



HENRIQUE SILVANO ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA PRESENÇA
DE OLIGOSSACARÍDEOS NA POLPA DE ARATICUM (*Annona
crassiflora* Mart.)**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

HENRIQUE SILVANO ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA PRESENÇA
DE OLIGOSSACARÍDEOS NA POLPA DE ARATICUM (*Annona
crassiflora* Mart.)**

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

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Henrique Silvano Arruda, e orientada pela Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2015

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

Ar69a Arruda, Henrique Silvano, 1991-
Avaliação da atividade antioxidante e da presença de oligossacarídeos na polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) / Henrique Silvano Arruda. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Glaucia Maria Pastore.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos fenólicos. 2. Flavonoides. 3. Prebióticos. 4. Frutas do cerrado. 5. Compostos bioativos. I. Pastore, Glaucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antioxidant activity and the presence of oligosaccharides in araticum pulp (*Annona crassiflora* Mart.)

Palavras-chave em inglês:

Phenolic compounds

Flavonoids

Prebiotics

Cerrado fruits

Bioactive compounds

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Glaucia Maria Pastore [Orientador]

Roberta Roesler

Mario Roberto Marostica Junior

Data de defesa: 16-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore
Orientadora
DCA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Gustavo Molina
Membro Titular
UFVJM

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
Membro Titular
DEPAN/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Membro Suplente
DCA/FEA/UNICAMP

Dr.^a Roberta Roesler
Membro Suplente
NATURA INOV. TEC. PROD. LTDA

RESUMO

Este estudo teve por objetivo determinar as melhores condições de obtenção de compostos fenólicos e oligossacarídeos a partir da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) liofilizada (PAL), bem como avaliar sua atividade antioxidante e quantificar seu conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FL) e oligossacarídeos. A otimização das variáveis temperatura de extração (X_1 : 25 - 75 °C) e concentração de etanol (X_2 : 0 - 70 %, v/v) na recuperação de CFT a partir da PAL foi realizada empregando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) por meio do método de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A eficiência do processo de extração foi monitorada ao longo do tempo e foi notado que as condições de equilíbrio foram atingidas entre 75 e 90 minutos. Os resultados sugeriram que as condições ótimas foram: concentração de etanol de 46 % (v/v) e temperatura de extração de 75 °C. Nas condições ótimas, o CFT experimental foi de $4,67 \pm 0,03$ g GAE.100 g⁻¹ PAL, que foi muito próximo ao valor predito ($4,41$ g GAE.100 g⁻¹ PAL). Dois métodos de extração foram utilizados na obtenção dos extratos para a determinação da atividade antioxidante e do conteúdo CFT e FL na PAL: um método clássico (extração sólido-líquido otimizado - E_{SL}) e outro moderno (extração assistida por ultrassom - E_{AU}). O extrato obtido pelo método E_{SL} apresentou os maiores conteúdos de CFT ($4,67 \pm 0,03$ g GAE.100 g⁻¹ PAL), FL ($4,00 \pm 0,15$ g CE.100 g⁻¹ PAL) e a maior atividade antioxidante para todos os ensaios realizados ($DPPH_{IC50} = 46,56 \pm 0,81$ µg.mL⁻¹; $DPPH_{Trolox} = 609,58 \pm 36,38$ µmol TE.g⁻¹ PAL; $TEAC_{ABTS} = 683,65 \pm 4,57$ µmol TE.g⁻¹ PAL e $ORAC_{FL-T} = 1.593,72 \pm 37,50$ µmol TE.g⁻¹ PAL). Os resultados sugerem que a elevada atividade antioxidante observada pode estar relacionada principalmente à presença de compostos fenólicos. A influência da concentração de etanol sobre a recuperação de oligossacarídeos da PAL foi avaliada utilizando quatro soluções hidroetanólicas (0, 20, 50 e 80 % de etanol, v/v) e foi observado que o sistema solvente contendo 50 % de etanol (v/v) apresentou a maior eficiência extratora. Em seguida, os conteúdos de mono- (frutose e glicose), di- (sacarose e maltose) e oligossacarídeos (fruto-, malto-, galacto- e xilo-oligossacarídeos) foram determinados por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência acoplada ao Detector Amperométrico Pulsado (CTAAE-DAP). Os resultados demonstraram que o fruto apresentou quantidades similares de frutose e glicose. Seis oligossacarídeos foram identificados: 1-cestose (GF_2), 1F-β-frutofuranosilnistose (GF_4), maltotriose (G_3), xilotriose (X_3), xilopentaose (X_5) e xilo-hexaose (X_6). Dentre os oligossacarídeos identificados, os maiores conteúdos foram observados para o GF_2 , ao passo que o GF_4 apresentou os menores conteúdos. O conteúdo de oligossacarídeos totais ($GF_2 + GF_4 + G_3 + X_3 + X_5 + X_6$) obtido foi de $6,842$ mg.g⁻¹ PAL. Assim, o araticum pode contribuir com a ingestão dietética de compostos antioxidantes e oligossacarídeos prebióticos. Além disso, o fruto pode ser explorado pelas indústrias de alimentos como um potencial ingrediente na formulação de alimentos funcionais.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, flavonoides, prebióticos, frutas do Cerrado, compostos bioativos, extração.

ABSTRACT

This study aimed to determine the best conditions to obtain phenolic compounds and oligosaccharides from the freeze-dried araticum pulp (*Annona crassiflora* Mart.) (FDAP), as well as to evaluate its antioxidant activity and to quantify the content of phenolic compounds (TPC), total flavonoids (FL) and oligosaccharides. The optimization of the variables extraction temperature (X_1 : 25 - 75 °C) and ethanol concentration (X_2 : 0 - 70 %, v/v) in the phenolic compounds (TPC) recovery from FDAP was performed using the Response Surface Methodology (RSM) by means of Central Composite Rotational Design (CCRD). The efficiency of the extraction process was monitored over time, and it was noted that the equilibrium conditions were reached between 75 and 90 minutes. Results suggested that the optimal conditions were: ethanol concentration of 46 % (v/v) and extraction temperature of 75 °C. In the optimum conditions, the experimental TPC was 4.67 ± 0.03 g GAE.100 g⁻¹ FDAP, which was very close to the value predicted by mathematical model (4.41 g GAE.100 g⁻¹ FDAP). Two extraction methods were conducted in order to obtain the extracts used to determine the antioxidant activity and the CFT and FL contents in PAL: a classical (optimized solid-liquid extraction - E_{SL}) and a modern method (ultrasound-assisted extraction - U_{AE}). The extract obtained by E_{SL} method presented the highest contents of TPC (4.67 ± 0.03 g GAE.100 g⁻¹ FDAP), FL (4.00 ± 0.15 g CE.100 g⁻¹ FDAP) and the highest antioxidant activity for all the performed assays (DPPH_{IC50} = 46.56 ± 0.81 µg.mL⁻¹; DPPH_{Trolox} = 609.58 ± 36.38 µmol TE.g⁻¹ FDAP; TEAC_{ABTS} = 683.65 ± 4.57 µmol TE.g⁻¹ FDAP and ORAC_{FL-T} = $1,593.72 \pm 37.50$ µmol TE.g⁻¹ FDAP). The results suggest that the high antioxidant activity observed may be related primarily to the presence of phenolic compounds. The influence of ethanol concentration on the recovery of the oligosaccharides from FDAP was evaluated using four hydroethanolic solutions (0, 20, 50 and 80 % ethanol, v/v) and it was observed that the solvent system containing 50 % ethanol (v/v) showed the highest extraction efficiency. Then, the contents of mono- (fructose and glucose), di- (sucrose and maltose), oligosaccharides (fructo-, malto-, galacto- and xylo-oligosaccharides) were determined by High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). The results demonstrated that the fruit contained similar amounts of fructose and glucose. Six oligosaccharides were identified: 1-kestose (GF_2), 1F-β-fructofuranosylnystose (GF_4), maltotriose (G_3), xylotriose (X_3), xylopentaose (X_5) and xylohexaose (X_6). Among the identified oligosaccharides, higher values concentrations were observed for GF_2 , whereas GF_4 was present in lower concentrations. The total oligosaccharides content ($GF_2 + GF_4 + G_3 + X_3 + X_5 + X_6$) obtained was 6.842 mg.g⁻¹ FDAP. Therefore, the araticum can contribute to the dietary intake of antioxidant compounds and prebiotic oligosaccharides. Moreover, the studied Cerrado fruit can be exploited by the food industry as a potential ingredient in the formulation of functional foods.

Keywords: Phenolic compounds, flavonoids, prebiotics, Cerrado fruits, bioactive compounds, extraction.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
AGRADECIMENTOS.....	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxvii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
OBJETIVOS	7
Objetivo Geral	7
Objetivos Específicos	7
CAPÍTULO 1.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1. Cerrado	9
2. Araticum (<i>Annona crassiflora</i> Mart.).....	11
3. Compostos Fenólicos.....	15
4. Atividade Antioxidante	24
5. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante	30
6. Oligossacarídeos	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 2..... 57

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) 57

RESUMO	59
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Soluções e reagentes químicos.....	64
2.2. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras.....	64
2.3. Procedimento de extração	65
2.4. Otimização dos parâmetros de extração.....	66
2.5. Análise dos dados.....	67
2.6. Validação do modelo.....	67
2.7. Determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) (<i>Folin-Ciocalteu Micro-Assay</i>)	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
3.1. Cinética de extração	69
3.2. Ajuste do modelo	72
3.3. Análise da superfície de resposta do CFT.....	75
3.4. Verificação do modelo preditivo.....	79
3.5. Comparação com outros métodos de extração.....	80
4. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

CAPÍTULO 3..... 89

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) 89

RESUMO	91
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95

2.1.	Soluções e reagentes químicos.....	95
2.2.	Matéria-prima, coleta e preparo das amostras.....	96
2.3.	Procedimento de extração	97
2.3.1.	<i>Extração sólido-líquido (E_{SL})</i>	97
2.3.2.	<i>Extração assistida por ultrassom (E_{AU})</i>	97
2.4.	Procedimentos analíticos.....	98
2.4.1.	<i>Determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) (Folin-Ciocalteu Micro-Assay)</i>	98
2.4.2.	<i>Determinação dos flavonoides totais (FL)</i>	99
2.4.3.	<i>Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•)</i> 99	
2.4.4.	<i>Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox ($TEAC_{ABTS}$)</i>	100
2.4.5.	<i>Capacidade de absorção do radical oxigênio ($ORAC_{FL}$)</i>	101
2.5.	Análise dos dados.....	102
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	103
3.1.	Conteúdo de compostos fenólicos (CFT) e flavonoides totais (FL)	103
3.2.	Atividade antioxidante	106
3.3.	Influência das condições de extração na quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante	115
4.	CONCLUSÃO.....	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

CAPÍTULO 4..... 125

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS NO FRUTO DO CERRADO ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) 125

RESUMO	127
1. INTRODUÇÃO.....	129
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	132
2.1.	Soluções e reagentes químicos..... 132
2.2.	Matéria-prima, coleta e preparo das amostras..... 132
2.3.	Procedimento de extração
2.4.	Determinação cromatográfica dos açúcares

2.4.1. Instrumentação e condições cromatográficas	134
2.4.2. Identificação e quantificação dos açúcares	134
2.5. Análise Estatística	135
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	137
3.1. Efeito de fatores únicos na extração de oligossacarídeos	137
3.1.1. Efeito do tempo de extração	137
3.1.2. Efeito da concentração de etanol	138
3.2. Quantificação de açúcares na polpa de araticum	141
4. CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
CONCLUSÕES GERAIS	151
PERSPECTIVAS FUTURAS	153

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Cora Coralina

Dedico

Primeiramente a Deus, pela presença constante em todos os momentos ao longo desta jornada, principalmente nos difíceis, que não foram poucos. Aos meus pais, João Batista Arruda e Leone Silvano da C. Arruda, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu vencesse mais esta etapa de minha vida. Aos meus irmãos, Rodrigo Silvano Arruda e Gabrielle Silvano Arruda, pela compreensão, amor e amizade. Vocês são sem dúvidas ESPECIAIS.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado força, saúde e coragem ao longo desta trajetória, não permitindo que eu desistisse deste sonho, mesmo em meio a tantas dificuldades. Por ter me iluminado nas escolhas mais difíceis, me guiando a trilhar o caminho mais correto possível e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais que me ajudaram de muitas formas na execução e conclusão desta dissertação. VOCÊ É O MAIOR MESTRE QUE ALGUÉM PODE CONHECER.

Aos meus pais, João Batista Arruda e Leone Silvano da C. Arruda, pelos imensuráveis esforços, por sempre terem acreditado no meu potencial, pelo amor e dedicação incondicional em todas as etapas de minha vida, sendo meu alicerce e de onde tirei forças para superar todos os obstáculos em busca desta vitória. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram, em muitos momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. A distância nestes últimos anos só nos aproximou ainda mais. A vocês não tenho e nunca teria palavras o suficiente para agradecer tudo o que fizeram e fazem por mim. ENFIM, ESTA VITÓRIA NÃO É SÓ MINHA, É NOSSA.

Aos meus irmãos, Rodrigo Silvano Arruda e Gabrielle Silvano Arruda, pela compreensão, amor e companheirismo em todos os momentos desta jornada. Obrigado por cada palavra doada, por cada minuto de atenção e por cada luta compartilhada. TEREI O PRAZER DE COMPARTILHAR DE SUAS VITÓRIAS UM DIA.

À minha orientadora, Prof. Dr.^a Glaucia Maria Pastore, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelos ensinamentos transmitidos, pela compreensão e por acreditar em meu potencial na execução deste projeto. HOJE POSSO DIZER QUE A MINHA FORMAÇÃO, INCLUSIVE PESSOAL, NÃO TERIA SIDO A MESMA SEM A SUA PESSOA.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior, Prof. Dr. Gustavo Molina, Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas e Dr.^a Roberta Roesler, pelo paciente trabalho de revisão da redação e pelas sugestões. VOCÊS CONTRIBUÍRAM DIRETAMENTE PARA A QUALIDADE FINAL DESTA DISSERTAÇÃO.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), pela oportunidade concedida e por fornecerem os recursos necessários para o desenvolvimento deste projeto. ESTA INSTITUIÇÃO FICARÁ MARCADA PARA SEMPRE NA MINHA HISTÓRIA E MEMÓRIA.

Aos meus companheiros de caminhada do Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos: Gustavo Araujo (Guga), Verônica Pavan (Veh), Maira, Nadir (Nadirzinho), Jane, Maysa, Renata Sancho, Iramaia (Angel), Ana Paula, Ana Simiqueli, Ana Stela, Leonardo (Leo), Murillo, Débora e Dora, por tornarem o ambiente mais agradável e descontraído.

Agradeço em especial ao meu eterno amigo Gustavo Araujo, companheiro de todos os momentos e irmão na amizade, com quem compartilhei várias horas de trabalho e aprendi muito, tanto pessoal quanto profissionalmente, ao longo destes anos de convivência. Muito obrigado pelos momentos de descontração, pelos conselhos, pela paciência, pelo auxílio, pelas conversas agradáveis e pela amizade verdadeira. Você fez parte da minha formação e vai continuar em minha vida com certeza. Deus lhe reserva um brilhante futuro. O MEU OBRIGADO É MUITO POUCO AMIGO, ENTÃO, A VOCÊ, TUDO DE MELHOR QUE O MUNDO PODE OFERECER.

E o que dizer de você Arícia Possas? Obrigado pela paciência, pelo incentivo, pela força, pela amizade, pelas horas de estudos compartilhadas, pelo auxílio durante a escrita desta dissertação, pela presença reconfortante nos momentos mais difíceis, pelas conversas divertidas, pelos sorrisos e principalmente pelo carinho. A VOCÊ MEU MUITO OBRIGADO, VOCÊ É UMA PESSOA ESPECIAL.

À minha inestimável amiga Verônica Pavan, pelos conhecimentos compartilhados, pelo auxílio e pelas risadas. Pessoa de grande coração. O SUCESSO TE AGUARDA.

À minha grande amiga Jane, pelos ensinamentos e momentos de descontração. SUA SIMPATIA É CATIVANTE.

Às minhas companheiras de mestrado Débora e Maira, pelo companheirismo, apoio e momentos de descontração. OBRIGADO.

À minha amiga Ana Stela, pelas suas histórias bizarras, certeza de boas risadas. POR FAVOR, ESCREVA UM LIVRO.

À minha querida amiga Martha Elisa, pelo auxílio, amizade e contribuições a este trabalho. Apesar da distância você sempre esteve presente. VOCÊ ME DÁ FORÇAS PRA SUPERAR MEUS LIMITES.

Ao meu amigo Henrique Delgado e sua família, pela confiança, amizade, passeios, conversas, estímulo, enfim por tudo. LEVO A AMIZADE DE VOCÊS.

À minha amiga Gisleine (Gi), a sua presença nas kitnets tornaram os dias mais agradáveis. Agradeço pelas várias risadas compartilhadas, pelas conversas e pela acolhida. VOCÊ É SINÔNIMO DE ALEGRIA.

À Angel, pelos ensinamentos, comprometimento, auxílio, paciência e confiança. O QUE SERIA DO LABORATÓRIO SEM VOCÊ?

Ao meu querido Nadir, por manter o laboratório sempre organizado, pelos momentos de descontração, conversas e conselhos de grande valor. O MUNDO PRECISA DE PESSOAS COMO VOCÊ.

Ao pessoal do vôlei, em especial ao Henrique Delgado (Xará), Pedro Bravo, Herivelton, Germano, Jaqueline (Jaque) e Camila Dourado, por serem meu desafogo, pelos vários momentos divertidos, pelas incontáveis risadas, pelo auxílio na adaptação à cidade e pela fuga da rotina compartilhada nos fins de semana. SEM VOCÊS MINHA ESTADIA AQUI NÃO SERIA A MESMA.

Agradecimentos

Ao meu tio Ademaro, por ter confiado em mim e não medido esforços para que eu pudesse me estabelecer aqui em Campinas. NUNCA ME ESQUECEREI DESSE ATO DE SOLIDARIEDADE.

Aos funcionários da FEA, em especial ao Cosme, Marquinhos, Geraldo e Bianca, pela atenção, disponibilidade, paciência e ajuda. VOCÊS FORAM FACILITADORES NA TRAJETÓRIA RUMO A ESTE SONHO.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante a realização do mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

O meu muito obrigado, sem todos vocês esta etapa não poderia ser concluída.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - *Annona crassiflora*. **A:** Árvore (**Foto:** Henrique Arruda); **B:** Tronco; **C e D:** Flores; **E:** Folhas; **F:** Fruto (**Fotos:** Maurício Mercadante).....12

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Figura 1 - Cinética de extração dos compostos fenólicos totais ao longo dos 90 minutos de extração para os 11 ensaios do planejamento experimental.....70

Figura 2 - Superfície de resposta (**A**) e curva de contorno (**B**) para CFT em função da temperatura e concentração de etanol.....75

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS NO FRUTO DO CERRADO ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.)

Figura 1 – Efeito do tempo de extração na eficiência de recuperação de oligossacarídeos na polpa de araticum. Valores marcados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0.05$).....138

Figura 2 - Efeito da concentração de etanol na eficiência de recuperação de oligossacarídeos na polpa de araticum para o tempo de 15 minutos de extração. Valores marcados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0.05$).....140

Figura 3 - Perfil CTAAE-DAP dos mono- e dissacarídeos (**A**), *FOS* e *MOS* (**B**) e *XOS* (**C**) extraídos da polpa de araticum nas melhores condições de extração (Etanol 50 % v/v, 50 °C e 15 minutos de extração). (*) Picos de possíveis oligossacarídeos não identificados pelo método.....145

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Atividades biológicas do araticum (<i>Annona crassiflora</i>).....	14
Tabela 2 - Estruturas e exemplos de algumas classes de compostos fenólicos.....	16
Tabela 3 - Compostos antioxidantes do araticum (<i>Annona crassiflora</i>).....	29
Tabela 4 - Diferentes métodos e seus princípios de ação utilizados na determinação da atividade antioxidante de componentes alimentares.....	33
Tabela 5 - Classes e características de alguns oligossacarídeos.....	39
Tabela 6 - Estratégias e exemplos de processos utilizados para obtenção de oligossacarídeos.....	42

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Tabela 1 - Planejamento experimental e valores experimentais e preditos para o conteúdo de fenólicos totais na polpa de araticum.....	71
Tabela 2 - Coeficientes de regressão e análise do modelo DCCR para a extração de compostos fenólicos da polpa de araticum (90 minutos de extração).....	73
Tabela 3 - ANOVA do modelo polinomial quadrático reduzido para otimização dos parâmetros de extração de compostos fenólicos da polpa de araticum (90 minutos de extração).....	74
Tabela 4 - Resumo de métodos de extração utilizados por diferentes pesquisadores para a extração de CFT da polpa de araticum.....	82

Capítulo 3 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.)

Tabela 1 - Relação de solventes utilizados na E_{AU} para cada método analítico.....98

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FL) na PAL.....104

Tabela 3 - Atividade antioxidante da PAL e dos principais compostos fenólicos antioxidantes.....107

Tabela 4 - Estrutura molecular dos padrões de referência analisados.....112

Tabela 5 - Condições do sistema extrator para os métodos de extração empregados.....115

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS NO FRUTO DO CERRADO ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.)

Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas na separação dos açúcares da PAL.....135

Tabela 2 - Dados da regressão linear e faixa de linearidade dos analitos investigados.....136

Tabela 3 - Composição e conteúdo de açúcares e oligossacarídeos separados via CTAAE-DAP na polpa de araticum.....143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(Fenol-MoW₁₁O₄)⁴⁻: Complexo de cor azul formado entre o molibdênio/tungstênio (Reagente de *Folin-Ciocalteu*) e compostos fenólicos.

