safra de frutos que foram semeados em áreas não inundáveis pode ocorrer entre os meses de novembro a maio, embora também sejam encontrados frutos o ano todo (VILLACHICA, 1996). A melhoria genética dos materiais com elevado teor de ácido ascórbico e elevada produtividade podem alcançar até 23 kg de fruto/planta/safra, e a multiplicação vegetativa é facilitada por meio de técnicas de clonagem. O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em função do alto valor nutricional, também introduziu sementes de camu-camu em outras regiões do Brasil, como nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (YUYAMA, 2011).

O sabor do fruto caracteriza-se como suave, no entanto, seu elevado teor de ácidos ascórbico e cítrico, além de fenólicos, revela a um sabor ácido e amargo, o que minimiza seu consumo *in natura* (MYODA et al., 2010). O camu-camu apresenta alto potencial, tanto para a indústria alimentícia, quanto para a indústria farmacêutica. As frutas podem ser utilizadas na forma de antioxidante natural, como conservadores, sucos, néctares, geleias, iogurtes, sorvetes, licores, bebidas fermentadas, corantes naturais, provenientes de antocianinas, nutracêuticos (comprimidos, cápsulas, pastilhas de ácido ascórbico) e cosméticos (creme facial, xampu, condicionador). (RODRIGUES et al., 2001; YUYAMA et al., 2002; MAEDA; ANDRADE, 2003; VIEIRA et al., 2010; YUYAMA, 2011; CHAGAS et al., 2012).

Como a fruta ainda é pouco difundida no Brasil, a comercialização é feita em pequena escala, grande parte sob forma de polpa congelada, na proximidade das regiões produtoras. Já em países da Europa, no Japão e Estados Unidos, a fruta, bastante procurada, é importada e sua polpa transformada em bebidas espumantes, vinagre, sorvete e doces (YUYUAMA, 2011).

Frutas tropicais são atrativas para a indústria de alimentos, principalmente por sua aparência única, sabor e valor nutricional (KANESHIMA et al., 2013). O camu-camu tem recebido atenção em função do seu alto teor de compostos antioxidantes, tais como o ácido ascórbico e os polifenóis, incluindo flavonóis, antocianinas, derivados do ácido elágico, elagitaninos, derivados do ácido gálico e proantocianidinas. Estudos anteriores relataram conteúdos superiores de polifenóis, como ácido elágico total, quercetina e cianidina, quando comparados com outros

frutos da família Myrtaceae (INOUE et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010; AKTER et al., 2011; DONADO-PESTANA et al., 2018).

De acordo com Albertino et al. (2009), a fruta fornece trinta vezes mais ácido ascórbico que laranjas, além de apresentar aminoácidos e minerais, que servem de complemento para a absorção de vitaminas. Inoue et al. (2008) testaram as propriedades do camu-camu em voluntários fumantes e constataram que, embora os mecanismos não sejam claros, o suco de camu-camu apresenta maior potencial antioxidante e anti-inflamatório que comprimidos de vitamina C, contendo teor equivalente de ácido ascórbico. Estudos conduzidos por Schwertz et al. (2012) revelaram que a ingestão do suco de camu-camu apresentou efeito modulador do perfil lipídico em ratos. Segundo os autores, uma dose de 10 mL/kg foi suficiente para reduzir o colesterol total e o LDL (lipoproteína de baixa densidade). Devido à baixa concentração de carboidratos e lipídeos, o suco torna-se uma boa opção alimentar para pessoas com restrições energéticas.

Rufino et al. (2010) determinaram a atividade antioxidante e os compostos bioativos de 18 frutas tropicais consideradas não tradicionais. Segundo os autores, grande parte das frutas nativas e exóticas inexploradas no Brasil poderiam ser de interesse para a agroindústria e servir como fonte de renda para as populações locais. O acesso levaria a mercados específicos, onde os consumidores priorizam, tanto características sensoriais, quanto o caráter exótico e suas funcionalidades, como a presença de nutrientes capazes de reduzir o risco de doenças degenerativas (AKTER et al., 2011).

De acordo com Azevedo et al. (2019), o extrato bruto de camu-camu, sem purificação, representa uma mistura complexa de polifenóis, que desempenha efeitos sinérgicos em efeitos antimutagênicos *in vivo*. Além disso, nos ensaios realizados, os grupos de tratamento com três concentrações de camu-camu (17, 85 e 170 mg/kg de massa corporal) não apresentaram nenhum tipo de efeito genotóxico ou mutagênico em comparação com controles negativos. Os resultados obtidos indicaram que extratos de casca e polpa de camu-camu demonstram efeito protetor nos primeiros estágios de mutação, protegendo as células de lesões primárias no DNA (genotoxicidade), tais como quebras nas cadeias e/ou locais lábeis em álcalis. No mesmo estudo, os autores constataram que os extratos de camu-camu diminuíram o estresse oxidativo *in vivo* e protegeram contra os efeitos mutagênicos de drogas na

medula óssea e em micronúcleos do intestino, os quais são capazes de prever o risco de câncer.

Estudos relataram que as sementes de camu-camu são compostas por diferentes classes de compostos fenólicos, que são amplamente conhecidos por seus efeitos funcionais. Dentre essas substâncias destacam-se os ácidos fenólicos (ácidos elágico e sirínico) e os flavonoides, como quercetina, miricetina, rutina e catequina (REYNERTSON et al., 2008; AKTER et al., 2011; AZEVÊDO et al., 2008).

De acordo com Azevêdo et al. (2014), o resíduo (cascas e sementes) de camu-camu seco também pode ser considerado uma excelente fonte de compostos ativos, incluindo ácido ascórbico, ácido elágico, proantocianidinas, miricetina e quercetina. Em um segundo estudo, os autores verificaram que extratos de resíduos do fruto foram capazes de regular e/ou aumentar a expressão de genes de resposta antioxidante (superóxido dismutase e catalase) e promover maior resistência contra o estresse oxidativo *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*, além de apresentar efeito neuroprotetor (AZEVEDO et al., 2015). Fidelis et al. (2018) reportaram a presença de diferentes classes de compostos fenólicos em exocarpo de semente de camu-camu, e identificaram pela primeira vez na literatura a presença de *trans*-resveratrol. Além disso, as estruturas químicas dos compostos estudados apresentaram relação com atividades biológicas testadas *in vitro*, como atividade anti-hipertensiva e antioxidante.

De acordo com Myoda et al. (2010), o conteúdo fenólico total de extratos de semente de camu-camu mostrou ser três vezes maior que o de acerola, provando ser um recurso multifuncional para a indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos fortificados com compostos ativos. Um estudo feito por Yazawa et al. (2011) relatou a importância de sementes de camu-camu como fonte de compostos anti-inflamatórios. Os resultados avaliados *in vivo* e *in vitro* sugeriram que o extrato metanólico da semente suprime a formação de edema em pata de rato por meio da inibição da produção de óxido nítrico em células derivadas de macrófagos *in vitro*.

Segundo Langley et al. (2015), a farinha produzida de resíduos de sementes e cascas de camu-camu apresenta maior atividade antioxidante quando comparado com a polpa em pó. Foi possível constatar que o fruto inteiro pode contribuir não somente para o gerenciamento de condições inflamatórias e boa saúde em geral, como também demonstrar ação potencial antiobesidade, efeito protetor na lesão hepática e potencial para a redução do risco de doenças relacionadas ao sistema imunológico.

Em uma revisão recente, Donado-Pestana et al. (2018) mostraram que a composição química e atividade antioxidante *in vitro*, e em alguns casos *in vivo*, da polpa e casca de camu-camu foram já estudadas, entretanto, não descrevem a composição química, atividade antioxidante e aplicação de extratos das sementes dessas frutas em alimentos. Assim sendo, o desenvolvimento de alimentos ricos em antioxidantes extraídos de frutos nativos, em especial de subprodutos agroindustriais, representa uma tendência tecnológica que deve ser mais investigada (GRANATO et al., 2018). Enriquecer alimentos utilizando antioxidantes é uma maneira de aumentar a ingestão dos mesmos na dieta alimentar. No entanto, antioxidantes, quando sintéticos, podem apresentar toxicidade, além de exigirem elevados custos de fabricação. Por isso, a substituição por antioxidantes naturais implica em benefícios à saúde (SOONG; BARLOW, 2004).

As sementes e cascas de camu-camu são coprodutos geralmente descartados sem aproveitamento de seus constituintes químicos (RODRIGUES et al., 2001). Sabendo-se que, em muitos casos, essas partes da fruta podem apresentar maior atividade antioxidante quando comparadas com a polpa, utilizar resíduos do processamento torna-se uma maneira de aproveitamento e conversão em coprodutos de maior valor agregado. Isso permite a sua valorização econômica, abrindo espaço para um segmento do agronegócio. Estudos químicos, desenvolvimento e inovação tecnológica são formas de valorização de espécies de frutas nativas, capazes de incentivar e fomentar o plantio e consumo, bem como preservar a biodiversidade. (GUO et al., 2003; LIMA et al., 2008; AZEVÊDO et al., 2014; BORGES et al., 2015).

### 3.3 JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*)

O gênero *Myrciaria*, pertencente à família Myrtaceae, compreende mais de 80 espécies, dentre as quais, 21% são nativas do Brasil e encontram-se espalhadas em diversos biomas brasileiros. Além do Brasil, a distribuição geográfica das espécies *Myrciaria* ocorre em regiões como Paraguai, Bolívia, Argentina e América Central (BORGES et al., 2014).

A jabuticabeira, também conhecida pelos nomes populares “jabuticabeira-preta”, “jabuticabeira-rajada” e “jaboticaba”, é uma árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae, nativa e espontânea em grande parte do Brasil, pode ser encontrada desde o estado do Pará ao Rio Grande do Sul. Entretanto, os estados de



São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo compreendem as maiores produções (GOMES, 1972; DONADIO, 2000; LORENZI, 2002; BRUNINI et al., 2004).

A árvore, de grande rusticidade e longevidade, com altura de 10-15 m, apresenta tronco liso de 30-40 cm de diâmetro, flores brancas e sésseis; folhas opostas, lanceoladas e vermelhas quando estão novas, de 6-7 cm de comprimento por 2-3 cm de largura (GOMES, 1972; LORENZI, 2002). As flores e os frutos crescem em aglomerados no tronco principal e em ramos velhos. Como o apodrecimento e a fermentação ocorrem entre 2-3 dias após a colheita, o tempo de frutificação e comercialização tornam-se curtos em virtude de sua perecibilidade. Os frutos apresentam 20-30 mm de diâmetro, contém de uma a quatro sementes e a coloração da casca varia de avermelhada a roxa ou negra quando estão maduras, enquanto a polpa apresenta cor esbranquiçada (BARROS et al., 1996; COSTA et al., 2013).

Segundo Donadio (2000), a espécie *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg é classificada como jabuticabeiras provenientes do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro e leva alguns nomes vulgares, como “jabuticaba paulista”, “jabuticaba-açú” e “jabuticaba ponhema”. Enquanto que *M. jaboticaba* (Vell) Berg, que leva nomes vulgares “jabuticaba sabará” ou “jabuticaba de cabinho”, seriam as plantas nativas de São Paulo e Rio de Janeiro.

Segundo Gomes (1972), cinco variedades de jabuticaba podem ser encontradas no Brasil:

*Jabuticaba Sabará*: plantada de forma mais intensa, é considerada a mais apreciada e doce entre as jabuticabas.

*Jabuticaba Paulista*: de grande produção, maior porte comparada a anterior, no entanto, sua maturação é tardia.

*Jabuticaba Rajada*: crescimento e produção semelhantes às anteriores, com frutos grandes e doces. A pele apresenta coloração verde-bronzeada e a maturação é mediana.

*Jabuticabeira Branca*: de grande produção, essa variedade apresenta porte médio, com frutas grandes e coloração verde-clara.

*Jabuticabeira Ponhema*: de grande porte e farta produção. Normalmente consumida quando madura. É a variedade mais apropriada à fabricação de geleias, doces e licores.

Embora vegetações da jabuticabeira possam ocorrer em diferentes épocas do ano, são mais intensas durante o fim do inverno e início da primavera devido a

produção de folhas novas na periferia da copa, revelando um tom de cor diferenciado, que varia do verde claro ao arroxado, de acordo com cada espécie. O tempo de amadurecimento do fruto dura em torno de 3 semanas após o florescimento e podem ser feitas até 5 colheitas durante o ano em boas condições de cultivo e clima. Além disso, embora seja originária de clima tropical, sua adaptação pode ocorrer também em clima subtropical, porém requer boa umidade do solo. O transporte para a comercialização de frutos de alta perecibilidade deve ser rápido e chegar ao consumidor, preferencialmente, no mesmo dia da colheita (DONADIO, 2000). De acordo com Lorenzi (2002), a jabuticabeira floresce geralmente duas vezes ao ano, entre os meses de julho a agosto e novembro a dezembro. Já a frutificação ocorre em janeiro e agosto - setembro.

Apesar de grande capacidade de produção da planta (média anual de 200 kg de frutos por planta adulta) e apreciação por parte dos consumidores, os pomares de jabuticaba são, na maior parte, domésticos no Brasil. A ausência de cultivares melhoradas durante o período juvenil da planta, curta colheita de frutos e conservação pós-colheita restringe o plantio comercial de jabuticaba no país. Apesar de ter grande potencial para cultivo e comercialização, parte dos frutos é perdida por consequência da dificuldade em colhê-los, fragilidade, rápida deterioração e ataque de pássaros e insetos. Uma entre poucas plantações comerciais, a fazenda de Hidrolândia (GO), compreende 130 hectares e possui em torno de 38 mil jabuticabeiras, local onde o consumidor tem o direito de escolher a quantidade desejada (SALOMÃO et al., 2018).

Dentre as diferentes espécies de jabuticaba, 'Paulista' (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O. Berg) e 'Sabará' (*Myrciaria jaboticaba* [Vell] O. Berg) são as mais conhecidas (DONADIO, 2000). A primeira, Figura 2, apresenta fruto pequeno, com epicarpo fino, pedúnculo escuro e com sabor doce; enquanto a segunda apresenta frutos grandes, sésseis, com epicarpo mais espesso e um sabor doce menos pronunciado (GOMES, 1972). A jabuticabeira 'Sabará' compreende a maior área plantada entre as variedades brasileiras (BRUNINI et al., 2004).

**Figura 2-** Jabuticaba "Paulista" (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg)



**Fonte:** Wu et al. (2013)

O interesse econômico deve-se a sua rusticidade, propriedades nutricionais, funcionais e a diversidade de aplicações. A partir de jabuticaba, além de seu consumo *in natura*, são produzidos sucos, geleias, compotas, produtos fermentados, licor, vinho, vinagre, xaropes e também cosméticos (CITADIN; DANNER; SASSO, 2010; CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; INADA et al., 2015). Em virtude de um aumento da demanda por alimentos saudáveis, nutritivos e seguros, além da preocupação com a ingestão de produtos naturais, o desenvolvimento de novos produtos tem mostrado um crescimento cada vez maior. Eles podem ser obtidos de diferentes partes de frutas, como a polpa, casca e a semente (ALVES et al., 2017).

Além de suas propriedades sensoriais, frutas e vegetais também são reconhecidos por representarem excelentes fontes de compostos bioativos, os quais estão associados aos efeitos benéficos à saúde, como na redução do risco de diversas doenças crônicas não comunicáveis (BOIENG et al., 2012). Estudos revelam que, além de apresentar componentes alimentares nutritivos, como as vitaminas, minerais, ácidos orgânicos, fibras dietéticas, açúcares e gorduras insaturadas, as frutas classificadas como *berries*, como a jabuticaba, são fonte de fenólicos, tais como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (HORSWALD; ANDLAUER, 2011; WU et al., 2013).

A jabuticaba vem sendo considerada uma das melhores fontes alimentares de antocianinas e elagitaninos. Até o presente momento foram relatados mais de vinte compostos fenólicos, com destaque especial para ácido gálico, galotaninos, ácido elágico e derivados, quercetina, miricitina, jaboticabin, cianidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeo (WU et al., 2012; ALEZANDRO et al., 2013a, NEVES et al.,

2018). Segundo Alezandro et al. (2013a) sementes de jabuticaba apresentam concentrações mais elevadas de alguns compostos, como elagitaninos e proantocianidinas, quando comparadas com a polpa e casca. Nesse estudo, os autores constataram funcionalidades *in vitro*, tais como atividade antioxidante e inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase.

Em um trabalho do grupo de pesquisa, Hacke et al. (2016) detectaram, por meio da técnica IES-EM/EM, os seguintes compostos fenólicos de um extrato orgânico da semente de jabuticaba: ácido elágico, punicalina, pedunculagina, castalagina e vescalagina. O mesmo extrato demonstrou atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* contra diferentes micro-organismos.

Um estudo da administração diária da fruta, conduzido *in vivo*, revelou diminuição do colesterol total e triacilgliceróis, além de diminuição da peroxidação lipídica no plasma e cérebro (ALEZANDRO et al., 2013b). Alves et al. (2017) testaram formulações de presunto reestruturado adicionado de farinha de cascas de jabuticaba e concluíram que é possível preparar e comercializar esse produto, uma vez que, com adição de 0,5% dessa farinha, o teor de fibras, compostos fenólicos e dureza aumentaram e o brilho foi reduzido, além de ser bem aceito sensorialmente. Borges et al. (2015) realizaram uma otimização das propriedades de extratos secos por pulverização de sementes e cascas de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e constataram que os extratos exibiram potencial para uso farmacêutico e nutracêutico. Segundo os mesmos autores, embora a jabuticaba tenha importância agrícola e comercial, ainda há pouca informação sobre o aproveitamento de resíduos obtidos durante o processamento de seus frutos.

Resíduos de frutas e verduras, provenientes do processamento, representam, aproximadamente, 25 a 30% dos produtos. Sementes, cascas e bagaço são consideradas fontes de fitoquímicos, compostos bioativos de alto valor, como os polifenóis, carotenóides, fibras alimentares, vitaminas, enzimas, óleos, etc. Esses subprodutos têm potencial para serem direcionados para o desenvolvimento de alimentos funcionais ou enriquecidos, medicamentos e produtos farmacêuticos, ou, ainda, para a indústria têxtil, contribuindo também para um desenvolvimento sustentável (SAGAR et al., 2018). Estratégias, como o desenvolvimento de novos produtos ou extração de compostos antioxidantes podem ser levantadas, o que potencializa a industrialização (LIMA et al., 2008; RUFINO et al., 2010; RUFINO et al., 2011).

### 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes endógenos (HALLIWELL, 2007). As moléculas de oxigênio que não são devidamente reduzidas pelo sistema endógeno (3 a 5%), por meio da cadeia respiratória e retículo endoplasmático, recebem somente um elétron, que ocupará um dos orbitais externos, enquanto que o outro continuará não emparelhado, acarretando o surgimento de intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio - EROs. (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2015). As EROs, tais como radicais de ânions superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ , peróxido de hidrogênio,  $H_2O_2$ , radical hidroxila,  $\bullet OH$ , e hidroperoxila,  $HO_2^{\bullet}$ , retiram um elétron de moléculas celulares para obter estabilidade, causando danos às mesmas. São formadas em condições fisiológicas normais, por meio da respiração mitocondrial, auto-oxidação, reações enzimáticas e exercícios físicos excessivos. A morte celular, que é provocada por catalisadores primários das EROs, derivada da oxidação, pode levar à ocorrência de desordens, como danos ao DNA, aos cromossomos, ocorrência de mutações e doenças crônicas. Além das EROs, espécies reativas de nitrogênio, ERNs, também são responsáveis por danos aos tecidos, como o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (CHANDA; DAVE, 2009; DASGUPTA; KLEIN, 2014; GALANO et al., 2015).

No que se refere aos danos causados ao organismo, os radicais de ânion superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ , encontram-se em maior quantidade sob condições de estresse, após ingestão de certos medicamentos ou por meio de infecções e doenças. Entretanto, diferentes mecanismos no organismo combatem espécies reativas a fim de estabelecer a homeostase redox da célula, eliminando radicais livres e prevenindo possíveis lesões celulares, como é o caso dos antioxidantes biológicos ou enzimáticos, superóxido dismutase, SOD, catalase, CAT, e glutathione peroxidase, GPx (KIM et al., 2016).

De acordo com Halliwell (2007), “um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação desse substrato”. Huang, Ou e Prior (2005) definiram a palavra ‘antioxidante’ como uma substância que se opõe à oxidação ou inibe reações promovidas pelo oxigênio ou peróxido e que pode ser

utilizada como conservante em diversos produtos alimentícios de forma a retardar reações que desqualifiquem o produto.

Para interromper reações de radicais em cadeia, o sistema de defesa não enzimático, que envolve os antioxidantes dietéticos, como os compostos fenólicos, eliminam as EROs e espécies reativas de nitrogênio, ERNs, mantendo as estruturas e funções das células, inibindo reações de peroxidação de lipídios. Dentre os antioxidantes presentes na dieta convencional, destacam-se os inibidores de reação em cadeia de radicais, eliminadores de radicais livres, inibidores de enzimas oxidativas, cofatores de enzimas antioxidantes e agentes quelantes de metais de transição (BARBOSA et al., 2010; RUFINO et al., 2011; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011; ZOU et al., 2016).

Evidências científicas revelam que o consumo de alimentos que contenham compostos fenólicos em sua composição promove efeitos benéficos à saúde, uma vez que desempenham diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante (SHAHIDI; NACZK, 2003), anti-inflamatória (INOUE et al., 2008), anticancerígena (DAI; MUMPER, 2010), hipolipidêmica (SCHWERTZ et al., 2012), citotóxica (DEL RIO et al., 2013; CARMO et al., 2018), antimicrobiana (MYODA et al., 2010), antidiabética, antiobesidade e antiproliferativa (WU et al., 2013). Assim, a ingestão de alimentos que incluam compostos bioativos na dieta melhora a qualidade de vida e reestabelece o equilíbrio no mecanismo de proteção do corpo (CHANDA; DAVE, 2009).

Antioxidantes naturais representam um grande interesse por suas diversas aplicações na indústria química-farmacêutica, cosmética e de alimentos, podendo substituir antioxidantes sintéticos (ALMEIDA et al., 2011). No entanto, estudos relatam que as propriedades biológicas dos polifenóis dependem da sua absorção no intestino e sua biodisponibilidade (SAURA-CALIXTO; SERRANO; GOÑI, 2007; DEL RIO et al., 2013; MARIKO et al., 2017). Segundo Shahidi e Ambigaipalan (2015), o que determina as propriedades antioxidantes de compostos fenólicos são, sobretudo, o número e a posição dos substituintes no anel aromático, visto que diferentes substituintes afetam a reatividade e, conseqüentemente, a capacidade antioxidante do composto fenólico.

Os antioxidantes naturais, denominados de polifenóis ou compostos fenólicos, abrangem mais de 8000 estruturas, representando uma abundante classe de metabólitos secundários. Apresentam inúmeras funções na planta, como defesa contra herbívoros, insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de polinizadores e

animais dispersores de sementes, como agentes alelopáticos e proteção dos vegetais contra a luz UV e visível (DEL RIO et al, 2013).

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados e são classificados como flavonoides e não flavonoides (DAI; MUMPER, 2010). Um fenol é um composto que contém um grupo –OH ligado a um anel benzênico (GUITTERIDGE; HALLIWELL, 2010). O número de subunidades de fenol determina a classificação dos compostos: os fenóis simples contêm apenas uma funcionalidade fenol, como por exemplo, os ácidos fenólicos; em contrapartida, os polifenóis contêm duas, por exemplo, flavonoides e estilbenos, ou mais subunidades de fenol, como no caso dos taninos (GALANO et al., 2015). Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos, os quais vêm sendo cada vez mais estudados em função da capacidade em proporcionar atividades biológicas promotoras da saúde, dentre elas, efeitos anti-inflamatórios, cardioprotetores, antioxidantes, redução de riscos de doenças neurodegenerativas e intervenção em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer (PAN; LAI, HO, 2010; DAI; MUMPER, 2010; DELRIO et al., 2013)

Como agentes sequestrados de radicais livres, os antioxidantes produzem espécies significativamente menos reativas ou são capazes de cessar a reação de radical em cadeia (antioxidantes primários). Os principais mecanismos de ação incluem a transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e transferência simples de elétrons (TSE) (FLOEGEL et al., 2011). Métodos que se baseiam em TAH resultam em uma competição entre o antioxidante e o substrato para gerar radicais peroxila, por meio da decomposição de compostos azo. Já métodos baseados em TSE medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, alterando a cor após sua redução, indicando que a coloração representará as concentrações de antioxidantes na amostra em questão (BARTOSZEK; POLAK, 2016).

Os antioxidantes também podem ser considerados preventivos (antioxidantes secundários), ou seja, retardam o processo de oxidação por vias indiretas por meio da quelação de metais, decomposição de hidroperóxidos em espécies não radicais, restauração de antioxidantes primários por hidrogênio ou doação de elétrons, inibição de oxigênio singlete ou sequestro de oxigênio tripleto e absorção de radiação UV (GALANO et al., 2015).

Frutas, vegetais e bebidas, como sucos, chás, vinhos e cafés compõem as principais fontes de polifenóis. No entanto, a composição química desses compostos pode ser afetada devido a alguns fatores, tais como a variedade da fruta, maturação, fatores ambientais, processamento e armazenamento. Fatores ambientais, exposição à luz, diferentes sistemas de cultivo e tipos de solo também influenciam consideravelmente a composição do metabolismo secundário. No que se refere ao grau de maturação, os ácidos fenólicos tendem a diminuir com o aumento do estágio de maturação; por outro lado, a concentração de antocianinas aumenta. No armazenamento, polifenóis podem ser oxidados, causando alterações na cor, em propriedades organolépticas, bem como em sua funcionalidade, afetando a qualidade do produto. O tratamento térmico e o processamento industrial também podem resultar na perda ou diminuição do teor desses compostos (MANACH et al., 2004; SCHWERTZ et al., 2012).

### 3.4.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem os compostos fenólicos encontrados em maior quantidade na dieta alimentar. São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos. A estrutura básica de um flavonoide compreende um núcleo flavan, contendo 15 átomos de carbonos, ou seja, 2 anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ), diferenciados por A, B e C (Figura 3), que podem ter diferentes substituintes. Ocorrem como agliconas, mas, geralmente são encontrados na forma glicosídeos. As principais subclasses de flavonoides compreendem as flavonas, os flavonóis, flavan-3-óis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas, diferenciando-se conforme o estado de oxidação do anel central C. Além desses grupos, outros também podem ser encontrados na natureza, como as chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonóis, flavan-3,4-dióis, cumarinas e auronas. O número de grupos fenol-OH e suas posições determinam a atividade antioxidante *in vitro*. (DAI; MUMPER, 2010; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; DEL RIO et al., 2013).

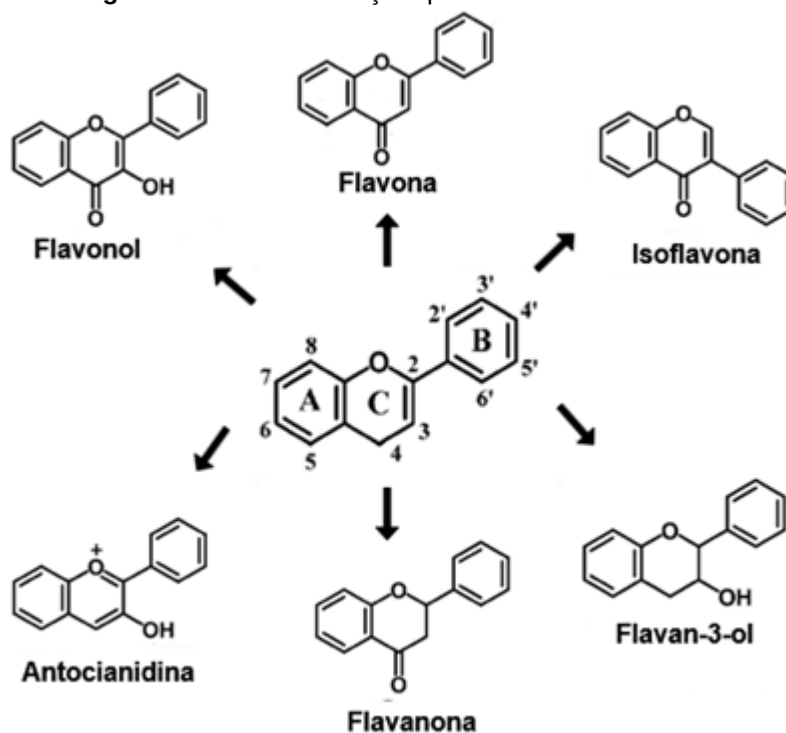
Evidências científicas revelaram que os flavonoides são compostos bioativos reconhecidos por seus efeitos biológicos e seu potencial de uso pela indústria farmacêutica. A propriedade anti-inflamatória dos flavonoides é responsável por



amenizar respostas inflamatórias, servindo como agentes cardioprotetores, neuroprotetores e quimiopreventivos (PAN; LAI; HO, 2010).

Essa classe de compostos revela alta atividade antioxidante devido ao seu elevado potencial redox, que permite, além da atuação como agentes redutores, doadores de hidrogênio, supressores de oxigênio e quelantes de íons de transição, também inibir os efeitos da xantina oxidase (MERKEN; BEECHER, 2000; DONG et al., 2016).

**Figura 3** – Subclassificação química dos flavonoides



Fonte: Adaptado de Del Rio et al. (2013)

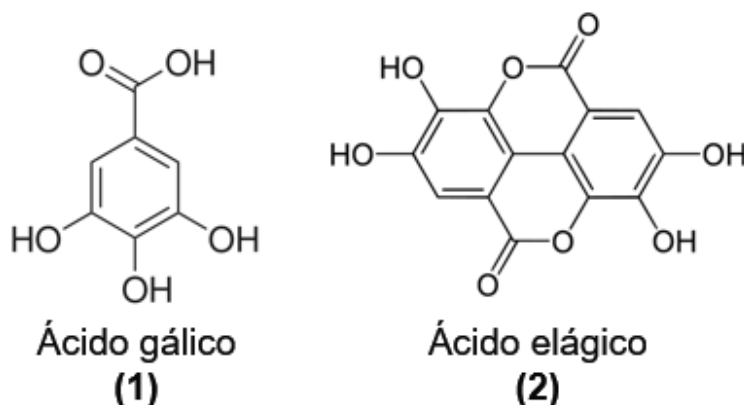
### 3.4.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos por todo o reino vegetal, considerados parte integrante da dieta humana e consumido em diferentes preparações medicinais. Essa classe de compostos fenólicos compreende os ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados e ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, diferenciando-se de acordo com o padrão da hidroxilação e metoxilação em seus anéis aromáticos. No entanto, somente os derivados de ácido benzóico são ácidos fenólicos, enquanto que os derivados de ácido cinâmico são denominados fenilpropanóides. (MANACH et al., 2004; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comumente encontrados na natureza e consistem, principalmente, de ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e isômeros do ácido clorogênico. As formas ligadas são derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico. Os ácidos cafeico e quínico se combinam para formar ácido clorogênico. Podem ser encontrados em qualquer parte do fruto, no entanto, as concentrações diminuem ao passar para estádios avançados de amadurecimento. Considerado ácido fenólico mais abundante, o ácido cafeico, livre e esterificado, constitui a maior parte do conteúdo total de ácidos hidroxicinâmicos da maioria dos frutos. Em cereais, a principal fonte dessa classe de compostos se deve ao ácido ferúlico, correspondendo, muitas vezes, a 90% dos polifenóis. Encontrado, sobretudo, nas partes externas do grão. No que diz respeito aos ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados, tais como os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e protocatecuico, estão presentes na forma de glicosídeos e em menor concentração nas frutas e vegetais (CLIFFORD, 2000; MANACH et al., 2004; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Os ácidos fenólicos apresentam atividade antioxidante em consequência da reatividade de sua porção fenol, ou seja, é dependente das posições dos grupos hidroxila e metoxila no anel aromático. O potencial antioxidante é dado, principalmente, pela eliminação de radicais via doação de átomos de hidrogênio, doação de elétrons e, ainda, eliminação de oxigênio singlete. No entanto, substituintes no anel aromático podem afetar a estabilização e, conseqüentemente, influenciar a capacidade de eliminação radical desses compostos (MANACH et al., 2004; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Dentre os ácidos fenólicos encontrados em sementes de camu-camu e jabuticaba, destacam-se os ácidos gálico (1) e elágico (2), Figura 4 (KANESHIMA et al., 2013; AZEVEDO et al., 2015; HACKE et al., 2015; INADA et al., 2015). O ácido elágico, derivado de ácido gálico, pode ser encontrado nas formas livre, glicosilada ou como precursores de elagitaninos (tanino hidrolisável), polímeros de ácido elágico (LANDETE, 2011).

**Figura 4** - Estrutura química do ácido gálico e ácido elágico

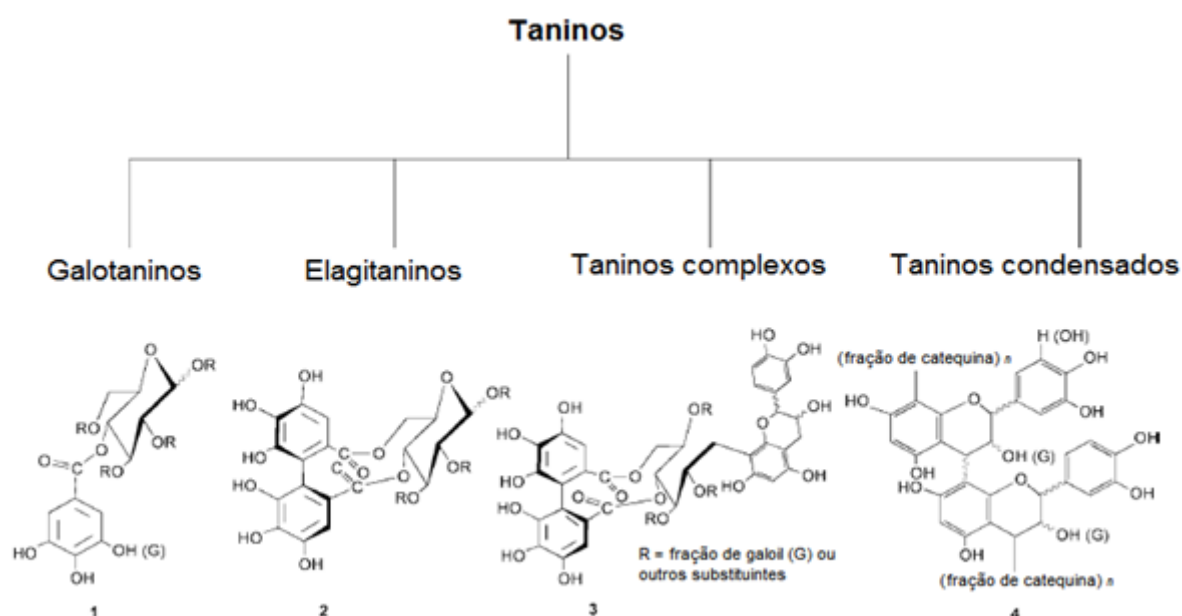


### 3.4.3 Taninos

Os taninos são metabólitos secundários de plantas superiores e, segundo sua classificação, podem ser divididos em condensados e hidrolisáveis (KHANBABAE; VAN REE, 2001; KANESHIMA et al., 2016).

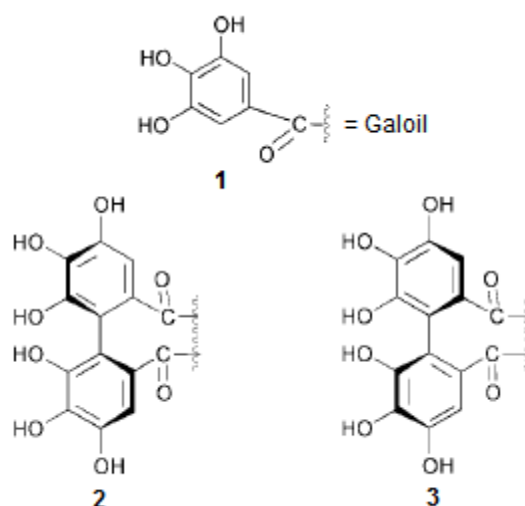
Os taninos condensados são formados por pelo menos duas unidades de (+)-catequina, conhecidas como flavan-3-óis, ligadas, mais especificamente, no C-4 com C-6 ou C-8 (Figura 5) e, alternativamente, podem estar ligados por meio do grupo hidroxila do C-3 de cada unidade de (+)-catequina para uma unidade de galol. São decompostos em antocianidinas por meio da reação de oxidação catalisada por ácido após aquecimento em soluções de álcool-ácido e, portanto, são referidos como proantocianidinas. Esses compostos, além de influenciarem o sabor e o aspecto dos alimentos, demonstram efeitos benéficos devido às suas propriedades antioxidantes e habilidade de complexar íons metálicos (KOLECKAR et al., 2008; DAI; MUMPER, 2010).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de polióis, geralmente D-glicose, e ácidos carboxílicos fenólicos, ou seja, apresentam um núcleo central de glicose ou um poliol esterificado com ácido gálico, conhecido também como galotanino, ou, ainda, com ácido elágico, conhecido como elagitaninos (Figura 5). Uma grande variedade na estrutura desses compostos é observada em função das reações de oxidação intermoleculares, originando diferentes compostos (KHANBABAE; VAN REE, 2001; DAI; MUMPER, 2010; KANESHIMA et al., 2016). De acordo com Borges et al. (2015), após hidrólise e sob condições ácidas, os elagitaninos liberam ácido elágico.

**Figura 5 - Classificação dos taninos**

**Fonte:** Adaptado de KHANBABAE & VAN REE (2001)

Os elagitaninos C-glicosídeos, Figura 6, são compostos formados a partir de galotaninos por meio do acoplamento oxidativo de pelo menos duas unidades de galoi (1), produzindo uma unidade hexahidroxidifenoil, HHDP, axialmente quiral (2 e 3). A estrutura desses compostos é caracterizada por uma ligação C–C entre o carbono anomérico de um açúcar em anel aberto e o carbono não substituído do grupo hexahidroxidifenoil, HHDP (KHANBABAE; VAN REE, 2001; QUIDEAU et al., 2004).

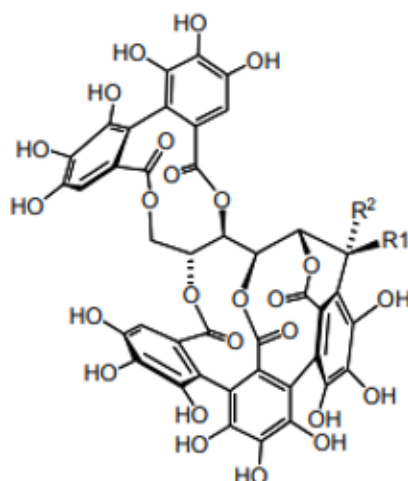
**Figura 6 - Elagitaninos C-glicosídeos.**

**Fonte:** Adaptado de Khanbabae e Van Ree (2001)

Os elagitaninos (Figura 7) castalagina e vescalagina são denominados epímeros e a única diferença estrutural observada entre eles é a posição do grupamento hidroxila em C-1. Embora sejam muito similares, esses compostos diferem em reatividade química. A vescalagina, particularmente, se conjuga com (+)-catequina, formando flavano-elagitaninos ou, ainda, apresenta a possibilidade de sofrer reação de substituição nucleofílica em C-1, podendo se tornar o precursor de vários oligômeros de C-glicosídeo (QUIDEAU, 2009).

Segundo Abe et al. (2011), um interesse muito particular tem sido despertado em relação ao ácido elágico e elagitaninos devido, principalmente, ao potencial antioxidante e sua atividade biológica, como efeitos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (ALEZANDRO et al., 2013c), citotoxicidade em células tumorais (DEL RIO et al., 2013), atividade antimicrobiana (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2005), atividade antiherpética (QUIDEAU et al., 2004), antitumoral (AFAQ et al., 2005) cardioprotetora, e antiproliferativa contra diferentes linhagens de câncer (BORGES et al., 2015).

Conforme estudo da disponibilidade de derivados de ácido elágico realizado por Alezandro (2013a), os autores observaram que esses compostos fenólicos são metabolizados, principalmente, pela microbiota intestinal e seus derivados são detectados em diferentes órgãos quando estudados em ratos. Os resultados revelaram que a jabuticaba pode ser considerada uma importante fonte de compostos antioxidantes e seu consumo pode estar ligado a redução do risco de alterações metabólicas causadas pela diabetes e obesidade, como a resistência à insulina e a dislipidemia. De acordo com Kaneshima et al. (2013), o ácido elágico derivado dos elagitaninos vescalagina e Castalagina já foi identificado em sementes de camu-camu. Portanto, as sementes desse fruto, que contém C-glicosídeos de alto peso molecular, podem ser consideradas um recurso funcional para a indústria de alimentos.

**Figura 7** - Elagitaninos castalagina e vescalagina

Castalagina:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = OH$

Vescalagina:  $R^1 = OH$ ,  $R^2 = H$

**Fonte:** Adaptado de Quideau (2009)

### 3.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS: SOLVENTES E MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Amostras de materiais vegetais são submetidas ao processo de extração de compostos orgânicos para análises e desenvolvimento de produtos, precedidos de procedimentos preparatórios, como secagem e/ou liofilização, moagem, trituração, e homogeneização do tamanho de partícula (DAI; MUMPER, 2010). Considerado uma etapa essencial na recuperação de compostos presentes em materiais de fontes naturais, o procedimento de extração pode ser desenvolvido por diversas metodologias. Comparadas aos métodos convencionais de extração, como Soxhlet e maceração, técnicas atuais eficazes reduzem o tempo do processo e requerem menores quantidades de solventes (WANG et al., 2010; VIEIRA et al., 2017).

Nesse sentido, para tornar-se viável ampliar o processo para diferentes aplicações comerciais, se faz necessário encontrar condições ótimas de operação. O mecanismo do procedimento de extração consiste em três estágios: primeiramente, a temperatura e/ ou o poder de irradiação é aumentado, em seguida, o soluto alvo (por exemplo, os compostos fenólicos) é separado das regiões ativas da planta, ocorrendo, então, a difusão dos solutos, do conteúdo químico termolábil para o solvente (ŞAHİN et al., 2017).

O método convencional de extração sólido-líquido de substâncias é realizado, de maneira geral, utilizando solventes orgânicos, como o álcool metílico, álcool etílico e propanona (VIEIRA et al., 2017). Extrações utilizando solventes são comumente empregados devido à sua eficiência, facilidade de uso e ampla aplicabilidade. O álcool metílico, particularmente, apresenta maior eficiência na extração de polifenóis de menor peso molecular; já a propanona é considerada mais eficiente na extração de flavonóis de maior peso molecular (DAI; MUMPER, 2010). Álcool etílico é um dos solventes mais utilizados por pesquisadores, principalmente devido à sua miscibilidade em água e em diferentes solventes orgânicos, como propanona, éter etílico, glicerol e tolueno, bem como devido à sua capacidade de dissolver substâncias polares e apolares, além de apresentar baixa toxicidade (KERTON; MARRIOTT, 2013). A propanona é capaz de impedir a formação do complexo proteína-polifenol durante a extração e quebrar ligações de hidrogênio formadas entre grupos fenólicos e carboxílicos de proteínas, o que leva a um aumento do rendimento da extração de compostos polifenólicos (LUCCI; SAURINA; NÚÑEZ, 2017).

Outras particularidades de solventes alcoólicos referem-se ao emprego frequente na extração de compostos fenólicos de fontes naturais e o alto rendimento do extrato final que proporcionam. Ademais, uma maior eficiência na extração dos compostos pode ser identificada quando existem misturas de álcoois e água (GIRONI; PIEMONTE, 2011). Esse fato pode ser explicado pela alteração da polaridade do meio quando é realizada uma mistura da água com o solvente, obtendo-se maior conteúdo de compostos fenólicos extraídos da matriz estudada (GIRONI; PIEMONTE, 2011; HUSSAIN et al., 2011; WIJEKOON et al., 2012).

O processo de extração de compostos bioativos de fontes vegetais depende de alguns fatores, tais como a natureza da matriz, tamanho de partícula, tipo de solvente utilizado, temperatura de extração, presença de agitação e/ou enzimas, propriedades químicas dos fenólicos, incluindo estrutura molecular, polaridade, concentração, número de anéis aromáticos e grupos hidroxila (LUCCI; SAURINA; NÚÑEZ, 2017). As principais variáveis que afetam o processo de extração clássica são a temperatura, o solvente, a parte da planta a ser estudada (i.e., folhas, sementes, casca, etc), e a pressão aplicada. Nesse sentido, um dos fatores essenciais para definir o tipo e a quantidade de compostos bioativos extraídos está na etapa de preparação da amostra (SAGAR et al., 2018). Diversas variáveis de processo exigem certo direcionamento e consideração individual, principalmente referente à natureza

intrínseca e à estabilidade dos compostos alvo a partir da matriz em estudo. Para isso, identificar essas variáveis envolvidas previamente ao processo de otimização é de suma importância para maximizar as respostas, utilizando menor tempo, consumo de energia e solvente, obtendo um sistema de extração com mais rentabilidade e lucratividade (DAI; MUMPER, 2010).

Segundo Bezerra et al. (2008), a otimização estatística de um processo/produto trata-se de um aperfeiçoamento do desempenho de um sistema, processo ou produto, com a finalidade de conseguir maior proveito e melhor resposta possível. A otimização se dá por meio do monitoramento e medida da influência de cada variável, ou fator, por vez em uma resposta experimental, também conhecido como abordagem *'uma de cada vez'*. Ou seja, sempre que um parâmetro é alterado, os outros permanecem constantes (VIEIRA et al., 2017). Como o método anteriormente citado não apresenta efeito interativo entre todas as variáveis do sistema, a otimização estatística pode ser realizada de forma a resolver esse problema por meio da utilização da metodologia de superfície de resposta, MSR (GRANATO; CALADO, 2014; DEAN; VOSS; DRAGULJIĆ, 2017).

A MSR tem sido uma das ferramentas mais populares de otimização dos últimos anos e sua importância está ligada às suas principais funções: desenvolver, melhorar e otimizar um processo. Compreende aplicações importantes nas etapas de projeto, desenvolvimento e formulação de novos produtos. Dentre essas aplicações, destacam-se o mapeamento de uma superfície de resposta sobre uma região de interesse particular, a otimização da resposta e seleção das condições de operação (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016; ŞAHİN et al., 2017).

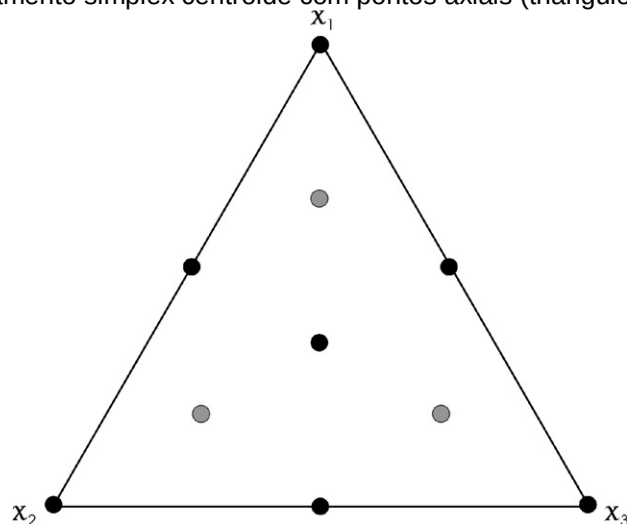
A partir da MSR, torna-se possível analisar interações ou o efeito de variáveis independentes, sozinhas ou combinadas, no qual a variável de interesse é influenciada por outras, com o objetivo de otimizar a resposta. Além disso, pode ser gerado um modelo matemático que descreve os processos químicos e bioquímicos envolvidos. Para isso, são utilizadas técnicas estatísticas e matemáticas relacionadas ao ajuste de modelos empíricos conforme os dados experimentais obtidos a partir de um delineamento experimental (BAŞ; BOYACI, 2007; BEZERRA et al., 2008). Para utilizar essa metodologia, se faz necessário, primeiramente, definir um planejamento experimental que determine quais experimentos (condições experimentais) devem ser realizados.



A fim de reduzir ao máximo o erro experimental, tornar mínima a variação do acaso, assim como reduzir custos operacionais e obter melhorias no desempenho e rendimento de processos, são estabelecidos os planejamentos experimentais (DOE). Dentre as principais técnicas de planejamento experimental, pode-se citar: planejamento fatorial (completo e fracionado), saturado, composto central e planejamento de misturas. Na indústria de alimentos, quando uma nova formulação ou novo produto são propostos, delineamentos de misturas são os mais utilizados. Suas propriedades dependem das proporções dos ingredientes e não de seus valores absolutos. A partir desse delineamento é possível determinar a composição ideal de cada componente em uma mistura (normalmente utiliza-se três), obtendo-se um produto com as melhores características (GRANATO; CALADO, 2014).

Segundo Ferreira et al. (2007), as propriedades de misturas baseiam-se nas proporções de cada componente. O delineamento simplex centroide com pontos axiais, representado como triângulo de concentrações, é normalmente utilizado para estudos ternários, ou seja, cada ponto no vértice do triângulo constitui um componente puro ou uma mistura de componentes (Figura 8). Já os pontos centrais caracterizam misturas binárias dos componentes ou misturas representadas nos vértices. Os pontos axiais contêm uma porção de 2/3 de um dos ingredientes e 1/6 de outros dois. Esse delineamento avalia e valida os dados lineares, modelos quadráticos e cúbicos.

**Figura 8** - Delineamento simplex centroide com pontos axiais (triângulo de concentrações)



Fonte: Ferreira et al. (2007)

O delineamento de misturas simplex centroide pode ser utilizado para avaliar efeitos isolados, binários e ternários na extração de compostos bioativos. Karnopp et al. (2017) avaliaram os efeitos de suco de uva roxo, farinha de casca de uva e oligofrutose na composição proximal, propriedades físico-químicas, sinérese, características sensoriais, conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos iogurtes. Santos et al. (2018) avaliaram o tempo e a temperatura de extração de compostos bioativos de uma combinação de três chás diferentes (*rooibos* fermentado, chá branco e mate torrado) em função do perfil sensorial, composição química e atividade antioxidante. Em outros casos, três solventes diferentes podem ser testados para otimizar a extração de farinha de soja fermentada em relação à composição fenólica e atividade antioxidante (HANDA et al., 2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES QUÍMICOS

Ácido gálico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), cloreto de ferro III hexahidratado, reagente de Folin-Ciocalteu (2,4,6-tripiridyl-s-trizina (TPTZ)), cloreto férrico hexahidratado, acetonitrila grau HPLC, os padrões analíticos (HPLC, pureza>97%), ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido ferúlico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina, quercetina-3-rutinosídeo, ácido clorogênico e ampicilina foram adquiridos de Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Álcool etílico 99,8% P.A, álcool metílico 99,8% P.A e sulfato de ferro (II) adquiridos de Neon (São Paulo, PR, Brasil). Ácido clorídrico, isobutanol, acetato de sódio anidro (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na), fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ferricianeto de potássio (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]), ácido ascórbico, cloreto de alumínio hexahidratado e nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Hidróxido de sódio e propanona 99,5% P.A foram adquiridos de Synth (Diadema, SP, Brasil) Ferrocianeto de potássio foi obtido da marca Merck, ácido fórmico de Reagen e nitrito de sódio de Química Moderna. Wort agar adquirido da Difco, França). As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura pelo sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, São Paulo, Brasil).

### 4.2 SEMENTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) E JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)

#### 4.2.1 Coleta, preparo e secagem das sementes

Neste estudo, amostras de sementes de frutos maduros de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) foram fornecidas por um produtor do município de Iguape (coordenadas geográficas: 24° 41' 51 "Sul, 47° 34' 16" Oeste a 6 m de altitude), SP, em abril de 2017; e sementes de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg), cv. Paulista, foram colhidas maduras no município de Siqueira Campos (coordenadas geográficas: 23° 41' 20" Sul, 49° 47'52" Oeste), PR, em setembro de 2017. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram submetidas ao congelamento em freezer a -18 °C até o momento das análises.

Realizou-se o descongelamento das sementes e as mesmas foram separadas com o auxílio de peneiras, lavadas em água corrente para retirada de resíduos e excesso de polpa e casca. Após a higienização, as sementes foram acondicionadas em um recipiente contendo 5 L de água potável e, em seguida, sanitizadas com solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) (2% p/v) a 100 mg/L, por 15 min. Passado esse tempo, foram lavadas em água corrente, que foi retirada para que as sementes fossem conduzidas a secagem (INADA et al., 2015).