[E:A]: Concentração de Etanol (% v/v, etanol:água)

[Fe³⁺-(TPTZ)₂]²⁺: Complexo ferroso 2,4,6-tripiridil-s-triazina

[Fe³⁺-(TPTZ)₂]³⁺: Complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina

¹O₂: Oxigênio Singlete

AAPH: 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina)-dihidroclorado

ABTS^{•+}: Radical Cátion 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A_{DPPH}: Absorbância da Solução de DPPH

A_{Extrato}: Absorbância da Amostra

AH: Antioxidante

AlCl₃(6.H₂O): Cloreto de Alumínio Hexahidratado

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOS: Arabino-oligossacarídeos

Ara: Arabinose

AUC: Curva de decaimento da fluoresceína ao longo do tempo

C. krusei: *Candida krusei*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

C: Catequina

CA: Coluna Analítica

CAT: Catalase

CE: Equivalentes de Catequina (*Catechin Equivalents*)

CFT (TPC): Compostos Fenólicos Totais (*Total Phenolic Compounds*)

CHOS: Quito-oligossacarídeos

CI: Corrida Isocrática

CoQH₂: Coenzima Q Reduzida

CR: Coeficiente de Regressão

CS: *Cleaning step*

CTAAE-DAP (HPAEC-PAD): Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência acoplada ao Detector Amperométrico Pulsado (*High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection*)

Cu⁺: Íon Cuproso

Cu²⁺: Íon Cúprico

CUPRAC: Poder Antioxidante de Redução do Íon Cúprico (Cu²⁺) (*Cupric Ions Reducing Antioxidant Power*)

CytB₅Rase: NADH:Citocromo b5 Redutase

DBB (BBD): Delineamento *Box–Behnken* (*Box–Behnken Design*),

DCC (CCD): Delineamento Composto Central (*Central Composite Design*)

DCCR (CCRD): Delineamento Composto Central Rotacional (*Central Composite Rotational Design*)

DCF: Diclorofluoresceína

DCFH-DA: Diclorofluorescina-Diacetato (*Dichlorofluorescin-Diacetate*)

DFCTN (TFFD): Delineamentos Fatoriais Completos com 3 Níveis (*Three-Level Full Factorial Designs*)

DMPD•⁺: Radical Cátion N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DPPH•: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPPH_{IC50}: Concentração final do extrato em µg/mL requerida para decrescer ou inibir 50 % da concentração inicial do radical DPPH•.

DPPH_{Trolox}: Atividade Sequestradora do Radical DPPH• Equivalente ao *Trolox*

DST's: Doenças Sexualmente Transmissíveis

EA: Extração Aquosa

E_{AU} (U_{AE}): Extração Assistida por Ultrassom (*Ultrasound-Assisted Extraction*)

EC: Epicatequina

ED: Detector Eletroquímico (Electrochemical Detector)

EGC: Epigallocatequina

EHE: Extração Hidroetanólica

Em.: Emissão

EP: Erro Padrão

ER: Erro Relativo

E_{SL}: Extração Sólido-Líquido (*Solid-Liquid Extraction*)

Est: Estaquiase

Ex.: Excitação

f₀: Fluorescência obtida no tempo 0

Fe[(CN)₆]₂: Complexo Fe²⁺-ferricianeto

Fe[(CN)₆]₃: Complexo Fe³⁺-ferricianeto

Fe²⁺: Íon Ferroso

Fe³⁺: Íon Férrico

Fe₄[Fe(CN⁻)₆]₃: Complexo Azul de *Prussian*

FeCl₃: Cloreto Férrico

f_i: Fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 1 e 80 minutos

FL: Flavonoides totais

FM: Fórmula Molecular

FOS: Fruto-oligossacarídeos

FRAP: Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrio (Fe^{3+}) (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*)

Fru: Frutose

FT: Fonte de Variação

G₃: Maltotriose

G₄: Maltotetraose

G₅: Maltopentaose

G₆: Malto-Hexaose

G₇: Malto-Heptaose

GAE: Equivalente de Ácido Gálico (*Gallic Acid Equivalents*)

Gal: Galactose

GalA: Ácido Galacturônico

GC: Galocatequina

GF₂: 1-kestose

GF₃: Nistose

GF₄: 1F-β-frutofuranosilnistose

GL: Gradiente Linear

GL: Graus de Liberdade

Glc: Glicose

GlcN: Glicosamina.

GlcNAc: N-Acetilglicosamina

GOS: Galacto-oligossacarídeos

GP: Grau de Polimerização

GPx: Glutationa Peroxidase

GR: Glutationa Redutase

GRAS: Geralmente Reconhecido como Seguro (*Generally Recognized as Safe*)

GSH: Glutationa Reduzida

GSSG: Glutationa Oxidada

GTO: Gentio-oligossacarídeos

H: Hidrofílico

H•: Átomo de Hidrogênio

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

HCl: Ácido Clorídrico

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (*High-Density Lipoprotein*)

HNO₂: Ácido Nitroso

HO₂•: Radical Peroxila

HOCl: Ácido Hipocloroso

Imal: Isomaltotriose

IMOS: Isomalto- oligossacarídeos

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

K: Kaempferol

K₂S₂O₈: Persulfato de Potássio

KMBA: α -ceto- γ -ácido metiolbutírico

L. chagasi: *Leishmania chagasi*

L. infantum: *Leishmania infantum*

L. major: *Leishmania major*

L: Lipofílico

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low-Density Lipoprotein*)

LIF: Ligações Indicativas de Função

m.f.: Matéria fresca

m.s.: Matéria Seca

M: Miricetina

Mal: Maltose

MaOS: Manano-oligossacarídeos

MDA: Malonaldeído

MNPCE: Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (*Micronucleated Polychromatic Erythrocytes*)

MOS: Malto-oligossacarídeos

MSR (RSM): Metodologia de Superfície de Resposta (*Response Surface Methodology*)

M^{x+}: Íons Metálicos

n.a.: não disponível

N₂O₃: Óxido Nitroso

Na₂CO₃: Carbonato de Sódio

Na₂WO₄/Na₂MoO₄: Complexo de cor amarela formado entre o molibdênio e tungstênio no Reagente de *Folin-Ciocalteu*

NADPH/NADP⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NaNO₂: Nitrito de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NAUC: Área Útil, calculada pela diferença entre as AUC do extrato e do branco

NBT: Nitroazul de Tetrazólio

NO•: Radical Óxido Nítrico

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

NQO1: NADPH:Quinona Aceptor Oxidorredutase

O₂: Oxigênio Molecular

O₂•⁻: Radical Superóxido

OH•: Radical Hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORAC_{FL}: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

ORAC_{FL}-H: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio da Fração Hidrofílica

ORAC_{FL}-L: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio da Fração Lipofílica

ORAC_{FL}-T: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio Total

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (*Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*)

p.a.: Padrão Analítico

PAL (FDAP): Polpa de Araticum Liofilizada (*Freeze-Dried Araticum Pulp*)

PC: Pré-Coluna

PM: Peso Molecular.

POS: Oligossacarídeos Pécicos

Q: Quercetina

QM: Quadrado Médio

R•: Radical Livre

R²: Coeficiente de Determinação

RAE: Equivalente de Atividade de Retinol (*Retinol Activity Equivalents*)

Raf: Rafinose

RE: Re-equilíbrio

R_{FL-CFT}: Relação entre o conteúdo de flavonoides totais e compostos fenólicos totais

RFO: Oligossacarídeos da Família da Rafinose

RH: Radical Livre Reduzido

RMCD: β-Ciclodextrina Metilada Randomizada

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species*)

RO•: Radical Alcoxila

ROH: Álcool

RONOO: Alquil Peroxinitrato

ROOH: Hidroperóxido

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

R_{SS}: Relação solvente-sólido

Sac: Sacarose

SBox: S-benzoxazolil

SCN⁻: Tiocianato

SIN-1: 3-N-morfolinosidnonimina etilcarbamida

SOD: Superóxido Dismutase

SOS: Oligossacarídeos de Soja

SQ: Soma de Quadrados

STaz: S-tiazolinil

T: Temperatura (°C)

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TE: Equivalentes de *Trolox* (*Trolox Equivalents*)

TEAC_{ABTS}: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TMSOTf: Trimetilsililtrifluormetanossulfonato

TOSCA: Capacidade Total de Sequestro de Oxirradical (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*)

TRAP: Capacidade Antioxidante Total (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*)

Trolox: Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico

TrxRs: Tioredoxina Redutase

UV: Ultravioleta

VP: Valor Predito

X₁: Xilose

X₂: Xilobiose

X₃: Xilotriose

X₄: Xilotetraose

X₅: Xilopentaose

X₆: Xilo-Hexaose

XOS: Xilo-oligossacarídeos

Xyl: Xilose

INTRODUÇÃO GERAL

O tema nutrição tem despertado um progressivo interesse não só por parte da comunidade científica, mas também da sociedade em geral (MUZQUIZ *et al.*, 2012). Atualmente um número crescente de pessoas busca prevenir doenças e atingir um melhor estado de saúde por meio da modificação de seus hábitos alimentares e do estilo de vida (DI BARTOLOMEO; STARTEK; VAN DEN ENDE, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS): “*A saúde é um estado de bem-estar físico, mental e social completo e não meramente a ausência de doença ou enfermidade*” (WHO, 1948).

Os consumidores estão mais conscientes da relação entre dieta, saúde e prevenção de doenças e, dessa forma, esperam que os alimentos que ingerem sejam, além de saborosos e atrativos, também seguros e saudáveis a fim de melhorar seu bem-estar físico e mental (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009; CORRADINI; LANTANO; CAVAZZA, 2013). Neste contexto, há um crescente interesse nos chamados “alimentos funcionais”, que são definidos como alimentos naturais ou processados, consumidos como parte da dieta habitual que, além da função básica de nutrir, contêm conhecidos compostos biologicamente ativos que, quando administrados em quantidade e qualidade definidas, fornecem benefícios à saúde clinicamente comprovados e documentados (DI BARTOLOMEO; STARTEK; VAN DEN ENDE, 2013). Sendo assim, estes alimentos são uma importante fonte na prevenção, gerenciamento e tratamento de doenças crônicas, no controle da obesidade e da função imune e na modulação da taxa de envelhecimento por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A crescente demanda pelos alimentos funcionais pode ser explicada pelo aumento constante da expectativa de vida, paralelo ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, à redução do risco de doenças por meio da prevenção e à melhoria da qualidade de vida e bem-estar, que contribuem para o aumento da longevidade saudável (SAAD, 2006; CORRADINI; LANTANO; CAVAZZA, 2013).

Os alimentos funcionais compreendem: (i) os alimentos convencionais com substâncias bioativas que ocorrem naturalmente (por exemplo, fibra dietética), (ii) os alimentos enriquecidos com substâncias bioativas (por exemplo, probióticos e antioxidantes), e (iii) os ingredientes alimentares sintéticos introduzidos nos alimentos tradicionais (por exemplo, prebióticos). Dentre os componentes funcionais destacam-se os probióticos e prebióticos (oligossacarídeos), fibras solúveis, ômega-3, ácidos graxos poli-insaturados, ácido linoleico conjugado, compostos antioxidantes, vitaminas e minerais, algumas proteínas, peptídeos e aminoácidos, bem como fosfolípidios (GRAJEK; OLEJNIK; SIP, 2005; AL-SHERAJI *et al.*, 2013).

Perspectivas promissoras para a exploração de frutos tropicais não tradicionais se devem aos teores consideráveis de vitamina C, antocianinas, carotenoides e compostos fenólicos, além de sua atividade antioxidante (CAMPOS *et al.*, 2012). As frutas e sementes exóticas podem ser alternativas de matéria-prima em quantidades viáveis para processos industriais, além de possíveis fontes de nutrientes e compostos bioativos, impulsionando o interesse em sua composição (LUZIA; JORGE, 2013).

Por enfrentarem a estação da seca, permanecendo de dois a seis meses sem chuva, a flora do Cerrado desenvolveu muitas adaptações para resistir ao sol, às secas e as consequentes queimadas. Quando as plantas são submetidas a elevadas temperaturas e prolongada incidência de luz, há uma tendência de que estas aumentem a síntese e a atividade de enzimas e compostos antioxidantes a fim de captar radicais livres que tipicamente são produzidos nessas condições e que são tóxicos às membranas celulares. Estes compostos provenientes do metabolismo de tais plantas podem prevenir ou retardar o desenvolvimento de várias doenças, o que pode explicar seus diversos usos na medicina popular (ROESLER, 2007).

A flora do Cerrado possui diversas espécies frutíferas com grande potencial de utilização agrícola e/ou econômica, pois possuem altos teores de açúcares, proteínas, ácidos graxos, sais minerais, carotenoides e vitaminas (principalmente do complexo B) (VERA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008). Intensa investigação e o aumento do consumo destas frutas

têm sido estimulados pelo crescente interesse mundial em suas propriedades funcionais, atribuídas à presença de substâncias bioativas que, mesmo em pequenas quantidades, propiciam efeitos benéficos à saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2011). Porém, poucos estudos objetivaram avaliar a atividade antioxidante e prebiótica dos frutos deste bioma (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é um fruto típico do Cerrado brasileiro e está entre as 20 espécies mais utilizadas na alimentação regional (CAVALCANTE *et al.*, 2008), apresentando diversas aplicações na medicina popular. Suas folhas, casca do tronco, frutos e sementes podem ser utilizados no tratamento de feridas, doenças sexualmente transmissíveis (DST's), acidentes ofídicos, doenças degenerativas como *Parkinson* e *Alzheimer*, no combate aos piolhos, como antimicrobiano, antidiarreico, antitumoral e antirreumático. Além disso, sua polpa é rica em carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais (DRAGANO *et al.*, 2010).

Embora estes frutos sejam muito utilizados pela medicina popular, existem poucos estudos científicos que avaliaram a relação entre as atividades biológicas e seus usos etnobotânicos a fim de validá-los (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010).

Neste contexto, este estudo tem por objetivo determinar as melhores condições de obtenção de compostos fenólicos e oligossacarídeos a partir da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), assim como avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos por meio de diferentes métodos antioxidantes *in vitro*. A metodologia empregada consiste em uma estratégia de planejamento experimental, na qual foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização das condições de extração (temperatura e concentração de solvente) dos compostos fenólicos. Posteriormente, foram realizados ensaios antioxidantes e a determinação dos oligossacarídeos presentes nestes frutos a fim de estimar sua aplicabilidade como uma fonte sustentável de antioxidantes e prebióticos em cosméticos, alimentos e fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHERAJI, S. H. *et al.* Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.

CAMPOS, R. P. *et al.* Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 41–49, 2012.

CAVALCANTE, T. R. M. *et al.* Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 235–240, 2008.

CORRADINI, C.; LANTANO, C.; CAVAZZA, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 13, p. 4591–4605, 2013.

DI BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J. B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 10, p. 1457–1473, 2013.

DRAGANO, N. R. V. *et al.* Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319–325, 2010.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 665–671, 2005.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231–235, 2013.

MUZQUIZ, M. *et al.* Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 227–244, 2012.

OLIVEIRA, M. E. B. DE *et al.* Características químicas e físico-químicas de pequis da Chapada do Araripe, Ceará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 114–125, 2010.

OLIVEIRA, M. N. DE *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, v. 38, n. 1, p. 1–21, 2002.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435–441, 2009.

ROCHA, W. S. *et al.* Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

ROESLER, R. **Estudo de frutas do cerrado brasileiro para avaliação de propriedade funcional com foco na atividade antioxidante**. 218 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814–821, 2010.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SILVA, M. R. *et al.* Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790–1793, 2008.

SIQUEIRA, E. M. DE A. *et al.* Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 1-7, 2013.

VERA, R. *et al.* Caracterização física de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 71–79, 2005.

WHO. Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference. **Official Records of the WHO**, n. 2, p. 100, 1948.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo determinar as melhores condições de obtenção de compostos fenólicos e oligossacarídeos a partir da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), assim como avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos para o conhecimento do potencial deste fruto.

Objetivos Específicos

- Estudar os parâmetros de extração dos compostos bioativos;
- Obter as condições ótimas de extração de compostos fenólicos presentes na polpa de araticum empregando a MSR por meio do método de DCCR;
- Quantificar os compostos fenólicos (método *Folin-Ciocalteu*) e os flavonoides totais (método colorimétrico) dos extratos da polpa de araticum;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos por meio dos métodos DPPH (Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e ORAC_{FL} (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*);
- Avaliar a influência do solvente extrator sobre o conteúdo de mono-, di- e oligossacarídeos;
- Identificar e quantificar mono-, di- e oligossacarídeos por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência acoplada ao Detector Amperométrico Pulsado (CTAAE-DAP);
- Correlacionar os resultados obtidos com os usos etnobotânicos do araticum.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cerrado

O Cerrado é o bioma mais característico do Brasil ocupando aproximadamente 2 milhões de km² (cerca de 25 % do território nacional), abrangendo áreas de 13 estados e do Distrito Federal, sendo que, cerca de 90 % de suas áreas estão situadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Bahia. Por ocupar a região Central do Brasil, conecta-se com quatro dos seis biomas brasileiros, dentre eles a Mata Atlântica a sudeste e a Floresta Amazônica ao norte, sendo composto por onze fitofisionomias com formações campestres mais abertas até formações florestais com dossel fechado. Este bioma ainda constitui uma grande fonte natural de recursos biológicos, apresentando fauna e flora diversificada e sendo considerado o segundo maior bioma do país, superado apenas pela Floresta Amazônica (SILVA *et al.*, 2009; MIGUEL *et al.*, 2011; ARRUDA; CRUZ; ALMEIDA, 2012).

Suas espécies abrangem cerca de 30 % do total existente no Brasil, porém o conhecimento sobre suas plantas e animais ainda é escasso (MARIANO; COURI; FREITAS, 2009). Neste bioma encontra-se cerca de 1.000 espécies de árvores, 3.000 de ervas ou arbustos e quase 5.000 trepadeiras (LAGE, 2011). Algumas são usadas como alimento, remédio, material para confecção de artesanato ou para fins ornamentais (SILVA; JÚNIOR; FERREIRA, 2008).

A vegetação é caracterizada por árvores de pequeno porte, retorcidas, distribuídas em um tapete graminoso, podendo ocorrer em algumas áreas formações rasteiras de gramíneas e ciperáceas, enquanto a fauna é constituída na sua maioria por insetos, aves,

roedores, répteis, caninos e felinos (BRAGA FILHO *et al.*, 2009; ÁVILA; OLIVEIRA; ASCHERI, 2010).

O Cerrado é considerado um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo (LIMA *et al.*, 2012b). No entanto, sua ocupação e utilização têm sido realizadas de forma desordenada, sem o conhecimento necessário sobre o uso e o comportamento da maioria das espécies nativas desta região. Estima-se que nos últimos anos, cerca de 40 a 70 % da cobertura original do Cerrado tenha sido suprimida para a agricultura e pecuária, uso urbano e extração mineral. Com isso um grande número de espécies frutíferas tornou-se extintas, o que impossibilita o conhecimento, a preservação ou a utilização de suas características (MARIANO-DA-SILVA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2012a).

O Cerrado é rico em espécies frutíferas nativas, sendo que 44 % de todas as plantas nele encontradas são endêmicas, com destaque para o araticum (*Annona crassiflora* Mart.), o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), a cagaita (*Eugenia dysenterica* D.C.), o caju arbóreo do Cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz), a mangaba (*Hancornia spenciosa* Gomez) e a gabioba (*Campomanesia cambessedeanana* Berg.) (BRAGA FILHO *et al.*, 2014). Muitas destas constituem fontes em potencial de exploração econômica, uma vez que apresentam elevados teores de açúcares, proteínas, ácidos graxos, sais minerais, carotenoides e vitaminas (SILVA *et al.*, 2008).

O aproveitamento dos frutos do Cerrado dá-se desde os primórdios da ocupação desta região, sendo que seu consumo foi iniciado pelos índios e exerceu um importante papel para a sobrevivência dos primeiros desbravadores e colonizadores da região. A incrementação desses frutos na culinária vem despertando a atenção de vários seguimentos da sociedade, dentre os quais se destacam agricultores, indústrias, instituições de pesquisa e órgãos de saúde. Atualmente, as mais de 58 espécies de frutas nativas do Cerrado utilizadas pela população apresentam um elevado valor nutricional, além de oferecerem atrativos sensoriais como cor, sabor e aroma peculiares e intensos (ARRUDA; CRUZ; ALMEIDA, 2012).

A exploração econômica do Cerrado tem sido possibilitada pelo desenvolvimento de pesquisas e tecnologias voltadas para este ecossistema, tornando-o uma das áreas mais importantes na produção de alimentos do Brasil. Além disso, observa-se uma atenção especial voltada para o melhor aproveitamento das frutíferas nativas com o intuito de preservá-las e utilizá-las de forma racional e sustentável (QUEIROZ, 2011). Entretanto, os dados disponíveis quanto à caracterização e aplicação tecnológica destes frutos ainda são muito restritos, ressaltando-se a urgente necessidade do desenvolvimento de pesquisas científicas para que se possa determinar o potencial dos mesmos.

2. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.)

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.), conhecido popularmente como bruto, cabeça-de-negro, cascudo, panã, marolo e pinha-do-Cerrado, pertence à família *Annonaceae* (BRAGA FILHO *et al.*, 2009; ÁVILA; OLIVEIRA; ASCHERI, 2010). Este fruto encontra-se amplamente distribuído no Cerradão, Cerrado *stricto sensu* e Campo Rupestre, abrangendo os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (SILVA; GOMES; MARTINS, 2009; COTA *et al.*, 2011). Além disso, está entre as 20 espécies mais utilizadas na alimentação regional (CAVALCANTE *et al.*, 2008), sendo consumido *in natura* ou sob a forma de doces, geleias, sucos, licores, tortas, pães, bolos, iogurtes e sorvetes (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2007; MUNDIM, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A planta é hermafrodita, decídua (perde as folhas parte do ano) e xerófita (possui mecanismos anatomo-fisiológicos para restringir a perda de água), com 6 a 8 m de altura por 2 a 4 m de copa, produzindo de 30 a 80 frutos por planta (Figura 1A) (PIRES, 2011). O tronco é geralmente tortuoso, variando de 20 a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa resistente a ação do fogo (Figura 1B). Suas flores geralmente são solitárias e axilares, apresentando coloração esverdeada ou branco-amarelada com pétalas engrossadas e carnosas (Figuras 1C e 1D). As folhas são crasso-membranosas, coriáceas

quando maduras e ferrugineo-hirsutas quando jovens, sendo dispostas de forma intercalada na posição horizontal ao longo dos ramos (Figura 1E) (SILVEIRA, 2014).