As amostras, espalhadas uniformemente sob telas de *nylon* perfuradas, foram submetidas ao processo de secagem, o qual foi realizado em uma estufa de secagem e esterilização com circulação e renovação de ar (Tecnal, Modelo TE-393/1, São Paulo, Brasil). Durante o procedimento, as sementes foram analisadas quanto ao seu teor de umidade, medindo-se diversas vezes até que alcançasse o valor desejado, por meio de um analisador de umidade por infravermelho (SARTORIUS®, modelo MA 35). Ao todo, a secagem de sementes de camu-camu teve duração de 31 h, à temperatura de 35 °C (Figura 9), segundo metodologia descrita por Fidelis et al. (2018). Sementes de jabuticaba foram secas durante um período de 49 h à 35°C.

**Figura 9** - Sementes de camu-camu secas



**Fonte:** Autor, 2018.

Após a etapa de secagem, as amostras foram preparadas para a moagem. Utilizando-se um moinho de facas (Ika Werke, modelo M 20, São Paulo, Brasil), as sementes foram moídas e peneiradas com o auxílio de uma peneira de 42 Tyler mesh (0,354 mm) a fim de obter uma padronização de tamanho de partícula (Figura 10 e 11). O material obtido foi mantido em um recipiente de vidro, sob refrigeração até o início das extrações.

**Figura 10** – Sementes de camu-camu moídas



Fonte: Autor, 2018.

**Figura 11** - Sementes e farinha de semente de jabuticaba



Fonte: Autor, 2018

#### 4.2.2 Planejamento experimental

O planejamento experimental de mistura simplex centroide aumentado, com três pontos internos, Tabela 1, foi utilizado para avaliar os efeitos isolados, misturas binárias e ternárias dos solventes, totalizando dez ensaios, demonstrados como valores reais e codificados.

Segundo Ferreira et al. (2007), o delineamento de mistura simplex centroide avalia e valida os dados lineares, modelos quadráticos e cúbicos. O modelo cúbico especial, quando direcionado para um sistema ternário, apresenta sete termos. O modelo linear representa os três primeiros termos, utilizado quando há ausência de efeitos de interação entre os componentes. Três outros termos correspondem aos efeitos de interação binária, sinérgicos ou antagônicos, para todos os pares de componentes possíveis. Com os termos lineares, forma-se o modelo quadrático, enquanto que o último termo constitui o efeito da interação ternária e é usado para obter valores máximos e mínimos no interior do triângulo de concentração.

**Tabela 1** - Planejamento experimental simplex centroide para extração dos compostos fenólicos de sementes de camu-camu e jabuticaba.

| Ensaio | Á<br>(Água)   | B<br>(Álcool etílico) | C<br>(Propanona) |
|--------|---------------|-----------------------|------------------|
| 1      | 1 (200)       | 0 (0)                 | 0 (0)            |
| 2      | 0 (0)         | 1 (200)               | 0 (0)            |
| 3      | 0 (0)         | 0 (0)                 | 1 (200)          |
| 4      | 0,5 (100)     | 0,5 (100)             | 0 (0)            |
| 5      | 0,5 (100)     | 0 (0)                 | 0,5 (100)        |
| 6      | 0 (0)         | 0,5 (100)             | 0,5 (100)        |
| 7      | 0,333 (66,7)  | 0,333 (66,7)          | 0,334 (66,6)     |
| 8      | 0,666 (133,4) | 0,167 (33,3)          | 0,167 (33,3)     |
| 9      | 0,167 (33,3)  | 0,666 (133,4)         | 0,167 (33,3)     |
| 10     | 0,167(33,3)   | 0,167 (33,3)          | 0,666 (133,4)    |

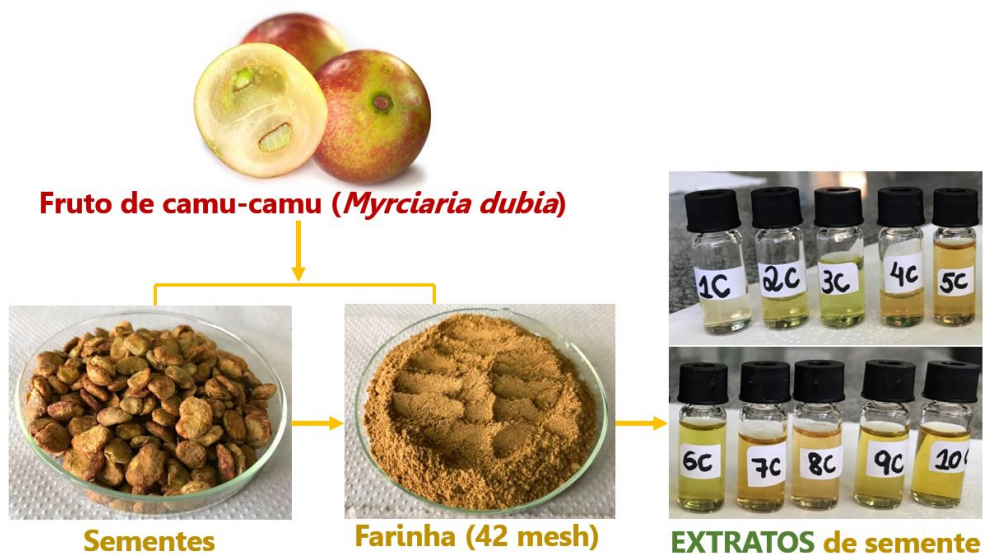
A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para avaliar o efeito da combinação de três diferentes solventes (água ultrapura, álcool etílico e propanona) na extração de compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante *in vitro*. Os resultados obtidos a partir da caracterização química e atividade antioxidante dos extratos foram avaliados por regressão linear múltipla (descrito em 4.8), a partir do delineamento experimental e MSR, de modo a estabelecer uma relação matemática entre os fatores (tipo de solvente) e as respostas (GRANATO et al., 2014a).

#### 4.2.3 Extração de compostos fenólicos de sementes de *M. dubia* e *M. cauliflora*

Como descrito acima (4.2.2) foi utilizado um planejamento de mistura simplex-centroide e avaliado o efeito da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos a partir de sementes de camu-camu e jabuticaba. Para isso, foram utilizados solventes de diferentes polaridades (água ultrapura, álcool etílico e propanona).

As extrações foram realizadas na proporção 1:20, m/v (amostra: solvente, m/v). Para isso, 10 g de farinha obtida das sementes foram misturadas com 200 mL de mistura de solventes (FIDELIS et al., 2018). Ao todo, foram realizadas 10 diferentes extrações para cada semente estudada (Figuras 12 e 13).

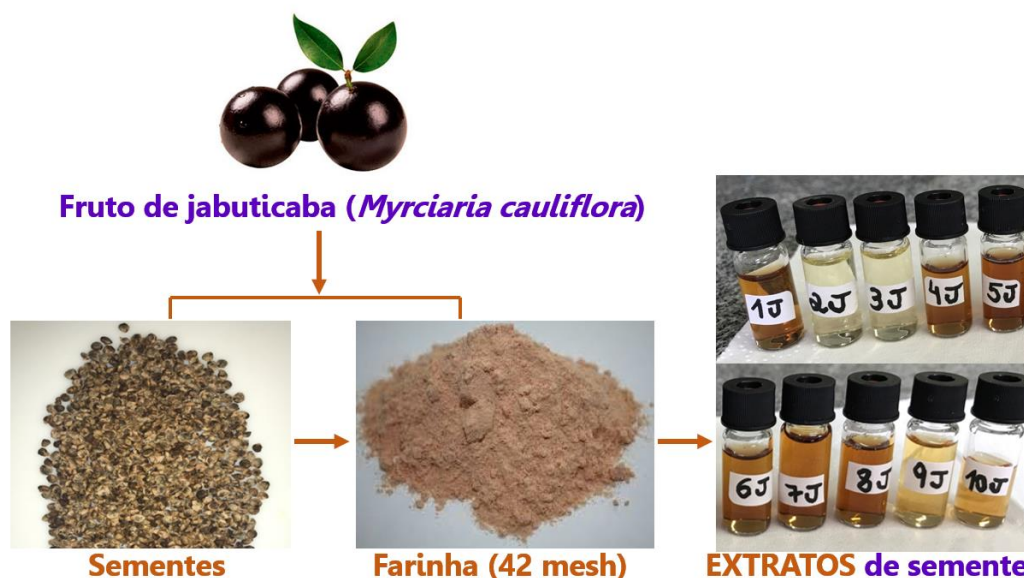
**Figura 12** - Obtenção de extratos de sementes de camu-camu (*M. dubia*)



Fonte: Autor, 2018.



**Figura 13** - Obtenção de extratos de sementes de jabuticaba (*M. cauliflora*)



Fonte: Autor, 2018

A técnica utilizada para esse fim foi a extração por agitação contínua, com controle de temperatura. A solução extratora foi mantida a  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 45 min utilizando banho para circulação constante de água (Marca Tecnal, Modelo Dubnoff TE-0,53, São Paulo, Brasil). Em seguida, o extrato bruto das sementes foi filtrado utilizando papel filtro e, posteriormente, transferido para um rotaevaporador, a fim de obter uma solução aquosa. Em seguida, as amostras foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e submetidas ao processo de liofilização (Terroni, modelo LD 1500A, Brasil), sob vácuo de 1200  $\mu\text{mL Hg}$  (FIDELIS et al., 2018). O mesmo procedimento foi realizado para a aquisição do extrato nas condições otimizadas do sistema de solventes.

A polaridade de diferentes solventes é um fator importante quando os produtos naturais são estudados. Nesse sentido, solventes não-tóxicos foram testados, isoladamente e em combinações binárias e ternárias, para verificar os impactos nos níveis de compostos bioativos, fenólicos e atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica dos extratos de sementes.

Segundo Aherne e O'Brien (2002), além de fatores intrínsecos, como o complexo sistema de enzimas que regulam a síntese e distribuição desses compostos no organismo vegetal, fatores extrínsecos também podem interferir no teor de flavonoides, como variações no tipo de planta, estação, clima, grau de maturação, preparo e processamento térmico na secagem.



### 4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

#### 4.3.1 Conteúdo fenólico total (CFT)

Os compostos fenólicos totais foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Price e Butler (1977), adaptado por Margraf et al. (2015), pelo método Azul da Prússia. Para isso, foi pipetado em microplaca de 96 poços uma alíquota de 100 µL da solução de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (0,5 mmol/L) e 100 µL das amostras de extratos de sementes de *M. dubia* e *M. cauliflora* diluídas, nas devidas proporções (1:100, v/v), deixando reagir por 2 min. Posteriormente adicionou-se 100 µL da solução de ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) a 0,5 mmol/L e agitou-se por 20 s. Após 15 min de reação, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 725 nm em leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. Para calcular o teor de compostos fenólicos totais foi construída uma curva analítica com ácido gálico na faixa de concentração de 0 - 35 mg/L, obtendo-se um  $R^2=0,999$ . A análise foi realizada em triplicata e os valores expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE/100 g).

#### 4.3.2 Flavonoides totais (FT)

O teor de flavonoides totais foi quantificado a partir do método colorimétrico descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), modificado por Herald, Gadgil e Tilley (2012). Primeiramente, os extratos de sementes foram diluídas em água ultrapura, nas devidas proporções (1:5 v/v). Em seguida, foram adicionados 25 µL de amostra em microplaca de 96 poços, com posterior adição de 100 µL de água ultrapura e 10 µL de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 0,718 mol/L. Após 5 minutos, foram adicionados 25 µL de cloreto de alumínio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a 0,41 mol/L e a reação ocorreu por mais 5 min, seguido de adição de 50 µL de NaOH a 1 mol/L. Após 10 min de reação, a complexação do alumínio com os flavonoides foi monitorada em 510 nm usando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

A linha de base do equipamento foi registrada a partir de uma solução com todos os reagentes em suas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A curva analítica foi preparada com (+)-catequina, na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L, obtendo-se um  $R^2=0,992$ . A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg catequina equivalente por 100 g de semente (mg CE/100 g).

#### 4.3.3 Taninos condensados (TC)

O teor de taninos condensados foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Horszwald e Andlauer (2011), no qual a vanilina reage com os taninos em meio ácido ( $H_2SO_4$ ). Primeiramente, foram adicionados 25  $\mu$ L de amostras de extratos de sementes de *M. dubia* e *M. cauliflora* (diluídas na proporção 1:2 e 1:7, v/v, respectivamente) em microplaca de 96 poços, com posterior adição de 150  $\mu$ L de solução de vanilina a 0,26 mol/L e 75  $\mu$ L da solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 0,33 mol/L. Após 15 min de incubação, a reação foi monitorizada em 500 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

A linha de base do equipamento foi registrada a partir de uma solução com todos os reagentes em suas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A curva analítica foi preparada com solução padrão de catequina, na faixa de concentração de 60 a 650 mg/L, obtendo-se um  $R^2=0,996$ . A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg de catequina equivalente por 100 g de amostra (mg CE/100 g).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* (AA)

A Atividade antioxidante foi avaliada de acordo com diferentes métodos a fim de obter os três principais mecanismos pelos quais os compostos fenólicos exercem efeitos antioxidantes: transferência de elétrons (capacidade de captura do radical DPPH• e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu), transferência de átomos de hidrogênio (inibição da peroxidação lipídica) e capacidade de quelar íons de transição.

#### 4.4.1 Atividade antioxidante de captura do radical DPPH•

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH• foi determinada conforme a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 40 µL de amostras de extratos de sementes de camu-camu diluídas (1:50, v/v) e 260 µL de uma solução metanólica de 0,10 mmol/L de DPPH•. Decorrido o tempo de reação, 30 min, em um ambiente escuro, com temperatura de aproximadamente 25 °C, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 517 nm, utilizando espectrofotômetro de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

A linha de base do equipamento foi registrada a partir de uma solução com todos os reagentes em suas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A curva analítica foi preparada com solução padrão de ácido ascórbico, na faixa de concentração de 0 a 21 mg/L, obtendo-se um  $R^2=0,992$ . A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de semente (mg AAE/100 g).

#### 4.4.2 Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (CRFC)

A metodologia realizada com o reagente de Folin-Ciocalteu, descrita por Singleton e Rossi (1965), adaptada para microplaca de 96 poços, consistiu em adicionar 25 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, 200 µL de água ultrapura e 25 µL de amostras de sementes de sementes de *M. dubia* e *M. cauliflora* previamente diluídas (1:50, v/v). Após 5 min, 25 µL da solução de carbonato de sódio a 10% foram adicionados à mistura e a placa foi agitada por 20 segundos. A absorbância foi registrada após 60 min em comprimento de onda de 725 nm.

A curva analítica foi preparada com ácido gálico em uma faixa de concentração de 20 a 120 mg/L, obtendo-se um  $R^2=0,991$ . O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE/100 g), calculado a partir da equação da reta obtida pela curva analítica.

#### 4.4.3 Inibição da peroxidação lipídica *in vitro* – gema de ovo

A fim de associar as propriedades antioxidantes, medidas por meios químicos, e a atividade antioxidante por um sistema biológico (gema de ovo), foram testados extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba para inibição da peroxidação lipídica, induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , de fosfolípidos e triacilgliceróis contidos em gema de ovo, de acordo com os ensaios descritos Daker et al. (2008), com algumas modificações. Para isso, foram misturadas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de extrato diluído em água ultrapura (v/v) com 500  $\mu\text{L}$  de gema homogeneizada (gema de ovo emulsionada com tampão de fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,4, na proporção de 25 g/L e 50  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso a 4 mmol/L. Essa solução foi mantida em um banho com água a 37 °C durante um período de 45 minutos e, posteriormente, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido acético a 20% v/v (pH 3,5) e 1 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 0,67% m/v. Em seguida, a mistura obtida foi mantida a 95 °C durante 30 min e o conteúdo foi centrifugado a 700 g por 15 min a 25 °C. O controle foi composto de gema de ovo tamponada homogeneizada (500  $\mu\text{L}$ ), solução de  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{L}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, com o objetivo de produzir a oxidação máxima de lipídios da gema de ovo.

A gema de ovo é composta principalmente de fosfolípidos, triacilgliceróis e proteínas que são propensos à oxidação, acarretando na formação de produtos oxidados, que por sua vez reagem com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), obtendo-se um complexo de coloração rosa que absorve em 532 nm. A formação de produtos de lipoperoxidação foi monitorada por meio de um leitor de microplacas no comprimento de onda de 532 nm (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Os resultados serão expressos como % de inibição da peroxidação lipídica, calculada conforme a Equação (1):

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \quad (1)$$

#### 4.4.4 Inibição da peroxidação lipídica *ex vivo* - homogenato de cérebro de rato Wistar

A inibição da peroxidação lipídica também foi avaliada em cérebro de ratos Wistar seguindo as mesmas condições de análise descritas por Fidelis et al. (2018). O ensaio tem como objetivo estimar a capacidade antioxidante de composto bioativos, com base na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas na reação de lipoperoxidação espontânea do tecido cerebral. Para isso, 500 µL de homogenato de cérebro tamponado foi misturado com 50 µL de amostra, devidamente diluída em água ultrapura. Nesse estudo, foram testadas cinco diferentes diluições dos extratos otimizados (1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6, v/v). O homogenato permaneceu sob constante agitação durante o processo de pipetagem. Após 5 min, 50 µL de uma solução 4 mmol/L de FeSO<sub>4</sub> foram adicionados e agitados, com o auxílio de um vórtex, a fim de induzir a lipoperoxidação. Os tubos foram deixados reagir em banho a 37 °C por 45 min. Após o tempo de reação, 500 µL de uma solução de ácido acético a 20% (v/v) pH 3,5 e 1000 µL de uma solução de TBA a 46 mmol/L foram adicionados aos tubos. Para completar a reação de TBARS, os tubos foram transferidos para um banho de glicerina a 95 °C ± 5°C por 30 min.

Após arrefecimento em um banho de gelo, a solução dentro dos tubos foi transferida para *eppendorfs* e centrifugados durante 15 min em 10.000 *g* a 25 °C. Em seguida, 300 µL de sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A formação de TBARS foi medida a 532 nm, utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Os resultados foram expressos como percentual (%) de inibição da peroxidação lipídica (Equação 2). O protocolo biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo 047/2017) (Anexo – Carta de Aprovação CEUA).

$$(\%) \text{ inibição} = \left[ \frac{(Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra})}{Abs \text{ controle}} \right] \times 100 \quad (2)$$

#### 4.4.5 Atividade quelante frente ao íon de transição $\text{Cu}^{2+}$

Os metais de transição podem reagir muito rapidamente com peróxidos como doadores de um elétron e formar radicais. O excesso de cobre no organismo pode desencadear a geração de espécies reativas, tornando-se potencialmente prejudicial. Assim, a capacidade quelante de íons metálicos é uma propriedade importante de medicamentos e produtos naturais, como extratos vegetais, visto que é capaz de reduzir a concentração do metal de transição, retardando o processo de oxidação.

A capacidade dos extratos em quelar o  $\text{Cu}^{2+}$  foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Santos, Brizola e Granato (2017). Para fins práticos, utilizando microplacas de 96 poços, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de solução de acetato de sódio a 50 mmol/L em pH 6 foi misturada com 30  $\mu\text{L}$  de amostra diluída na solução de acetato de sódio e 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0,1 mg/mL. Após 2 min, 8,5  $\mu\text{L}$  de uma solução de violeta de pirocatecol a 2 mmol/L foram adicionados aos poços para dar início à reação. A placa contendo os 96-poços foi agitada durante 30 s e deixou-se reagir por 20 min. O complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$  foi monitorado em 532 nm, utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Água ultrapura foi utilizada como controle em substituição à amostra de extrato.

A atividade quelante de cobre (íon cúprico), que pode ser expresso pela percentagem de formação do complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ , foi calculada pela Equação (3):

$$\begin{aligned} \text{Poder quelante de íon } \text{Cu}^{2+} (\% \text{ formação pirocatecol violeta} - \text{Cu}^{2+}) & \quad (3) \\ &= \left[ \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right] * 100 \end{aligned}$$

A linha de base do equipamento foi registrada utilizando-se uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A análise foi conduzida em triplicata e os resultados expressos em percentual (%) de formação de complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ .

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE SEMENTES DE *Myrciaria dubia* e *Myrciaria cauliflora*

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1853), *Salmonella* Enteritidis (S 2887), *Salmonella* Typhimurium (IAL 2431), *Escherichia coli* (IAL 2064), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006).

*Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1853), *Salmonella* Enteritidis (S 2887), *Salmonella* Typhimurium (IAL 2431), *Escherichia coli* (IAL 2064) foram cultivados em Caldo Nutriente (Kasvi, São Paulo, Brasil) a 37 °C por 24 h. *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) também foram cultivados em Caldo Nutriente, mas na temperatura de 30°C por 24 h. Para o cultivo de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foi utilizado o Caldo Triptona de Soja (Kasvi, São Paulo, Brasil) adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura (Kasvi, São Paulo, Brasil), incubado a 37 °C por 24 h e para *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) foi utilizado o Caldo de Extrato de Malte (formulado) a 30 °C durante 24 h. As suspensões de células bacterianas foram padronizadas e inoculadas por pour-plate em Ágar Nutriente (Kasvi, São Paulo, Brasil).

Os testes de atividade antimicrobiana aplicados neste estudo foram realizados de acordo com Cleeland e Squires (1991) usando o método de difusão em ágar placa-cavidade. As suspensões padronizadas foram adicionadas ao Ágar Nutriente, exceto *S. cerevisiae* que foi adicionado ao Wort Agar (Difco®) a fim de se obter uma concentração final de 10<sup>8</sup> UFC/mL para cada micro-organismo testado. Após o plaqueamento, uma cavidade de 8 mm foi realizada, em triplicata onde todos os extratos foram adicionados, seguindo incubação a 37°C por 24 h para *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e para *B. cereus*, *S. aureus* e *S. cerevisiae* a 30°C por 24 h. Os extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba foram diluídos em dimetil sulfoxido (DMSO) até uma concentração final de 20%, que representa 2 mg/cavidade, e DMSO foi usado como um controle negativo. A ampicilina (10 µg) foi utilizada como controle positivo e todos os testes foram realizadas em duplicada. Os resultados foram expressos como mm de inibição do crescimento retirando-se o diâmetro do halo onde a amostra foi inserida (8 mm).

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação dos compostos fenólicos individuais foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu LC-20T, equipado com DAD (detector de diodo) e detectores de fluorescência, sistema de desgaseificação, amostrador automático e coluna de forno. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>, 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 3,5 µm). Para a separação cromatográfica, a eluição gradiente utilizada para a quantificação de ácidos fenólicos, *trans*-resveratrol e flavonoides foi apresentada na Tabela 2. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C para ambos os métodos, o volume de injeção da amostra foi de 10 µL, com a taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A fase móvel consistiu em água acidificada com ácido fórmico a 0,2% (v/v) (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). Os comprimentos de onda utilizados foram 255, 272, 306, 318, 325, 360 e 520 nm para o detector DAD e  $\lambda_{\text{emission}} = 320 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{extinction}} = 210 \text{ nm}$  para o detector de fluorescência.

Os extratos foram filtrados por meio de uma membrana de *nylon* de 0,45 µm e injetados em triplicata para cada método. Para quantificação dos compostos fenólicos nas amostras, as curvas analíticas foram preparadas em triplicata, com sete concentrações uniformemente espaçadas (0,5 - 100 mg/L) com todas as linhas de regressão apresentando  $R^2 \geq 0,997$  e resíduos que seguiram a distribuição normal (dados não apresentados). Os resultados da composição fenólica individual foram expressos em mg/100 g de sementes.

Os elagitaninos castalagina e vescalagina também foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi realizada usando um sistema de HPLC JASCO LC-2000 Plus equipado com um detector MD-2010 Plus e uma coluna Atlantis T3 (3 mm, 4,6 mm i.d x 150 mm, Waters, Milford, MA, EUA). A fase móvel para eluição gradiente foi composta por 5% de acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente A) e 100% de acetonitrila (solvente B). A condição do gradiente foi a seguinte: 0 min, 0% B; 5 min, 10% de B; 25 min, 15% de B; 40 min, 50% de B; 45-50 min, 100 B; 51 min, 0% B.



**Tabela 2** - Condições de gradiente de eluição para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

| Ácidos fenólicos |            |            | Flavonoides e t-resveratrol |            |            | Antocianinas |            |            |
|------------------|------------|------------|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|------------|
| Tempo (min)      | Fase A (%) | Fase B (%) | Tempo (min)                 | Fase A (%) | Fase B (%) | Tempo (min)  | Fase A (%) | Fase B (%) |
| 0                | 100        | 0          | 0                           | 100        | 0          | 0            | 100        | 0          |
| 10               | 97         | 3          | 5                           | 88         | 12         | 3            | 90         | 10         |
| 15               | 90         | 10         | 11                          | 45         | 55         | 6            | 77         | 23         |
| 17               | 88         | 12         | 19                          | 35         | 65         | 10           | 65         | 35         |
| 23               | 45         | 55         | 30                          | 100        | 0          | 12           | 20         | 80         |
| 30               | 35         | 65         | 37                          | 100        | 0          | 15           | 100        | 0          |
| 35               | 100        | 0          |                             |            |            | 20           | 100        | 0          |
| 47               | 100        | 0          |                             |            |            |              |            |            |

#### 4.7 VIABILIDADE CELULAR

O efeito citotóxico *in vitro* dos extratos das sementes de jabuticaba e camu-camu foram analisados em relação as linhagens celulares: A549 (células epiteliais do adenocarcinoma pulmonar), HCT8 (células de carcinoma de cólon humano) e IMR90 (fibroblastos do pulmão humano). As células A549 e HCT8 foram mantidas em DMEM/Ham-F12, suplementado com 10% de FBS. As células IMR90 foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/baixa glicose com adição de 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, São Paulo, Brasil). Todos os meios continham 100 UI de penicilina/100 µg de estreptomicina.

As linhagens celulares foram cultivadas em incubadora umidificada a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/ poço (A549 e HCT8) e  $2 \times 10^3$  (IMR90), 100 µL/poço. Após 24 h, as células foram tratadas com 100 µL de concentrações seriadas (100 - 900 µg/mL) de extrato de sementes de camu-camu e jabuticaba. Após 48 h de tratamento, 10 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em água miliQ) foram adicionados em cada poço. Após 4 h de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan que se formaram foram dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (LAO et al., 2016). A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas. A

absorbância a 570 nm foi lida utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek).