Figura 1 - *Annona crassiflora*. A: Árvore (**Foto:** Henrique Arruda); **B:** Tronco; **C e D:** Flores; **E:** Folhas; **F:** Fruto (**Fotos:** Maurício Mercadante).

Os frutos apresentam formato oval e arredondado, superfície tomentosa de cor verde no fruto em desenvolvimento e marrom quando maduro (Figura 1F). As dimensões dos frutos podem variar de 9 a 15 cm de comprimento e de 10 a 15 cm de diâmetro, pesando de 500 g a 4,5 kg, com densidade de $1,09 \text{ g.cm}^{-3}$. Possuem um grande número de sementes, variando de 70 a 190, as quais apresentam coloração marrom-escura e formato obovoide-achatada medindo de 10 a 13 mm por 20 a 27 mm (BRAGA FILHO *et al.*, 2007; ÁVILA; OLIVEIRA; ASCHERI, 2010; LAGE, 2011). A polpa é levemente doce, com um aroma agradável e a coloração varia do branco ao amarelo (DAMIANI *et al.*, 2011). A floração acontece principalmente nos meses de setembro a novembro, a frutificação a partir de dezembro e a colheita dos frutos maduros de fevereiro a abril (SILVA; GOMES; MARTINS, 2009).

O fruto do araticum apresenta rendimentos médios de $40 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de casca, $51 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de polpa e $9 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de sementes, sendo um fruto de alto valor nutricional, uma vez que sua polpa é rica em carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides, lipídeos, fibras e algumas vitaminas e minerais (DRAGANO *et al.*, 2010; DAMIANI *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, o araticum é utilizado pela medicina popular no tratamento de feridas, doenças sexualmente transmissíveis (DST's), acidentes ofídicos e doenças degenerativas como *Parkinson* e *Alzheimer*, sendo usado também no combate aos piolhos, como antimicrobiano, antidiarreico, antitumoral e antirreumático (VILAR *et al.*, 2008; DRAGANO *et al.*, 2010). A infusão das folhas e das sementes trituradas é usada no combate à diarreia e como indutor da menstruação. As sementes trituradas misturadas com óleo são empregadas contra parasitas do couro cabeludo e micoses sistêmicas, além de serem usadas como inseticidas (MARTINS, 2006; ROESLER, 2007; MUNDIM, 2008; COTA *et al.*, 2011). A ampla utilização desta espécie pela medicina popular tem estimulado estudos científicos que visam examinar a relação entre as atividades biológicas e os usos etnobotânicos a fim de validá-los, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividades biológicas do araticum (*Annona crassiflora*).

Atividade biológica	Exemplos	Referências
Atividade antimalárica	Frações das folhas ricas em flavonoides e alcaloides reduziram a parasitemia de <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos e aumentaram seu tempo de vida após o tratamento.	Pimenta <i>et al.</i> (2014)
Atividade antimicrobiana	Extratos etanólicos das folhas inibiram o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> .	Lage <i>et al.</i> (2014)
	Extratos etanólicos do tronco, folhas e frações do fruto (casca, polpa e semente) inibiram o crescimento de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina (ORSA) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538.	Silva <i>et al.</i> (2014)
	Atividade fungicida contra estirpes de <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> foi observada em extratos etanólicos das folhas.	Silva <i>et al.</i> (2001)
Atividade inseticida	Extratos das sementes apresentaram atividade ninficida sobre ninfas de percevejo-do-colmo do arroz (<i>Tibraca limbativentris</i>).	Krinski & Massaroli (2014)
	Atividade larvicida contra o <i>Aedes aegypti</i> foi observada em extratos etanólicos da casca da raiz, raiz e tronco.	Rodrigues <i>et al.</i> (2006); Omena <i>et al.</i> (2007)
Atividade antiprotozoária	O óleo essencial das folhas foi ativo contra <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. major</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Oliani <i>et al.</i> (2013)
	Extratos etanólicos do tronco, raiz e casca da raiz da planta inibiram o crescimento de <i>Leishmania donovani</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Mesquita <i>et al.</i> (2005)
	Extratos das folhas apresentaram atividade antiparasitária contra <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Tempone <i>et al.</i> (2005)
Atividade moluscicida	Extratos etanólicos do tronco, casca das raízes e da polpa e semente dos frutos mostraram atividade contra os ovos e caracóis adultos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> .	Santos & Sant'Ana (2001)
Atividade herbicida	As substâncias estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado, isoladas no extrato bruto de acetato de etila das sementes reduziram o desenvolvimento de radícula e hipocótilo de amendoim-bravo (<i>Euphorbia heterophylla</i>).	Inoue <i>et al.</i> (2010)
Atividade antioxidante	Extratos etanólicos da casca e semente preveniram a peroxidação lipídica, o aumento de equivalentes de glutatona e o decréscimo da atividade das enzimas hepáticas catalase em ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl ₄).	Roesler (2011)
	Extratos da casca, semente e polpa inibiram a peroxidação lipídica de microsomos do fígado de ratos.	Roesler <i>et al.</i> (2006); Roesler <i>et al.</i> (2007)
Atividade antimutagênica	Camundongos tratados com extrato etanólico das folhas apresentaram significativa redução na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) o que pode contribuir para um efeito anticarcinogênico.	Vilar <i>et al.</i> (2008)

No entanto, como muitas frutíferas desse bioma, seus frutos ainda são pouco explorados comercialmente, restringindo-se a feiras e beiras de estradas, apesar da realidade de consumo crescente (REZENDE; CÂNDIDO; MALAFAIA, 2012).

3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de substâncias químicas classificadas como metabólitos secundários em plantas, caracterizados por conterem em sua estrutura no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados, além de outros substituintes (APAK *et al.*, 2007; HAMINIUK *et al.*, 2012). Atualmente mais de 8.000 estruturas de compostos fenólicos são conhecidas, variando desde moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos, até substâncias altamente polimerizadas como os taninos (DAI; MUMPER, 2010).

A diversidade de estruturas dos compostos fenólicos resulta não somente da grande variedade de esqueletos carbônicos dentro desse grupo de compostos, mas também de várias modificações (por exemplo, acilação ou glicosilação) de substituintes primários e secundários (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). Com base no número de anéis aromáticos e elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros, os compostos fenólicos podem ser classificados em diversas classes (APAK *et al.*, 2007; CHEYNIER *et al.*, 2013; QUIRÓS-SAUCEDA *et al.*, 2014). A Tabela 2 apresenta as estruturas genéricas e exemplos de algumas classes de compostos fenólicos. Além desta grande diversidade, os compostos fenólicos podem se encontrar associados com carboidratos (simples ou complexos), lipídeos, ácidos orgânicos, aminas e componentes da parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina) (QUIRÓS-SAUCEDA *et al.*, 2014; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Tabela 2 - Estruturas e exemplos de algumas classes de compostos fenólicos.

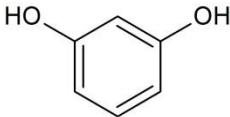
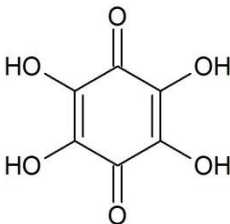
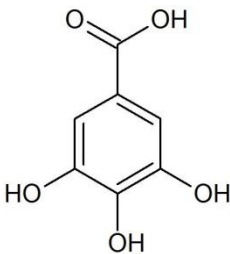
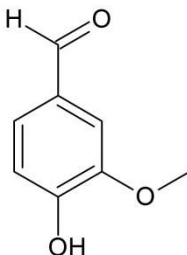
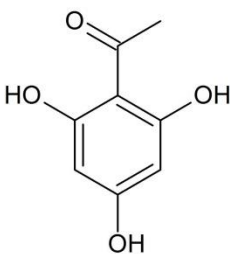
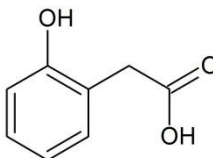
Classe	Estrutura genérica	Exemplo	Estrutura
Fenóis simples	C ₆	Resorcinol	
Benzoquinonas	C ₆	Tetrahidroxi- <i>p</i> -benzoquinona	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	Ácido gálico	
Aldeídos fenólicos	C ₆ -C ₁	Vanilina	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	Floroacetofenona	
Ácidos fenilacético	C ₆ -C ₂	Ácido 2-hidróxifenilacético	

Tabela 2 - Continuação.

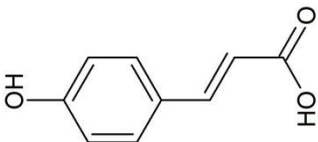
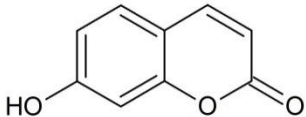
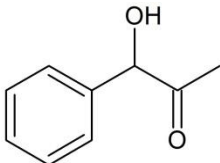
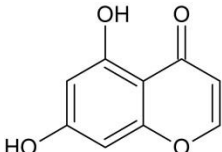
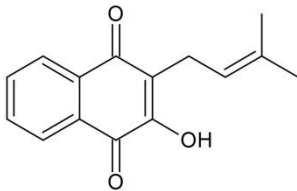
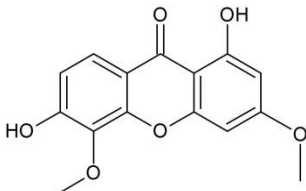
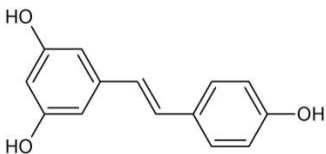
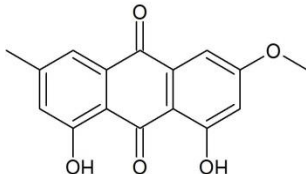
Classe	Estrutura genérica	Exemplo	Estrutura
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	Ácido <i>p</i> -cumárico	
Cumarinas	C ₆ -C ₃	Umbeliferona	
Fenilpropanonas	C ₆ -C ₃	1-hidroxi-1-fenilpropanona	
Cromonas	C ₆ -C ₃	5,7-dihidroxicromona	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	Lapachol	
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆	1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona	
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol	
Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆	Fisciona	

Tabela 2 - Continuação.

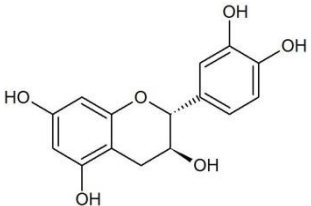
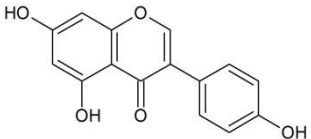
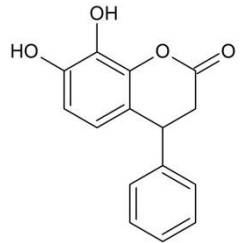
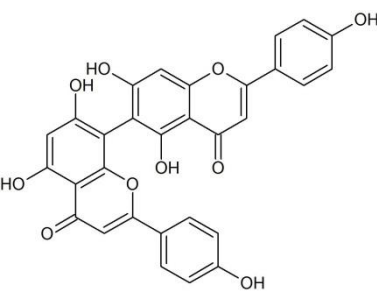
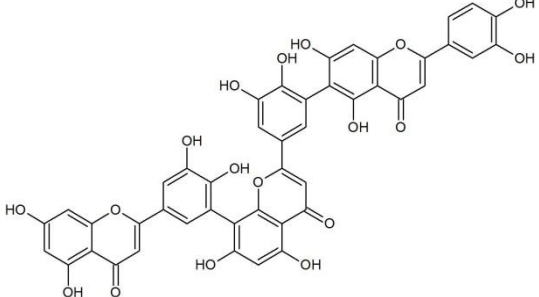
Classe	Estrutura genérica	Exemplo	Estrutura
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	(+)-catequina	
Isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$	Genisteína	
Neoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$	7,8-dihydroxineoflavanona	
Biflavonoides e dímeros proantocianidina	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Agatisflavona	
Triflavonoides e trímeros de proantocianidina	$(C_6-C_3-C_6)_3$	Triluteolina	

Tabela 2 - Continuação.

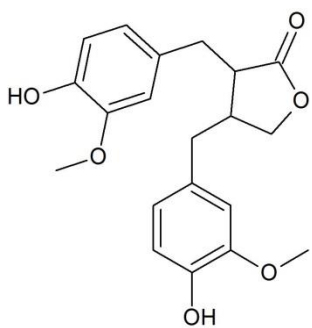
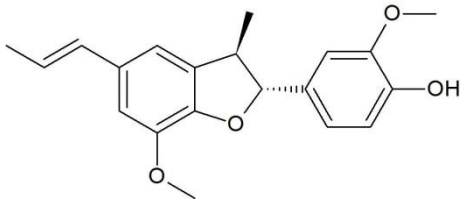
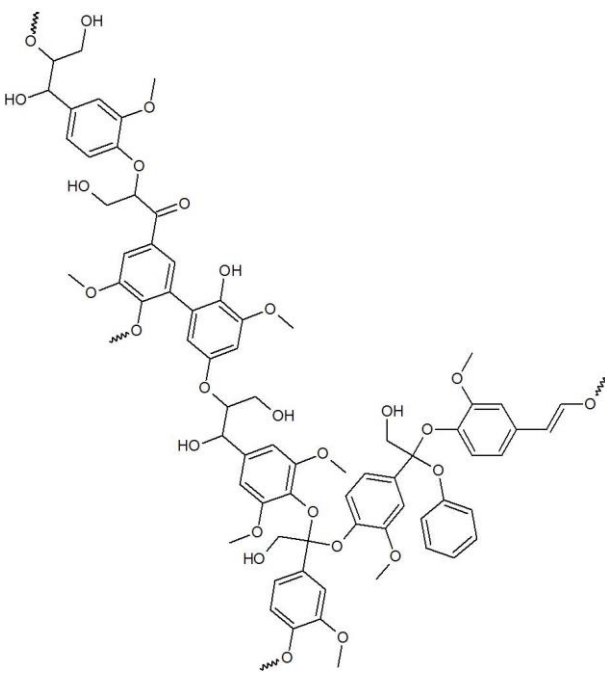
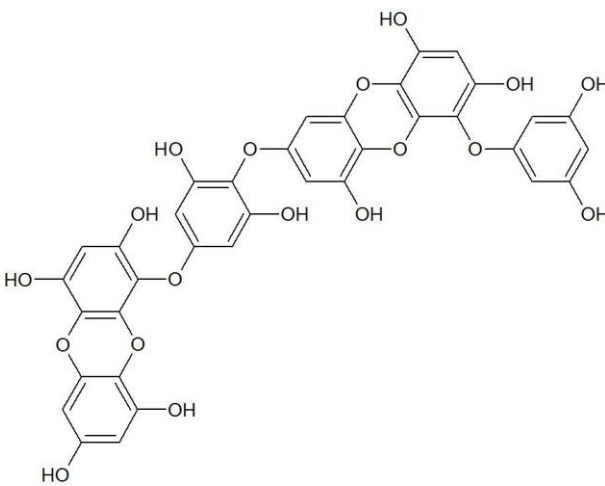
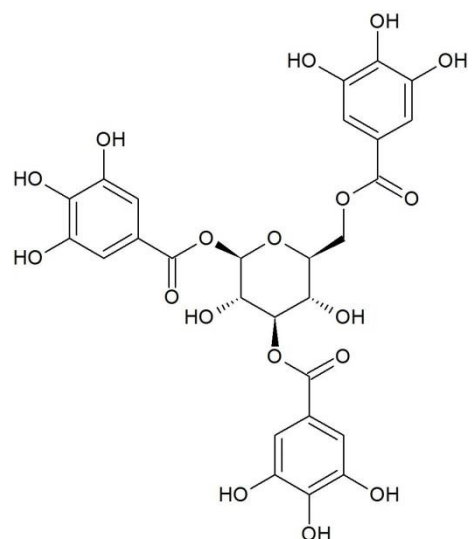
Classe	Estrutura genérica	Exemplo	Estrutura
Lignanas	$(C_6-C_3)_2$	Matairesinol	
Neolignanas	$(C_6-C_3)_2$	Licarina A	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	—	

Tabela 2 - Continuação.

Classe	Estrutura genérica	Exemplo	Estrutura
Melaninas catecol e florotaninos	$(C_6)_n$	Dieckol	
Taninos	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Corilagina	

Alguns autores também classificam os compostos fenólicos como extraíveis e não-extraíveis. No primeiro caso, os compostos fenólicos possuem baixa e média massa molecular, podem ser extraídos usando diferentes solventes (água, metanol, acetona, entre outros) e incluem alguns taninos hidrolisáveis e proantocianidinas; por outro lado, os não-extraíveis são compostos de alta massa molecular ou fenóis ligados a fibra dietética ou proteína que permanecem insolúveis no solvente utilizado (MATTHEWS *et al.*, 1997; LANDETE, 2012).

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais largamente distribuídos no reino das plantas. Eles são incomuns em bactérias, fungos e algas e não são sintetizados nem por humanos nem por animais. As briófitas são produtoras regulares, incluindo polifenóis como os flavonoides, porém é nas plantas vasculares que se encontra a maior variedade destes compostos (CHEYNIER *et al.*, 2013; LEWANDOWSKA *et al.*, 2013).

A habilidade de sintetizar compostos fenólicos foi selecionada ao longo do curso da evolução em diferentes linhagens de plantas quando tais compostos eram direcionados a necessidades específicas, permitindo assim, que as plantas lidassem com os constantes desafios provenientes das mudanças ambientais ocorridas ao longo do processo evolutivo. A produção de compostos fenólicos envolve sinais regulatórios e ocorre geralmente durante a lignificação de novos crescimentos ou durante o desenvolvimento do fruto e da flor, ou ainda como resposta a sinais ambientais para a proteção da planta contra o estresse abiótico e biótico (CHEYNIER *et al.*, 2013), como o ataque de insetos e patógenos, radiação UV e ferimentos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Alguns compostos fenólicos são amplamente distribuídos enquanto outros são específicos a certas famílias de plantas, ou encontrados somente em alguns órgãos vegetais ou em certos estágios de desenvolvimento. A diversidade de estruturas está relacionada a uma variedade de propriedades associadas a papéis específicos nas plantas e, consequentemente, com sua distribuição. As antocianinas, por exemplo, são os pigmentos que constituem a maioria dos órgãos vegetais vermelhos e azuis, encontradas em flores e frutos maduros onde exercem um papel preponderante no processo de atração envolvido na polinização e na disseminação das sementes. Além disso, elas também são muito comuns em folhas jovens onde podem exercer um efeito contra insetos herbívoros. Em contrapartida, os flavonóis protegem os tecidos das plantas contra a radiação UV, enquanto as proantocianidinas e taninos hidrolisáveis presentes na maioria dos tecidos vegetais nos primeiros estágios de desenvolvimento podem participar da defesa da planta contra herbívoros, fungos e vírus, presumivelmente devido à sua propriedade de complexar proteínas (CHEYNIER, 2012).

As principais fontes de compostos fenólicos na dieta humana são frutas, vegetais e bebidas (chá e vinho). Notáveis fontes deste grupo de substâncias incluem *berries*, chá, cerveja, uvas/vinho, óleo de oliva, chocolate/cacau, café, nozes, amendoins, romã, pipoca, erva mate, e outros frutos e vegetais. Frutas como a maçã, pêra, cereja e várias *berries* contêm até 200 - 300 mg de compostos fenólicos por 100 g de peso fresco, enquanto que uma taça de vinho tinto ou um copo de chá ou café contém cerca de 100 mg de compostos fenólicos (LANDETE, 2012). O teor destes compostos presente nos vegetais é muito dependente do grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e condições de armazenamento, dentre outros fatores (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos influenciam múltiplas propriedades sensoriais dos alimentos tais como sabor e cor, e contribuem para o aroma e paladar de vários produtos de origem vegetal (LANDETE, 2012). Estes compostos são responsáveis pelas cores laranja, vermelha, azul ou violeta de muitos frutos e vegetais como maçãs, *berries*, beterrabas e cebolas. Além disso, contribuem para o amargor e a adstringência de frutas e sucos de frutas, por causa de sua interação (principalmente procianidina) com glicoproteínas salivares e afetam o sabor e a cor dos diferentes tipos de vinho (branco, *rosé* e tinto), sendo críticos para a preservação, maturação e envelhecimento dos mesmos (DAI; MUMPER, 2010).

O consumo destes compostos está associado a uma redução no risco de desenvolvimento de múltiplas doenças crônicas não-transmissíveis. Como, por exemplo, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, certos tipos de câncer, diabetes tipo II e osteoporose, que é supostamente atribuída às suas multifacetadas atividades biológicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e moduladora de sinais de transdução (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Além do mais, os compostos fenólicos têm sido identificados como princípios ativos de várias ervas utilizadas pela medicina popular. O reconhecimento dos benefícios proporcionados por esses produtos naturais à saúde humana encoraja consumidores a incluir alguns alimentos e bebidas típicos derivados de

vegetais na alimentação diária, dentre os mais preferidos destacam-se o azeite de oliva, óleos vegetais, cítricos, chocolate, chá, café e o vinho (APAK *et al.*, 2007).

Os efeitos benéficos dos compostos fenólicos são frequentemente atribuídos à sua atividade antioxidante, que é mediada por uma variedade de mecanismos, incluindo a supressão ou o sequestro de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ROS/RNS), quelatação de metais de transição, inibição de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e regulação e/ou proteção dos sistemas de defesa endógenos (DAI; MUMPER, 2010; CHEYNIER, 2012). A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes está relacionada com o número e a posição dos grupos hidroxila na molécula, sendo que o aumento do número de grupos hidroxila promove uma elevação na atividade antioxidante. Por outro lado, a glicosilação resulta em uma perda de atividade antioxidante destes compostos, provavelmente devido ao impedimento estérico provocado pelas unidades de açúcares (CARTEA *et al.*, 2011).