A concentração que promove 50% de inibição do crescimento celular ( $IC_{50}$ ), a concentração do agente que inibe o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas ( $IG_{50}$ ) e a concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células em comparação com o número de células no início do tratamento ( $LC_{50}$ ) foi determinada de acordo com Ramirez-Mares et al. (2016). Os experimentos foram conduzidos em medidas quadruplicadas em três dias diferentes e a análise dose-resposta foi determinada por meio de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA E OTIMIZAÇÃO

Os dados experimentais foram apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão amostral ( $n=3$ ). Os experimentos foram realizados a fim de obter um método de seleção aleatório para minimizar o efeito da variabilidade nas respostas obtidas devido a erros sistemáticos. Quando apropriado, a comparação de médias entre os grupos foi realizada por análise de variâncias unifatorial (ANOVA). Para isso, a homocedasticidade do conjunto de dados foi verificada pelo teste de Brown-Forsythe usando o *software* TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Statistica Ltd, EUA). As diferenças entre os valores médios encontrados foram identificadas pelo teste de diferença mínima significativa de Fisher, considerando  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

Para correlacionar as propriedades funcionais *in vitro* com a composição fenólica dos extratos de sementes, os coeficientes de correlação (valor  $r$ ) foram calculados. Essa análise ajuda a compreender qual composto fenólico será responsável pela(s) propriedade(s) funcional(is) *in vitro* (FIDELIS et al., 2018).

Para avaliar os efeitos dos solventes água, álcool etílico (EtOH) e propanona na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR), seguindo as recomendações e procedimentos descritos por Granato et al. (2014b). Os dados experimentais relacionados à composição química e atividade antioxidante foram ajustados utilizando o modelo cúbico completo, conforme descrito pela Equação 4, onde  $y$  representa a função resposta prevista dos dados

experimentais,  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  são os coeficientes de regressão para efeitos lineares,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{23}$  representam os coeficientes de interação binária (coeficientes quadráticos) e  $b_{123}$  é o coeficiente de regressão ternário. No mesmo sentido,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam os três solventes de extração em estudo:

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (4)$$

Os modelos matemáticos propostos incluíram apenas os coeficientes de regressão com significância ( $p \leq 0,05$ ) e a qualidade dos modelos foi determinada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ),  $R^2$  ajustado e os resíduos foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizando a RSM, foi possível obter modelos de regressão para descrever a propriedade funcional (potencial antioxidante) e compostos químicos extraídos das sementes em função do (s) solvente (s). O intervalo de  $\pm 95\%$  confiança foi calculado para cada coeficiente de regressão. A análise de regressão linear múltipla (MLR) foi utilizada para compreender quantitativamente como cada solvente afetou a composição fenólica e atividade antioxidante medidas por diferentes ensaios. Coeficientes de regressão (beta) foram analisados para avaliar as principais variáveis para a predição da composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos. A magnitude de beta permite comparar a contribuição relativa de cada variável independente (sistema de solventes) na predição da variável dependente (composição fenólica e atividade antioxidante). A curva de contorno foi utilizada para analisar o comportamento de cada variável estudada em função das proporções entre os solventes.

Com o objetivo de maximizar a extração do conteúdo fenólico total e atividade antioxidante das sementes de camu-camu e jabuticaba, foi utilizada a otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980). Para este propósito, um total de 100 iterações foi executado usando a função de desejabilidade para obter a melhor combinação de solventes visando maximizar a extração de compostos bioativos e capacidade antioxidante. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* TIBCO Statistica v.13.3 (TIBCO Statistica Ltd, EUA). O sistema otimizado de solvente para cada semente foi utilizado para extração de compostos fenólicos e os extratos foram liofilizados sob vácuo de 1200  $\mu\text{mL}$  Hg (Terroni, modelo LD 1500A, Brasil) e congelados a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SEMENTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)

#### 5.1.1 Composição fenólica

A caracterização química preliminar dos extratos de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) foi realizada com base em métodos de determinação de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (TC). Apesar de sofrer impactos por processos aplicados, como o congelamento, secagem e trituração, as sementes de camu-camu podem ser consideradas fontes relevantes de constituintes ativos, com elevado teor de compostos fenólicos.

A Tabela 3 mostra que a distribuição normal, homoscedasticidade e diferenças significativas entre os valores médios foram observadas para todas as respostas ( $p < 0,001$ ), demonstrando que o sistema de solventes afeta diretamente a extração de compostos fenólicos de extrato de semente de camu-camu.

**Tabela 3** - Composição química de extratos de semente de *Myrciaria dubia* de acordo com o delineamento experimental

| Ensaio                               | A<br>(Água) | B<br>(EtOH) | C<br>(Propanona) | Conteúdo<br>fenólico total<br>(mg AGE/100 g) | Flavonoides<br>totais<br>(mg CE/100 g) | Taninos<br>condensados<br>(mg CE/100 g) |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                                    | 1           | 0           | 0                | 2502 ± 46 <sup>e</sup>                       | 260 ± 11 <sup>g</sup>                  | 171 ± 11 <sup>i</sup>                   |
| 2                                    | 0           | 1           | 0                | 1353 ± 19 <sup>f</sup>                       | 366 ± 11 <sup>f</sup>                  | 512 ± 10 <sup>g</sup>                   |
| 3                                    | 0           | 0           | 1                | 657 ± 14 <sup>g</sup>                        | 265 ± 1 <sup>g</sup>                   | 315 ± 2 <sup>h</sup>                    |
| 4                                    | 0,5         | 0,5         | 0                | 3403 ± 170 <sup>d</sup>                      | 1105 ± 36 <sup>c</sup>                 | 1221 ± 30 <sup>b</sup>                  |
| 5                                    | 0,5         | 0           | 0,5              | 5420 ± 87 <sup>b</sup>                       | 1332 ± 83 <sup>b</sup>                 | 942 ± 18 <sup>e</sup>                   |
| 6                                    | 0           | 0,5         | 0,5              | 1479 ± 17 <sup>f</sup>                       | 476 ± 14 <sup>e</sup>                  | 528 ± 20 <sup>g</sup>                   |
| 7                                    | 0,333       | 0,333       | 0,334            | 5422 ± 79 <sup>b</sup>                       | 1700 ± 114 <sup>a</sup>                | 1328 ± 38 <sup>a</sup>                  |
| 8                                    | 0,666       | 0,167       | 0,167            | 5474 ± 1180 <sup>b</sup>                     | 1389 ± 22 <sup>b</sup>                 | 1142 ± 74 <sup>c</sup>                  |
| 9                                    | 0,167       | 0,666       | 0,167            | 4145 ± 59 <sup>c</sup>                       | 594 ± 58 <sup>d</sup>                  | 725 ± 17 <sup>f</sup>                   |
| 10                                   | 0,167       | 0,167       | 0,666            | 5619 ± 67 <sup>a</sup>                       | 1384 ± 62 <sup>b</sup>                 | 1052 ± 41 <sup>d</sup>                  |
| <i>p</i> -valor (normalidade)        |             |             |                  | 0,8531                                       | 0,8680                                 | 0,9254                                  |
| <i>p</i> -valor (homoscedasticidade) |             |             |                  | 0,8311                                       | 0,4765                                 | 0,8303                                  |
| <i>p</i> -valor (one-way ANOVA)      |             |             |                  | <0,001                                       | <0,001                                 | <0,001                                  |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ )

O conteúdo de CFT determinado em semente de camu-camu variou de 657 a 5619 mg AGE/100 g de semente e a maior concentração média (5619 mg AGE/100 g) foi obtida na mistura ternária, composta por propanona, água e EtOH (Tabela 3). Comparativamente, Myoda et al. (2010) determinaram o teor de CFT pelo método Folin-Ciocalteu (CRFC) e obtiveram 369 mg AGE/100 g em resíduo de suco de camu-camu. Em outros estudos utilizando o método CRFC, Pereira et al. (2015), Chirinos et al. (2010) Genovese et al. (2008) e Azevedo et al. (2014) determinaram 411, 1320, 1797 mg e 1843 mg AGE/100 g, respectivamente, em fruto (polpa e/ ou casca) de camu-camu. Assim, os resultados do presente estudo comprovam que o conteúdo de compostos fenólicos encontrado em sementes é consideravelmente maior em comparação com outras frações do fruto.

Margraf et al. (2015) compararam os métodos Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu na determinação de compostos fenólicos totais em amostras de suco de uva e chás, no qual o método Folin-Ciocalteu apresentou valores mais elevados. Os autores sugerem que a interferência de outros compostos químicos presentes em alimentos e ervas podem agir como redutores do reagente Folin-Ciocalteu comprometendo a confiabilidade dos resultados. Compostos não fenólicos, açúcares, aminoácidos, aminas aromáticas ascorbatos e sulfitos também podem interferir na medida e causar superestimação da atividade antioxidante na amostra. Nesse caso, como o método Azul da Prússia apresenta menores interferências, ele torna-se uma alternativa ao método Folin-Ciocalteu na estimativa de fenólicos totais em frutas.

O conteúdo de FT variou de 260 a 1700 mg CE/100 g de semente e o maior valor foi evidenciado na mistura ternária de água, EtOH e propanona (0,333:0,333:0,334, v/v, respectivamente). Em estudos anteriores, teores consideráveis de flavonoides já foram evidenciados em sementes de camu-camu, tais como quercetina, rutina, miricetina e catequina (FRACASSETTI et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

O conteúdo de taninos condensados variou de 171 a 1328 mg CE/100 g de semente. Assim como FT, TC foram evidenciados em maior conteúdo na mistura ternária de solventes (0,333:0,333:0,334, v/v), indicando que esses compostos são extraídos de forma mais eficiente quando estão dissolvidos em um meio com diferença de polaridade. Segundo Fracassetti et al. (2013), uma vez que a fração semente de camu-camu está sendo estudada, espera-se que o resíduo seja uma fonte importante de taninos condensados, que incluem vários compostos, como a catequina e seus

derivados. Embora essa classe de compostos apresente alta atividade antioxidante, ela também confere maior adstringência a essa fração do fruto, o que reduz sua aceitação sensorial.

Fatores externos, como condições climáticas, tipo de solo, tipo de solvente de extração e a parte da planta estudada são capazes de interferir no conteúdo fenólico. A temperatura, tempo de exposição, área de contato e a estrutura molecular da matriz em estudo também afetam as características intrínsecas e a composição química (SETFORT et al., 2017). A região de cultivo e a temperatura afetam consideravelmente os níveis de polifenóis em frutos. Segundo Azevedo et al. (2019), um menor conteúdo de compostos fenólicos foi observado em frutos que estiveram expostos à água no período em que o nível dos rios da Amazônia aumenta, levando a um acúmulo de água em torno da planta e, conseqüentemente, redução da sua temperatura.

De acordo com Cacace e Mazza (2003), a temperatura exerce uma influência direta no processo de extração, principalmente pelo fato de reduzir a viscosidade do solvente, facilitar a permeabilidade na membrana celular e, ainda, aumentar a difusão dos compostos fenólicos pelo solvente. Além disso, o solvente pode ter contribuição considerável. O álcool etílico é comumente utilizado, principalmente devido à sua miscibilidade em água e em diferentes solventes orgânicos, como propanona, éter etílico, glicerol e tolueno, o que explica sua capacidade de dissolver substâncias polares e apolares, além de apresentar baixa toxicidade (KERTON; MARRIOTT, 2013). A propanona, por sua vez, é capaz de impedir a formação do complexo proteína-polifenol durante a extração e quebrar ligações de hidrogênio formadas entre grupos fenólicos e carboxílicos de proteínas, aumentando o rendimento da extração de compostos polifenólicos (LUCCI; SAURINA; NÚÑEZ, 2017).

### **5.1.2 Atividade antioxidante *in vitro***

Os valores de atividade antioxidante (AA) de diferentes amostras de extrato de camu-camu foram dispostos na Tabela 4. Os métodos avaliados foram atividade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup>, capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, CRFC, atividade quelante frente ao íon Cu<sup>2+</sup> e inibição da peroxidação lipídica *in vitro*. Para obter uma avaliação mais ampla da atividade antioxidante de extratos complexos de plantas é recomendado o uso de métodos com mecanismos de ação, meios e tempos

de reação distintos (AVAN et al., 2016). No presente estudo, os três mecanismos de ação antioxidante atualmente conhecidos foram utilizados: transferência de elétrons (DPPH• e CRFC), quelação de íons de metais de transição (atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ ) e transferência de íon  $\text{H}^+$  (inibição de peroxidação lipídica).

**Tabela 4** - Atividade antioxidante, atividade quelante de metais e inibição da peroxidação lipídica de extratos de semente de *Myrciaria dubia* de acordo o delineamento experimental

| Ensaio                               | A<br>(Água) | B<br>(EtOH) | C<br>(Propanona) | DPPH•<br>(mg AAE/<br>100 g) | CRFC<br>(mg AGE/<br>100 g) | Atividade<br>quelante<br>de $\text{Cu}^{+2}$<br>(%) <sup>1</sup> | Inibição da<br>peroxidação<br>lipídica<br>(%) <sup>2</sup> |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1                                    | 1           | 0           | 0                | 1963 ± 11 <sup>e</sup>      | 2114 ± 99 <sup>f</sup>     | 85 ± 1 <sup>d</sup>                                              | 72 ± 4 <sup>d</sup>                                        |
| 2                                    | 0           | 1           | 0                | 1190 ± 84 <sup>h</sup>      | 1502 ± 64 <sup>g</sup>     | 92 ± 1 <sup>c</sup>                                              | 63 ± 1 <sup>f</sup>                                        |
| 3                                    | 0           | 0           | 1                | 1336 ± 50 <sup>g</sup>      | 1803 ± 163 <sup>fg</sup>   | 95 ± 1 <sup>a</sup>                                              | 24 ± 1 <sup>g</sup>                                        |
| 4                                    | 0,5         | 0,5         | 0                | 4187 ± 61 <sup>b</sup>      | 4354 ± 115 <sup>d</sup>    | 77 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 86 ± 0 <sup>a</sup>                                        |
| 5                                    | 0,5         | 0           | 0,5              | 4216 ± 34 <sup>b</sup>      | 6579 ± 658 <sup>ab</sup>   | 77 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 84 ± 2 <sup>ab</sup>                                       |
| 6                                    | 0           | 0,5         | 0,5              | 1441 ± 85 <sup>f</sup>      | 3074 ± 45 <sup>e</sup>     | 93 ± 1 <sup>b</sup>                                              | 68 ± 1 <sup>e</sup>                                        |
| 7                                    | 0,333       | 0,333       | 0,334            | 4409 ± 60 <sup>a</sup>      | 6909 ± 110 <sup>a</sup>    | 77 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 83 ± 0 <sup>b</sup>                                        |
| 8                                    | 0,666       | 0,167       | 0,167            | 4455 ± 15 <sup>a</sup>      | 6264 ± 208 <sup>b</sup>    | 77 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 84 ± 0 <sup>ab</sup>                                       |
| 9                                    | 0,167       | 0,666       | 0,167            | 2873 ± 28 <sup>d</sup>      | 5201 ± 201 <sup>c</sup>    | 83 ± 0 <sup>e</sup>                                              | 79 ± 0 <sup>c</sup>                                        |
| 10                                   | 0,167       | 0,167       | 0,666            | 3424 ± 45 <sup>c</sup>      | 6274 ± 83 <sup>b</sup>     | 78 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 84 ± 0 <sup>ab</sup>                                       |
| <i>p</i> -valor (normalidade)        |             |             |                  | 0,8361                      | 0,8801                     | 0,8420                                                           | 0,6885                                                     |
| <i>p</i> -valor (homoscedasticidade) |             |             |                  | 0,7521                      | 0,3567                     | 0,981                                                            | 0,4031                                                     |
| <i>p</i> -valor (one-way ANOVA)      |             |             |                  | <0,001                      | <0,001                     | <0,001                                                           | <0,001                                                     |

Nota: <sup>1</sup> valores de percentual (%) de formação de complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ . <sup>2</sup> valores de percentual (%) de inibição da peroxidação lipídica. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ )

Os resultados mostraram que os extratos foram capazes de eliminar o radical DPPH• e, nesse método, a atividade antioxidante foi maior no extrato de mistura ternária de solventes (0,666 água: 0,167 EtOH: 0,167 propanona, v/v), 4455 mg AAE/100 g de semente, e não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o extrato contendo uma proporção de 0,333:0,333:0,334 (v/v) dos solventes em estudo. Assim, a mistura dos três solventes foi capaz de conferir ao extrato maior solubilização de compostos fenólicos no meio, acarretando, consequentemente, em um aumento na atividade antioxidante. Comparativamente, Fidelis et al. (2018) observaram maior atividade antioxidante (2838 mg AAE/100 g) em exocarpo de semente de camu-camu pelo mesmo método. Grigio et al. (2017), em estudo sobre os compostos químicos presentes em diferentes partes de camu-camu, observaram 245 mg de AAE/100 g em

extrato aquoso da semente, indicando valores muito inferiores aos encontrados no presente trabalho.

Myoda et al. (2010) constataram que os extratos de 50% de propanona da casca e semente de camu-camu exibiram potente atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH\*, e frações do extrato obtido por cromatografia em resina Sephadex LH-20 indicaram que as atividades antioxidantes foram diretamente relacionadas aos teores de polifenóis. O extrato de sementes e casca de camu-camu mostrou potente atividade sequestradora de radicais DPPH\*, sendo que elagitaninos C-glicosídicos como a vescalagina e castalagina mostraram ser responsáveis pela atividade de eliminação de radicais DPPH (KANESHIMA et al., 2013). Gonçalves et al. (2010) observaram que o camu-camu (extrato de fruta hidrometanólico acidificado) apresentou maior atividade antioxidante (DPPH\*) quando comparado com outras frutas brasileiras (tucumã, uxi, cambuci, abiu, carambola, araçá-boi, mana-cubiu, maracujá, graviola, cupuaçu, buriti, tamarindo, araçá, bacuri e granadilla). Para Azevedo et al. (2019), frutos maduros e cultivados em ambiente seco (estado de São Paulo, Brasil) demonstraram maior atividade antioxidante (DPPH\*), período em que o conteúdo de polifenóis é maior.

A capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (CRFC) variou de 1502 a 6909 mg AGE/100 g de semente, e a maior atividade antioxidante foi identificada em amostra de mistura ternária de água, EtOH e propanona, na proporção de 0,333:0,333:0,334 (v/v), respectivamente. Esses resultados corroboram aos obtidos por Rufino et al. (2010), Chirinos et al. (2010) e Azevedo et al. (2014), que determinaram 1176, 1320 e 1843 mg AGE/100 g, respectivamente. Em contrapartida, esses estudos foram realizados em fruto (polpa e casca) de camu-camu. Foi possível constatar que a atividade antioxidante encontrada em sementes é consideravelmente maior em comparação com outras frações do fruto. Além disso, confirmou-se a eficiência da mistura de solventes com diferentes polaridades na determinação da atividade antioxidante.

A atividade quelante frente ao  $\text{Cu}^{2+}$  (íon cúprico) variou de 77 a 95% de formação de complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ . As amostras de combinações binárias de água e EtOH e água e propanona (0,5:0,5, v/v) e ternárias de água, EtOH e propanona e água, EtOH e propanona (0,333:0,333:0,334 e 0,666:0,167:0,167, v/v, respectivamente) apresentaram o menor valor, ou seja, apresentaram maior atividade



antioxidante, e não diferenciaram entre si ( $p \leq 0,05$ ), demonstrando a eficiência de misturas de solventes com polaridades diferentes na determinação da capacidade antioxidante.

A atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  foi determinada com a finalidade de verificar a eficiência dos compostos fenólicos em ligar-se ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Uma vez que foi evidenciada alta porcentagem de formação do complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$  o resultado obtido indica que os compostos fenólicos presentes no extrato apresentam baixa capacidade de quelar ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Em contrapartida, a composição apresenta forte atividade de doação de elétron pelo TSE. Compostos fenólicos com um único grupo OH no anel aromático e sem um grupo O-CH<sub>3</sub> no anel benzeno geralmente não apresentam propriedades quelantes de metais. Por conseguinte, para flavonoides, os pontos de fixação de íons de metais de transição são os grupos *orto*-difenílicos das posições 3',4'-di-hidroxi no anel B e as estruturas 4-ceto, 3-hidroxi ou 4-ceto e 5-hidroxi no anel C dos flavonóis. A presença grupos metoxila/hidroxila na posição *orto* dos ácidos fenólicos aumenta a capacidade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ , enquanto a glicosilação do grupo OH dos fenóis impede a ligação dos íons metálicos (ZHOU et al., 2006; ŘÍHA et al., 2014).

A inibição da peroxidação lipídica *in vitro* em semente variou de 24 a 86%. Ressalta-se que esse é o primeiro trabalho que determinou a inibição da peroxidação lipídica do extrato de sementes de *M. dubia*. A amostra que apresentou maior percentual de inibição da peroxidação lipídica, 86%, foi a de mistura binária, 50% água e 50% EtOH, corroborando os dados obtidos por Fidelis et al. (2018), que observaram maior inibição da oxidação em extrato hidroalcoólico de exocarpo de semente de *M. dubia*. Em um estudo sobre os efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos na capacidade antioxidante total e compostos bioativos, Pereira et al. (2015) observaram uma redução da peroxidação lipídica no fígado e soro de ratos após consumo de suco de frutas tropicais contendo camu-camu. Gonçalves et al. (2014) confirmaram que o consumo de extratos de polpa congelada de camu-camu aumentou significativamente a atividade antioxidante plasmática em ratos diabéticos.

A gema de ovo é composta essencialmente de fosfolípidos, triacilgliceróis e proteínas, que são propensos à oxidação, acarretando na formação de produtos oxidados, que, por sua vez, reagem com duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Os lipídeos presentes na gema de ovo sofrem rápida peroxidação não enzimática quando incubados na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  via reação de Fenton. Segundo

Ferreira e Matsubara (1997), íons  $\text{Fe}^{2+}$  estão altamente relacionados com a produção de diferentes espécies reativas, em especial as de oxigênio. Os radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) reagem com os lipídeos presentes no homogenato de gema de ovo resultando em hidroperóxidos e outras substâncias oxidadas que reagem com o TBA, aumentando a absorbância da solução em 532 nm.

Sabe-se que o solvente no qual a reação ocorre tem grande relevância nos resultados, visto que a polaridade do mesmo afeta o mecanismo da reação (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Nesse estudo, uma relação entre compostos bioativos e atividade antioxidante foi sugerida. A partir da análise, foi observada correlação significativa positiva ( $p \leq 0.05$ ) da atividade antioxidante ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) dos extratos com CFT ( $r_{\text{DPPH}} = 0,8992$ ), FT ( $r_{\text{DPPH}} = 0,9156$ ) e TC ( $r_{\text{DPPH}} = 0,8975$ ). O mesmo ocorreu utilizando outros métodos que determinam atividade antioxidante, como CRFC, que apresentou correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ) com CFT ( $r_{\text{CRFC}} = 0,9556$ ), FT ( $r_{\text{CRFC}} = 0,9153$ ) e TC ( $r_{\text{CRFC}} = 0,8475$ ); IPL com CFT ( $r_{\text{IPL}} = 0,7834$ ), FT ( $r_{\text{IPL}} = 0,6690$ ) e TC ( $r_{\text{IPL}} = 0,6804$ ). Correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ), porém negativa, foi observada quando analisada a atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  em relação ao CFT ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,9204$ ), FT ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,8652$ ) e TC ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,8287$ ). Nesse caso, a correlação inversa observada na atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  indica que, quanto menor o percentual de formação do complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ , maior será a atividade antioxidante, representando a capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra em se ligarem ao  $\text{Cu}^{2+}$ .

Segundo Kaneshima et al. (2016), sementes e cascas de camu-camu, resíduos da produção de suco, contêm elagitaninos C-glicosídicos de alto peso molecular em sua composição fenólica, o que explica a atividade antioxidante observada nos extratos de semente de camu-camu. Esses dados indicam que a semente de camu-camu pode se tornar um recurso útil e ecologicamente interessante para desenvolvimento de alimentos potencialmente funcionais. No estudo, os autores relataram pela primeira vez o isolamento desses taninos de sementes e casca da fruta. Esses compostos (taninos hidrolisáveis) apresentaram atividade antioxidante mais forte que o ácido gálico e o ácido ascórbico medidos por ambos os ensaios de transferência de elétrons ( $\text{DPPH}^\bullet$  e ABTS) e de transferência de átomos de hidrogênio (ORAC). A elevada atividade antioxidante desses compostos está relacionada com a conformação do grupo hidroxila na C-1 do anel aberto D-glicose. Assim como taninos hidrolisáveis, em geral, sementes de camu-camu apresentam grande conteúdo de

flavonoides e taninos condensados, compostos que também possuem um elevado número de grupos hidroxila presentes em sua estrutura química, o que explica sua alta atividade antioxidante (FRACASSETTI et al., 2013). Segundo Inoue et al. (2008), compostos polifenólicos, como os flavonoides e alguns ácidos fenólicos são responsáveis por reduzir o estresse oxidativo *in vivo*. Os autores evidenciaram potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do camu-camu *in vivo* em humanos. Segundo Langley et al. (2015), maior atividade antioxidante foi evidenciada em farinha de resíduos de sementes quando comparada a outras partes do fruto, destacando o potencial anti-inflamatório do fruto.

### 5.1.3 Metodologia de superfície de resposta (MSR)

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi empregada para modelar os efeitos de A, B, e C na composição química (fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados) e atividade antioxidante (capacidade de captura do radical DPPH<sup>•</sup>, atividade quelante frente ao íon Cu<sup>2+</sup> e inibição da peroxidação lipídica) de semente de camu-camu. Os efeitos dos solventes de forma isolada, assim como suas misturas binárias e ternárias em relação aos seus parâmetros de análise (composição fenólica e atividade antioxidante) foram apresentados na Figura 14. Adicionalmente, o sistema de solvente foi otimizado para maximizar a extração de compostos bioativos da matriz vegetal.

Utilizou-se a regressão linear múltipla (RLM), baseada na MSR, para relacionar os solventes com as respostas. No entanto, para que um modelo MSR seja proposto, não apenas a equação e os valores de R<sup>2</sup> devem ser levados em consideração para fazer inferências sobre a qualidade estatística do modelo, mas também precisam ser calculados e discutidos o R<sup>2</sup> ajustado, que calcula a proporção da variação na variável dependente contabilizada pelas variáveis explicativas, e analisar a normalidade dos resíduos, que representam o alinhamento entre valores observados e esperados (preditos) (GRANATO et al., 2014b). Sendo assim, avaliou-se os efeitos quantitativos das variáveis de resposta (solventes água, álcool etílico e propanona) na composição fenólica e atividade antioxidante de sementes de camu-camu (Tabela 5).