As propriedades biológicas e os efeitos benéficos à saúde atribuídos aos compostos fenólicos dependem da quantidade ingerida e de sua biodisponibilidade (QUIRÓS-SAUCEDA *et al.*, 2014). A liberação e/ou absorção de compostos fenólicos podem ser afetadas por diferentes fatores. Resumidamente, seguem os principais fatores envolvidos:

- (i) A estrutura química dos compostos fenólicos (grau de glicosilação; acilação; estrutura básica, por exemplo, derivados de flavona ou benzeno; conjugação com outros fenólicos, massa molecular, grau de polimerização e solubilidade) e suas interações com diferentes moléculas como proteínas e fibras dietéticas. A maioria dos compostos fenólicos em sua forma nativa (polimérica, glicosilada ou esterificada) necessita ser enzimaticamente hidrolisada antes da absorção, enquanto que a associação dos compostos fenólicos à fibra dietética e proteínas pode reduzir sua bioacessibilidade e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade (HAMINIUK *et al.*, 2012; LANDETE, 2012);

- (ii) As etapas de processamento as quais os vegetais são submetidos. O descascamento de frutas, a clarificação e estabilização de sucos de frutas industrializados podem resultar na perda de uma significativa porção de alguns compostos fenólicos. Durante o processamento da polpa de frutas pode ocorrer a degradação oxidativa de compostos fenólicos como resultado da liberação e ação de polifenoloxidase citoplasmática. Por outro lado, a maceração, fermentação ou processamento de frutos pode resultar na difusão de compostos fenólicos no suco, incluindo a solubilização de compostos de partes descartadas, como cascas e sementes;
- (iii) As interações biológicas entre os compostos fenólicos e células, enzimas e proteínas do sistema gastrointestinal e microflora colônica. Muitos compostos fenólicos somente são bioacessíveis e biodisponíveis ao corpo humano por meio da ação de enzimas intestinais e/ou hepáticas ou da microflora colônica (HAMINIUK *et al.*, 2012). Diversas espécies de bactérias presentes no intestino atuam neste processo de transformação dos fenóis obtidos por meio da alimentação, sendo os gêneros *Clostridium* e *Eubacterium* os mais comumente envolvidos na bioconversão e no metabolismo destes compostos (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009).

4. Atividade Antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Porém, o metabolismo do oxigênio em células vivas também leva à inevitável produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou nitrogênio (RNS) (ROESLER *et al.*, 2006). Espécies reativas ou radicais livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, característica que os tornam altamente reativos e instáveis (SITTA *et al.*, 2014), promovendo reações de oxidação de outras moléculas, tais como proteínas, lipídeos e DNA, a fim de estabilizá-los (GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012).

A geração de ROS/RNS [espécies radicais: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), radical peroxila ($HO_2^{\bullet}$), radicais alcóxila ($RO^{\bullet}$), radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-); e espécies não-radicais: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido nitroso (HNO_2), óxido nítrico (N_2O_3) e alquil peroxinitratos ($RONOO$)] ocorre naturalmente durante o metabolismo (respiração, fagocitose, intoxicação, metabolismo de ácido graxos, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes) de plantas e animais (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; THATOI; PATRA; DAS, 2013) e exercem um importante papel nos mecanismos de defesa contra as infecções (CARTEA *et al.*, 2011). Entretanto, a produção destas espécies pode ser estimulada pela radiação UV, atividade física intensa, estresse emocional, hábitos de vida inadequados como tabagismo, alcoolismo e dieta rica em gorduras saturadas, além de agentes xenobióticos provenientes da poluição do ar ou substâncias químicas presentes em alimentos e bebidas tais como tetracloreto de carbono, resíduos de pesticidas e herbicidas, aditivos químicos, hormônios e toxinas microbianas (ELSAYED, 2001; ROESLER, 2011).

A geração excessiva destas espécies pode provocar um desbalanço entre os ROS/RNS e os mecanismos de defesa antioxidantes e promover um desequilíbrio na taxa de sua remoção, levando a modificações oxidativas em membranas celulares ou moléculas intracelulares que resultam na oxidação de constituintes de membranas, enzimas e DNA e acúmulo de peróxidos lipídicos (CARTEA *et al.*, 2011). Este estresse oxidativo a nível celular ou subcelular é considerado um dos principais fatores associados ao processo de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, catarata, câncer, diabetes tipo II e doenças neurodegenerativas (*Parkinson* e *Alzheimer*), assim como ao processo de envelhecimento natural (SRINIVASAN, 2014).

Os níveis de espécies reativas no organismo são controlados por uma série de processos antioxidantes endógenos, enzimáticos e/ou não enzimáticos, altamente eficientes. Dentre os antioxidantes produzidos pelo corpo envolvidos em processos não enzimáticos destacam-se a Glutathiona Reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao

ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipoico (forma reduzida do ácido lipoico), ácido úrico, melatonina, bilirrubina, ubiquinol e Coenzima Q Reduzida (CoQH₂) (PORTELA *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2014).

As principais enzimas envolvidas no balanço redox são a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione Redutase (GR) e a Glutathione Peroxidase (GPx). Cada uma delas é responsável pela redução de uma espécie reativa diferente e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012).

As SOD são metaloenzimas responsáveis pela catálise da dismutação do radical superóxido (O₂•⁻) a oxigênio molecular (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Equação 1) e é encontrada em 3 isoformas, sendo duas delas intracelulares e uma extracelular. As CAT são enzimas intracelulares que catalisam a degradação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular (O₂) (Equação 2). As GPx são encontradas tanto no citosol quanto na mitocôndria e são responsáveis pela remoção de uma grande variedade de hidroperóxidos [convertem H₂O₂ em água e peróxidos orgânicos (ROOH) em seus respectivos álcoois (ROH)] (Equações 3 e 4) (GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012).



As GR apresentam a função de neutralizar potenciais danos à membrana por meio da associação da catálise da redução da glutathione com reações de detoxificação envolvendo a tiol-conjugação de xenobióticos (MOURÃO *et al.*, 2009) e ainda são responsáveis pela redução da GSSG (Glutathione Oxidada) à GSH (Glutathione Reduzida), por meio da oxidação do NADPH em NADP⁺ (Equação 5) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

**Equação 5**

Além dessas enzimas antioxidantes, a NADPH:Quinona Aceptor Oxidorredutase (NQO1) atua na proteção de células contra efeitos citotóxicos de eletrófilos, catalisando a redução de dois elétrons de quinonas e epóxi-quinonas reativos e tóxicos, resultando na sua detoxificação. Outra importante enzima é a NADH:Citocromo b5 Redutase (CytB₅Rase), que exerce um papel fundamental em diversas reações metabólicas no fígado, como a dessaturação e alongamento de ácidos graxos, a biossíntese de colesterol e plasmalogênio, além de participar de algumas reações realizadas pela citocromo P-450. Além disso, as Tiorredoxina Redutases (TrxRs) exercem um importante papel na sinalização celular da regulação redox e também estão envolvidas na regeneração de importantes antioxidantes, tais como ubiquinona, ácido lipoico e ácido ascórbico (TUNG *et al.*, 2014).

Os processos oxidativos também podem ser retardados ou prevenidos por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes exógenas fornecidas pela dieta ou suplementadas como os tocoferóis (vitamina E), carotenoides (alguns, a exemplo do β -caroteno, são precursores da vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, os quais atuam impedindo ou diminuindo o desencadeamento das reações oxidativas (SOARES, 2002; PORTELA *et al.*, 2014).

Os antioxidantes são definidos como qualquer molécula capaz de retardar, inibir ou prevenir a oxidação de materiais oxidáveis, mesmo quando administrados em baixas quantidades ($< 1\%$, comumente de $1 - 1.000 \text{ mg.L}^{-1}$) quando comparado à quantidade de material que eles protegem (GÜLÇİN, 2012). Eles exercem seu papel protetor contra espécies reativas geradas pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas por meio de diferentes mecanismos, incluindo a neutralização ou sequestro destas espécies, quelação ou inativação de íons metálicos e interrupção das reações de oxidação em cadeia pela destruição das espécies reativas (RAJENDRAN *et al.*, 2014), impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos, duplas ligações de ácidos graxos poli-insaturados e das bases nitrogenadas do DNA. Desta forma, eles intervêm na fase de iniciação de reações oxidativas, produzindo compostos estáveis que retardam o processo de oxidação, evitando a

formação de lesões e a perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999; PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

Além de suas propriedades biológicas, o interesse por antioxidantes naturais está crescendo por parte das indústrias cosméticas, farmacêuticas e especialmente das alimentícias, uma vez que eles podem ser utilizados como substituintes de antioxidantes sintéticos (ALMEIDA *et al.*, 2011).

As principais fontes dietéticas de compostos antioxidantes são frutas, vegetais, cereais, nozes e chás. Típicos compostos que apresentam atividade antioxidante são os fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (ROESLER *et al.*, 2006).

A polpa do araticum é uma rica fonte de fitoquímicos com atividade antioxidante, como os carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais (DRAGANO *et al.*, 2010). Estudos conduzidos anteriormente demonstraram que a polpa deste fruto apresenta significativa atividade antioxidante em vários modelos *in vitro* (ROESLER *et al.*, 2007; DAMIANI *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012), sendo que alguns compostos, largamente reconhecidos como antioxidantes, já foram identificados nesta espécie, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Compostos antioxidantes do araticum (*Annona crassiflora*).

Parte da planta	Classe	Compostos identificados	Referências
Madeira	Alcaloides	Liriodinina e Aterospermidina	Gonçalves, Mosqueira & Pimenta (2010)
Folhas	Flavonoides	Quercetina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinosídeo; kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosídeo; quercetina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosídeo; quercetina-3- <i>O</i> - β - <i>L</i> -arabinopiranosídeo e (-)-epicatequina	Lage <i>et al.</i> (2014)
	Alcaloides	Romucosina, Xilopino, Annoretina e Anonaína	Egydio; Valvassoura & Santos (2013)
Casca do fruto	—	Ácido ascórbico, ácido málico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina e rutina	Roesler <i>et al.</i> (2007)
Polpa	Carotenoides	Licopeno, α - e β -caroteno	Cardoso <i>et al.</i> (2013)
	Vitaminas antioxidantes	Vitamina A, Vitamina C (Ácido ascórbico) e Vitamina E (α -tocoferol e α -tocotrienol)	
	Açúcares e ácidos orgânicos	Ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido ascórbico e hexoses	Roesler <i>et al.</i> (2007); Damiani <i>et al.</i> (2013)
Sementes	—	Ácido ascórbico, ácido málico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina, ácido cafeoil tartárico, cafeoil glicose, quercetina e rutina	Roesler <i>et al.</i> (2007)
	Fitoesteróis	Campesterol, Stigmasterol e β -sitosterol	Luzia & Jorge (2013)
	Tocoferóis	α -, β -, γ - e δ -tocoferol	
	Carotenoides	β -caroteno	
	Acetogeninas	Araticulina e Crassiflorina	Santos, Boaventura & Oliveira (1994); Santos <i>et al.</i> (1996)

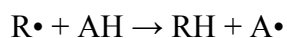
5. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante

Muitos métodos têm sido usados para avaliar e comparar a atividade antioxidante de frutas, devido à complexidade dos substratos analisados e à diversidade química dos compostos antioxidantes presentes nestas matrizes (HAMINIUK *et al.*, 2012). A capacidade de um antioxidante em sequestrar radicais livres é frequentemente avaliada por meio da utilização de radicais estáveis de referência ou por métodos de competição usando espectrofotômetro convencional operando no UV/Visível. Estes métodos envolvem compostos cromogênicos de natureza radical que, pela ação de antioxidantes, são reduzidos levando ao desaparecimento ou modificação da região cromófora (THATOI; PATRA; DAS, 2013).

A capacidade de antioxidantes em sequestrar radicais livres *in vitro* tem sido avaliada por diversos métodos sob diferentes condições. Os ensaios antioxidantes disponíveis diferem em relação ao mecanismo de ação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos, não existindo um procedimento metodológico universal para avaliar a capacidade antioxidante o que impõe a necessidade da realização de diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação distintos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Dessa forma, faz-se necessária a padronização de um método atendendo os seguintes critérios: (i) utilizar uma fonte radical biologicamente relevante; (ii) ser tecnicamente simples; (iii) usar um método com ponto final e mecanismo químico bem definidos; (iv) apresentar instrumentação e reagentes facilmente disponíveis; (v) ter boa repetibilidade e reprodutibilidade; (vi) ser adaptável para ensaios de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e para o uso de diferentes fontes radicais; e (vii) ser adaptável a análise de *high-throughput* para análises rotineiras de controle de qualidade (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante podem ser classificados de acordo com os mecanismos de reação em métodos de transferência de átomos de hidrogênio ou métodos de transferência de elétrons (APAK *et al.*, 2007).

Os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio medem a capacidade de um antioxidante (AH) em sequestrar radicais livres ($R\bullet$) (geralmente radicais peroxila) pela doação de um átomo de hidrogênio ($H\bullet$) (Equação 6). Estas reações são independentes do solvente e pH e geralmente são bastante rápidas (completadas de segundos a minutos). Uma vez que em ensaios antioxidantes baseados na transferência de átomos de hidrogênio, tanto o indicador fluorescente quanto os antioxidantes reagem com o radical, a atividade antioxidante pode ser determinada através das cinéticas de competição medindo a curva de decaimento da fluorescência do indicador na ausência e presença de antioxidantes e integrando a área sob estas curvas (APAK *et al.*, 2007). Exemplos de métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio são: (i) Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*); (ii) Capacidade Antioxidante Total (TRAP - *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*); (iii) Capacidade de Inibição da Peroxidação Lipídica; (iv) Capacidade Total de Sequestro de Oxirradical (TOSCA - *Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*); (v) Ensaios *Crocin-bleaching*; e (vi) Ensaios de Quimiluminescência (GÜLÇİN, 2012).



Equação 6

Por outro lado, os métodos baseados na transferência de elétrons medem a habilidade de um antioxidante (AH) em reduzir qualquer composto [geralmente íons metálicos (M^{x+}), grupos carbonila e radicais ($R\bullet$)] por meio da transferência de um elétron (Equações 7 - 10). Estas reações são relativamente mais lentas e são dependentes do solvente e pH. Na maioria destes ensaios, os antioxidantes reagem com um indicador fluorescente ou colorimétrico (agente oxidante) ao invés de radicais peroxila. Os ensaios espectrofotométricos baseados na transferência de elétrons medem a capacidade de um antioxidante em reduzir um agente oxidante, o qual muda de cor quando reduzido, sendo que o grau de mudança de cor (um aumento ou redução da absorbância a um dado comprimento de onda) é correlacionado à concentração de antioxidantes presentes na amostra (APAK *et al.*, 2007). Alguns métodos baseados na transferência de elétrons são: (i) Fenólicos Totais pelo ensaio com o Reagente *Folin-Ciocalteu*; (ii) Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC - *Trolox Equivalence Antioxidant Capacity*);

(iii) Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico (Fe^{3+}) (FRAP - *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*); (iv) Potencial Antioxidante Total, usando um Complexo- Cu^{2+} como um oxidante; (v) Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}\cdot$); (vi) Atividade Sequestradora do Radical 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}\cdot^+$); (vii) Atividade Sequestradora do Radical N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina ($\text{DMPD}\cdot^+$); (viii) Poder Antioxidante de Redução do Íon Cúprico (Cu^{2+}) (CUPRAC - *Cupric Ions Reducing Antioxidant Power*) (GÜLÇİN, 2012).



Os principais métodos empregados na determinação da atividade antioxidante de componentes alimentares, assim como seus princípios, estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Diferentes métodos e seus princípios de ação utilizados na determinação da atividade antioxidante de componentes alimentares.

Método	Princípio	Referências
Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC - <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)	Este método mede a habilidade de um antioxidante contra o radical peroxila, onde o antioxidante e um marcador fluorescente (geralmente fluoresceína) competem cineticamente por radicais peroxila gerados através da decomposição de compostos nitrogenados tais como AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)-dihidroclorado) a 37 °C. A atividade antioxidante pode ser determinada calculando a curva de decaimento da fluorescência de um indicador na presença e ausência de antioxidantes, integrando a área sob essas curvas.	Apak <i>et al.</i> (2007)
Capacidade Antioxidante Total (TRAP - <i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter</i>)	Este método monitora a habilidade de compostos antioxidantes em interferir na reação entre radicais peroxila (gerados através do AAPH) e um indicador alvo. O TRAP é baseado no aumento da quimiluminescência do luminol, no qual os radicais peroxila gerados a partir do AAPH oxidam o luminol levando à formação de radicais luminol que emitem luz. A atividade antioxidante é determinada através da duração do período de tempo (tempo de indução) no qual a amostra bloqueia o sinal de quimiluminescência, devido à presença de antioxidantes, sendo que o tempo é proporcional à quantidade de antioxidantes presentes na amostra.	Somogyi <i>et al.</i> (2007); Pisoschi & Negulescu (2011)
Capacidade de Inibição da Peroxidação Lipídica (<i>The lipid peroxidation inhibition Assay</i>)	O método fundamenta-se no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda acoplada ao lipossomo provocada pelo ataque de uma espécie reativa. Após a adição de uma espécie redutora, ou seja, o antioxidante, observa-se um menor decaimento da fluorescência. Isto significa que a membrana dos lipossomos foi protegida e o antioxidante foi atacado pelas espécies reativas presentes no meio.	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
Capacidade Total de Sequestro de Oxirradical (TOSCA - <i>Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay</i>)	Este método permite a quantificação da capacidade de antioxidantes em absorver três potentes oxidantes (radicais hidroxila, peroxila e peroxinitrila). O ensaio se baseia na formação desses oxidantes pela reação de <i>Fenton</i> na presença de ferro direcionada por ascorbato, homólise térmica de AAPH e 3-N-morfolinosidnonimina etilcarbamida (SIN-1), respectivamente. Estes oxidantes reagem com o α -ceto- γ -ácido metilbutírico (KMBA), o qual é oxidado e produz etileno. A atividade antioxidante dos compostos testados é quantificada através de sua habilidade em inibir a formação de etileno em relação a uma reação controle.	Somogyi <i>et al.</i> (2007)

Tabela 4 - Continuação.

Método	Princípio	Referências
Inibição do Branqueamento da Crocina (<i>Crocin-bleaching Assay</i>)	Este método baseia-se na extensão do branqueamento da crocina (pigmento carotenóide natural) pela ação de radicais peróxila. Neste ensaio, o decréscimo da absorbância devido ao branqueamento do carotenóide crocina provocado pela ação de radicais peróxila gerados pela decomposição térmica do AAPH é monitorado a 450 nm. Os antioxidantes presentes na amostra competem com a crocina pelos radicais peróxila, inibindo o branqueamento do meio. Dessa forma, o poder antioxidante das substâncias adicionadas ao meio reacional é proporcional à inibição da descoloração da crocina.	Somogyi <i>et al.</i> (2007)
Método do Tiocianato Férrico (FTC - <i>Ferric Thiocyanate Assay</i>)	O método tiocianato é utilizado para medir o nível de peróxido durante o estágio inicial de oxidação lipídica. Este ensaio é baseado na formação de peróxidos durante a oxidação do ácido linoleico, que oxida o Fe^{2+} a Fe^{3+} . O Fe^{3+} forma um complexo colorido com o tiocianato (SCN^-) com máxima absorção a 500 nm. Na presença de antioxidantes, a oxidação do ácido linoleico é lenta. Assim, o desenvolvimento da cor, pela formação dos complexos Fe^{3+} -tiocianato, também será lenta. Portanto, elevados valores de absorbância indicam altos níveis de ácido linoleico oxidado e, consequentemente, baixa atividade antioxidante dos compostos em questão.	Moon & Shibamoto (2009); Nile, Khobragade & Park (2012)
Fenólicos Totais (<i>Folin-Ciocalteu</i>)	O método se baseia na transferência de elétrons, em meio alcalino, dos compostos fenólicos para complexos fosfotúngsticos/fosfomolibdênicos (Reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i>). Os compostos fenólicos são energeticamente oxidados em meio alcalino, resultando na formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$, que por sua vez, reage com o molibdato [estado de oxidação (VI)] (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{Na}_2\text{MoO}_4$) formando óxido de molibdênio [(estado de oxidação (V)], o qual forma complexos azuis com o tungstênio [cor azul no complexo $(\text{Fenol-MoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}$] que podem ser facilmente identificados por espectrofotometria numa faixa de 750 a 765 nm.	Oliveira <i>et al.</i> (2009); Gülçin (2012)
Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC - <i>Trolox Equivalence Capacity</i>)	Neste ensaio, o ABTS é oxidado por oxidantes (geralmente $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) à sua correspondente forma radical cátion ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), que absorve a 734 nm (coloração verde-azulado), por meio da perda de um elétron pelo átomo de nitrogênio do ABTS. Na presença de qualquer antioxidante doador de hidrogênio o átomo de nitrogênio sequestra um átomo de hidrogênio, promovendo uma descoloração da solução acompanhada pelo decréscimo da absorbância que é proporcional à concentração de sequestradores de radicais adicionados à solução reagente de ABTS.	Gülçin (2012); Thatoi, Patra & Das (2013)

Tabela 4 - Continuação.

Método	Princípio	Referências
Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico (Fe^{3+}) (FRAP - <i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i>)	O ensaio FRAP mede a habilidade de antioxidantes em reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina [Fe^{3+} -(TPTZ) $_2$] $^{3+}$ ao complexo ferroso de coloração azul-intenso [Fe^{2+} -(TPTZ) $_2$] $^{2+}$ em meio ácido (pH 3,6). A atividade antioxidante é determinada medindo o aumento da absorbância a 593 nm que é proporcional à concentração de antioxidantes presentes na amostra.	Somogyi <i>et al.</i> (2007)
Poder Antioxidante de Redução do Íon Cúprico (Cu^{2+}) (CUPRAC - <i>Cupric Ions Reducing Antioxidant Power</i>)	Este ensaio é baseado na redução de Cu^{2+} a Cu^+ em meio hidroetanólico pela ação de agentes redutores (pH 7,0) na presença de neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) que forma complexos com o Cu^+ com pico de máxima absorção a 450 nm. O aumento da absorbância a 450 nm é proporcional à concentração de antioxidantes presentes na amostra.	Gülçin (2012)
Atividade Sequestradora do Radical N,N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD $\bullet^+$)	Neste ensaio, o DMPD é oxidado por oxidantes (geralmente FeCl_3) ou em pH ácido à sua correspondente forma radical cátion (DMPD $\bullet^+$), que absorve à 505 nm (coloração púrpura). Na presença de qualquer antioxidante doador de hidrogênio, o radical cátion (DMPD $\bullet^+$) sequestra um átomo de hidrogênio, promovendo uma descoloração da solução acompanhada pelo decréscimo da absorbância que é proporcional à concentração de sequestradores de radicais adicionados à solução reagente de DMPD.	Fogliano <i>et al.</i> (1999); Gülçin (2012)
Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $\bullet$)	Este método é baseado na redução do radical DPPH $\bullet$ em solução alcoólica na presença de um antioxidante doador de hidrogênio devido à formação da forma não-radical DPPH-H na reação. Neste ensaio, o radical cromogênio púrpura (DPPH $\bullet$), que absorve em um comprimento de onda de 516 nm, é reduzido por compostos sequestradores de radicais (antioxidantes) à sua correspondente forma reduzida (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma acompanhada pelo decréscimo da absorbância que é proporcional à concentração de sequestradores de radicais adicionados à solução reagente de DPPH.	Haminiuk <i>et al.</i> (2012); Thatoi, Patra & Das (2013)
Sequestro de Radical Ânion Superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) (<i>Superoxide Anion Radical Scavenging Assay</i>)	Este método é baseado na geração de radical ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) usando um sistema xantina-xantina oxidase a pH 7,4. Os $\text{O}_2\bullet^-$ podem reduzir nitrozol de tetrazólio (NBT) em formazana (complexo colorido), que é espectrofotometricamente monitorado a 560 nm.	Oliveira <i>et al.</i> (2009); Gülçin (2012)

Tabela 4 - Continuação.

Método	Princípio	Referências
Poder Antioxidante Redutor de Íons Fe^{3+} (<i>Ferric Ions Reducing Antioxidant Power</i>)	Este método é baseado na capacidade de um composto reduzir diretamente o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Neste ensaio, os compostos antioxidantes reduzem o complexo Fe^{3+} -ferricianeto ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ de coloração amarela) à forma ferrosa (Fe^{2+}) ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$). A adição de Fe^{3+} (FeCl_3) ao produto reduzido leva à formação de um complexo de coloração azul-intenso (<i>Perl's Prussian</i> , $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) que absorve fortemente no comprimento de onda de 700 nm. Nesta determinação, a cor amarela da solução teste muda para verde ou azul dependendo do poder redutor dos antioxidantes. Uma elevada absorbância indica alto poder de redução do íon férrico.	Gülçin (2012)
Valor de Ácido Tiobarbitúrico (TBA - <i>Thiobarbituric Acid Assay</i>)	Este método é baseado na formação de malonaldeído (MDA) a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados com no mínimo três ligações duplas (óleo de fígado de bacalhau ou qualquer tipo de óleo que contenha ácido linolênico, ácido araquidônico ou ácidos graxos ω -3). Neste ensaio, o MDA produzido reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando produtos de condensação vermelho que absorvem a 532 nm. A ação dos antioxidantes presentes na amostra retarda a formação do MDA reduzido a intensidade da coloração do meio reacional. Assim, uma baixa absorbância indica uma elevada atividade antioxidante.	Moon & Shibamoto (2009); Nile, Khobragade & Park (2012)
Capacidade de Quelar Metais (<i>Metal-chelating Assay</i>)	A determinação da atividade queladora de metais de um antioxidante é baseada na medida da absorbância do complexo vermelho Fe^{2+} -ferrozina após tratamento prévio de uma solução ferrosa com o material teste. A ferrozina forma um complexo com os íons Fe^{2+} livres, mas não com íons Fe^{2+} ligados a outros agentes queladores, resultando em uma redução na coloração vermelha do complexo que pode ser monitorada a 562 nm. Assim, baixa absorbância indica elevada atividade quelante de metais por parte dos antioxidantes da amostra.	Gülçin (2012); Thatoi, Patra & Das (2013)
Sequestro de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) (<i>Hydrogen peroxide scavenging</i>)	Este método se baseia na absorção intrínseca do H_2O_2 na região UV (230 nm), uma vez que a concentração de H_2O_2 diminui pela ação dos compostos sequestradores, havendo uma consequente redução da absorbância do meio reacional a 230 nm.	Gülçin (2012); Thatoi, Patra & Das (2013)

Tabela 4 - Continuação.

Capacidade Sequestradora de Radical Óxido Nítrico (NO•) (<i>Nitric Oxide Radical Scavenging Capacity Assay</i>)	Este método é baseado na formação de coloração róseo-avermelhada pelo tratamento de uma amostra contendo nitrito com o reagente de <i>Griess</i> . Neste ensaio, o ácido sulfanílico é convertido pelo nitrito a um sal diazônio sob condições ácidas, o qual se complexa instantaneamente com a N-(1-naftil)-etilenediamina formando um produto azo altamente colorido (coloração róseo-avermelhada) que pode ser detectado a 548 nm.	Gülçin (2012)
Ensaio Baseado na Diclorofluorescina-Diacetato (DCFH-DA - <i>Dichlorofluorescin-Diacetate-Based Assay</i>)	Este ensaio usa AAPH para gerar radicais peroxila e DCFH-DA como substrato oxidável para os radicais peroxila. A oxidação da DCFH-DA pelos radicais peroxila converte DCFH-DA em diclorofluoresceína (DCF). A DCF é altamente fluorescente (Ex. 480 nm; Em. 526 nm) e também absorve em comprimento de onda de 504 nm. Portanto, a DCF produzida pode ser monitorada tanto fluorometricamente quanto espectrofotometricamente.	Somogyi <i>et al.</i> (2007); Thatoi, Patra & Das (2013)
Branqueamento do β-caroteno (<i>β-carotene Bleaching Assay</i>)	Este método é baseado na reação entre β-caroteno e radicais peroxila com produção de epóxidos de β-caroteno. Neste ensaio, o ácido linoleico é seletivamente oxidado através da ação de lipoxigenases que produzem radicais peroxila. Esses radicais peroxila reagem com o β-caroteno (amarelo) formando um radical β-caroteno estável (incolor), promovendo uma descoloração gradual da solução teste que pode ser monitorada espectrofotometricamente a 470 nm. Quando um antioxidante está presente na solução teste, estes reagem competitivamente com os radicais peroxila, retardando a descoloração do meio. Desta forma, uma alta absorbância indica uma elevada atividade antioxidante.	Moon & Shibamoto (2009)

6. Oligossacarídeos

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*), os oligossacarídeos são compostos cujas unidades de monossacarídeos estão unidas por ligações glicosídicas, podendo ser classificados em dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacarídeos, pentassacarídeos, etc, de acordo com o número de unidades monoméricas. No entanto, a diferença entre oligo- e polissacarídeos não pode ser rigorosamente descrita, sendo assim, o termo “oligossacarídeo” normalmente utilizado para se referir a uma estrutura definida, ao passo que “polissacarídeo” refere-se a um polímero de comprimento não especificado (MCNAUGHT, 1997).

Alguns pesquisadores definem os oligossacarídeos como carboidratos de baixo peso molecular com grau de polimerização (número de unidades de monossacarídeos ligadas) variando entre 2 e 10 (GÄNZLE; FOLLADOR, 2012). Em contrapartida, outros pesquisadores frequentemente consideram que estes compostos podem apresentar grau de polimerização de até 20 - 25 (COURTOIS, 2009). A glicose, galactose, frutose e xilose são os monossacarídeos mais comumente presentes na estrutura dos oligossacarídeos (MORRIS; MORRIS, 2012).

Os oligossacarídeos podem ser classificados de acordo com a composição de monossacarídeos, grau de polimerização e tipo de ligação formada entre os monossacarídeos na cadeia do oligômero (GÄNZLE; FOLLADOR, 2012). As classes de oligossacarídeos mais comumente investigadas são os fruto-oligossacarídeos (*FOS*) e galacto-oligossacarídeos (*GOS*). No entanto, há um crescente interesse na caracterização e quantificação de alguns oligossacarídeos emergentes como os xilo-oligossacarídeos (*XOS*), isomalto-oligossacarídeos (*IMOS*), glico-oligossacarídeos, pectino-oligossacarídeos (*POS*), manano-oligossacarídeos (*MaOS*), gentio-oligossacarídeos (*GTO*), quito-oligossacarídeos (*CHOS*) e oligossacarídeos de soja (*SOS*) (KONDEPUDI *et al.*, 2012; MORRIS; MORRIS, 2012; LAM; CHI-KEUNG CHEUNG, 2013). As principais classes de oligossacarídeos, assim como algumas de suas características estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Classes e características de alguns oligossacarídeos.

Classe	Abreviatura	Estruturas	GP ^{f, g}	LIF
Fruto-oligossacarídeos	FOS	α -D-Glc-[1,2- β -D-Fru] _n ou β -D-Fru-[1,2- β -D-Fru] _n	2-5	β -1,2 ^a
Galacto-oligossacarídeos	GOS	[β -D-Gal-1,4] _n -D-Glc ou [β -D-Gal-1,6] _n - β -D-Gal-1,4-D-Glc	2-5	β -1,2; β -1,3; β -1,4; β -1,6 ^{b, c}
Malto-oligossacarídeos	MOS	α -D-Glc-[1,4-D-Glc] _n	2-8	α -1,4 ^a
Isomalto- oligossacarídeos	IMOS	α -D-Glc-[1,6-D-Glc] _n	2-5	α -1,6 ^a
Xilo-oligossacarídeos	XOS	β -D-Xyl-[1,4-D-Xyl] _n	2-7	β -1,4 ^a
Arabino-oligossacarídeos	AOS	α -D-Ara-[1,5-D-Ara] _n	2-9	α -1,2; α -1,3; α -1,5 ^e
Gentio-oligossacarídeos	GTO	β -D-Glc-[1,6-D-Glc] _n	2-10	β -1,6 ^a
Oligossacarídeos Pécicos	POS	α -D-GalA-[1,4-D-GalA] _n	2-10	α -1,4 ^d
Oligossacarídeos da Família da Rafinose	RFO	[α -D-Gal-1,6] _n - α -D-Glc-1,2- β -D-Fru	3-6	α -1,6 ^a
Oligossacarídeos de Soja	SOS	[α -D-Gal-1,6] _n - α -D-Glc-1,2- β -D-Fru	3-4	α -1,6 ^a
Quito-oligossacarídeos	CHOS	β -D-GlcNAc-[1,4-D-GlcNAc] _n ; β -D-GlcN-[1,4-D-GlcN] _n ou [β -D-GlcNAc-1,4-D-GlcN] _n	2-6	β -1,4 ^f
Isomaltulose ou Palatinose	—	α -D-Glc-1,6-D-Fru	2	α -1,6 ^a
Glicosilsacarose	—	α -D-Glc-1,4- α -D-Glc-1,2- β -D-Fru	3	α -1,4 ^a
Lactosacarose	—	β -D-Gal-1,4- α -D-Glc-1,2- β -D-Fru	3	β -1,4 ^a
Lactulose	—	β -D-Gal-1,4-D-Fru	2	β -1,4 ^a

GP e n: Grau de Polimerização; **LIF:** Ligações Indicativas de Função; **Fru:** Frutose; **Glc:** Glicose; **Gal:** Galactose; **Xyl:** Xilose; **Ara:** Arabinose; **GalA:** Ácido Galacturônico; **GlcNAc:** N-Acetilglicosamina; **GlcN:** Glicosamina.

^aSako, Matsumoto & Tanaka (1999); ^bBarile & Rastall (2013); ^cGänzle & Follador (2012); ^dGullón *et al.* (2013); ^eWestphal *et al.* (2010); ^fSako & Tanaka (2011); ^gQiang, YongLie & QianBing (2009).

Os oligossacarídeos são solúveis em água e moderadamente doces (30 a 60 % em relação à doçura da sacarose). Sua doçura é dependente da estrutura química, do grau de polimerização dos oligossacarídeos presentes (quanto maior o comprimento da cadeia do oligossacarídeo menor a intensidade da doçura) e dos níveis de mono- e dissacarídeos na mistura. Sua doçura relativamente baixa é muito útil em vários tipos de alimentos nos quais o uso da sacarose é restrito devido à sua elevada doçura ou quando é desejável a adição de um agente estabilizante com doçura reduzida para melhorar o sabor dos alimentos. Além disso, por apresentarem baixo conteúdo calórico ($1,5 - 2,0 \text{ kcal.g}^{-1}$, aproximadamente 40 - 50 % em comparação à sacarose) podem ser utilizados em conjunto com edulcorantes artificiais como o aspartame e a sucralose, com a vantagem de mascarar os sabores residuais produzidos por alguns destes edulcorantes. Por apresentarem peso molecular mais elevado que os mono- e dissacarídeos, os oligossacarídeos proporcionam uma maior viscosidade, promovendo melhoria no corpo e sabor dos alimentos (OKU; NAKAMURA, 2002; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Esta classe de carboidratos também pode ser utilizada para alterar a temperatura de congelamento de alimentos, controlar a intensidade de escurecimento devido às reações de *Maillard* em produtos processados termicamente e como substitutos de gordura por suas propriedades de ligação à água e geleificação. Além disso, evitam a secagem excessiva por apresentar elevada capacidade de retenção de umidade; auxiliam no controle do crescimento microbiano, uma vez que reduzem a atividade de água; e inibem a retrogradação do amido (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; DI BARTOLOMEO; STARTEK; VAN DEN ENDE, 2013).

As principais fontes de oligossacarídeos são os leites humano e bovino, mel, frutas e legumes como a chicória, aspargo, alcachofra de Jerusalém, cebola, alho, alho-poró, banana, centeio, cevada, batata *yacon* e a soja, sendo que na maior parte dessas fontes as concentrações variam entre 0,3 e 6 % do peso fresco, porém para a chicória estes valores se encontram entre 5 e 10 %, enquanto que na alcachofra de Jerusalém e na batata *yacon* o valor encontrado pode atingir até 20 % (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Entretanto, poucos oligossacarídeos são produzidos naturalmente e seu isolamento a partir destas

fontes é extremamente difícil devido à complexidade estrutural de tais compostos (WEIJERS; FRANSSEN; VISSER, 2008). Assim, estratégias alternativas foram desenvolvidas, sendo que atualmente podem ser obtidos a partir da despolimerização de polissacarídeos (amido, inulina ou xilana) ou por meio de síntese química ou enzimática, como pode ser observado na Tabela 6.

Os processos de despolimerização são considerados mais competitivos, uma vez que geram uma grande variedade de oligômeros a partir de um único polímero, ao passo que os processos de polimerização são demorados e dispendiosos, além de produzirem apenas oligômeros com baixo grau de polimerização (COURTOIS, 2009).

Os oligossacarídeos funcionais apresentam importantes propriedades físico-químicas e fisiológicas benéficas à saúde dos consumidores e, por esta razão, seu uso como ingredientes alimentares tem crescido rapidamente (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009). Os efeitos benéficos à saúde atribuídos aos oligossacarídeos incluem não-cariogenicidade; baixo valor calórico; habilidade em estimular o crescimento e a atividade de bactérias benéficas (principalmente, bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) no trato digestivo pela inibição do crescimento das bactérias patogênicas; protonação de amônia e aminas potencialmente tóxicas; alívio da constipação; saciedade; melhoria na absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro; redução dos níveis séricos e hepáticos de triglicérides, fosfolipídios e colesterol e aumento da razão HDL-colesterol/LDL-colesterol; redução do ganho de peso e consumo de energia; redução da incidência de câncer colônico, diarreia e inflamações; melhoria na resposta do sistema imune e diminuição dos níveis sanguíneos de glicose (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2011; GÄNZLE, 2012; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; GULLÓN *et al.*, 2013). Porém, o consumo de doses excessivas de oligossacarídeos pode causar desconforto intestinal, flatulência ou mesmo diarreia devido ao seu efeito osmótico, que pode transferir água do intestino grosso (um efeito que é inversamente relacionado ao tamanho da cadeia), além de apresentarem uma alta taxa de fermentação e produção de gases (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Tabela 6 - Estratégias e exemplos de processos utilizados para obtenção de oligossacarídeos.

Estratégia	Exemplos de Processos	Referências
Despolimerização Química	Radicais livres hidroxila (Reação de <i>Fenton</i>)	Zúñiga; Matsuhira & Mejías (2006); Chandía & Matsuhira (2008)
	Ácidos diluídos ou concentrados (até 2 M) como HCl, H ₂ SO ₄ , ácido trifluoroacético, fórmico ou nítrico sob aquecimento (entre 50 e 90 °C)	Delattre <i>et al.</i> (2005); Akpınar, Erdogan & Bostanci (2009); Loaiza, Chavez & Sabino (2014)
Despolimerização Física	Micro-ondas	Singh <i>et al.</i> (2003); Rose & Inglett (2010); Li <i>et al.</i> (2013); Hu <i>et al.</i> (2013); Bian <i>et al.</i> (2014)
	Radiólise por luz UV	Wasikiewicz <i>et al.</i> (2005); Burana-osot <i>et al.</i> (2009); Burana-osot <i>et al.</i> (2010)
	Irradiação γ	Bisio <i>et al.</i> (2004); Wasikiewicz <i>et al.</i> (2005); Kang <i>et al.</i> (2006); Kang <i>et al.</i> (2009); Jalan <i>et al.</i> (2013)
	Ultrassonificação	Wasikiewicz <i>et al.</i> (2005); Vodeníčarová <i>et al.</i> (2006); Popa-Nita <i>et al.</i> (2009); Sujka & Jamroz (2013)
	Tratamento térmico	Nattorp <i>et al.</i> (1999); Borrega & Sixta (2013); Forgo <i>et al.</i> (2013); Xiao <i>et al.</i> (2013)
Despolimerização Bioquímica	Enzimas bacterianas ou fúngicas pertencentes ao grupo das polissacarídeo hidrolases (EC 3.2.1.-) ou polissacarídeo liases (EC 4.2.2.-)	Giese <i>et al.</i> (2011); Yang <i>et al.</i> (2011)
Síntese Química	Condensação na presença de catalisadores como trimetilsililtrifluormetanossulfonato (TMSOTf) e a partir de aceptores 4,6- <i>O</i> -benzilideno-glucopiranosil	He, Yang & Du (2002)
	Glicosilação na presença de aceptores ésteres 6- <i>O</i> -sulfatos	Tiruchinapally <i>et al.</i> (2011)
	S-benzoxazolil (SBox) e S-tiazolinil (STaz) glycosídeos como aceptores e/ou doadores de de grupos glicosil	Parlato <i>et al.</i> (2008)
	Utilização de 2-azido-2-deoxi- β -D-manopiranosil como blocos de construção	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Síntese Enzimática	Enzimas bacterianas ou fúngicas pertencentes ao grupo das glicosiltransferases, glicosilintetases ou fosforilases	Monsan, Remaud-Siméon & André (2010); Seibel & Buchholz (2010); Filici & Marciello (2013); Nakai <i>et al.</i> (2013); Saad <i>et al.</i> (2013)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de 3 g de fruto-oligossacarídeos (*FOS*) por dia para adultos e 0,4 g por dia para crianças (ROUZAUD, 2006). Segundo a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas pela Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2014), para que um produto apresente as alegações funcionais atribuídas aos *FOS*, este deve fornecer no mínimo 3 g de *FOS*, se o alimento for sólido, ou 1,5 g se o alimento for líquido, na porção do produto pronto para consumo.

Desta forma, a popularidade dos oligossacarídeos aumentou fortemente, sobretudo nos últimos anos. Como consequência, várias pesquisas têm sido realizadas visando a descoberta de novos oligossacarídeos, fontes e propriedades biológicas, bem como o desenvolvimento de novos produtos que contenham esses compostos. Entretanto, é importante destacar que na revisão de literatura realizada não foram encontrados artigos relacionados à composição de oligossacarídeos na polpa de araticum, o que torna este trabalho de extrema relevância, visando a identificação e quantificação desta classe de compostos neste fruto, para agregar valor e ampliar o seu potencial de aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 5, p. 660–666, 2009.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.
- APAK, R. *et al.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496–1547, 2007.
- ARRUDA, H. S.; CRUZ, R. G. DA; ALMEIDA, M. E. F. DE. Caracterização química, funcionalidade e toxicidade do pequi. **Nutrição Brasil**, v. 11, n. 5, p. 315–319, 2012.
- ÁVILA, R. DE; OLIVEIRA, L. F. DE; ASCHERI, D. P. R. Caracterização dos Frutos Nativos dos Cerrados: Araticum, Baru e Jatobá. **Revista Agrotecnologia**, v. 1, n. 1, p. 53–70, 2010.
- BARILE, D.; RASTALL, R. A. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 214–219, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BIAN, J. *et al.* Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. **Food Chemistry**, v. 156, p. 7–13, 2014.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.
- BISIO, A. *et al.* Controlled γ -ray irradiation of heparin generates oligosaccharides enriched in highly sulfated sequences. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 101–112, 2004.
- BORREGA, M.; SIXTA, H. Purification of cellulosic pulp by hot water extraction. **Cellulose**, v. 20, n. 6, p. 2803–2812, 2013.
- BRAGA FILHO, J. R. *et al.* Danos causados por insetos em frutos e sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841) no Cerrado de Goiás. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 4, p. 21–28, 2007.

BRAGA FILHO, J. R. *et al.* Germinação de sementes e emergência de plântulas de araticum oriundos do cerrado de goiás. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 74–81, 2014.