No presente estudo, os dados experimentais foram ajustados utilizando o modelo cúbico completo, o qual leva em consideração efeitos singulares (isolados), binários e terciários. Todos os modelos de regressão linear múltipla propostos foram considerados significativos ( $p < 0,001$ ) para explicar os efeitos de cada tipo de solvente na composição química e atividade antioxidante dos extratos de sementes de *M. dubia*. Além disso, os valores de  $R^2$  explicaram acima de 95% a variância dos resultados. A análise dos resíduos não mostrou tendência típica e seguiu a distribuição normal ( $p > 0,05$ ; exceto para taninos condensados e inibição da peroxidação lipídica). O  $R^2$  ajustado também foi fornecido, e os resultados evidenciam a proximidade aos valores de  $R^2$ , indicando que os modelos gerados a partir da MSR apresentaram boa qualidade estatística e podem descrever satisfatoriamente o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante em amostras de extratos de sementes de *M. dubia*.

A partir da análise de variâncias unifatorial (ANOVA), a significância e adequação dos modelos da MSR (Tabela 5) foram avaliadas. Os efeitos significativos ( $p \leq 0,05$ ) para cada tipo de solvente foram observados em todas as respostas estudadas, indicando que a equação matemática proposta para explicar cada variável de resposta foi satisfatória.

O efeito da interação entre solventes água e EtOH aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) as seguintes respostas: CFT, FT, TC, CRFC, DPPH<sup>•</sup> e IPL (Tabela 5). O mesmo comportamento foi observado para as combinações de água e propanona. Por outro lado, as combinações de EtOH e propanona aumentaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) apenas FT, TC, CRFC e ILP. Já o efeito do modelo cúbico de mistura ternária de água, EtOH e propanona levou a um aumento de CFT, FT, TC, CRFC e DPPH<sup>•</sup>. Esses efeitos de interações diminuíram os valores de atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ , no entanto, isso indica que houve um aumento na atividade antioxidante do extrato. O que explica o efeito antagônico nesse caso é que, quanto menor for a formação de complexo de complexo violeta de pirocatecol -  $\text{Cu}^{2+}$ , maior será a atividade antioxidante. No presente estudo, misturas de solventes revelam maior conteúdo de compostos fenólicos e, conseqüentemente, maior atividade quelante.

**Tabela 5** - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de camu-camu

| Componentes do modelo                | Coeficientes de regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | - 95%<br>Confiança | + 95%<br>Confiança |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------|---------|---------|--------------------|--------------------|
| <b>Conteúdo fenólico total – CFT</b> |                           |             |         |         |                    |                    |
| A (Água)                             | 2617                      | 278         | 9,43    | <0,001  | 2043               | 3192               |
| B (Álcool etílico)                   | 1569                      | 243         | 6,44    | <0,001  | 1065               | 2072               |
| C (Propanona)                        | 955                       | 253         | 3,77    | <0,001  | 431                | 1478               |
| AB                                   | 5831                      | 1352        | 4,31    | <0,001  | 3034               | 8628               |
| AC                                   | 15455                     | 1345        | 11,49   | <0,001  | 12673              | 18237              |
| ABC                                  | 57569                     | 8226        | 7,00    | <0,001  | 40553              | 74586              |
| AC (A-C)                             | -13161                    | 3932        | -3,35   | <0,001  | -21294             | -5027              |
| R <sup>2</sup>                       | 0,95                      |             |         |         |                    |                    |
| R <sup>2</sup> ajustado              | 0,93                      |             |         |         |                    |                    |
| p-valor (normalidade dos resíduos)   | 0,15                      |             |         |         |                    |                    |
| <b>Flavonoides totais – FT</b>       |                           |             |         |         |                    |                    |
| A (Água)                             | 251                       | 41          | 6,11    | <0,001  | 166                | 337                |
| B (Álcool etílico)                   | 357                       | 41          | 8,70    | <0,001  | 272                | 443                |
| C (Propanona)                        | 256                       | 41          | 6,22    | <0,001  | 170                | 341                |
| AB                                   | 3133                      | 201         | 15,55   | <0,001  | 2714               | 3552               |
| AC                                   | 4242                      | 201         | 21,05   | <0,001  | 3823               | 4661               |
| BC                                   | 604                       | 201         | 3,00    | 0,006   | 185                | 1024               |
| ABC                                  | 12016                     | 1322        | 9,09    | <0,001  | 9267               | 14765              |
| AB(A-B)                              | 7767                      | 669         | 11,60   | <0,001  | 6375               | 9160               |
| AC(A-C)                              | -5711                     | 669         | -8,53   | <0,001  | -7103              | -4318              |
| R <sup>2</sup>                       | 0,99                      |             |         |         |                    |                    |
| R <sup>2</sup> ajustado              | 0,98                      |             |         |         |                    |                    |
| p-valor (normalidade dos resíduos)   | 0,88                      |             |         |         |                    |                    |
| <b>Taninos condensados – TC</b>      |                           |             |         |         |                    |                    |
| A (Água)                             | 167                       | 22          | 7,47    | <0,001  | 120                | 213                |
| B (Álcool etílico)                   | 508                       | 22          | 22,75   | <0,001  | 461                | 554                |
| C (Propanona)                        | 311                       | 22          | 13,92   | <0,001  | 264                | 357                |
| AB                                   | 3501                      | 109         | 31,98   | <0,001  | 3273               | 3729               |
| AC                                   | 2781                      | 109         | 25,40   | <0,001  | 2553               | 3009               |
| BC                                   | 442                       | 109         | 4,03    | <0,001  | 214                | 669                |
| ABC                                  | 5848                      | 718         | 8,14    | <0,001  | 4354               | 7341               |
| AB (A-B)                             | 5270                      | 364         | 14,49   | <0,001  | 4514               | 6026               |
| AC (A-C)                             | -3478                     | 364         | -9,56   | <0,001  | -4234              | -2722              |
| R <sup>2</sup>                       | 0,99                      |             |         |         |                    |                    |
| R <sup>2</sup> ajustado              | 0,99                      |             |         |         |                    |                    |
| p-valor (normalidade dos resíduos)   | 0,001                     |             |         |         |                    |                    |

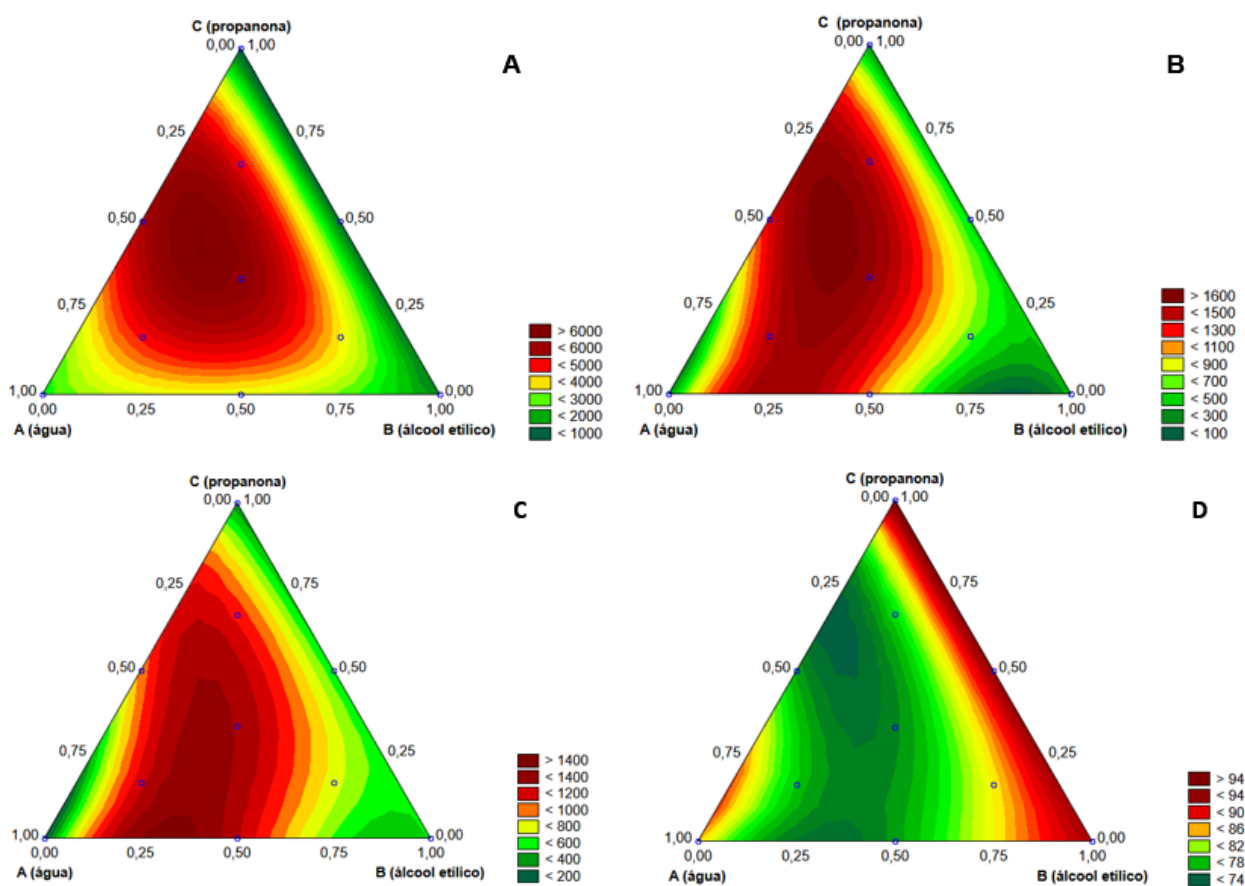
(continua)

**Tabela 6** – Continuação. Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de camu-camu

| <b>Atividade quelante frente ao íon Cu<sup>2+</sup></b> |        |       |        |        |         |        |
|---------------------------------------------------------|--------|-------|--------|--------|---------|--------|
| A (Água)                                                | 85     | 0,67  | 127,02 | <0,001 | 83,85   | 86,63  |
| B (Álcool etílico)                                      | 92     | 0,61  | 150,00 | <0,001 | 90,37   | 92,90  |
| C (Propanona)                                           | 95     | 0,61  | 155,66 | <0,001 | 93,83   | 96,36  |
| AB                                                      | -48    | 3,24  | -14,82 | <0,001 | -54,84  | -41,38 |
| AC                                                      | -53    | 3,24  | -16,61 | <0,001 | -60,66  | -47,19 |
| ABC                                                     | -99    | 19,73 | -5,00  | <0,001 | -139,66 | -57,81 |
| AB(A-B)                                                 | -31,63 | 10,92 | -2,90  | 0,01   | -54,27  | -8,99  |
| AC(A-C)                                                 | 90,12  | 10,92 | 8,25   | <0,001 | 67,48   | 112,76 |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,98   |       |        |        |         |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,97   |       |        |        |         |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,23   |       |        |        |         |        |
| <b>Capacidade Redutora do Folin-Ciocalteu – CRFC</b>    |        |       |        |        |         |        |
| A (Água)                                                | 2090   | 210   | 9,94   | <0,001 | 1655    | 2524   |
| B (Álcool etílico)                                      | 1562   | 210   | 7,43   | <0,001 | 1127    | 1997   |
| C (Propanona)                                           | 1926   | 210   | 9,16   | <0,001 | 1491    | 2361   |
| AB                                                      | 10255  | 1058  | 9,69   | <0,001 | 8066    | 12444  |
| AC                                                      | 18682  | 1058  | 17,65  | <0,001 | 16493   | 20871  |
| BC                                                      | 6051   | 1058  | 5,72   | <0,001 | 3862    | 8240   |
| ABC                                                     | 44259  | 6976  | 6,34   | <0,001 | 29828   | 58691  |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,97   |       |        |        |         |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,97   |       |        |        |         |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,37   |       |        |        |         |        |
| <b>Capacidade de captura do radical DPPH*</b>           |        |       |        |        |         |        |
| A (Água)                                                | 1966   | 32    | 62,15  | <0,001 | 1900    | 2031   |
| B (Álcool etílico)                                      | 1193   | 32    | 37,71  | <0,001 | 1127    | 1258   |
| C (Propanona)                                           | 1339   | 32    | 42,32  | <0,001 | 1273    | 1404   |
| AB                                                      | 10457  | 155   | 67,43  | <0,001 | 10135   | 10780  |
| AC                                                      | 10282  | 155   | 66,30  | <0,001 | 9960    | 10605  |
| BC                                                      | 725    | 155   | 4,68   | <0,001 | 403     | 1048   |
| ABC                                                     | 14946  | 1017  | 14,69  | <0,001 | 12830   | 17061  |
| AB(A-B)                                                 | 5351   | 515   | 10,39  | <0,001 | 4279    | 6422   |
| AC(A-C)                                                 | -3519  | 515   | -6,83  | <0,001 | -4591   | -2448  |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,99   |       |        |        |         |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,99   |       |        |        |         |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,55   |       |        |        |         |        |
| <b>Inibição da Peroxidação Lipídica – IPL</b>           |        |       |        |        |         |        |
| A (Água)                                                | 73     | 1,80  | 40,41  | <0,001 | 69      | 77     |
| B (Álcool etílico)                                      | 64     | 1,80  | 35,33  | <0,001 | 60      | 67     |
| C (Propanona)                                           | 25     | 1,80  | 13,75  | <0,001 | 21      | 29     |
| AB                                                      | 71     | 8     | 8,80   | <0,001 | 54      | 88     |
| AC                                                      | 141    | 8     | 17,45  | <0,001 | 125     | 158    |
| BC                                                      | 97     | 8     | 11,95  | <0,001 | 80      | 114    |
| AB(A-B)                                                 | 86     | 29    | 2,91   | <0,001 | 25      | 147    |
| AC(A-C)                                                 | -247   | 29    | -8,38  | <0,001 | -308    | -186   |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,97   |       |        |        |         |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,97   |       |        |        |         |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,002  |       |        |        |         |        |

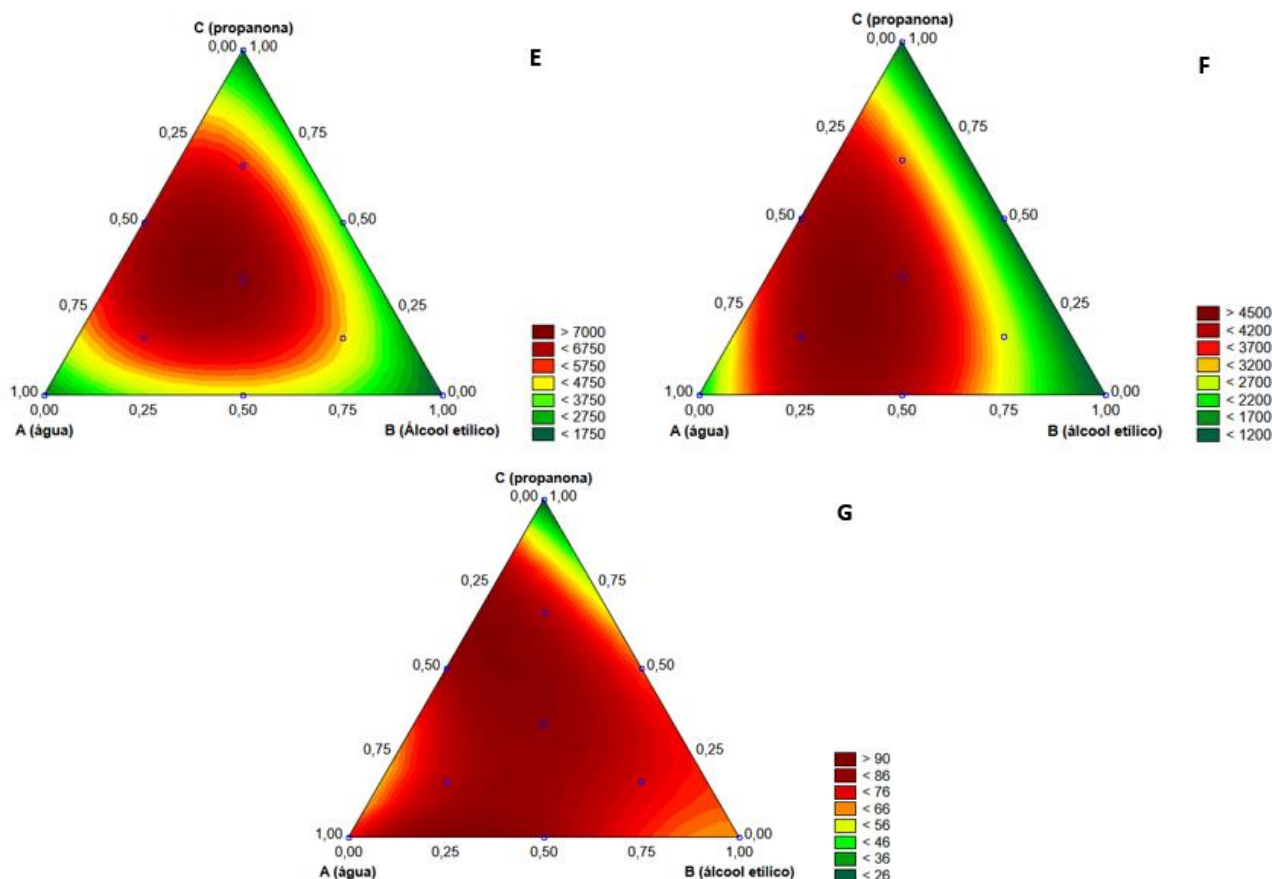
No plano bidimensional, os gráficos de contorno gerados, de acordo com as equações matemáticas, para prever as interações entre as variáveis e seu efeito correspondente nas variáveis de resposta são apresentados na Figura 14. As superfícies de resposta mostram os efeitos dos solventes na extração de compostos fenólicos e influência na atividade antioxidante. A interação cúbica entre os solventes água, EtOH e propanona mostrou uma significativa e sinérgica influência no rendimento de CFT, FT, TC, CRFC e DPPH<sup>•</sup>. As combinações de água e EtOH condicionaram o aumento de CFT, FT, TC, CRFC, DPPH<sup>•</sup> e IPL. O mesmo comportamento foi observado para as combinações de água e propanona. Em contrapartida, as combinações de EtOH e propanona aumentaram apenas FT, TC, CRFC e ILP.

**Figura 14** - Efeitos do tipo de solvente sobre o CFT (A), FT (B), TC (C), Atividade quelante de Cu<sup>2+</sup> (D) CRFC (E), DPPH<sup>•</sup> (F) e IPL (G) em extratos de sementes de camu-camu representados por gráfico de contorno



(continua)

(continuação)



### 5.1.3.1 Otimização

A partir do uso da metodologia de superfície de resposta foi possível gerar os modelos da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de semente de camu-camu, e, na sequência, encontrar as melhores condições de extração por meio da otimização simultânea baseada na função desejabilidade. A otimização simultânea utilizando o conteúdo fenólico total, taninos condensados, DPPH\*, atividade quelante frente ao íon  $\text{Cu}^{2+}$  e inibição da peroxidação lipídica *ex vivo* sugeriu um extrato com sistema de solventes contendo 43,3% de propanona, 40,7% de água e 16% de EtOH. Esse modelo estatístico apresentou um valor-*d* equivalente a 0,976, indicando que foram satisfeitos aproximadamente 98% de desejabilidade de aumentar o CFT, TC, DPPH\*, atividade quelante frente ao  $\text{Cu}^{2+}$  e IPL.

Esse novo sistema de solventes (43,3: 40,7: 16, v/v) foi adotado para a obtenção do extrato otimizado de semente de camu-camu, o qual foi analisado utilizando os mesmos ensaios experimentais. Portanto, uma validação externa foi realizada com as proporções de solventes acima mencionadas para testar os modelos



gerados pelo RSM e os resultados foram apresentados na Tabela 6. Os resultados demonstraram que os dados experimentais se encontraram dentro dos intervalos de previsão de  $\pm 95\%$  propostos pelos modelos. Assim, os modelos de regressão foram considerados preditivos.

**Tabela 7** - Valores preditos e experimentais para a mistura de 40,7 % água, 16 % álcool etílico e 43,3% propanona

| Variáveis de resposta                        | Valor médio predito | -95% Predição | +95% Predição | Valor experimental |
|----------------------------------------------|---------------------|---------------|---------------|--------------------|
| Conteúdo fenólico total (CFT) (mg AGE/100 g) | 5906                | 4254          | 7558          | 5314 $\pm$ 73      |
| Taninos condensados (TC) (mg CE/100 g)       | 1233                | 1064          | 1403          | 1263 $\pm$ 66      |
| DPPH* (mg AAE/100 g)                         | 4472                | 4077          | 4868          | 4130 $\pm$ 36      |
| Atividade quelante de Cu <sup>2+</sup> (%)   | 75                  | 72            | 79            | 78 $\pm$ 2         |
| Inibição da peroxidação lipídica (IPL) (%)   | 89                  | 82            | 96            | 86 $\pm$ 1         |

Nota: <sup>1</sup> valores de percentual (%) de formação de complexo violeta de pirocatecol-Cu<sup>2+</sup>; <sup>2</sup> valores de percentual (%) de inibição da peroxidação lipídica.

Em conclusão, a metodologia de superfície de resposta apresentou resultados satisfatórios na modelagem da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos de *Myrciaria dubia* utilizando água, propanona e álcool etílico como solventes. Não obstante, as equações de regressão linear múltipla geradas podem ser usadas para fins de previsão quando o sistema de solventes utilizado for empregado. Em termos tecnológicos, esse é o primeiro trabalho a reportar a otimização do sistema de solventes de semente de camu-camu.

## 5.2 SEMENTES DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)

### 5.2.1 Composição fenólica

Os valores médios quantificados para os compostos fenólicos de sementes de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* cv. Paulista) analisados por espectrofotometria estão dispostos na Tabela 7. Foram constatadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para todas as variáveis de resposta avaliadas por meio da análise de variâncias unifatorial (ANOVA).

**Tabela 8** - Composição química de extratos de *Myrciaria cauliflora* de acordo com o delineamento experimental

| Ensaio                               | A<br>(Água) | B<br>(EtOH) | C<br>(Propanona) | Conteúdo<br>fenólico total<br>(mg AGE/100 g) | Flavonoides<br>totais<br>(mg CE/100 g) | Taninos<br>condensados<br>(mg CE/100 g) |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                                    | 1           | 0           | 0                | 5422 ± 129 <sup>f</sup>                      | 861 ± 29 <sup>g</sup>                  | 126 ± 6 <sup>f</sup>                    |
| 2                                    | 0           | 1           | 0                | 2318 ± 27 <sup>i</sup>                       | 315 ± 21 <sup>h</sup>                  | 195 ± 1 <sup>de</sup>                   |
| 3                                    | 0           | 0           | 1                | 2048 ± 17 <sup>j</sup>                       | 278 ± 16 <sup>i</sup>                  | 202 ± 10 <sup>d</sup>                   |
| 4                                    | 0,5         | 0,5         | 0                | 6221 ± 97 <sup>c</sup>                       | 1190 ± 30 <sup>f</sup>                 | 367 ± 18 <sup>c</sup>                   |
| 5                                    | 0,5         | 0           | 0,5              | 6153 ± 53 <sup>c</sup>                       | 1456 ± 25 <sup>e</sup>                 | 569 ± 30 <sup>b</sup>                   |
| 6                                    | 0           | 0,5         | 0,5              | 4282 ± 33 <sup>h</sup>                       | 1592 ± 37 <sup>de</sup>                | 164 ± 4 <sup>e</sup>                    |
| 7                                    | 0,333       | 0,333       | 0,334            | 6551 ± 53 <sup>a</sup>                       | 1646 ± 231 <sup>d</sup>                | 541 ± 21 <sup>b</sup>                   |
| 8                                    | 0,666       | 0,167       | 0,167            | 6408 ± 86 <sup>b</sup>                       | 2314 ± 61 <sup>a</sup>                 | 371 ± 13 <sup>c</sup>                   |
| 9                                    | 0,167       | 0,666       | 0,167            | 5195 ± 20 <sup>g</sup>                       | 1883 ± 80 <sup>c</sup>                 | 374 ± 33 <sup>c</sup>                   |
| 10                                   | 0,167       | 0,167       | 0,666            | 5562 ± 123 <sup>d</sup>                      | 2052 ± 42 <sup>b</sup>                 | 636 ± 22 <sup>a</sup>                   |
| <i>p</i> -valor (normalidade)        |             |             |                  | 0,8066                                       | 0,9219                                 | 0,9022                                  |
| <i>p</i> -valor (homoscedasticidade) |             |             |                  | 0,4630                                       | 0,5317                                 | 0,8313                                  |
| <i>p</i> -valor (one-way ANOVA)      |             |             |                  | <0,001                                       | <0,001                                 | <0,001                                  |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ )

O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) variou de 2048 a 6551 mg AGE/100 g de semente, indicando forte efeito do sistema de solventes. O extrato de mistura ternária (0,333:0,333:0,334, v/v) representou maior teor, indicando que os compostos têm um caráter químico com diferenças de polaridade. Comparativamente, Hacke et al. (2016) relataram um conteúdo superior ao presente estudo, 8650 mg AGE/100 g de sementes de jabuticaba. Os autores concluíram que não houve influência do tempo e temperatura de extração no conteúdo de CFT. Rufino et al. (2010) analisaram os polifenóis e a capacidade antioxidante de extratos aquosos-orgânicos de 18 frutos tropicais brasileiros não tradicionais e encontraram valores semelhantes para polpa de jabuticaba, 3584 mg AGE/100 g de matéria seca. Reynertson et al. (2008) investigaram o teor total de fenólicos da jabuticaba (*M. cauliflora*) e encontraram 3160 mg de AGE/100 g de fruta. Santos et al. (2010) encontraram valores que variaram de 2500 a 3500 mg AGE/100 g de casca. Os valores encontrados são semelhantes aos de sementes de outras frutas, como sementes de jaca, 2770 mg AGE/100 g, longan, 6260 mg AGE/100 g, abacate, 8820 mg AGE/100 g e tamarindo, 9450 mg AGE/100 g (SOONG; BARLOW, 2004). Por outro lado, valores inferiores foram relatados em sementes de espécies vegetais

diferentes, como pequi (211 mg AGE/100g), murici (404 mg AGE/100g) e maracujá (216 mg AGE/100g), de acordo com o estudo realizado por Araújo et al. (2018), no qual determinaram CFT a partir do método de CRFC.

O conteúdo de flavonoides totais variou de 278 a 2314 mg CE/100 g de semente. Maior valor foi identificado em extrato de mistura ternária de água, EtOH e propanona (0,666:0,167:0,167, v/v, respectivamente), indicando que compostos mais hidrofílicos representam a classe dos compostos analisados, sugerindo o perfil de fenólicos de sementes de jabuticaba.

O conteúdo de taninos condensados (TC) nos extratos de semente variou de 126 a 636 CE/100 g de semente. O maior conteúdo desses compostos foi obtido quando a amostra foi tratada com maior proporção de solvente orgânico propanona, seguido de água e EtOH (0,666:0,167:0,167, v/v), sugerindo a afinidade dos taninos condensados aos três solventes, mas, principalmente, propanona. Isso indica que compostos menos polares podem estar presentes nessas sementes. Alezandro et al. (2013a) relataram valores 10 vezes menores em sementes de jabuticaba *M. cauliflora* cv. Paulista e *M. jaboticaba* cv. Sabará, 10 mg CE/100 g e 15 mg CE/100 g, respectivamente. Segundo Pérez-Jiménez et al. (2008), solventes orgânicos aquosos com polaridades diferentes aumentam a eficiência do processo de extração, uma vez que são capazes de extrair diferentes classes de compostos.

Os resíduos são compostos de sementes, pele, casca e bagaço e contêm boas fontes de compostos bioativos, como constatado no presente estudo. Esses fitoquímicos podem ser utilizados para diferentes fins, especialmente para o desenvolvimento de alimentos funcionais ou enriquecidos, na indústria farmacêutica, indústria têxtil, entre outras. O uso de resíduos para a produção de componentes bioativos torna-se um importante fator contribuinte para o desenvolvimento sustentável (SAGAR et al., 2018). Segundo Naczk e Shahidi (2004), a composição fenólica de frações dos frutos pode variar de acordo com os estádios de maturação, espécies, variedade, origem geográfica, condições e práticas agrícolas, armazenamento e distribuição. Abe et al. (2011) avaliaram o efeito do processo de maturação em frutos de jabuticaba e concluíram que o conteúdo de compostos fenólicos diminui ao passar para estádios mais avançados.

### 5.2.2 Atividade antioxidante *in vitro*

Amostras de semente de jabuticaba exibiram alta atividade antioxidante (AA), como mostra a Tabela 8. A atividade antioxidante frente ao radical DPPH• variou de 1613 a 5080 mg AAE/100 g de semente. As misturas que representaram maior potencial antioxidante e não apresentaram diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre elas são as seguintes: 0,333:0,333:0,334 água, EtOH e propanona, respectivamente, 0,5:0,5 EtOH e propanona e 0,5:0,5 água e propanona. Alta atividade antioxidante em sementes de jabuticaba também foi relatada anteriormente por Hacke et al., 2016. Sementes apresentam atividade antioxidante e conteúdo fenólico consideravelmente maior em comparação com outras partes comestíveis do fruto (corroborando os encontrados anteriores (SOONG; BARLOW, 2004). Alezandro et al. (2013a) compararam a casca, polpa, semente e o fruto inteiro de jabuticaba e constataram que a fração semente apresentou destaque em relação às outras partes do fruto na maioria dos métodos de determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

**Tabela 9** - Atividade antioxidante, quelante de metais e inibição da peroxidação lipídica de extratos de semente de *Myrciaria cauliflora* de acordo o delineamento experimental

| Ensaio                               | A<br>(Água) | B<br>(EtOH) | C<br>(Propanona) | DPPH*<br>(mg AAE/<br>100 g) | CRFC<br>(mg AGE/<br>100 g) | Atividade<br>Quelante<br>de Cu <sup>2+</sup><br>(%) <sup>1</sup> | Inibição da<br>Peroxidação<br>Lipídica<br>(%) <sup>2</sup> |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1                                    | 1           | 0           | 0                | 4232 ± 30 <sup>e</sup>      | 5817 ± 37 <sup>e</sup>     | 68 ± 1 <sup>d</sup>                                              | 82 ± 1 <sup>d</sup>                                        |
| 2                                    | 0           | 1           | 0                | 1613 ± 34 <sup>i</sup>      | 3314 ± 108 <sup>g</sup>    | 89 ± 0 <sup>a</sup>                                              | 76 ± 1 <sup>e</sup>                                        |
| 3                                    | 0           | 0           | 1                | 2725 ± 65 <sup>h</sup>      | 2758 ± 100 <sup>h</sup>    | 89 ± 1 <sup>a</sup>                                              | 71 ± 1 <sup>f</sup>                                        |
| 4                                    | 0,5         | 0,5         | 0                | 5001 ± 21 <sup>b</sup>      | 6975 ± 643 <sup>c</sup>    | 66 ± 1 <sup>e</sup>                                              | 86 ± 1 <sup>a</sup>                                        |
| 5                                    | 0,5         | 0           | 0,5              | 5032 ± 13 <sup>ab</sup>     | 7864 ± 428 <sup>ab</sup>   | 62 ± 1 <sup>g</sup>                                              | 86 ± 0 <sup>ab</sup>                                       |
| 6                                    | 0           | 0,5         | 0,5              | 2785 ± 64 <sup>g</sup>      | 4744 ± 65 <sup>f</sup>     | 78 ± 0 <sup>b</sup>                                              | 78 ± 1 <sup>e</sup>                                        |
| 7                                    | 0,333       | 0,333       | 0,334            | 5080 ± 9 <sup>a</sup>       | 8283 ± 184 <sup>a</sup>    | 59 ± 1 <sup>h</sup>                                              | 83 ± 0 <sup>cd</sup>                                       |
| 8                                    | 0,666       | 0,167       | 0,167            | 4938 ± 18 <sup>c</sup>      | 7445 ± 78 <sup>b</sup>     | 64 ± 1 <sup>f</sup>                                              | 84 ± 1 <sup>bc</sup>                                       |
| 9                                    | 0,167       | 0,666       | 0,167            | 3979 ± 13 <sup>f</sup>      | 5427 ± 67 <sup>e</sup>     | 74 ± 1 <sup>c</sup>                                              | 77 ± 1 <sup>e</sup>                                        |
| 10                                   | 0,167       | 0,167       | 0,666            | 4450 ± 9 <sup>d</sup>       | 6499 ± 113 <sup>d</sup>    | 73 ± 1 <sup>c</sup>                                              | 83 ± 1 <sup>cd</sup>                                       |
| <i>p</i> -valor (normalidade)        |             |             |                  | 0,8290                      | 0,9275                     | 0,9066                                                           | 0,9027                                                     |
| <i>p</i> -valor (homoscedasticidade) |             |             |                  | 0,6962                      | 0,3235                     | 0,9426                                                           | 0,8911                                                     |
| <i>p</i> -valor (one-way ANOVA)      |             |             |                  | <0,001                      | <0,001                     | <0,001                                                           | <0,001                                                     |

Nota: <sup>1</sup> valores de percentual (%) de formação de complexo violeta de pirocatecol-Cu<sup>2+</sup>; <sup>2</sup> valores de percentual (%) de inibição da peroxidação lipídica. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ )

A capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (CRFC) variou de 2758 a 8283 mg AGE/100 g de semente, sendo que o maior valor encontrado representa uma mistura ternária de solventes (0,333:0,333:0,334, v/v), que não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o valor encontrado na mistura de água e propanona (0,5:0,5, v/v). Os resultados estão de acordo com os obtidos por Alezandro et al. (2013a), que verificaram que o extrato orgânico (solução de metanol/água [70:30, v/v]) de sementes de jabuticaba var. Sabará apresentou maior atividade antioxidante pelo método CRFC (aproximadamente 9000 mg CE/100 g de sementes) em comparação à casca, polpa e frutos inteiros. Segundo Inada et al. (2015), a atividade antioxidante encontrada em sementes de jabuticaba foi semelhante ao presente estudo, 1007 mg AGE/100 g. Comparativamente, sementes de juçara apresentaram valores muito inferiores, 200 mg AGE/100 g, que representa apenas 10% da menor AA encontrada em sementes de jabuticaba.

A atividade quelante frente ao  $\text{Cu}^{2+}$  variou de 59 a 89% de formação de complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ . A amostra de combinação ternária água, EtOH e propanona (0,333:0,333:0,334, v/v, respectivamente) apresentou o menor percentual de formação de complexo, o que representa maior atividade antioxidante, indicando a eficiência da mistura de solventes com diferentes polaridades na determinação da capacidade antioxidante. Esse resultado indica que os compostos fenólicos presentes no extrato apresentam capacidade intermediária de se ligarem ao  $\text{Cu}^{2+}$ , uma vez que foi obtida porcentagem relativamente alta de formação do complexo violeta de pirocatecol-  $\text{Cu}^{2+}$ .

Esse foi o primeiro trabalho que determinou a inibição da peroxidação lipídica (IPL) do extrato de sementes de *M. cauliflora*. Os valores encontrados variaram de 71 a 86%, indicando efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do sistema de solvente na transferência de íon  $\text{H}^+$  dos antioxidantes presentes na semente para os radicais gerados na reação química com agentes oxidantes. Não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as misturas binárias água e EtOH (50:50, v/v) e água e propanona (50:50, v/v).

Ao comparar os resultados foi observado que o conteúdo fenólico foi proporcional a AA. Assim, uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos extraídos e a capacidade antioxidante total pôde ser sugerida. Nesse estudo, houve correlação significativa positiva ( $p \leq 0,05$ ) da atividade antioxidante (DPPH\*) dos extratos com CFT ( $r_{\text{DPPH}} = 0,9407$ ), FT ( $r_{\text{DPPH}} = 0,6449$ ) e TC ( $r_{\text{DPPH}} = 0,6690$ ). O mesmo ocorreu utilizando outros métodos de atividade antioxidante, como CRFC, que

apresentou correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ) com CFT ( $r_{\text{CRFC}} = 0,9613$ ), FT ( $r_{\text{CRFC}} = 0,6938$ ) e TC ( $r_{\text{CRFC}} = 0,7035$ ); IPL com CFT ( $r_{\text{IPL}} = 0,8894$ ), FT ( $r_{\text{IPL}} = 0,5562$ ) e TC ( $r_{\text{IPL}} = 0,5847$ ). Correlação significativa ( $p \leq 0.05$ ), porém negativa, foi observada quando analisada a atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  em relação ao CFT ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,9654$ ), FT ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,6311$ ) e TC ( $r_{\text{atividade quelante de Cu}^{2+}} = -0,5732$ ). A atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  indica que, quanto menor o percentual de formação do complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ , maior será a atividade antioxidante, representando a capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra em se ligarem ao  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 5.2.3 Metodologia de superfície de resposta (MSR)

O delineamento simplex-centróide aumentado ( $n=10$  condições) foi utilizado para obter a melhor relação de solventes, maior rendimento de compostos fenólicos e, conseqüentemente, maior potencial antioxidante dos extratos de sementes de jabuticaba. A partir da análise estatística, Tabela 9, foi possível observar que todos os solventes apresentaram efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) na extração dos compostos fenólicos e AA dos extratos de semente de jabuticaba. Usando a análise de variâncias unifatorial (ANOVA), a significância e adequação dos modelos de RSM foram avaliadas, e foram obtidos  $p$ -valores abaixo de 0,05, indicando que a equação matemática proposta para explicar cada variável de resposta foi satisfatória. Além disso, os valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$  foram superiores a 80%, o que significa que a maior parte da variabilidade nos dados experimentais pode ser explicada pelos modelos matemáticos de segunda ordem. Adicionalmente, os resíduos seguiram uma distribuição normal ( $p > 0,05$ ; exceto para CFT, CRFC e atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ ), o que indica que os modelos descreveram satisfatoriamente a composição fenólica e atividade de extratos de semente de *M. cauliflora*.

O efeito da interação entre misturas binárias (modelo quadrático) de água e EtOH e água e propanona, assim como mistura ternária (modelo cúbico), mostrou mesmo resultado, ou seja, aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) as seguintes respostas: CFT, TC, CRFC e DPPH $^{\bullet}$  (Tabela 9). Essas interações diminuiram a atividade quelante frente ao  $\text{Cu}^{2+}$ , indicando maior atividade antioxidante, obtida por uma relação inversa. O resultado obtido indica que solventes de diferentes polaridades contribuem para maior rendimento da extração de compostos fenólicos e

para maior atividade antioxidante, consequentemente. Por outro lado, a combinação de EtOH e propanona aumentou somente CFT. Apenas IPL não aumentou significativamente com nenhuma das interações entre os solventes.

O mesmo resultado para os parâmetros CFT e AA foi obtido anteriormente por Hacke et al. (2016), que analisaram extratos de semente de jabuticaba utilizando água, EtOH e propanona como solventes.

**Tabela 10** - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de jabuticaba

| Componentes do modelo                | Coeficientes de regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | - 95% Confiança | + 95% Confiança |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------|---------|---------|-----------------|-----------------|
| <b>Conteúdo fenólico total – CFT</b> |                           |             |         |         |                 |                 |
| A (Água)                             | 5428                      | 45          | 120     | <0,001  | 5334            | 5522            |
| B (Álcool etílico)                   | 2319                      | 44          | 53      | <0,001  | 2227            | 2410            |
| C (Propanona)                        | 2054                      | 45          | 46      | <0,001  | 1960            | 2148            |
| AB                                   | 9421                      | 222         | 42      | <0,001  | 8957            | 9884            |
| AC                                   | 9700                      | 221         | 44      | <0,001  | 9238            | 10161           |
| BC                                   | 8495                      | 255         | 33      | <0,001  | 7963            | 9027            |
| ABC                                  | 6825                      | 1629        | 4       | <0,001  | 3427            | 10223           |
| AC (A-C)                             | -8266                     | 647         | -13     | <0,001  | -9616           | -6917           |
| R <sup>2</sup>                       | 0,99                      |             |         |         |                 |                 |
| R <sup>2</sup> ajustado              | 0,99                      |             |         |         |                 |                 |
| p-valor (normalidade dos resíduos)   | 0,001                     |             |         |         |                 |                 |
| <b>Taninos condensados – TC</b>      |                           |             |         |         |                 |                 |
| A (Água)                             | 133                       | 16          | 8       | <0,001  | 99              | 166             |
| B (Álcool etílico)                   | 182                       | 14          | 13      | <0,001  | 153             | 212             |
| C (Propanona)                        | 200                       | 15          | 13      | <0,001  | 169             | 232             |
| AB                                   | 846                       | 78          | 11      | <0,001  | 683             | 1008            |
| AC                                   | 1663                      | 78          | 21      | <0,001  | 1501            | 1824            |
| ABC                                  | 3434                      | 514         | 7       | <0,001  | 2365            | 4504            |
| AC(A-C)                              | -2720                     | 228         | -12     | <0,001  | -3193           | -2246           |
| R <sup>2</sup>                       | 0,98                      |             |         |         |                 |                 |
| R <sup>2</sup> ajustado              | 0,97                      |             |         |         |                 |                 |
| p-valor (normalidade dos resíduos)   | 0,56                      |             |         |         |                 |                 |

(continua)

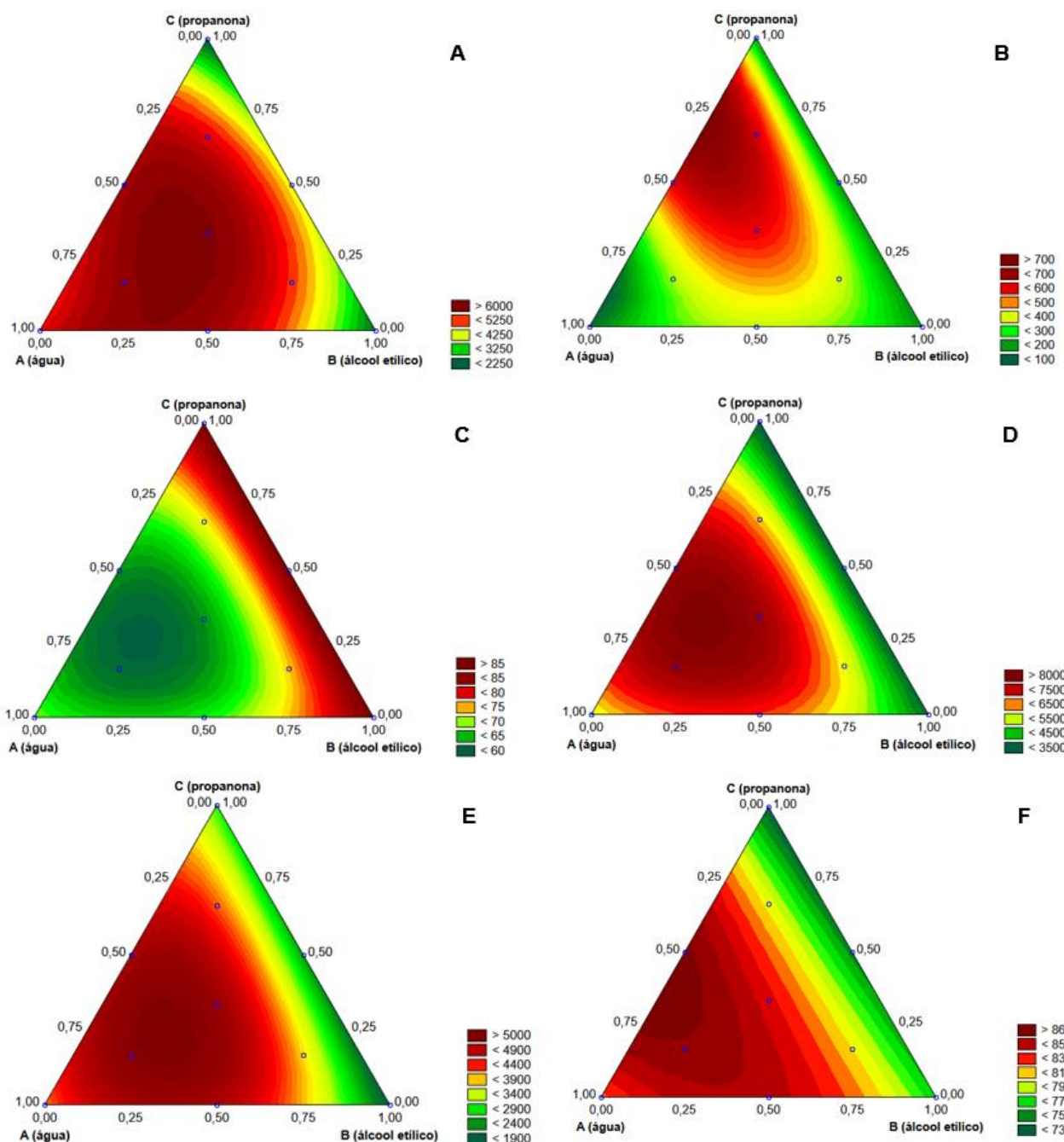
**Tabela 11** – Continuação. Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da combinação de solventes na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos de sementes de jabuticaba

| <b>Atividade quelante frente ao íon Cu<sup>2+</sup></b> |         |       |    |        |      |        |
|---------------------------------------------------------|---------|-------|----|--------|------|--------|
| A (Água)                                                | 69      | 2     | 35 | <0,001 | 65   | 73     |
| B (Álcool etílico)                                      | 86,13   | 2     | 48 | <0,001 | 82   | 90     |
| C (Propanona)                                           | 86,13   | 2     | 48 | <0,001 | 82   | 90     |
| AB                                                      | -42,73  | 10    | -4 | <0,001 | -63  | -22    |
| AC                                                      | -58,14  | 10    | -6 | <0,001 | -78  | -38    |
| ABC                                                     | -168,81 | 65    | -3 | <0,001 | -303 | -35    |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,90    |       |    |        |      |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,88    |       |    |        |      |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,04    |       |    |        |      |        |
| <b>Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu – CRFC</b>    |         |       |    |        |      |        |
| A (Água)                                                | 5675    | 343   | 16 | <0,001 | 4963 | 6386   |
| B (Álcool etílico)                                      | 3655    | 314   | 12 | <0,001 | 3003 | 4307   |
| C (Propanona)                                           | 3362    | 314   | 11 | <0,001 | 2710 | 4014   |
| AB                                                      | 8248    | 1707  | 5  | <0,001 | 4708 | 11787  |
| AC                                                      | 13440   | 1707  | 8  | <0,001 | 9901 | 16979  |
| ABC                                                     | 32460   | 11265 | 3  | <0,001 | 9098 | 555822 |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,91    |       |    |        |      |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,88    |       |    |        |      |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,01    |       |    |        |      |        |
| <b>Capacidade de captura do radical DPPH*</b>           |         |       |    |        |      |        |
| A (Água)                                                | 4088    | 156   | 26 | <0,001 | 3765 | 4411   |
| B (Álcool etílico)                                      | 1875    | 143   | 13 | <0,001 | 1579 | 2171   |
| C (Propanona)                                           | 3011    | 143   | 21 | <0,001 | 2715 | 3307   |
| AB                                                      | 7761    | 774   | 10 | <0,001 | 6155 | 9367   |
| AC                                                      | 5711    | 774   | 7  | <0,001 | 4105 | 7316   |
| ABC                                                     | 17343   | 5111  | 3  | <0,001 | 6744 | 27941  |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,95    |       |    |        |      |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,94    |       |    |        |      |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,05    |       |    |        |      |        |
| <b>Inibição da peroxidação lipídica ex vivo – IPL</b>   |         |       |    |        |      |        |
| A (Água)                                                | 82      | 1     | 60 | <0,001 | 79   | 84     |
| B (Álcool etílico)                                      | 76      | 1     | 62 | <0,001 | 74   | 79     |
| C (Propanona)                                           | 73      | 1     | 59 | <0,001 | 70   | 75     |
| AB                                                      | 22      | 6     | 3  | <0,001 | 9    | 36     |
| AC                                                      | 36      | 6     | 6  | <0,001 | 23   | 50     |
| R <sup>2</sup>                                          | 0,80    |       |    |        |      |        |
| R <sup>2</sup> ajustado                                 | 0,77    |       |    |        |      |        |
| p-valor (normalidade dos resíduos)                      | 0,61    |       |    |        |      |        |



A Figura 15 apresenta os gráficos da superfície de resposta para as variáveis de resposta em um plano bidimensional, gerados de acordo com as equações de regressão linear múltipla. A interação cúbica e interações binárias mostraram uma significativa e sinérgica influência no rendimento dos CFT, TC, CRFC e DPPH<sup>•</sup>. Em contrapartida, as combinações de EtOH e propanona influenciaram apenas CFT. IPL não influenciou nenhuma das interações entre os solventes.

**Figura 15** - Efeitos do tipo de solvente sobre o CFT (A), TC (B), Atividade quelante de Cu<sup>2+</sup> (C), CRFC (D), DPPH<sup>•</sup> (E) e IPL (F) em extratos de sementes de jabuticaba representados por gráfico de contorno.



### 5.2.3.1 Otimização

Uma otimização simultânea foi proposta utilizando a função desejabilidade de acordo com o conteúdo fenólico total, taninos condensados, DPPH•, atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e inibição da peroxidação lipídica, o que resultou em um extrato contendo 52% de água + 48% de propanona. Esse modelo estatístico apresentou um valor-d equivalente a 0,977, indicando que foram satisfeitos 98% de desejabilidade de aumentar o CFT, TC, DPPH•, atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e inibição da peroxidação lipídica.

Uma validação externa foi realizada com as proporções de solventes acima mencionadas para testar os modelos gerados pelo RSM e os resultados foram apresentados na Tabela 10. A partir dos resultados obtidos foram encontrados dados experimentais dentro dos intervalos de previsão de  $\pm 95\%$  propostos pelos modelos. Assim, os modelos de regressão estudados podem ser considerados preditivos.

**Tabela 12** - Valores preditos e experimentais para a mistura de 52% de água e 48% de propanona

| Variáveis de resposta                        | Valor médio predito | -95% Predição | +95% Predição | Valor experimental |
|----------------------------------------------|---------------------|---------------|---------------|--------------------|
| Conteúdo fenólico total (CFT) (mg AGE/100 g) | 6659                | 4984          | 8333          | 5750 $\pm$ 136     |
| Taninos condensados (TC) (mg CE/100 g)       | 629                 | 433           | 826           | 528 $\pm$ 90       |
| DPPH• (mg AAE/100 g)                         | 5260                | 4487          | 6033          | 4800 $\pm$ 16      |
| Atividade quelante de $\text{Cu}^{2+}$ (%)   | 60                  | 51            | 70            | 58 $\pm$ 2         |
| Inibição da peroxidação lipídica (IPL) (%)   | 87                  | 81            | 92            | 81 $\pm$ 0         |

Nota: <sup>1</sup> valores de percentual (%) de formação de complexo violeta de pirocatecol- $\text{Cu}^{2+}$ ; <sup>2</sup> valores de percentual (%) de inibição da peroxidação lipídica

Em conclusão, a metodologia de superfície de resposta apresentou resultados satisfatórios na modelagem da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos de *Myrciaria cauliflora* utilizando água e propanona e álcool etílico como solventes. Sendo assim, as equações de regressão linear múltipla geradas podem ser usadas para fins de previsão quando o sistema de solventes utilizado for empregado.

### 5.3 EXTRATOS OTIMIZADOS DE SEMENTES DE CAMU-CAMU E JABUTICABA

#### **5.3.1 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os valores médios para todos os compostos químicos de semente de camu-camu e jabuticaba quantificados por CLAE estão dispostos na Tabela 11.

Ao todo, 16 compostos fenólicos foram identificados e quantificados em camu-camu. Dentre eles, 8 correspondem à classe de ácidos fenólicos, 5 são flavonoides, 2 taninos hidrolisáveis (elagitaninos) e 1 estilbeno. O conteúdo fenólico total identificado em sementes de camu-camu foi de 1861 mg/100 g. Consequentemente, notou-se que a composição fenólica de um sistema contendo os três solventes estudados foi diversificada em comparação com a composição de extratos obtidos de apenas um tipo de solvente. Uma vez que poucos estudos relatam a composição química completa e a identificação de compostos fenólicos de sementes de camu-camu, o estudo foi conduzido de forma a também comparar os resultados referentes à outras frações do fruto.