BRAGA FILHO, J. R. *et al.* Produção de frutos e caracterização de ambientes de ocorrência de plantas nativas de araticum no cerrado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 461–473, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Alimentos**. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 2 out. 2014. (Atualizado em julho/2008. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas).

BURANA-OSOT, J. *et al.* Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 9, p. 1205–1210, 2010.

BURANA-OSOT, J. *et al.* Photolytic depolymerization of alginate. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 15, p. 2023–2027, 2009.

CARDOSO, L. DE M. *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, v. 68, n. 2, p. 121–134, 2013.

CARTEA, M. E. *et al.* Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251–280, 2011.

CAVALCANTE, T. R. M. *et al.* Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 235–240, 2008.

CHANDÍA, N. P.; MATSUHIRO, B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 235–40, 2008.

CHEYNIER, V. *et al.* Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, 2012.

COTA, L. G. *et al.* Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 2172–2180, 2011.

COURTOIS, J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 261–273, 2009.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 11, p. 353–361, 1996.

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

DAMIANI, C. *et al.* Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 723–729, 2011.

DAMIANI, C. *et al.* Stability of frozen marolo pulp during storage. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 713–721, 2013.

DELATTRE, C. *et al.* Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. **Minerva Biotechnology**, v. 17, p. 107–117, 2005.

DI BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J. B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 10, p. 1457–1473, 2013.

DRAGANO, N. R. V. *et al.* Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319–325, 2010.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 145–151, 2013.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental–nutritional interaction. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 828–834, 2001.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: a review of the literature. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 248–266, 2011.

FILICI, M.; MARCIELLO, M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: a powerful tool for a sweet challenge. **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 701–718, 2013.

FOGLIANO, V. *et al.* Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1035–1040, 1999.

FORGO, P. *et al.* Thermal degradation and consequent fragmentation of widely applied oligosaccharides. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 37–46, 2013.

GANAIIE, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12–17, 2013.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 116–122, 2012.

GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–15, 2012.

GIESE, E. *et al.* Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683–700, 2011.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. DE. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

GONÇALVES, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; PIMENTA, L. P. S. *Annona crassiflora* wood constituents: antimalarial efficacy, larvicidal and antimicrobial activity. In: GUPTA, V. K.; VERMA, A. K.; KAU, L. S. (Eds.). **Comprehensive Bioactive Natural Products-Efficacy, Safety & Clinical Evaluation**. 1. ed. Houston: Studium Press LLC, 2010. p. 293–305.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GULLÓN, B. *et al.* Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 2, p. 153–161, 2013.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HE, H.; YANG, F.; DU, Y. Synthesis of natural β -D-(1→3)-glucopyranosyl oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 18, p. 1673–1678, 2002.

HU, T. *et al.* Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method. **Carbohydrate Research**, v. 373, p. 53–58, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

INOUE, M. *et al.* Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735–741, 2010.

JALAN, N. *et al.* Studies on production of fructo-oligosaccharides (FOS) by gamma radiation processing of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 365–370, 2013.

KANG, H. J. *et al.* Antioxidant and cancer cell proliferation inhibition effect of citrus pectin-oligosaccharide prepared by irradiation. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 3, p. 313–320, 2006.

KANG, H. J. *et al.* Effect of citrus pectin oligosaccharide prepared by irradiation on high cholesterol diet B6.KOR-ApoE mice. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 884–888, 2009.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KONDEPUDI, K. K. *et al.* Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 489–497, 2012.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 217–224, 2014.

LAGE, G. A. *et al.* The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 11, p. 808–811, 2014.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 132 p. Dissertação (Mestrado em Química – Química Orgânica), Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LAM, K.-L.; CHI-KEUNG CHEUNG, P. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 1, p. 45–64, 2013.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936–948, 2012.

LEWANDOWSKA, U. *et al.* Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12183–12199, 2013.

LI, L. *et al.* Efficient synthesis of β -(1,6)-linked oligosaccharides through microwave-assisted glycosylation. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 3693–3699, 2013.

LIMA, I. L. P. *et al.* Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 675–684, 2012b.

LIMA, R. E. DE *et al.* Effect of water contents and storage on caju-de-árvore-do-cerrado seed germination. **Global Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 78–82, 2012a.

LOAIZA, M.; CHAVEZ, G.; SABINO, M. Obtención y modificación química de oligosacáridos de quitosano. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, n. 1, p. 25–26, 2014.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231–235, 2013.

MARIANO, R. G. DE B.; COURI, S.; FREITAS, S. P. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* camb. (Pequi) pulp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 637–643, 2009.

MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás - Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 771–777, 2009.

MARTINS, B. DE A. **Avaliação físico-química de frutos do cerrado *in natura* e processados para a elaboração de multimisturas**. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Programa de Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, Universidade Católica de Goiás, 2006.

MATTHEWS, S. *et al.* Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 405–410, 1997.

MCNAUGHT, A. D. Nomenclature of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 297, n. 1, p. 1–92, 1997.

MESQUITA, M. L. DE *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783–787, 2005.

MIGUEL, A. *et al.* Dinâmica da comunidade lenhosa de uma floresta de galeria na transição Cerrado-Floresta Amazônica no Leste de Mato Grosso, em um período de sete anos (1999 a 2006). **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 53–61, 2011.

MONSAN, P.; REMAUD-SIMÉON, M.; ANDRÉ, I. Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 293–300, 2010.

MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655–66, 2009.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 237–248, 2012.

MOURÃO, M. DE M. *et al.* Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. 1-9, 2009.

MUNDIM, S. A. P. **Elaboração de iogurte funcional com leite de cabra, saborizado com frutos do cerrado e suplementado com inulina**. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.

NAKAI, H. *et al.* Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 301–309, 2013.

NATTORP, A. *et al.* Model for random hydrolysis and end degradation of linear polysaccharides: application to the thermal treatment of mannan in solution. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 8, p. 2919–2926, 1999.

NILE, S. H.; KHOBRADE, C. N.; PARK, S. W. Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as an antioxidants. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1007–1014, 2012.

OKU, T.; NAKAMURA, S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1253–1261, 2002.

OLIANI, J. *et al.* Chemical composition and *in vitro* antiprotozoal activity of the volatile oil from leaves of *Annona crassiflora* mart. (Annonaceae). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 8–15, 2013.

OLIVEIRA, A. C. DE *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, K. A. DE M. *et al.* Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 277–281, 2008.

OMENA, M. C. DE *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2549–2556, 2007.

PALAFOX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. R6–R15, 2011.

PARLATO, M. C. *et al.* Application of glycosyl thioimidates in solid-phase oligosaccharide synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 5, p. 1716–1725, 2008.

PIMENTA, L. P. S. *et al.* *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1254–1259, 2014.

PIRES, M. V. V. **Estudo de características morfológicas e variabilidade genética de baru e araticum utilizando marcadores RAPD e microssatélites**. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011.

PISOSCHI, A.; NEGULESCU, G. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2011.

POPA-NITA, S. *et al.* Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1203–1211, 2009.

PORTELA, A. DA S. *et al.* Estatinas *x* ácido lipóico na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 9–15, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435–441, 2009.

QUEIROZ, S. É. E. Estudos moleculares em *Annona crassiflora* Mart. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, p. 23–29, 2011.

QUIRÓS-SAUCEDA, A. E. *et al.* Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1063–1072, 2014.

RAJENDRAN, P. *et al.* Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

REZENDE, M. L.; CÂNDIDO, P. DE A.; MALAFAIA, G. C. Sistemas agroalimentares localizados: uma abordagem para a exploração do marolo (*Annona Crassiflora* Mart.) na região de Alfenas, Minas Gerais. **Scientia Plena**, v. 8, n. 8, p. 1–7, 2012.

RODRIGUES, A. M. S. *et al.* Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314–317, 2006.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 93–100, 2011.

ROESLER, R. **Estudo de frutas do cerrado brasileiro para avaliação de propriedade funcional com foco na atividade antioxidante**. 218 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007.

ROESLER, R. *et al.* evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. C102–C107, 2006.

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E. Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1613–1618, 2010.

ROUZAUD, G. C. M. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Functional Ingredients for Microbial Management Strategies. In: BILIADERIS, C. G.; IZYDORCZYK, M. S. (Eds.). **Functional Food Carbohydrates**. New York: CRC Press, 2006. p. 479–509.

SAAD, N. *et al.* An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1–16, 2013.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69–80, 1999.

SAKO, T.; TANAKA, R. Prebiotics - Types. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 354–364.

SANTOS, A. F. DOS; SANT'ANA, A. E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 2001.

SANTOS, L. P. *et al.* Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 705–707, 1996.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. DE. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 387–391, 1994.

SEIBEL, J.; BUCHHOLZ, K. Tools in oligosaccharide synthesis current research and application. In: HORTON, D. (Ed.). **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. Washington: Elsevier Inc., 2010. v. 63, p. 101–138.

SELMA, M. V; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6485–6501, 2009.

SILVA, A. M. L.; GOMES, G. A. C.; MARTINS, B. A. Alterações físico-químicas e estudo enzimático da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart). **Estudos**, v. 36, n. 5/6, p. 775–783, 2009.

SILVA, E. P. DA *et al.* Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 803–809, 2009.

SILVA, J. J. DA *et al.* *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333–340, 2014.

SILVA, M. R. *et al.* Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790–1793, 2008.

SILVA, M. R.; JÚNIOR, R. T. DE O. S.; FERREIRA, C. C. DA C. Estabilidade da vitamina C em cagaita *in natura* e durante a estocagem da polpa e refresco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 1, p. 53–58, 2008.

SILVA, M. V *et al.* Growth inhibition effect of Brazilian Cerrado plant extracts on *Candida* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 2, p. 138–141, 2001.

SILVEIRA, P. S. DA. **Estudos fisiológicos e moleculares durante a superação da dormência morfológica de sementes de *Annona crassiflora***. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2014.

SINGH, V. *et al.* Hydrolysis of plant seed gums by microwave irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 523–525, 2003.

SITTA, A. *et al.* Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 2, p. 157–165, 2014.

SOARES JÚNIOR, M. S. *et al.* Filmes plásticos e ácido ascórbico na qualidade de araticum minimamente processado. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1779–1785, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOMOGYI, A. *et al.* Antioxidant measurements. **Physiological Measurement**, v. 28, n. 4, p. 41–55, 2007.

SOUZA, V. R. DE *et al.* Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012.

SRINIVASAN, K. Antioxidant potential of spices and their active constituents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 352–372, 2014.

SUJKA, M.; JAMROZ, J. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 413–419, 2013.

TEMPONE, A. G. *et al.* Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, 2005.

THATOI, H. N.; PATRA, J. K.; DAS, S. K. Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 3, p. 561–579, 2013.

TIRUCHINAPALLY, G. *et al.* Divergent heparin oligosaccharide synthesis with preinstalled sulfate esters. **Chemistry**, v. 17, n. 36, p. 10106–10112, 2011.

TUNG, B. T. *et al.* Modulation of endogenous antioxidant activity by resveratrol and exercise in mouse liver is age dependent. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 69, n. 4, p. 398–409, 1 abr. 2014.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. *et al.* Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 189–197, 2014.

VILAR, J. *et al.* Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, fev. 2008.

VODENICAROVÁ, M. *et al.* Xyloglucan degradation using different radiation sources: a comparative study. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 2, p. 157–64, 2006.

WASIKIEWICZ, J. M. *et al.* Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 73, n. 5, p. 287–295, 2005.

WEIJERS, C. A. G. M.; FRANSSEN, M. C. R.; VISSER, G. M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 436–456, 2008.

WESTPHAL, Y. *et al.* Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 9, p. 1180–1189, 2010.

XIAO, X. *et al.* Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 63–70, 2013.

YANG, H. *et al.* Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7171–7176, 2011.

ZHANG, J. *et al.* Practical preparation of 2-azido-2-deoxy-beta-D-mannopyranosyl carbonates and their application in the synthesis of oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 18, p. 2810–7, 2007.

ZÚÑIGA, E. A.; MATSUHIRO, B.; MEJÍAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 208–215, 2006.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.) USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Artigo a ser submetido ao periódico *Food Chemistry*

Henrique Silvano Arruda^{1*}, Gustavo Araujo Pereira¹ e Glaucia Maria Pastore¹

¹Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – FEA/UNICAMP.

*hsilvanoarruda@gmail.com

Otimização dos parâmetros de extração de compostos fenólicos da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) usando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

RESUMO

Neste estudo, a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi empregada para otimizar a temperatura (X_1 : 25 - 75 °C) e concentração de etanol (X_2 : 0 - 70 %) na recuperação de compostos fenólicos (CFT) a partir da polpa de araticum. A eficiência do processo de extração foi monitorada ao longo do tempo e foi notado que as condições de equilíbrio foram atingidas entre 75 e 90 minutos. Os resultados sugeriram que as condições ótimas foram concentração de etanol de 46 % (v/v) e temperatura de extração de 75 °C. Nas condições ótimas, o CFT experimental foi de $4,67 \pm 0,032$ g GAE.100 g⁻¹ de polpa de araticum liofilizada (PAL), que foi muito próximo ao valor predito (4,41 g GAE.100 g⁻¹ PAL). O modelo polinomial de segunda ordem ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais com R^2 ajustado de 0,9793 ($p < 0,0001$), implicando em uma boa concordância entre os valores preditos e experimentais, o que indica aceitabilidade da MSR na otimização das condições de extração de CFT da polpa de araticum.

Palavras-chave: frutos do Cerrado, compostos bioativos, antioxidantes, *Folin-Ciocauteau*, planejamento experimental.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente um número crescente de pessoas tem buscado um estilo de vida natural e saudável. Assim, os compostos bioativos naturais que podem ser utilizados na dieta ou aplicados como medicamentos naturais têm recebido grande atenção (GONG *et al.*, 2012). Plantas e produtos vegetais têm sido utilizados como fonte de medicamentos há muito tempo e suas propriedades medicinais vêm sendo investigadas em estudos científicos recentes desenvolvidos em todo o mundo devido às suas potentes atividades antioxidantes, ausência de efeitos colaterais e viabilidade econômica (SINGH; SHARMA; SARKAR, 2012).

Annona crassiflora Mart. é um planta frutífera nativa do Cerrado brasileiro pertencente à família *Annonaceae* conhecida popularmente como araticum, araticum-do-Cerrado, ariticum, articum, marolo, bruto, cabeça-de-negro e pasmada (VILLELA; BATISTA; DESSIMONI-PINTO, 2013). Várias partes dessa planta (folha, madeira, casca do fruto, fruto e semente) têm sido amplamente utilizadas pela medicina popular no tratamento de feridas, doenças sexualmente transmissíveis (DST's), acidentes ofídicos, doenças degenerativas e no combate aos piolhos, além disso, apresentam propriedades antimicrobiana, antidiarreica; antitumoral e antirreumática (DRAGANO *et al.*, 2010).

Os frutos contêm uma grande diversidade de compostos fitoquímicos tais como carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais (DRAGANO *et al.*, 2010), sendo considerada uma fonte natural de antioxidantes devido à capacidade de sequestrar radicais apresentada por estes compostos (ROESLER *et al.*, 2006; ROESLER *et al.*, 2007a; DAMIANI *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012). As diversas propriedades farmacológicas do fruto incluem atividade antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2014), atividade moluscicida (SANTOS; SANT'ANA, 2001) e atividade hepatoprotetiva (ROESLER, 2011). A polpa do fruto tipicamente é consumida *in natura* ou utilizada no preparo de doces, geleias, sucos, licores, tortas, pães, bolos, iogurtes e sorvetes (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2007). Nos últimos anos, este fruto tem atraído a atenção de pesquisadores

e indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas devido ao seu rico perfil de nutrientes e fitoquímicos.

Nas últimas décadas, o uso de compostos fenólicos de origem vegetal cresceu intensivamente nos setores alimentícios. Eles têm sido utilizados em substituição aos antioxidantes sintéticos devido aos efeitos indesejáveis tardios que podem causar à saúde humana e animal (ILAIYARAJA *et al.*, 2015). Compostos fenólicos compreendem um grupo diverso de moléculas biologicamente ativas e é uma das mais importantes classes de metabólitos secundários de plantas, sendo essenciais para seu crescimento. Além disso, o consumo destes compostos está associado a vários benefícios à saúde humana que são atribuídos às suas propriedades biológicas, tais como efeitos antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antiviral, antioxidante, cardioprotetor e vasodilatador (GHITESCU *et al.*, 2015).

A extração é o estágio inicial e também um dos passos mais importantes na recuperação e purificação de compostos fenólicos de matrizes vegetais (BAE *et al.*, 2015). A escolha do processo de extração deve ser fundamentada nas seguintes características: versatilidade, simplicidade, custo e capacidade de preservar a maioria dos compostos fenólicos presentes na matriz vegetal (THOO *et al.*, 2013). No entanto, não existe um procedimento de extração generalizado que se aplique a todos os compostos fenólicos, uma vez que os compostos fenólicos presentes em fontes naturais apresentam uma variedade de estruturas e propriedades físico-químicas e, portanto diferentes polaridades, além de poderem interagir de diversas maneiras com outros constituintes (açúcares, ácidos e grupos alquila) em sistemas alimentares, formando uma infinidade de compostos, dentre eles taninos condensados e fenóis poliméricos (YILMAZ; KARAASLAN; VARDIN, 2014). Além disso, a eficiência de extração dos compostos fenólicos também é afetada por outros fatores tais como método de extração, tamanho de partícula, tempo de contato, temperatura de extração, composição e polaridade do solvente, pH, relação solvente-sólido e número de re-extrações (CHAN *et al.*, 2009; THOO *et al.*, 2013). Assim, a escolha adequada destes fatores se torna um ponto crítico para a quantificação precisa e avaliação das propriedades benéficas dos compostos fenólicos (LUTHRIA, 2012), portanto, um procedimento de

extração específico deve ser desenvolvido e otimizado para cada matriz vegetal (CHEN *et al.*, 2013).

Vários métodos têm sido aplicados para extrair compostos fenólicos de matrizes vegetais, dentre eles a maceração, extração *Soxhlet*, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração sob alta pressão, extração por campo elétrico pulsado, entre outras (TAO *et al.*, 2014). A extração sólido-líquido ou extração por solvente é o método de extração mais comumente utilizado na recuperação de compostos fenólicos devido à sua simplicidade e facilidade (YIM *et al.*, 2013).

O método clássico de otimização consiste em variar um fator por vez (*one-factor-at-a-time*) mantendo os demais fixados em valores constantes. Apesar de simples, este método é incapaz de determinar os efeitos de interação entre os fatores, além de ser demorado, caro e menos efetivo (CHAN *et al.*, 2009). A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma técnica estatística efetiva para avaliar os efeitos de múltiplos fatores e suas interações e apresenta as vantagens de usar um reduzido número de medidas experimentais, fornece interpretação estatística dos dados e identifica a interação entre os fatores, caso exista, além de ser menos trabalhosa e demorada que os métodos clássicos de otimização (BAE *et al.*, 2015). A MSR tem sido aplicada com sucesso para modelar e otimizar processos bioquímicos e biotecnológicos relacionados a sistemas alimentares (GONG *et al.*, 2012). Diferentes métodos de MSR tais como Delineamento *Box–Behnken* (DBB) (*Box–Behnken Design - BBD*), Delineamento Composto Central (DCC) (*Central Composite Design - CCD*) e Delineamentos Fatoriais Completos com 3 Níveis (DFCTN) (*Three-Level Full Factorial Designs - TFFD*) têm sido largamente utilizados em diversos campos de pesquisa. O DCC é o método mais popular devido à sua adequação em modelo e planejamento experimental e por ser mais rápido e eficiente que muitos outros delineamentos (CHEN; ZHAO; YU, 2015).

Estudos acerca do conteúdo de compostos fenólicos na polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) ainda são escassos e nenhum trabalho anterior reportou a otimização das condições de extração sobre a recuperação destes compostos, o que pode levar à sua

subestimação. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo aplicar a MSR para otimizar a temperatura de extração e a concentração de etanol a fim de maximizar a recuperação de compostos fenólicos a partir da polpa de araticum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções e reagentes químicos

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$), obtida pelo um sistema de purificação *Milli-Q* (Millipore, Bedford, modelo CT Q3UV, MA, EUA). Foram utilizados reagentes de alto grau analítico com padrão de ácido gálico (*pureza* > 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), metanol (*p.a.*, Chemco, Hortolândia-SP, Brasil), etanol (*p.a.*, Dinâmica, Diadema-SP, Brasil), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (*p.a.*, Ecibra, Santo Amaro-SP, Brasil) e reagente Folin-Ciocalteu (*p.a.*, Dinâmica, Diadema-SP, Brasil). Todos os reagentes foram armazenados nas condições ideais conforme especificações dos fabricantes.

2.2. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras

Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) em completo estado de maturidade fisiológica foram coletados na área rural do município de Carmo do Paranaíba, Minas Gerais/Brasil, durante a estação de colheita (de janeiro a março de 2014), após caírem naturalmente das árvores. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), São Paulo/Brasil, em caixas de poliestireno, até 36 horas após a coleta. Os frutos livres de defeitos fisiológicos e patológicos e completamente maduros foram lavados com água corrente para a remoção de sujidades superficiais. Em seguida, a polpa do fruto foi manualmente separada das sementes e casca, congelada com auxílio de nitrogênio líquido e liofilizada (*LIOTOP*, modelo L101, São Carlos, Brasil). A temperatura e a pressão da câmara de liofilização

foram de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 Pa, respectivamente. O teor de umidade encontrado para a polpa foi de $71,73 \pm 1,97\%$. A polpa liofilizada (PAL) foi moída em moinho de facas (*Marconi, modelo MA340, Piracicaba, Brasil*) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi acondicionado e identificado em embalagens de polietileno e armazenado em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Sanyo Electric Co., modelo MDF-C8V1, Japão*) até o momento das extrações (CARDOSO *et al.*, 2013).

2.3. Procedimento de extração

A extração dos compostos fenólicos presentes na polpa de araticum foi realizada por meio de um método de extração convencional sólido-líquido, no qual foram utilizadas soluções hidroetanólicas. O etanol foi selecionado como solvente extrator devido a sua versatilidade, baixo custo, atoxicidade e caráter polar, além de ser comumente utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010; CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

A extração foi realizada misturando o fruto liofilizado à soluções hidroetanólicas (0 – 70 % v/v, etanol:água) conforme especificadas pelo planejamento experimental (Tabela 1) na razão de 10:1 (solvente para fruto liofilizado) em um banho-maria agitado (*New Brunswick Scientific Classic Series, modelo C76, NJ, EUA*) mantido a 200 rpm por 90 minutos. A temperatura de cada ensaio (25 - 75 $^{\circ}\text{C}$) (Tabela 1) foi mantida constante durante o procedimento de extração. As extrações foram conduzidas em *Erlenmeyer* adaptado para evitar o efeito vórtice, obtendo uma melhor mistura do sistema durante a extração. Alíquotas das amostras foram coletadas após 1 (homogeneização manual), 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos (banho de agitação) do início da extração para o monitoramento da cinética de extração dos compostos fenólicos. Após cada extração, as amostras foram transferidas para microtubos e em seguida centrifugadas (*Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R, Tuttlingen, Alemanha*) a 10.000 rpm por 11 minutos a 5 $^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Sanyo Electric Co., modelo MDF-C8V1, Japão*) até o momento das análises.

2.4. Otimização dos parâmetros de extração

A otimização dos parâmetros de extração dos CFT presentes na polpa de araticum foi realizada utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Antes do desenvolvimento do estudo pela MSR, a escolha das variáveis independentes e a determinação de seus níveis e valores experimentais foram definidos como anteriormente reportado por Ilaiyaraja *et al.* (2015) e Bachir bey *et al.* (2014), os quais otimizaram os parâmetros de extração de compostos fenólicos em fruta do macaco (*Feronia lominia*) e figo (*Ficus carica*), respectivamente. O efeito das variáveis independentes x_1 (temperatura de extração, °C) e x_2 (concentração de etanol, % v/v) sobre o processo de extração foi investigado empregando-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (RODRIGUES; IEMMA, 2009). As variáveis independentes estudadas e seus níveis codificados e reais encontram-se apresentados na Tabela 1.

Os experimentos foram conduzidos de forma randomizada e os dados foram analisados por meio de múltiplas regressões usando o método dos quadrados mínimos. A função resposta (Y) foi particionada em componentes linear, quadrático e interação e os dados foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem como mostrado na Equação 1:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Equação 1}$$

Onde Y é a resposta mensurada predita (CFT); β_0 é o intercepto; β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes do modelo (linear, quadrático e interação); e x_i e x_j são os níveis codificados das variáveis independentes. A fim de visualizar a relação entre a resposta e os níveis de cada fator e deduzir as condições ótimas, os coeficientes de regressão foram usados para gerar superfícies de resposta tridimensionais e curvas de contorno a partir da equação polinomial ajustada.

2.5. Análise dos dados

A significância dos coeficientes de regressão sobre a extração de CFT foi avaliada estatisticamente por meio de teste *t* de *Student*, enquanto que o modelo regressão polinomial foi avaliado através uma análise de variância (ANOVA). Para avaliar a influência do tempo de extração sobre o conteúdo de CFT extraídos, os resultados foram submetidos à ANOVA seguida de teste de *Tukey HSD*. Todas as análises estatísticas foram realizadas ao nível de 5 % de significância ($p \leq 0,05$) com o auxílio do *Software STATISTICA* versão 8.0 (*Statsoft, Oklahoma, USA*).

2.6. Validação do modelo

Os valores ótimos das variáveis independentes selecionadas foram obtidos resolvendo a equação da regressão e também pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno. A verificação do modelo preditivo de extração para os CFT foi realizada por meio de ensaios em triplicata nestas condições ótimas de composição do solvente, temperatura de extração e tempo de contato. Os valores preditos foram comparados com os valores experimentais a fim de determinar a validade e adequação do modelo.

2.7. Determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) (*Folin-Ciocalteu Micro-Assay*)

O CFT foi determinado espectrofotometricamente pelo método de *Folin-Ciocalteu* como descrito por Cicco *et al.* (2009), com algumas modificações. Este método envolve a redução do reagente *Folin-Ciocalteu* pelos compostos fenólicos, com concomitante formação de um complexo azul em meio básico, cuja absorbância a 760 nm aumenta linearmente com a concentração de fenólicos no meio reacional. Os extratos da fruta e os padrões da curva de calibração foram diluídos em metanol 50 % (v/v). Em seguida, 100 μ L das amostras diluídas, soluções de calibração ou branco (metanol 50 %) foram pipetadas em tubos teste de 10 mL juntamente com 100 μ L de reagente *Folin-Ciocalteu* 50 % (v/v). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso para atingir o

equilíbrio. Após 2 minutos, 800 µL de Na₂CO₃ 5 % (m/v) foram adicionados. A mistura foi mantida em banho-maria (*New Brunswick Scientific Classic Series, modelo C76, NJ, EUA*) a 40 °C por 20 minutos. Subsequentemente, os tubos foram rapidamente resfriados em banho de gelo e a absorbância mensurada em cubetas de 1 cm utilizando um espectrofotômetro UV/Visível (*Beckman, modelo DU600, CA, EUA*) operando a 760 nm. As soluções de metanol 50 % (v/v) e *Folin-Ciocalteu* 50 % (v/v) foram obtidas por meio da diluição em água. A curva de calibração ($y = 0,0115x + 0,0229$; $R^2 = 0,9908$) foi preparada com padrão de ácido gálico (10 - 80 µg.mL⁻¹), e o CFT foi expresso como g de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de fruto liofilizado (g GAE.100 g⁻¹ PAL). A quantificação foi realizada em triplicata e os valores foram reportados como média ± desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Existe um grande número de fatores que devem ser considerados para a obtenção das condições experimentais ótimas de extração de um composto a partir de matrizes alimentícias (BAE *et al.*, 2015). A MSR consiste de um grupo de técnicas empíricas desenvolvidas para avaliar a relação existente entre um conjunto de fatores experimentais controlados e as respostas medidas. Duas variáveis foram selecionadas para otimizar as condições de extração de compostos fenólicos presentes na polpa de araticum usando um DCCR. O DCCR fornece predições de relativamente alta qualidade ao longo de todo o espaço do planejamento e não requer o uso de pontos fora da faixa de variação original do fator (SINGH; SHARMA; SARKAR, 2012).

As variáveis independentes estudadas foram concentração de etanol (% v/v, etanol:água) e temperatura de extração (°C). O estudo de otimização foi composto de duas partes. Em primeiro lugar, aplicou-se a cinética de extração para observar o efeito do tempo sobre a extração de compostos fenólicos. Em seguida, a MSR foi utilizada para otimizar a concentração de etanol e a temperatura de extração. Há várias desvantagens em se utilizar etanol para a extração de compostos naturais a partir de tecidos vegetais tais como menor

eficiência de extração e dificuldade de remoção do meio. No entanto, em sistemas de processamento de alimentos é preferível o uso de etanol, uma vez que é um solvente menos perigoso, considerado natural e seguro para o consumo humano (YILMAZ; KARAASLAN; VARDIN, 2014).

3.1. Cinética de extração

A seleção do tempo de extração adequado é um parâmetro extremamente importante e devem-se considerar seus impactos na eficiência, mão-de-obra e custo energético (YILMAZ; KARAASLAN; VARDIN, 2014). O tempo de extração de compostos antioxidantes pode ser influenciado pelo grau de polimerização e solubilidade destes compostos e por sua interação com a matriz estudada (WONG *et al.*, 2014). O aumento do tempo de contato entre o solvente e a matriz leva à progressiva liberação do soluto da matriz sólida para o solvente (TAKEUCHI *et al.*, 2009). No entanto, a transferência de massa (equilíbrio da difusão do soluto entre sólido e solvente) atinge um valor máximo em determinado tempo (BACHIR BEY *et al.*, 2014), a partir do qual a recuperação do composto-alvo é mantida constante ou até mesmo é reduzida devido à degradação. Este fato pode ser explicado pela segunda lei da difusão de *Fick*, a qual prediz que após certo tempo, geralmente entre 1 e 2 horas, haverá um equilíbrio final entre as concentrações do soluto na matriz sólida e no solvente (BENMEZIANE *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2014).

O primeiro passo deste estudo foi avaliar a cinética de extração dos compostos fenólicos presentes na polpa de araticum a fim de se determinar o tempo no qual houve a máxima recuperação destes compostos. Como esperado, o CFT aumentou ao longo do tempo de extração, sendo observado um aumento mais expressivo nos 15 minutos iniciais, a partir do qual o aumento foi menor ou quase nulo (Figura 1).

Testes estatísticos foram conduzidos para avaliar a influência do tempo sobre a recuperação de CFT, os resultados estão reportados na Tabela 1. Como se pode observar, as concentrações de equilíbrio foram atingidas após 75 minutos para os ensaios 3, 5, 6 e 10;

após 60 minutos para os ensaios 2, 9 e 11; após 45 minutos para o ensaio 8 e após apenas 15 minutos para os ensaios 1 e 7. O ensaio 4 não atingiu as condições de equilíbrio, uma vez que o CFT foi máximo no tempo de 90 minutos ($p \leq 0,05$). Tendo em vista que alguns ensaios não haviam atingido o tempo de equilíbrio e que, com poucas exceções, não houve decréscimo na recuperação dos compostos fenólicos após ser atingido o tempo de equilíbrio, o tempo de extração foi fixado em 90 minutos para o procedimento de otimização das variáveis temperatura de extração e concentração de etanol no solvente extrator sobre o CFT.

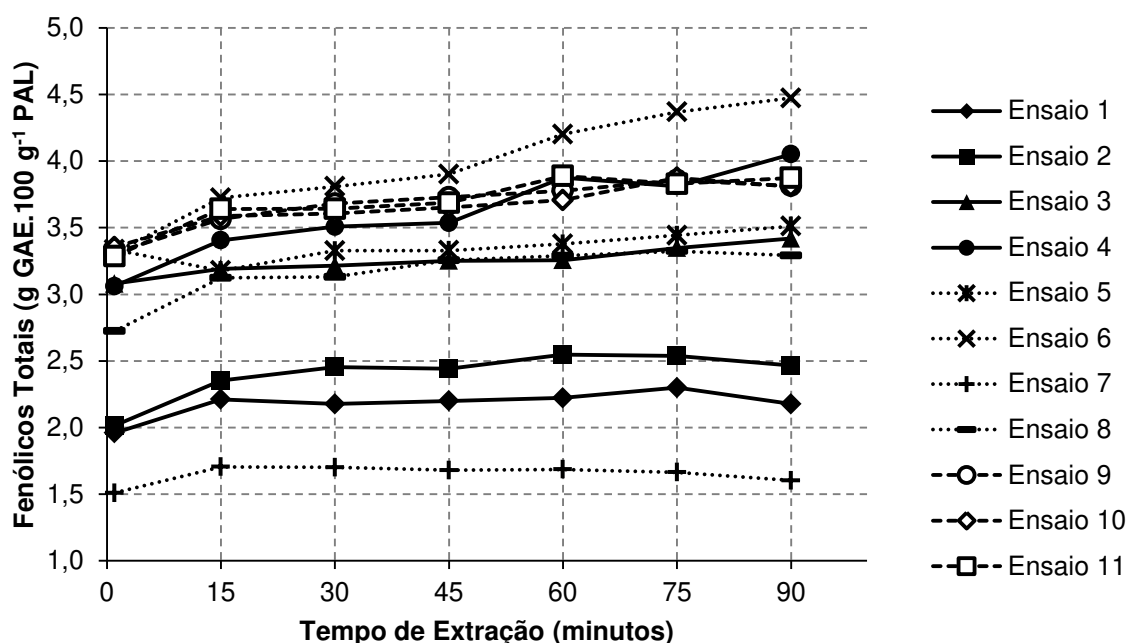


Figura 1 – Cinética de extração dos compostos fenólicos totais ao longo dos 90 minutos de extração para os 11 ensaios do planeamento experimental.

Tabela 1 - Planejamento experimental e valores experimentais e preditos para o conteúdo de fenólicos totais na polpa de araticum.

Ensaio	Variáveis				Fenólicos Totais (g GAE.100 g ⁻¹ PAL)								Erro do
	Codificadas		Reais		Valores Experimentais								modelo
	x_1	x_2	T	[E:A]	1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	90 min	ER (%)
1	-1	-1	32	10	1,96±0,027c	2,21±0,003b	2,18±0,023b	2,20±0,023b	2,22±0,034b	2,30±0,038a	2,18±0,009b	2,17	0,32
2	+1	-1	68	10	2,01±0,003d	2,35±0,026c	2,45±0,007b	2,44±0,021b	2,55±0,019a	2,54±0,023a	2,47±0,002b	2,75	-11,50
3	-1	+1	32	60	3,08±0,049d	3,19±0,042cd	3,21±0,054bcd	3,25±0,043bc	3,26±0,077bc	3,35±0,048ab	3,42±0,019a	3,47	-1,50
4	+1	+1	68	60	3,06±0,024e	3,41±0,049d	3,51±0,007cd	3,54±0,021c	3,88±0,062b	3,81±0,008b	4,05±0,052a	4,05	0,03
5	-1,41	0	25	35	3,34±0,037c	3,18±0,016d	3,33±0,036c	3,33±0,043c	3,38±0,026bc	3,44±0,037ab	3,51±0,035a	3,45	1,73
6	1,41	0	75	35	3,31±0,091e	3,72±0,117d	3,81±0,038cd	3,90±0,016c	4,20±0,055b	4,37±0,035ab	4,47±0,015a	4,27	4,53
7	0	-1,41	50	0	1,51±0,030c	1,70±0,010a	1,70±0,035a	1,68±0,011a	1,69±0,009a	1,66±0,017a	1,60±0,010b	1,44	10,12
8	0	1,41	50	70	2,72±0,055c	3,12±0,064b	3,13±0,062b	3,25±0,065ab	3,29±0,016a	3,32±0,048a	3,29±0,042a	3,28	0,37
9	0	0	50	35	3,31±0,018e	3,56±0,029d	3,68±0,052c	3,73±0,048bc	3,78±0,015ab	3,86±0,015a	3,81±0,014ab	3,86	-1,21
10	0	0	50	35	3,35±0,037d	3,59±0,056c	3,61±0,022bc	3,65±0,046bc	3,71±0,014b	3,87±0,041a	3,81±0,023a	3,86	-1,33
11	0	0	50	35	3,29±0,064d	3,64±0,055c	3,64±0,034c	3,69±0,070bc	3,89±0,039a	3,83±0,053ab	3,87±0,032a	3,86	0,35

T: Temperatura (°C); **[E:A]:** Concentração de etanol (% v/v, etanol:água); **VP:** Valor predito no tempo de 90 minutos; **ER:** Erro relativo (ER (%) = (VE - VP)*100/VE).

Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de *Tukey* (p > 0,05).

3.2. Ajuste do modelo

A recuperação de compostos fenólicos é significativamente influenciada por fatores tais como tipo e concentração de solvente, temperatura, tempo e pH (ILAIYARAJA *et al.*, 2015). Os efeitos da temperatura de extração (X_1 : 25 - 75 °C) e concentração de etanol (X_2 : 0 - 70 % v/v) sobre o CFT de extratos da polpa de araticum foram investigados neste estudo. O tempo de extração foi fixado em 90 minutos. Os valores experimentais e preditos do CFT sob diferentes combinações de condições de extração após 90 minutos de extração são apresentados na Tabela 1. Os resultados mostram que o CFT variou de 1,60 a 4,47 g GAE.100 g⁻¹ matéria seca (*m.s.*), sendo que o valor mínimo foi obtido no ensaio 7 (temperatura de 50 °C e concentração de etanol de 0 % v/v), ao passo que, o experimento 6 (temperatura de 75 °C e concentração de etanol de 35 % v/v) apresentou o maior CFT.

Os dados experimentais foram ajustados a uma modelo polinomial de segunda ordem e os coeficientes de regressão foram calculados (Tabela 2). A significância de cada coeficiente foi determinada pelos *t*- e *p*-valores conforme sumarizado na Tabela 2.

A equação da regressão em nível codificado negligenciando os termos insignificantes foi gerada (modelo reduzido) (Equação 2):

$$Y \text{ (g. 100 g}^{-1}\text{)} = 3,86 + 0,29x_1 + 0,65x_2 - 0,75x_2^2 \quad \text{Equação 2}$$

Os resultados indicam que o efeito linear de primeira ordem foi significativo ($p \leq 0,05$) para a temperatura de extração (x_1) e concentração de etanol (x_2); o efeito quadrático de segunda ordem foi significativo ($p \leq 0,05$) somente para a concentração de etanol (x_2^2); enquanto que o efeito de interação entre temperatura de extração e concentração de etanol ($x_1 * x_2$) não foi significativo ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Coeficientes de regressão e análise do modelo DCCR para a extração de compostos fenólicos da polpa de araticum (90 minutos de extração).

Fatores	Código	CR	EP	<i>t</i> -valor (5)	<i>p</i> -valor
Média	β_0	3,83	0,09	42,19	< 0,0001*
Linear					
$T(x_1)$	β_1	0,29	0,06	5,13	0,0037*
$[E:A](x_2)$	β_2	0,65	0,06	11,72	0,0001*
Quadrático					
$T(x_1^2)$	β_{11}	0,03	0,07	0,48	0,6502
$[E:A](x_2^2)$	β_{22}	-0,74	0,07	-11,18	0,0001*
Interação					
$T x [E:A](x_1 * x_2)$	β_{12}	0,09	0,08	1,09	0,3251

$t_{\text{Tabelado}}(0,05;5) = 2,57$. **CR:** Coeficiente de Regressão; **EP:** Erro Padrão; **T:** Temperatura (°C); **[E:A]:** Concentração de etanol (% v/v, etanol:água).

*Parâmetros estatisticamente significativos pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

O resultado do ajuste do modelo polinomial de segunda ordem reduzido é apresentado na Tabela 3. A ANOVA mostrou que o modelo obtido foi altamente significativo ($p < 0,0001$), atestando o bom ajuste do modelo. A adequação do modelo geralmente é avaliada com base no teste de falta de ajuste ($p > 0,05$). O *p*-valor obtido ($p = 0,04$) indicou uma significativa falta de ajuste do modelo, no entanto, este valor foi muito próximo do *p*-valor crítico, sendo assim, o modelo se torna aceitável para prever com precisão as variações. Além disso, a significância da falta de ajuste pode ser explicada pela baixíssima variação dos ensaios e, conseqüentemente ao baixo valor do erro puro. Como o *F*-valor é inversamente proporcional ao erro puro, quanto menor seu valor maior será o *F*-valor, tornando-o significativo ($F\text{-valor} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 3 - ANOVA do modelo polinomial quadrático reduzido para otimização dos parâmetros de extração de compostos fenólicos da polpa de araticum (90 minutos de extração).

FV	SQ	GL	QM	F-valor	F _{Tabelado}	p-valor
Regressão	7,5243	3	2,5081	110,47	4,35	< 0,0001
Resíduos	0,1590	7	0,0227			
<i>Falta de Ajuste</i>	0,1564	5	0,0313	24,27	19,30	0,0400
<i>Erro Puro</i>	0,0026	2	0,0013			
Total	7,6833	10				
R²: 0,9839						
R² Ajustado: 0,9793						

FT: Fonte de Variação; SQ: Soma de Quadrados; GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio.

A qualidade do ajuste do modelo pode ser determinada com base no coeficiente de determinação (R^2). O R^2 pode ser definido como a variação explicada pelo modelo em relação à variação total, sendo assim, quanto mais próximo de 1, melhor o modelo empírico se ajusta aos dados experimentais (CHAN *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que, para um bom ajuste, o R^2 do modelo deve ser no mínimo 0,80 (BAE *et al.*, 2015). Os resultados da ANOVA confirmam um bom ajuste do modelo com R^2 e R^2 ajustado de 0,9839 e 0,9793, respectivamente. No entanto, elevados valores de R^2 nem sempre indicam que o modelo está bem ajustado. Em um bom modelo estatístico, o R^2 ajustado deve ser comparável ao R^2 (DAHMOUNE *et al.*, 2015) com diferença não superior a 0,1 (THOO *et al.*, 2013). O R^2 ajustado corresponde ao valor do R^2 após a eliminação de termos insignificantes do modelo (CHAN *et al.*, 2009). Neste estudo, o R^2 ajustado (0,9793) foi muito próximo ao seu R^2 (0,9839) correspondente, indicando que, mesmo após a remoção de alguns termos, a qualidade do modelo foi mantida. Pode-se notar pelo valor de R^2 ajustado que apenas 2,07 % da variação total não pode ser explicada pelo modelo. Outra forma de avaliar a qualidade do ajuste de um modelo se trata da análise dos erros relativos que medem a porcentagem do desvio entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Como pode ser observado na Tabela 1, de forma

geral, os erros relativos foram muito baixos, com variações de 0,03 - 4,53 %, com exceção dos ensaios 2 (ER = -11,50 %) e 7 (ER = -10,12 %), demonstrando um alto grau de ajuste do modelo aos valores experimentais. Desta forma, estes resultados indicam que o modelo obtido foi adequadamente ajustado aos dados experimentais, podendo ser utilizado para prever o CFT em diferentes condições de extração.

3.3. Análise da superfície de resposta do CFT

Para investigar os efeitos interativos dos fatores temperatura de extração e concentração de etanol na recuperação de CFT foram construídas uma superfície de resposta (Figura 2A) e uma curva de contorno (Figura 2B). A análise da superfície de resposta indicou que existe uma faixa de concentração ideal de etanol para a máxima recuperação de CFT, devido ao efeito quadrático negativo e significativo apresentado pela concentração de etanol.