**Tabela 13** - Composição química de extrato otimizado de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

| Compostos fenólicos (mg/100 g)       | Extrato otimizado de semente de camu-camu | Extrato otimizado de semente de jabuticaba |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Ácidos fenólicos</b>              |                                           |                                            |
| Ácido gálico                         | 10,87 ± 4,00                              | 4,26 ± 0,13                                |
| Ácido elágico                        | 4,04 ± 0,26                               | 21,21 ± 0,51                               |
| Ácido cafeico                        | 2,15 ± 0,35                               | 2,04 ± 0,07                                |
| Ácido rosmarínico                    | 0,73 ± 0,00                               | 0,78 ± 0,00                                |
| Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico         | 3,42 ± 0,65                               | -                                          |
| Ácido 2,4-di-hidroxibenzóico         | 3,01 ± 0,22                               | 0,64 ± 0,06                                |
| Ácido ferúlico                       | 0,99 ± 0,20                               | 0,35 ± 0,00                                |
| Ácido 2-hidroxicinâmico              | 0,76 ± 0,39                               | -                                          |
| Ácido <i>p</i> -cumárico             | -                                         | 2,94 ± 0,08                                |
| <b>Flavonoides</b>                   |                                           |                                            |
| Quercetina                           | 0,45 ± 0,02                               | 0,25 ± 0,00                                |
| Quercetina-3-rutinosídeo             | 2,95 ± 0,36                               | 1,63 ± 0,13                                |
| Proantocianidina A2                  | 4,70 ± 0,70                               | -                                          |
| Malvidina-3,5-diglicosídeo           | 1,27 ± 0,08                               | 1,28 ± 0,08                                |
| Cianidina-3-glicosídeo               | 3,94 ± 0,03                               | 3,98 ± 0,06                                |
| <b>Elagitaninos</b>                  |                                           |                                            |
| Vescalagina                          | 785 ± 6,54                                | 1999 ± 24,38                               |
| Castalagina                          | 1036 ± 15,72                              | 1872 ± 17,54                               |
| <b>Estilbeno</b>                     |                                           |                                            |
| <i>trans</i> -Resveratrol            | 0,33 ± 0,03                               | -                                          |
| <b>Total identificado (mg/100 g)</b> | <b>1861</b>                               | <b>3910</b>                                |

Os compostos em estudo já foram identificados e quantificados em diferentes partes do fruto de camu-camu (polpa e casca) por outros autores (GENOVESE et al., 2008; CHIRINOS et al., 2010; RUFINO et al., 2010; FRACASSETTI et al., 2013; KANESHIMA et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014; FUJITA et al., 2015), com a exceção de *trans*-resveratrol, que foi identificado pela primeira vez em semente de camu-camu. Em um estudo realizado com o exocarpo de semente de camu-camu, *t*-resveratrol foi identificado e seu teor foi cerca de dez vezes maior que o encontrado em vinho tinto (FIDELIS et al., 2018).

Comparativamente, compostos fenólicos, como ácido elágico, elagitaninos e quercetina também foram os principais fenólicos detectados por Fujita et al. (2015) e, segundo os autores, podem ser responsáveis por maiores funcionalidades ligadas a antioxidantes. Valores semelhantes de ácido elágico (5,8 mg/100 g) e quercetina (0,8 mg/100 g) foram relatados anteriormente por Azevedo et al. (2015) em resíduos do

processamento da polpa de camu-camu. Abe et al. (2011) reportaram a presença de ácido elágico em fruto de camu-camu (1,6 mg/100 g), indicando conteúdo inferior ao encontrado na semente. Chirinos et al. (2010) isolaram catequinas, derivados de ácido elágico, antocianinas, flavonóis e flavanonas a partir de uma mistura de suco de fruta e casca de camu-camu.

No presente estudo foram identificados dois elagitaninos, castalagina (1036 mg/100g) e vescalagina (785 mg/100 g). Fracassetti et al. (2013) destacaram que, em espécies de plantas com ambos os compostos, a concentração de castalagina é, geralmente, maior que vescalagina, como observado em sementes de camu-camu, onde a proporção de castalagina para vescalagina foi de 6:4, m/m, aproximadamente. Segundo os mesmos autores, quando comparado com a polpa, sementes compreendem as maiores quantidades de fenóis detectadas. No estudo, foram identificados elagitaninos em farinha de semente de camu-camu e os mais abundantes foram a castalagina (114,67 mg/ 100 g), seguido de vescalagina (81,30 mg/ 100 g). Dentro da classe das antocianinas, cianidina-3-glicosídeo também foi relatada, entretanto, em polpa de camu-camu. Kaneshima et al. (2013) isolaram ácido gálico e ácido elágico em extrato de semente (solução aquosa de acetona 50%, v/v), sugerindo que o ácido elágico é, provavelmente, derivado de castalagina (460 mg/100 g) ou vescalagina (216 mg/100 g) e outros taninos relacionados no extrato.

Em uma revisão sobre a fonte, ingestão dietética, metabolismo, funções e os efeitos de elagitaninos (ET), ácido elágico e seus metabólitos derivados, Landete (2011) abordou que, além de sua atividade antioxidante, os ET têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios (*in vivo*), antimicrobianos, probióticos e estrogênicos e/ou antiestrogênico. Em outros estudos, foram relatadas funções biológicas *in vivo*, tais como atividade antiviral, antimicrobiana, reguladora glicêmica, antimutagênica, antitumoral e anticarcinogênica (ASCACIO-VALDÉS et al., 2011).

Diferenças na concentração encontradas na composição fenólica em comparação com outros trabalhos podem ser explicadas pelas diferentes condições ambientais, que influenciam no desenvolvimento da planta de forma direta, podendo modular os níveis de compostos bioativos (AGUIAR et al., 2016).

A composição fenólica de extrato otimizado de sementes de jabuticaba foi avaliada, 13 compostos foram identificados e quantificados (Tabela 11). Dentre eles, 7 correspondem aos ácidos fenólicos, 4 são flavonoides e 2 taninos hidrolisáveis (elagitaninos). O conteúdo fenólico total identificado foi de 3910 mg/100 g.

Wu et al. (2012) identificaram conteúdo semelhante, porém inferior, de ácido elágico em fruto, 15,4 mg/100 g e suco comercial de jabuticaba, 15,6 mg/100 g. Os mesmos autores identificaram maior conteúdo de quercetina em suco, 3,3 mg/100 g. Em contrapartida, malvidina-3-glicosídeo não foi detectada. Abe et al. (2011) identificaram conteúdos similares para ácido elágico, 27 mg/100 g em sementes, e quercetina, 0,56 mg/100 g, em frutos de jabuticaba. Além disso, a concentração total de ácido elágico foi maior em sementes de jabuticaba em comparação à polpa e casca. Cianidina-3-glicosídeo também foi identificada por Abe et al. (2011), no entanto, apenas em casca. No mesmo estudo, os autores avaliaram o efeito do processo de maturação no conteúdo de ácido elágico livre e constataram que os valores diminuem com o amadurecimento, o que está ligado à perda gradativa de adstringência. Este fenômeno é semelhante ao observado em outras frutas, como morangos. O ácido elágico é um composto reconhecido por suas atividades biológicas, com fortes propriedades eliminadoras de radical livre e quelante de metais (LANDETE, 2011).

Seraglio et al. (2018) obtiveram valores semelhantes e, alguns casos superiores, em polpa de jabuticaba: ácido gálico, 4,16 mg/100g, ácido ferúlico, 0,20 mg/100 g, ácido *p*-cumárico, 0,36 mg/100 g, quercetina, 5,21 mg/100 g; enquanto que quercetina-3-rutinosídeo esteve abaixo do LOD e ácido cafeico, 0,03 mg/100 g em quantidade inferior. Inada et al. (2015) relataram conteúdo aproximado de quercetina, 0,4 mg/100 g, enquanto que o ácido gálico e elágico foram identificados em maior quantidade, 30 e 83 mg/100 g, respectivamente. No estudo, os autores utilizaram álcool etílico 80% para extração, isso indica que o meio em que os compostos estão dispersos pode contribuir para maior solubilidade dos mesmos e resultar, conseqüentemente, em maior número e quantidade. Em comparação com sementes de juçara (*Euterpe edulis*), dentre os compostos citados acima, apenas ácido gálico foi identificado (1 mg/100 g), valor inferior ao encontrado no presente estudo.

Dentro da família Myrtaceae, a jabuticaba demonstrou ser a maior fonte de elagitaninos (ALEZANDRO et al., 2013a). Em um estudo sobre a variabilidade química de polifenóis e elagitaninos constituintes de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) em diferentes estágios de desenvolvimento, Pereira et al. (2017) constataram que o conteúdo de elagitaninos e de ácidos orgânicos diminuiu durante o desenvolvimento do fruto, enquanto que em plena maturação, o nível de antocianina, cianidina-3-o-glicose, sofreu um aumento acentuado. Ao longo dos estádios de maturação foi

observado que o castalagina variou de 2550 a 1757 mg/100 g, vescalagina, de 2817 a 953 mg/100 g e ácido elágico variou de 67 a 58 mg/100 g de em sementes de jabuticaba. Os autores concluíram que o perfil de elagitaninos apresentou diferença considerável entre os tecidos do fruto, como foi o caso de castalagina e vescalagina, que se concentraram principalmente em sementes, enquanto cauliflorina e antocianinas se acumularam em cascas. Ácido gálico, ácido elágico, pedunculagina e vescalagina foram detectados em todas as partes do fruto, entretanto, eles ocorrem em maior quantidade em sementes.

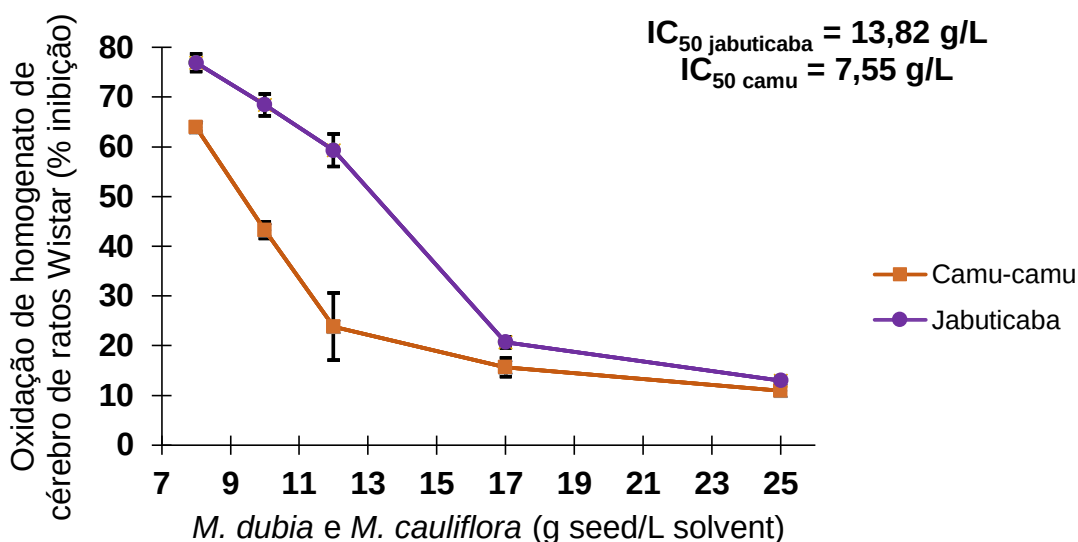
### 5.3.2 Inibição da peroxidação lipídica utilizando cérebro de ratos Wistar

A peroxidação lipídica, gerada a partir do estresse oxidativo nas células, provoca oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, responsáveis pela manutenção das membranas celulares, levando a uma alteração da permeabilidade e fluidez da bicamada lipídica, composição e integridade celular. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são alguns dos oxidantes mais comuns nas células. Os produtos gerados na peroxidação lipídica são tóxicos ao organismo, principalmente por induzir inflamação, envelhecimento, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e indução de câncer *in vivo* (GUÉRAUD et al., 2010; GASCHLER; STOCKWEL, 2017). A técnica utilizada no presente estudo estima a capacidade antioxidante de um composto com base na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas na reação de lipoperoxidação espontânea do tecido cerebral. O homogenato de cérebro foi utilizado como um sistema modelo que representa a atividade antioxidante de compostos fenólicos sob estresse oxidativo.

Concentrações de 8 a 10 g/L de extrato líquido de sementes de *M. dubia*, obtido das condições otimizadas de extração, apresentaram alta inibição da peroxidação lipídica em cérebro de rato Wistar (IPL) (Figura 16). No entanto, com o aumento da concentração, de 12 a 25 g/L, foi observada redução da inibição. O extrato otimizado de camu-camu exibiu valor de IC<sub>50</sub> igual a 7,55 g/L. Em estudos anteriores, Pereira et al. (2014) relataram redução da peroxidação lipídica no fígado e soro de ratos após consumo de suco de frutas tropicais contendo camu-camu. Gonçalves et al. (2014) descobriram que o consumo de extratos de polpa congelada de camu-camu aumentou significativamente a atividade antioxidante plasmática em ratos diabéticos.

Em amostras de extrato otimizado de semente de *M. cauliflora*, as concentrações de 8 a 10 g/L de extrato líquido de sementes, obtido das condições otimizadas de extração, demonstraram elevada inibição da peroxidação lipídica quando comparado a concentrações acima de 12 g/L, concentrações que demonstraram menor inibição da peroxidação lipídica (Figura 16). O extrato exibiu valor de  $IC_{50}$  igual a 13,82 g de semente/L de solvente. De acordo com estudos realizados por Alezandro et al. (2013b), a suplementação diária de jabuticaba levou a uma diminuição da peroxidação lipídica no plasma e no cérebro de ratos. Além disso, ratos diabéticos que consumiram a fruta apresentaram maior atividade de superóxido dismutase no cérebro, catalase e glutathione peroxidase (GPx) nos rins e fígado, e GPx no plasma, quando comparados com o grupo controle.

**Figura 16** - Inibição da peroxidação lipídica (IPL) *ex vivo* em extratos de semente de camu-camu e jabuticaba



Esse é o primeiro trabalho que determina a inibição da peroxidação lipídica *ex vivo* em extratos de semente de camu-camu e jabuticaba. Os resultados encontrados podem ser concedidos pela presença de substâncias que inibem a peroxidação lipídica ao mesmo tempo que também atuam por meio do mecanismo de quelação de metais de transição e eliminação de radicais iniciadores (hidroxilas) ou produtos oxidativos já formados (peroxil, alcoxil) (KOLECKAR et al., 2008). Segundo Priyadarsini et al. (2002), o ácido elágico é capaz de inibir a peroxidação lipídica *in vivo* e a habilidade de eliminar radicais livres pode ser considerada um dos fatores



responsáveis por essa ação antioxidante. Outros estudos comprovaram que taninos hidrolisáveis e condensados (proantocianidinas) também podem ser responsáveis pela inibição da peroxidação lipídica *in vitro* (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; TURGUT et al., 2016).

### 5.3.3 Atividade antimicrobiana

Uma vez que extratos vegetais inibem bactérias patogênicas sem atingir bactérias probióticas benéficas, a atividade antimicrobiana torna-se uma propriedade favorável, trazendo diversos benefícios para a saúde. Essa ação biológica pode estar relacionada majoritariamente aos compostos fenólicos presentes, tais como quercetina, catequina, ácido gálico, ácido elágico, elagitaninos e proantocianidinas (RAUHA et al., 2000; SARAIVA et al., 2012; FUJITA et al., 2015; HACKE et al., 2016).

Amostras de extratos otimizados liofilizados de sementes de camu-camu e jabuticaba testadas, utilizando método de difusão em ágar, mostraram inibição do crescimento de todos os micro-organismos estudados (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*). Os resultados obtidos (Tabela 12) se referem ao halo de inibição obtido pela atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.

**Tabela 14** - Atividade antimicrobiana de extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba

| Micro-organismo                     | Controle positivo <sup>a</sup><br>(mm) | Extrato otimizado de<br>semente de camu-<br>camu (mm) | Extrato otimizado de<br>semente de jabuticaba<br>(mm) |
|-------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644) | 27.82±0.43                             | 8.58±0.82                                             | 8.87±0.49                                             |
| <i>P. aeruginosa</i> (IAL 1853)     | 10.86±1.51                             | 8,72±1.35                                             | 7.90±0.44                                             |
| <i>S. Typhimurium</i> (IAL 2431)    | 27.02±0.11                             | 6.42±1.00                                             | 9.79±0.73                                             |
| <i>S. Enteritidis</i> (S 2887)      | 23.67±1.59                             | 6.82±1.36                                             | 8.33±1.59                                             |
| <i>B. cereus</i> (IAL 55)           | 7.73±0.02                              | 9.04±1.36                                             | 8.07±0.96                                             |
| <i>E. coli</i> (IAL 2064)           | 18.83±1.69                             | 6.74±0.80                                             | 9.04±0.65                                             |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 13565)       | 7.86±0.58                              | 9.70±1.92                                             | 9.47±1.86                                             |
| <i>S. cerevisiae</i> (NCYC 1006)    | 7.65±0.27                              | 5.74±0.68                                             | 7.28±1.61                                             |

<sup>a</sup> Controle positivo foi feito com ampicilina (10 µg) para todas as cepas bacterianas. Controle negativo foi preparado com água estéril para todos os micro-organismos testados.

Em condições nas quais o extrato bruto está sendo analisado, interações sinérgicas entre diferentes classes de compostos fenólicos podem resultar em maior potencial antimicrobiano. Azevedo et al. (2014) determinaram a zona de inibição de resíduos de camu-camu contra *S. aureus* e resultados semelhantes foram encontrados (12 mm). Myoda et al. (2010) avaliaram o potencial antibacteriano de extrato metanólico de resíduos de camu-camu contra *S. aureus*, que resultou em 4,7 mm de zona de inibição em sementes e 3,8 mm, em cascas. De acordo com Caillet et al. (2012), bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, são mais sensíveis aos compostos fenólicos, os quais agem por meio de desestabilização da membrana celular, inibição de enzimas chave, bem como apresentam forte capacidade de ligação a metais. Por outro lado, Gram-negativas apresentam um sistema de bicamada lipídica na membrana celular, o que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2014b).

O extrato de sementes de jabuticaba demonstrou maior halo de inibição para *S. Typhimurium* e *S. aureus*. Segundo Hacke et al. (2016), extrato de sementes de jabuticaba também inibiu o crescimento de bactérias, tais como *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. aureus*, apresentando valores semelhantes ao presente estudo. Comparativamente, os mesmos autores verificaram que extrato perdeu sua atividade contra *S. Thyphimurium*, *P. aeruginosa*, e *L. monocytogenes* após passar pelo processo de purificação, sugerindo que interações sinérgicas podem contribuir para maior ação antibacteriana. Resíduos de jabuticaba (extrato aquoso), analisados por Silva et al. (2014a), apresentaram 11 mm de zona de inibição contra *S. aureus*, 9,8 mm contra *L. monocytogenes* e 10 mm contra *E. coli*, indicando valores semelhantes.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba podem atuar como possíveis agentes antimicrobianos naturais. Em comparação com a ampicilina (controle positivo), as amostras apresentaram valores semelhantes, em geral, e maior inibição do crescimento de *S. aureus* e *B. cereus*, constatando seu potencial de uso tecnológico.

### 5.3.4 Viabilidade celular

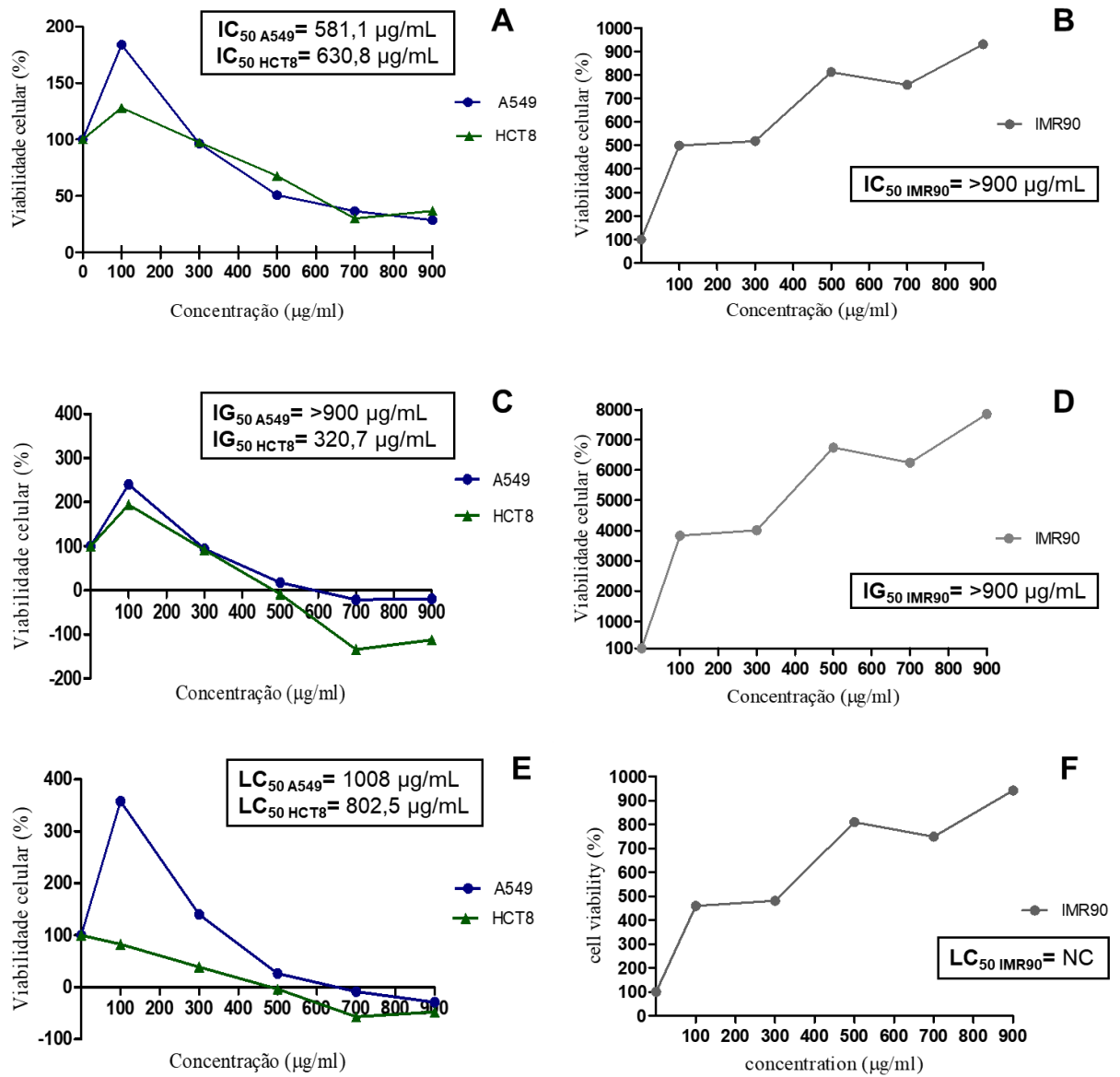
O efeito citotóxico de extratos otimizados liofilizados de semente de *M. dubia* e *M. cauliflora* foi avaliado em linhagens de células A549 (células epiteliais do adenocarcinoma pulmonar), HCT8 (células de carcinoma de cólon humano) e IMR90 (fibroblastos do pulmão humano). Os resultados do teste de viabilidade celular *in vitro* (IC<sub>50</sub>, IG<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub>) foram apresentados na Tabela 13 e Figuras 17 e 18.

**Tabela 15** – Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos otimizados liofilizados de sementes de camu-camu e jabuticaba

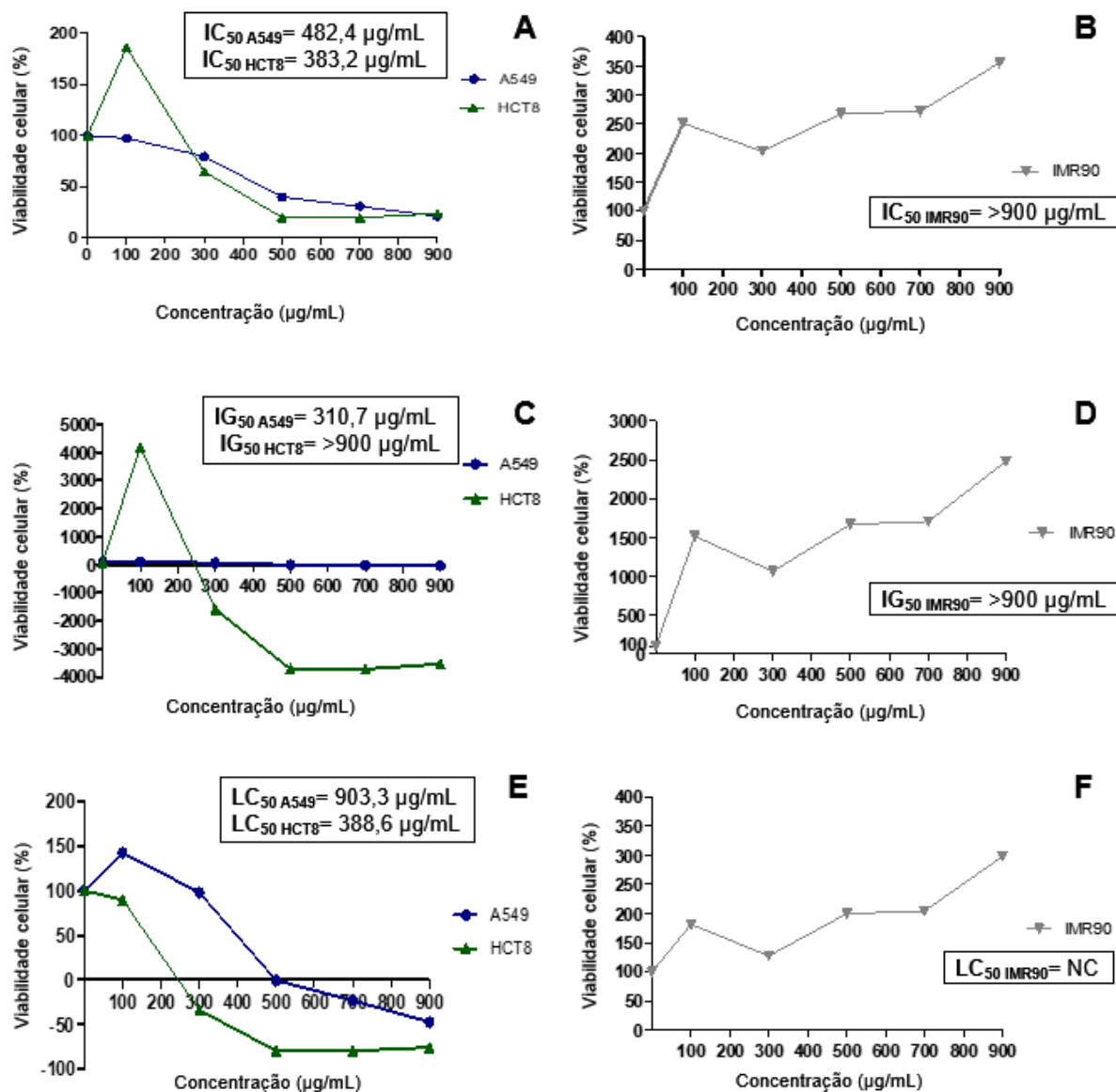
| Linhagens de células |                  | Extrato de semente de camu-camu | Extrato de semente de jabuticaba |
|----------------------|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| A549                 | IC <sub>50</sub> | 581,1                           | 482,4                            |
|                      | IG <sub>50</sub> | >900                            | 310,7                            |
|                      | LC <sub>50</sub> | 1008,0                          | 903,3                            |
| HCT8                 | IC <sub>50</sub> | 630,8                           | 383,2                            |
|                      | IG <sub>50</sub> | 320,7                           | >900                             |
|                      | LC <sub>50</sub> | 802,5                           | 388,6                            |
| IMR90                | IC <sub>50</sub> | >900                            | >900                             |
|                      | IG <sub>50</sub> | >900                            | >900                             |
|                      | LC <sub>50</sub> | NC                              | NC                               |

Nota: NC = Não Convergido. IC<sub>50</sub>: a concentração do agente que inibe o crescimento em 50% é a concentração em que  $(T/C) \times 100 = 50$ , em que T = número de células, no momento t de tratamento; C = células de controle no momento t de tratamento. IG<sub>50</sub>: a concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas, é a concentração na qual  $[(T - T_0)/(C - T_0)] \times 100 = 50$ , onde T e C são o número de células tratadas e controle, respectivamente, no tempo t de tratamento e T>T<sub>0</sub>; T<sub>0</sub> é o número de células no tempo zero. LC<sub>50</sub>: a concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% das células, em relação ao número no início do tratamento, é a concentração na qual  $[(T - T_0)/T_0] \times 100 = -50$ ; T<T<sub>0</sub>. Valores de IC<sub>50</sub>, IG<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> expressos em µg/mL.

**Figura 17-** Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de sementes de camu-camu



**Figura 18** - Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de sementes de jabuticaba



O extrato de semente de camu-camu apresentou efeito citotóxico e inibição da proliferação de ambas as linhagens de células cancerosas A549 e HCT8. Os resultados mostraram que foi necessária uma concentração de 581,8 µg/mL de extrato para inibir a multiplicação de metade das células A549 ( $IC_{50}$ ). Essa linhagem de células demonstrou comportamento mais resistente ao extrato, exibindo valores elevados de  $IG_{50}$  (>900 µg/mL), o que representa baixa citotoxicidade e atividade antiproliferativa, indicando que são necessárias concentrações muito altas para inibir a proliferação celular dessa linhagem de célula tumoral. Por outro lado, células HCT8 mostraram maior sensibilidade ao extrato, uma vez que apresentaram valores baixos

de  $IG_{50}$  (320,7  $\mu\text{g/mL}$ ), sugerindo considerável citotoxicidade e atividade antiproliferativa para essa linhagem de células cancerosas diante do extrato otimizado liofilizado de sementes de camu-camu.

De forma análoga, o extrato otimizado liofilizado de semente de jabuticaba exibiu citotoxicidade e inibição da proliferação de ambas as linhagens de células cancerosas. Os resultados mostraram que a concentração de 310,7  $\mu\text{g/mL}$  foi necessária para inibir o crescimento de metade das células A549 ( $IG_{50}$ ), o que sugere considerável citotoxicidade e ação antiproliferativa; enquanto que células HCT8 se mostraram mais resistentes ( $IG > 900 \mu\text{g/mL}$ ), apresentando menores efeitos citotóxicos. De modo geral, as células A549 e HCT8 revelaram comportamento semelhante e mostraram uma importante atividade antiproliferativa diante dos extratos, uma vez que foram obtidos valores relativamente baixos de  $IC_{50}$  (482,4 e 383,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

A figuras 17 e 18 demonstram um comportamento pró-carcinogênico em 100  $\mu\text{g/mL}$ , indicando, possivelmente, uma fase de adaptação das células frente aos extratos. Entretanto, em seguida foi observado um declínio, representando, portanto, um efeito carcinogênico.

Curiosamente, os extratos otimizados liofilizados de sementes de camu-camu e jabuticaba não inibiram o crescimento de células não cancerosas, IMR90 (Figura 17 e 18). Com base nesses resultados foi possível constatar que essas sementes mostraram certa seletividade para células cancerosas, visto que proporcionaram letalidade (conforme resultados de  $LC_{50}$ ) e inibição de proliferação em 50% ( $IC_{50}$ ) apenas de células cancerosas. Em contrapartida, estimularam a multiplicação de células saudáveis, não apresentando toxicidade.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram aos obtidos por Barros et al. (2015). O extrato aquoso de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) revelou efeito inibitório sobre o crescimento de diferentes linhas tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2). Por outro lado, o extrato não demonstrou toxicidade para células não tumorais (culturas primárias de células hepáticas, PLP2). Segundo Dias et al. (2014), o extrato aquoso polifenólico de açaí inibiu o crescimento de células de adenocarcinoma do cólon (SW-480 e HT-29) sem demonstrar toxicidade para as células fibroblásticas do cólon não malignas (CCD-18Co). Um estudo realizado por Silva et al. (2014b) mostrou redução da viabilidade celular de extrato hidroalcoólico de semente de açaí contra linhagens celulares de adenocarcinomas de

mama (MCF-7). Em comparação com outras partes do fruto estudadas, sementes demonstraram maior potencial citotóxico.

Esse é o primeiro estudo que reporta a proliferação de células humanas normais tratadas com extrato de semente de camu-camu e jabuticaba. Além disso, esses resultados estão relacionados ao extrato bruto, sem purificação, que corresponde a uma mistura complexa de polifenóis de camu-camu, podendo exercer efeitos sinérgicos em efeitos citotóxicos.

Extratos de sementes de camu-camu e jabuticaba revelaram efeitos citotóxicos, atividade antiproliferativa, atividade antioxidante química, inibição da peroxidação lipídica em sistema biológico e atividade antimicrobiana. A presença de elagitaninos na composição fenólica desses extratos vegetais pode estar associada às ações biológicas testadas, visto que suas funções já foram constatadas em estudos realizados anteriormente (LANDETE, 2011; ASCACIO-VALDÉS et al., 2011; FUJITA et al., 2015). Em conclusão, os extratos podem ser considerados potenciais agentes antimicrobianos. Os resultados obtidos sugerem uma possibilidade de uso tecnológico no desenvolvimento de alimentos potencialmente funcionais.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

- Os solventes água, álcool etílico e propanona expressaram forte efeito no rendimento da extração do conteúdo fenólico e atividade antioxidante de sementes de camu-camu. O sistema de solvente proposto na otimização foi composto por 43,3% de propanona, 40,7% de água e 16% de EtOH;
- Os solventes água e propanona foram cruciais para maximizar a extração dos polifenóis em sementes de jabuticaba (cv. Paulista). A melhor condição foi alcançada nas proporções de 52% de água e 48% de propanona;
- O uso da metodologia de superfície de resposta (MSR) mostrou-se adequado para avaliar os efeitos de três solventes na composição química (fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados) e atividade antioxidante (captura do radical DPPH•, atividade quelante frente ao íon  $\text{Cu}^{2+}$  e inibição da peroxidação lipídica) dos extratos vegetais. Os modelos foram considerados satisfatórios, obtendo-se  $R^2 > 0,95$  e  $R^2_{\text{ajustado}} > 0,93$  para camu-camu e  $R^2 > 0,80$  e  $R^2_{\text{ajustado}} > 0,77$  para jabuticaba;
- Os extratos otimizados de sementes de camu-camu e jabuticaba apresentaram elevado teor fenólico, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro*. Esses resultados podem ser utilizados em trabalhos futuros para isolamento dos constituintes químicos que estão associados ao potencial funcional dos extratos. Estudos *in vivo* devem ser realizados para corroborar as propriedades funcionais dos extratos de sementes.



## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto que camu-camu e jabuticaba são frutas reconhecidas pelo alto teor de compostos bioativos e propriedades antioxidantes, consideradas fontes alternativas de ingredientes funcionais, os extratos liofilizados das sementes dessas frutas poderão ser incluídos em produtos alimentícios, farmacêuticos e/ou cosméticos. Nesse aspecto, sugere-se:

Desenvolver nutracêuticos e/ou novos ingredientes com maior potencial funcional a partir de sementes de camu-camu e jabuticaba;

Avaliar a influência de outros compostos presentes em sementes de camu-camu e jabuticaba frente a atividade antioxidante, poder redutor e capacidade inibitória de enzimas digestivas;

Tendo em vista que os extratos revelaram atividade antimicrobiana, avaliar os efeitos sobre a flora intestinal (testes agudos e crônicos);

Avaliar efeitos protetores dos extratos sobre células normais do organismo, com base em outros métodos de análise, na tentativa de identificar efeitos positivos sobre a saúde;

Conduzir demais testes de toxicidade/proteção dos extratos em animais;

Avaliar parâmetros de tempo e temperatura na extração e definir as melhores condições do processo de extração;

Utilizar métodos de extração alternativos como extração assistida por ultrassom, micro-ondas, emprego de fluido supercrítico ou extração com uso de enzimas e verificar o impacto na composição química e potencial antioxidante dos extratos;

Os resultados deste estudo contribuem para incentivar e aumentar a produção, consumo e aproveitamento de subprodutos de camu-camu e jabuticaba cultivados em ambientes secos e seu uso como alternativa de alimento ou ingrediente promotores da saúde.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-87, 2012.
- AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; MUKHTAR, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- $\kappa$ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 423-433, 2005.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AIJN. **European Fruit Juice Association**. The Fruit Juice Industry: overall fruit juice consumption. Market Report, 2014.
- AKTER, M.; OH, S.; EUN, J.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1728-1732, 2011.
- ALBERTINO, A.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; GENZINI, L.; GOBETTO, R.; VINCENTI, M. Natural origin of ascorbic acid: validation by  $^{13}\text{C}$  NMR and IRMS. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 715-720, 2009.
- ALEZANDRO, M. R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparative analysis of chemical and phenolic composition of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 51, p. 468–477, 2013a.
- ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650-659, 2013b.
- ALEZANDRO, Marcela Roquim. Caracterização e biodisponibilidade de derivados de ácido elágico da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013b.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, C. M.; PRADO, G. M. do; MAGALHÃES, C.E. de C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.
- ALVES, A. P. C; MARQUES, T. R.; CARVALHO, T. C. L. de; PINHEIRO, C. M.; RAMOS, E.M.; CORRÊA, A.D. Elaboration and acceptability of restructured hams added with jaboticaba skin. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 37, n. 2, p. 0-0, 2017.

ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; GALEAZZI, M.A.M.; FERREIRA, S. A. N. Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and ripening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh) Fruits cultivated in the upland of Brazilian Central Amazon. In: **International Symposium on Tropical Fruits 370**, p. 177-180, 1995.

ARAÚJO, A. C. M. A.; MENEZES, E. G. T.; TERRA, A. W. C.; DIAS, B. O.; OLIVEIRA, E. R.; QUEIROZ, F. Bioactive compounds and chemical composition of Brazilian Cerrado fruits' wastes: pequi almonds, murici, and sweet passionfruit seeds. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2018.

AVAN, A. N., DEMIRCI ÇEKİÇ, S., UZUNBOY, S., & APAK, R. Spectrophotometric determination of phenolic antioxidants in the presence of thiols and proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1325, 2016.

AZEVEDO, J. C. S. de; FUJITA, A.; OLIVEIRA, E. L. de; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P.; Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**, v. 62, p. 934-940, 2014.

AZEVEDO, J. C. S. de; BORGES, K. C.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P.; VATTEM, D. A. Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. **Food Research International**, v. 73, p. 135-141, 2015.

AZEVEDO, L.; RIBEIRO, P. F. A.; OLIVEIRA, J. A. C.; CORREIA, M. G.; RAMOS, F. M.; OLIVEIRA, E. B.; BARROS, F.; STRINGHETA, P. C. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) from commercial cultivation has higher levels of bioactive compounds than native cultivation (Amazon Forest) and presents antimutagenic effects *in vivo*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, 2019.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. de; MINIM, P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARTOSZEK, M.; POLAK, J. A comparison of antioxidative capacities of fruit juices, drinks and nectars, as determined by EPR and UV-vis spectroscopies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 546-549, 2016.

BARROS, R. S.; FINGER, F. L.; MAGALHÃES, M. M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, n. 3-4, p. 209-215, 1996.

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; QUEIROZ, M. J. R. P.; SANTOS-BUELGA, S.; SANTOS, E. A.; REGIS, W. C. B.; FERREIRA, I. C. F. R. The powerful *in vitro* bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 318-322, 2015.

BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BERKER, K. I.; OZDEMIR, O. F. A.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783-4791, 2013.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, S.; HALLER, D.; KROKE, A.; LESCHIK-BONNET, E.; MÜLLER, M. J.; OBERRITER, H.; SCHULZE, M.; STEHLE, P.; WATZL, B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BORGES, L.; MARTINS, F. S.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Optimization of the spray-drying process for developing jabuticaba waste powder employing response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L. de; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378-383, 2004.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CAILLET, S.; CÔTÉ, J.; SYLVAIN, J.-F.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. **Food Control**, 23, 419–428, 2012.

CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 26-35, 2018.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, 343-656, 2010.

CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mcvaugh). **Revista Agro Ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2012.

CHANDA, S.; DAVE, R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996, 2009.

CHEMAT, F.; ZILL E, H.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A. (Ed.). Alternative solvents for natural products extraction. In: **Green Chemistry and Sustainable Technology**. Springer Berlin Heidelberg, ed. 1, p. 271-277, 2014.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019-1024, 2010.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In V. M. Lorian (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 739–788, 1991.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P. C.; KUPPUSAMY, U. R. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1092-1098, 2008.

DASGUPTA, A.; KLEIN, K. Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant Defense. In: \_\_\_\_\_. **Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease**, 1 ed. USA: Elsevier, p. 1-16, 2014.

DIAS, M. M. S.; NORATTO G.; MARTINO, H. S. D.; ARBIZU S.; PELUZIO, M. C. G.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutrition Cancer*, v. 66, n.8, p.1394-405, 2014.

DEAN, A.; VOSS, D.; DRAGULJIĆ, D. Response surface methodology. In: **Design and Analysis of Experiments**. Springer International Publishing, ed.2, p. 565-614, 2017.

DEL RIO, D.; RODRIGUES-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DERRINGER, G., SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DIAS, M. M. S.; NORATTO, G.; MARTINO, H. S. D.; ARBIZU, S.; PELUZIO, M. C. G.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394-1405, 2014.

DONG, Y., HUANG, H., ZHAO, M., SUN-WATERHOUSE, D., LIN, L., & XIAO, C. Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galangin and pinobanksin. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 26–36, 2016.

FAO. **FAO Statistical yearbook 2014**: Asia and the Pacific Food and Agriculture, 2014.

FAO. **OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations - Agricultural Outlook**, 144 p., 2015.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

FIDELIS, M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; CARMO, M. V.; AZEVEDO, L.; SILVA, M.C.; GRANATO, D. In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 479-490, 2018.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, , p. 1043-1048, 2011.

FRACASSETTI, D. COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and

antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 578-588, 2013.

FUJITA, A.; BORGES, K.; CORREIA, R.; FRANCO, B. D. G. M.; GENOVESE, M. I. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 495-500, 2013.

FUJITA, F.; SARKAR, D.; WU, S.; KENNELLY, E.; SHETTY, K.; GENOVESE, M. I. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. **Food Research International**, v. 77, p. 194-203, 2015.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.482, p. 419–425, 2017.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. D. S.; GONÇALVES, A. E. D. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.

GIRONI, F.; PIEMONTE, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 7, p. 857-862, 2011.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel Editora, ed. 12, 446 p., 1972.

GOMES, W. F.; TIWARI, B. K.; BARRAGÁN, O. R.; BRITO, S. de; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 218, p. 261-268, 2017.

GONÇALVES, A. E. D. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GONÇALVES, A. E. S.; LELLIS-SANTOS, C.; CURI, R.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE M. I. Frozen pulp extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. **Food research International**, v. 64, p. 1-8, 2014.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. de A. The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. In: GRANATO, D.; ARES, G., **Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology**, p. 1-18, 2014a.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A. A.; NUNES, D. S.; VAN RUTH, S. M. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10283-10296, 2014b.





GRANATO, D.; SANTO, J. S.; SALEM, R. D.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 1-7, 2017.

GUÉRAUD, F.; ATALAY, M.; BRESGEN, N.; CIPAK, A.; ECKL, P.M.; HUC, L.; JOUANIN, I.; SIEMS, W.; UCHIDA, K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, p.1098–1124, 2010.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v.23, p. 1719–1726, 2003.

HACKE, A. C. M.; GRANATO, D.; GALVÃO, L. M.; WEINERT, P. L.; PRADO-SILVA, L.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANA, A. S.; BATAGLION, G. A.; EBERLIN, M. N.; ROSSO, N. D. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 9, p. 2206-2217, 2016.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HANDA, C. L.; de LIMA, F.S.; GUELF, M. F. G.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2326-2331, 2012.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, p. 189-199, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.6, p. 1841–1856, 2005.

HUSSAIN, A.; CHATHA, S. A. S.; NOOR, S.; ARSHAD, M.; KHAN, Z. A.; RATHORE, H. A.; SATTAR, M. Z. Effect of extraction techniques and solvent systems on the extraction of antioxidant components from peanut (*Arachis hypogaea* L.) hulls. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 4, p. 890-896, 2012.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.

INOUE, T.; KOMODA, H.; UCHIDA, T.; NODE, K. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 127-132, 2008.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE.** Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes, v. 42, p.1-57, 2015, 2015.

KANESHIMA, T.; MYODA, T.; TOEDA, K.; FUJIMORI, T.; NISHIZAWA, M. Antioxidative constituents in camu-camu fruit juice residue. **Food Science and Technology Research**, v. 19, n. 2, p. 223-228, 2013.

KANESHIMA, T.; MYODA, T.; NAKATA, M.; FUJIMORI, T.; TOEDA, K. Antioxidant activity of C-Glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 76-81, 2016.

KARNOPP, A. R.; OLIVEIRA, K. G.; de ANDRADE, E. F.; POSTINGHER, B. M.; GRANATO, D. Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. **Food Chemistry**, v. 233, p. 401-411, 2017.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KERTON, F. M.; MARRIOTT, R. Alternative Solvents for Green Chemistry. **Royal Society of chemistry**, ed. 2, p. 153-155, 2013.

KIM, D.; SHIN, G.; KIM, J.; KIM, Y.; LEE, J.; LEE, J. S.; SONG, H.; CHOE, S. Y.; PARK, I.; CHO, J.; LEE, O. Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture. **Food Chemistry**, v. 194, p. 920-927, 2016.

KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 436-447, 2008.

LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.

ANGLEY, P. C.; PERGOLIZZI, J. V. J.; TAYLOR, R. J.; RIDGWAY, C. Antioxidant and Associated Capacities of Camu Camu (*Myrciaria dubia*): A Systematic Review. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 1, p. 8-14, 2015.

LAO, L., SHEN, J., TIAN, H., YAO, Q., LI, Y., QIAN, L., MURRAY, S. S., WANG, J. C. Secreted Phosphoprotein 24 kD Inhibits Growth of Human Prostate Cancer Cells Stimulated by BMP-2. **Anticancer Research**, v. 36, n. 11, p. 5773-5780, 2016.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVEZ, A. P. C.; ABREU, C. M. P. A. DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, n. 4, p. 416, 2008.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 517S-520S, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Editora Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, ed. 4, 2002.

LUCCI, P.; SAURINA, J.; NÚÑEZ, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2016.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amazônia**, v. 33, n. 3, p. 489-498, 2003.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARIKO, N.; HASSIMOTTO, A.; LAJOLO, F. M. Brazilian Native Fruits as a Source of Phenolic Compounds. In: **Global Food Security and Wellness**. Springer New York, p. 105-124, 2017.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397-C2403, 2015.

MARGRAF, T.; SANTOS, E. N. T.; DE ANDRADE, E. F.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145-155, 2016.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577–599, 2000.

MYODA, T.; FUJIMURA, S.; PARK, B.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWA, J.; NISHIZAWA, M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 304-307, 2010.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. John Wiley & Sons, ed. 4, 855 p., 2016.

NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 378-387, 2008.

PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; HARTMANN-SCHMIDLIN, S.; KÄHKÖNEN, M.; MÄTTÄ-RIIHINEN, K.; OKSMAN-CALDENTEY, M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 991-1000, 2005.

QUIDEAU, S.; VARADINOVA, T.; KARAGIOZOVAC, D. JOURDESB, M.; PARDONB, P.; BAUDRYB, C.; GENOVAC, P.; DIAKOV, T.; PETROVAC, R. Main Structural and Stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonahydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 2, p. 247-258, 2004.

QUIDEAU, S. **Chemistry and biology of ellagitannins - An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 374 p., 2009.

PEREIRA, A. C.; DIONÍSIO, A. P.; WURLITZER, N. J.; ALVES, R. E. A.; BRITO, E. S. de; SILVA, A. M. O.; BRASIL, I. M.; FILHO, J. M. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 157, p. 179-185, 2014.

PEREIRA, A. C. S.; WURLITZER, N. J.; DIONÍSIO, A. P.; SOARES, M. V. L.; BASTOS, M. S. R.; ALVES, R. E.; BRASIL, I. M. Synergistic, additive and antagonistic effects of fruit mixtures on total antioxidant capacities and bioactive compounds in tropical fruit juices. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 65, n. 2, 2015.

PEREIRA, L. D.; BARBOSA, J. M. G.; SILVA, A. J. R.; FERREIRA, P. H.; SANTOS, S. C. Polyphenol and ellagitannin constituents of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and chemical variability at different stages of fruit development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1209-1219, 2017.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1268-1272, 1977.

PRIYADARSINI, K. I.; KHOPDE, S. M.; KUMAR, S. S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2200-2206, 2002.

RAMIREZ-MARES, M. V., KOBAYASHI, H., DE MEJIA, E. G. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 269-278, 2016.

RAUHA, J. P., REMES, S., HEINONEN, M., HOPIA, A., KAHKONEN, M., KUJALA, T., PIJLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3–12, 2000.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIAN, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

ŘÍHA, M., KARLÍČKOVÁ, J., FILIPSKÝ, T., MACÁKOVÁ, K., ROCHA, L., BOVICELLI, P., SILVESTRI, I.P., SASO, L., JAHODÁŘ, L., HRDINA, R., MLADĚNKA, P. *In vitro* evaluation of copper chelating properties of flavonoids. **RSC Advances**, v. 4, p. 32628–32638, 2014.

RODRIGUES, R. B.; MENEZES, H. C. de; CABRAL, L. M. C.; DORNIER, M.; REYNES, M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Fruits**, v. 56, n. 5, p. 345-354, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, EDY. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2072-2075, 2011.

SAGAR, N.A., PAREEK, S., SHARMA, S., YAHIA, E.M., LOBO, M.G. Fruit and vegetable waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, n. 3, p. 512–531, 2018.

ŞAHİN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1056, 2017.

SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; AQUINO, C. F.; LINS, L. C. R. et al. Jabuticaba—*Myrciaria* spp. In: **Exotic Fruits**, p. 237-244, 2018.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, 2010.

SANTOS, J. S.; BRIZOLA, BRIZOLA, V. R. A.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515-522, 2017.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T. P.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C.; PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A. S.; AZEVEDO, L.; do CARMO, M. V.; GRANATO, D. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348-358, 2018.

SARAIVA, A. M.; SARAIVA, C. L.; GONÇALVES, A. M.; SOARES, R. R.; MENDES, F. O.; CORDEIRO, R. P.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 147–154, 2012.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492-501, 2007.

SCHWERTZ, M. C.; MAIA, J. R. P.; SOUSA, R. F. S. de; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O.; LIMA, E. S. Efeito hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2012.

SEABD. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento - Departamento de Economia Rural**. Análise da conjuntura agropecuária - Safra 2016/17, 2017.

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; BETTA, F. D.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649-656, 2018.

SETFORD, P. C.; JEFFERY, D. W.; GRBIN, P. R.; MUHLACK, R. A. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p.106-117, 2017.

SILVA, C. T. C.; ANDRADE, J. S. Postharvest modifications in camu-camu fruit (*Myrciaria dubia* McVaugh) in response to stage of maturation and modified atmosphere. **Acta Horticulturae**, v. 452, p. 23-26, 1997.

SILVA, Mariana Casagrande et al. Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 203-209, 2014a.

SILVA, D.F.; VIDAL, F.C.B.; SANTOS, D.; COSTA, M.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; MOURA, R.S. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. V. 14, p. 175–184, 2014b.

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

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press, 575 p. 2003.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SUGUINO, E.; ARAÚJO, P.S.R.; SIMÃO, S. Cultivo do Camu-camu (*Myrciaria dubia*). **ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação**, Série Produtor Rural, v. 16, p. 7-11, 2001.

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411–417, 2004.

TURGUT, S. S.; SOYER, A.; IŞIKÇI, F. Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 116, p. 126-132, 2016.

VIEIRA, V. B.; RODRIGUES, J. B.; BRASIL, C. C. B.; ROSA, C. S. da. Produção, caracterização e aceitabilidade de licor de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mcvaugh). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 519-22, 2010.

VIEIRA, V.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, O.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 341-352, 2017.

VILLACHICA L.H. **Frutales y Hortalizas Promisórios de la Amazônia**, Proyecto FAO/GCP/ RLA/118/NET, Lima, Peru: Tratado de Cooperacion Amazonica, Secretaria Pro-Tempore, 1996. 337 p., 1996.

WANG, P. ZHANG, Q.; WANG, Y.; WANG, T.; LI, X.; DING, L.; JIANG, G.. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 1, p. 43-48, 2010.

WIJEKOON, M. M. J. O.; BHAT, R.; KARIM, A. A.; Jeevani Osadee; BHAT, Rajeev; KARIM, Alias A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4, p. 615-619, 2011.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3135-3148, 2011.

WU, S.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513-7525, 2012.

WU, S.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148-159, 2013.

YAZAWA, K.; SUGA, K.; HONMA, A.; SHIROSAKI, M.; KOYAMA, T. Anti-inflammatory effects of seeds of the tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, p. 104–107, Tokyo, 2011.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2002.

YUYAMA, K. The camu-camu culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 335-690, 2011.

ZAPATA, S. M.; DUFOUR, J-P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: Chemical composition of fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, n. 3, p. 349-351, 1993.

ZHISHEN, J.; MENGEHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

ZHOU, K., YIN, J.J., YU, L.L. ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. **Food Chemistry**, v. 95, p. 446–457, 2006.

ZOU, Z.; WANPENG, X.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885-896, 2016.



**ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 047/2017****Protocolo UEPG – 19184/2017****Título – “Solicita 5 animais de descarte”****Interessado:** Daniel Granato ([granatod@gmail.com](mailto:granatod@gmail.com))**Data de Entrada – 26/10/2017****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – 17/11/2017 a 17/11/2019****Considerações**

Professor Daniel Granato (DEA):

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 5 ratos Wistar isogênicos de descarte.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais  
*Dra. Dionízia Xavier Scomparin*  
Coordenadora