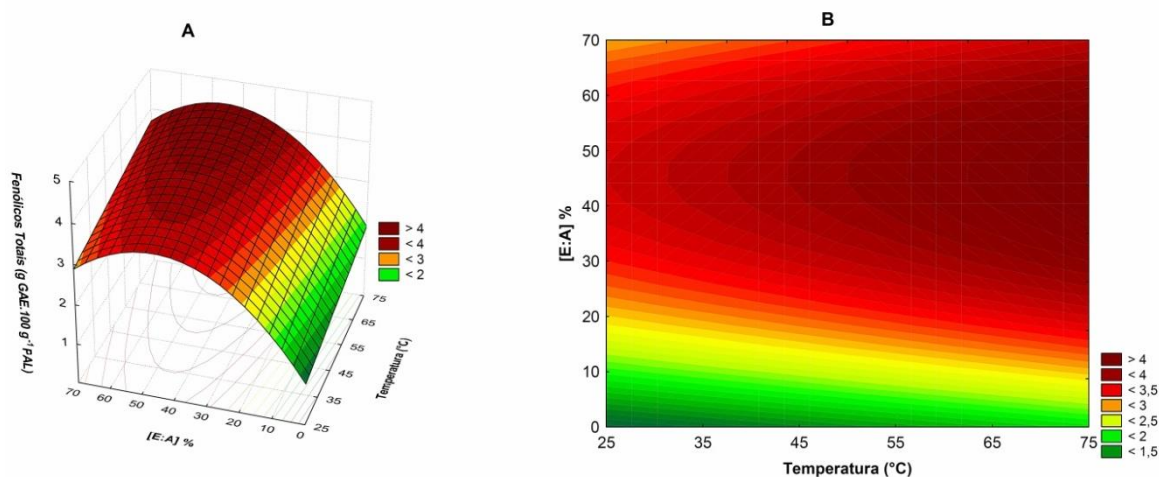


Figura 2 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para CFT em função da temperatura e concentração de etanol.

Nossos resultados também mostram que a extração de compostos fenólicos foi fortemente afetada pela variação na porcentagem de etanol. Um aumento no CFT foi notado com a elevação na concentração de etanol, e uma recuperação máxima foi obtida na região média de etanol (35 - 55 % v/v). A partir daí verificou-se um decréscimo no CFT na

região correspondente a altas concentrações de etanol (55 - 70 % v/v). Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos em outros estudos que utilizaram sistemas binários constituídos de etanol-água, os quais também reportaram aumento na extração de compostos fenólicos até determinada concentração de etanol (a qual varia com o estudo em questão) e a partir de então começou a diminuir (SINGH; SHARMA; SARKAR, 2012; THOO *et al.*, 2013; YILMAZ; KARAASLAN; VARDIN, 2014; BAE *et al.*, 2015; DAHMOUNE *et al.*, 2015).

Os vacúolos das células contêm predominantemente compostos fenólicos livres, enquanto a parede celular possui mais lignina, flavonoides e compostos fenólicos insolúveis que se encontram conjugados a açúcares, carboidratos da parede celular, ácidos orgânicos, proteínas e polissacarídeos (CHEN *et al.*, 2013). Significantes desafios na otimização de um método de extração de compostos fenólicos a partir de qualquer matriz alimentar são a diversidade estrutural dos compostos, a interação com outros componentes celulares e a existência de múltiplas formas de fenólicos agliconas e conjugadas (LUTHRIA, 2012). A solubilidade dos compostos fenólicos no solvente utilizado na extração influencia significativamente na recuperação destes compostos a partir de matrizes vegetais. Além disso, a polaridade do solvente exerce papel fundamental no aumento da solubilidade de compostos fenólicos. Portanto, é muito difícil desenvolver um procedimento de extração padrão aceitável para a recuperação de todos os fenólicos presentes no matriz (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009). Na literatura, vários solventes são utilizados na extração de compostos fenólicos, sendo muito comum o uso de misturas com água em diferentes proporções. De forma geral, os compostos fenólicos presentes em plantas são polares e usualmente são extraídos com solventes polares tais como, acetona, metanol, etanol e suas misturas e/ou soluções aquosas (BENMEZIANE *et al.*, 2014).

Água, etanol e suas misturas em diferentes proporções são os solventes mais comumente empregados em processos de extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais devido à sua abundância (MOURE *et al.*, 2001), diversidade de compostos fenólicos que podem dissolver (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009), por serem preferidos pelas indústrias de alimentos e recomendados pelo *US Food and Drug*

Administration para propósitos de extração (CHEN; ZHAO; YU, 2015). A água é um solvente fortemente polar, enquanto o etanol apresenta baixa polaridade, mas ambos podem ser misturados em qualquer proporção (ZHANG *et al.*, 2007) e formar combinações mais eficazes na extração de compostos fenólicos que quaisquer solventes utilizados individualmente (ILAIYARAJA *et al.*, 2015).

A adição de água a solventes orgânicos aumenta a eficiência de extração por: (i) causar um inchamento na material do vegetal, aumentando a área de superfície de contato entre a matriz vegetal e solvente e permitindo que o solvente orgânico penetre mais facilmente no interior da matriz da amostra (LUTHRIA, 2012; SHI; DING; XU, 2014) o que aumenta as taxas de transferência de massa por difusão (GHITESCU *et al.*, 2015); e (ii) extrair a fração de compostos fenólicos glicosilados que apresentam elevada hidrofilicidade (KIM *et al.*, 2014). Por outro lado, o etanol aumenta a recuperação de compostos fenólicos por romper a ligação entre os compostos fenólicos e a matriz da amostra (GHITESCU *et al.*, 2015) e por interagir com flavonoides provavelmente por meio de interações não-covalentes, promovendo sua rápida dissolução no solvente (SINGH; SHARMA; SARKAR, 2012). Entretanto, elevadas concentrações de etanol podem causar desnaturação proteica, dificultando a dissolução dos compostos fenólicos e, assim, influenciando na taxa de extração (CHEN *et al.*, 2013). Desta forma, existe uma determinada concentração de solvente na qual se atinge uma elevada taxa de extração. No presente estudo, a concentração ótima de etanol foi encontrada pelo uso de métodos matemáticos (derivada da Equação 2) e o valor encontrado foi de 46 % de etanol (v/v). De acordo com o princípio de “semelhante dissolve semelhante”, os compostos fenólicos extraídos da polpa de araticum teriam polaridade similar à do solvente extrator (etanol 46 %, v/v), uma vez que o solvente seria capaz de extrair apenas os compostos de polaridade semelhante (BENMEZIANE *et al.*, 2014).

A temperatura de extração apresentou apenas efeito linear significativo e positivo, indicando que um aumento na temperatura (de 25 - 75 °C, faixa estudada) promove aumento proporcional no CFT dos extratos, conforme pode ser observado na Figura 2.

Estes resultados indicam que os compostos fenólicos presentes na polpa de araticum podem ser relativamente estáveis sob condições de temperatura elevada.

O aumento da eficiência de extração de compostos fenólicos proporcionado pela elevação da temperatura pode ser atribuído: (i) ao amaciamento e inchamento dos tecidos que tornam as células permeáveis (BENMEZIANE *et al.*, 2014; TAO *et al.*, 2014); (ii) ao enfraquecimento das interações fenol-proteína e fenol-polissacarídeo que aumenta as taxas de difusão (BACHIR BEY *et al.*, 2014); (iii) ao aumento da solubilidade destes compostos no sistema, principalmente das frações poliméricas; e (iv) à rápida transferência de massa (ou taxa de difusão) devido à redução da viscosidade do solvente e à aceleração do movimento das moléculas (mobilidade molecular) (HUR *et al.*, 2014). Porém, o aquecimento pode não aumentar a extração de compostos fenólicos indefinidamente (BACHIR BEY *et al.*, 2014). A utilização de temperaturas superiores às usadas neste estudo ($> 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) pode reduzir a recuperação de compostos fenólicos através: (i) da degradação térmica e/ou química de alguns compostos fenólicos (ILAIYARAJA *et al.*, 2015); (ii) por promover a reação destes compostos com outros componentes da matriz, impedindo sua extração (YIM *et al.*, 2013); e por causar perda de solvente (GHITESCU *et al.*, 2015). Portanto, para a obtenção de um grupo específico de compostos, a temperatura de extração deve estar em conformidade com a estrutura molecular dos compostos-alvo, características da matriz, tendência à degradação e tempo de extração. Além disso, deve-se considerar também seu impacto econômico sobre os custos do processo (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Um importante parâmetro a ser observado em qualquer processo se trata da robustez, a qual mede a capacidade dos resultados produzidos por um método analítico em resistir à mudanças quando são feitas pequenas variações nas condições experimentais (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A robustez do método de extração otimizado no presente trabalho foi analisada por meio do modelo matemático gerado (Equação 2). Verificou-se que uma diminuição na temperatura de extração de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (condição de temperatura ótima) para $61,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (variação de $13,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, uma redução de 18 % na temperatura) com a concentração de etanol fixada no valor crítico (46 % v/v) ou uma

redução na concentração de etanol de 46 % v/v (concentração de etanol ótima) para 32,3 % v/v (variação de 13,7 %, ou seja, uma redução de 29,8 % do conteúdo de etanol na solução extratora) com a temperatura de extração fixada no valor crítico (75 °C), promoveu a redução de apenas 5 % no rendimento final de compostos fenólicos em relação ao valor máximo predito pelo modelo matemático nas condições otimizadas (4,41 g GAE.100 g⁻¹ PAL). Desta maneira, o método de extração de compostos fenólicos foi robusto, pois grandes alterações nas condições de extração (18 % na temperatura ou 29,8 % na concentração de etanol) provocaram pequena diminuição na recuperação de compostos fenólicos (redução de 5 %), o que também caracteriza o procedimento como de fácil controle. Além disso, a robustez permitiu verificar que é possível reduzir os custos de extração dos compostos fenólicos sem perdas significativas no rendimento por meio do uso de temperaturas de trabalho abaixo de 75 °C (menor gasto energético para manutenção da temperatura elevada) ou com o uso de menor quantidade de etanol no solvente extrator (redução de gastos na compra e/ou recuperação do solvente).

3.4. Verificação do modelo preditivo

A partir da análise das superfícies de respostas (Figura 2) e do modelo matemático gerado (Equação 2) foram determinadas as melhores condições de extração dos compostos fenólicos. A validação experimental do modelo matemático obtido (Equação 2) foi realizada por meio de ensaios em triplicata com o meio otimizado pelo planejamento experimental nas seguintes condições críticas: concentração de etanol de 46 % (v/v), temperatura de extração de 75 °C e tempo de extração de 90 minutos. A média dos valores de fenólicos totais obtida pelo procedimento de validação experimental foi $4,67 \pm 0,032$ g GAE.100 g⁻¹ PAL, valor muito próximo ao predito pelo modelo matemático nas condições otimizadas (4,41 g GAE.100 g⁻¹ PAL), apresentando erro relativo de apenas 5,54 %. A forte correlação entre os resultados real e predito confirmou que o modelo matemático obtido foi capaz de refletir satisfatoriamente o conteúdo de fenólicos totais extraídos em um sistema real, tornando-o adequado para prever os efeitos que a modificação dos níveis de cada variável em questão pode provocar no conteúdo de fenólicos extraídos (se a modificação dos níveis promove aumento ou redução da resposta analisada). Assim, a MSR pôde ser

aplicada efetivamente para otimizar o processo de extração de compostos fenólicos da polpa de araticum.

3.5. Comparação com outros métodos de extração

De acordo com a metodologia de extração desenvolvida e otimizada, a PAL apresentou um conteúdo de fenólicos totais de aproximadamente 4,67 g GAE.100 g⁻¹. Até o presente momento, poucos estudos foram conduzidos com a finalidade de avaliar o conteúdo de compostos fenólicos na polpa de araticum. Dentre os estudos disponíveis, nenhum avaliou a influência dos parâmetros de extração na obtenção destes compostos. A Tabela 4 foi construída com a finalidade de comparar a metodologia de extração do presente trabalho com metodologias utilizadas em outros estudos.

Como pode ser observado na Tabela 4, o CFT obtido no presente estudo foi muito superior aos valores até então reportados na literatura para este fruto. A variação entre os CFT obtidos nos estudos pode estar relacionada a diferenças na variedade, maturidade, clima, condições geográficas de produção, manuseio durante e após a colheita, condições de preparo e armazenamento da amostra (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008; LUZIA; JORGE, 2014) e método de extração, tais como relação solvente-sólido, massa, tempo de extração e número de re-extrações (DAMIANI *et al.*, 2011).

De forma geral, a eficiência da extração de um composto-alvo é influenciada por vários parâmetros do processo. Vários estudos têm demonstrado que os fatores mais importantes na recuperação de compostos fenólicos a partir de produtos naturais são tipo de solvente, temperatura, tempo de contato, relação solvente-sólido, tamanho de partícula, pH, dentre outros. O efeito positivo ou negativo de cada variável no fenômeno de transferência de massa é específico para cada tipo de matriz vegetal, devido às diferenças nas propriedades físico-químicas e morfológicas dos vegetais. Assim, um protocolo universal de extração não é aceitável, e um processo específico deve ser desenvolvido e otimizado para cada matriz (TAKEUCHI *et al.*, 2009; GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010). Como pode ser observado na Tabela 4, não há uma padronização nos parâmetros de

extração utilizados na recuperação de compostos fenólicos a partir da polpa de araticum, sendo que cada estudo utiliza tempo, temperatura, relação solvente-sólido, tipo e concentração de solvente distintos. Além disso, nenhum destes estudos avaliou a influência destes parâmetros sobre a extração dos compostos fenólicos. Desta forma, as condições utilizadas em tais estudos podem não ser as mais adequadas, o que levaria a uma subestimação do CFT na polpa de araticum.

Verifica-se que o procedimento de extração desenvolvido e otimizado em nosso trabalho foi mais eficiente na recuperação de compostos fenólicos da polpa de araticum quando comparado aos métodos estabelecidos na literatura, o que pode ser explicado pela combinação de um maior número de condições favoráveis neste procedimento que atuaram sinergicamente sobre a matriz estudada, aumentando a extração dos compostos nela presentes. Desta forma, estes resultados indicam que, para a extração seletiva de compostos fenólicos, é de grande importância o estudo e a otimização dos parâmetros de extração para cada matriz vegetal.

Tabela 4 - Resumo de métodos de extração utilizados por diferentes pesquisadores para a extração de CFT da polpa de araticum.

Origem	Preparo da amostra	Procedimento de extração	CFT	Referências
Goiânia-GO, Brasil	Fruta fresca.	Extração com solução hidroetanólica (95:5, v/v, etanol:água) na proporção 1:3 (m/m, fruta:solvente) por 20 minutos usando um liquidificador doméstico. Os extratos foram filtrados e o resíduo foi re-extraído sob as mesmas condições.	31,08 g GAE.kg ⁻¹ <i>m.s.</i>	Roesler <i>et al.</i> (2007a)
Minas Gerais, Brasil	Fruta fresca.	Extração realizada com dois solventes (EA : água destilada e EHE : 70:30, v/v, etanol:água). O material na proporção 1:20 (m/v, fruta:solvente) foi homogeneizado com o auxílio de <i>Ultra Turrax</i> (1 minuto, velocidade 5). Os extratos foram filtrados e o resíduo foi re-extraído sob as mesmas condições.	EHE : 211,11 mg GAE.100 g ⁻¹ <i>m.s.</i> EA : 260,50 mg GAE.100 g ⁻¹ <i>m.s.</i>	Damiani <i>et al.</i> (2011)
Goiânia-GO, Brasil	Fruta fresca.	Extração realizada com dois solventes (EA : água destilada e EHE : 95:5, v/v, etanol:água). O material na proporção 1:3 (m/m, fruta:solvente) foi homogeneizado por 20 minutos usando um liquidificador doméstico. Os extratos foram filtrados e o resíduo foi re-extraído sob as mesmas condições.	EHE : 20,31-31,08 g GAE.kg ⁻¹ <i>m.s.</i> EA : 16,91-17,01 g GAE.kg ⁻¹ <i>m.s.</i>	Roesler <i>et al.</i> (2006); Roesler <i>et al.</i> (2007b)
Região Norte de Minas Gerais, Brasil	Fruta fresca.	Uma extração sequencial foi conduzida utilizando duas soluções extratoras (Solvente 1: 50:50, v/v, metanol:água por 15 minutos; Solvente 2: 70:30, v/v, acetona:água por 1 hora). As extrações foram realizadas à temperatura ambiente.	739,37 mg GAE.100 g ⁻¹ <i>m.f.</i>	Souza <i>et al.</i> (2012)
Diamantina-MG, Brasil	Fruta fresca e farinha da polpa (seca em forno com circulação de ar forçado a 60±5 °C por 48 horas. Em seguida o material foi moído para a obtenção da farinha).	Extração com solução hidrometanólica (80:20, v/v, metanol:água) com auxílio de <i>Ultra Turrax</i> .	423,94 mg GAE.100 g ⁻¹ <i>m.f.</i> 1.245,44 mg GAE.100 g ⁻¹ de farinha da polpa	Villela, Batista & Dessimoni-Pinto (2013)
Carmo do Paranaíba-MG, Brasil	A polpa foi congelada com auxílio de nitrogênio líquido e liofilizada. Em seguida o material foi moído para a obtenção de um pó fino (PAL).	Extração com solução hidroetanólica (46:54, v/v, etanol:água) em banho de agitação por 90 minutos a 200 rpm mantido a 75 °C. Procedimento realizado uma única vez.	4,67 g GAE.100 g ⁻¹ <i>m.s.</i> 46,7 g GAE.kg ⁻¹ <i>m.s.</i> 1.320,21 mg GAE.100 g ⁻¹ <i>m.f.</i>	Presente estudo

CFT: Compostos Fenólicos Totais; **EHE**: Extração Hidroetanólica; **EA**: Extração Aquosa; *m.s.*: matéria seca; *m.f.*: matéria fresca.

4. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar o conteúdo de compostos fenólicos em frutas, no entanto, falhas no procedimento de extração podem subestimar estes valores. No presente estudo, a MSR usando o método DCCR foi empregada com sucesso para determinar as condições ideais de extração que produzem a máxima recuperação de compostos fenólicos da polpa de araticum na faixa de estudo. O modelo polinomial de segunda ordem descreveu satisfatoriamente os dados experimentais. As condições ótimas encontradas para a extração dos compostos fenólicos foram concentração de etanol de 46 % (v/v), temperatura de extração de 75 °C e tempo de extração de 90 minutos. Nas condições ótimas, o CFT experimental foi de 4,67 g GAE.100 g⁻¹ PAL, que foi muito próximo ao valor predito (4,41 g GAE.100 g⁻¹ PAL), indicando assim a adequação do modelo empregado. Ao melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado reportando o efeito conjunto da concentração de etanol, temperatura e tempo de extração na recuperação de compostos fenólicos da polpa de araticum. A partir do procedimento de extração nós conseguimos recuperar uma quantidade de CFT significativamente superior às encontradas na literatura até o presente momento, reforçando a necessidade de se desenvolver e otimizar um processo de extração para cada matriz analisada. De acordo com os resultados, pode-se concluir que o araticum apresenta elevado conteúdo de compostos fenólicos, sendo assim, se consumido regularmente pode proporcionar vários benefícios à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785–788, 2009.

BACHIR BEY, M. *et al.* Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. *Azenjar*) total phenolic compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 162, p. 277–282, 2014.

BAE, I. K. *et al.* Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469–475, 2015.

BENMEZIANE, F. *et al.* Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*). **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 1025–1029, 2014.

CARDOSO, L. DE M. *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, v. 68, n. 2, p. 121–134, 2013.

CHAN, S. W. *et al.* Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. **International Food Research Journal**, v. 16, n. 2, p. 203–213, 2009.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from *sugar beet molasses*. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.

CHEN, X. *et al.* Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus virens*. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 14, n. 10, p. 903–915, 2013.

CICCO, N. *et al.* A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 107–110, 2009.

DAHMOUNE, F. *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 585–595, 2015.

DAMIANI, C. *et al.* Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 723–729, 2011.

DRAGANO, N. R. V. *et al.* Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319–325, 2010.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 8, p. 1148–1155, 2010.

GHITESCU, R.-E. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 535–541, 2015.

GONG, Y. *et al.* Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 9–16, 2012.

HUR, S. J. *et al.* Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

ILAIYARAJA, N. *et al.* Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 173, p. 348–354, 2015.

KIM, S. *et al.* Extraction of antioxidants from *Aloe vera* leaf gel: a response surface methodology study. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1804–1815, 2014.

LUTHRIA, D. L. Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 842–850, 2012.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Study of antioxidant activity of non-conventional Brazilian fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1167–1172, 2014.

MOURE, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2009. p. 358.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 93–100, 2011.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007a.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2007b.

ROESLER, R. *et al.* Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. C102–C107, 2006.

SANTOS, A. F. DOS; SANT'ANA, A. E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 2001.

SHI, D.; DING, H.; XU, S. Optimization of microwave-assisted extraction of wedelolactone from *Eclipta alba* using response surface methodology. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 34–42, 2014.

SILVA, J. J. DA *et al.* *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333–340, 2014.

SINGH, B.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum* spp.) using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 294–308, 2012.

SOARES JÚNIOR, M. S. *et al.* Filmes plásticos e ácido ascórbico na qualidade de araticum minimamente processado. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1779–1785, 2007.

SOUZA, V. R. DE *et al.* Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012.

TAKEUCHI, T. M. *et al.* Low-Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2009. p. 137–218.

TAO, Y. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 2, p. 706–15, 2014.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

THOO, Y. Y. *et al.* Optimal binary solvent extraction system for phenolic antioxidants from mengkudu (*Morinda citrifolia*) fruit. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 7004–22, 2013.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816–823, 2008.

VILLELA, P.; BATISTA, Â. G.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Nutritional composition of *Annona crassiflora* pulp and acceptability of bakery products prepared with its flour. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 417–423, 2013.

WONG, Y. S. *et al.* Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 257–265, 2014.

YILMAZ, F. M.; KARAASLAN, M.; VARDIN, H. Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

YIM, H. S. *et al.* Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275–83, 2013.

ZHANG, Z.-S. *et al.* Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 17–24, 2007.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.)

Artigo a ser submetido ao periódico *Food Research International*

Henrique Silvano Arruda^{1*}, Gustavo Araujo Pereira¹ e Glaucia Maria Pastore¹

¹Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – FEA/UNICAMP.

*hsilvanoarruda@gmail.com

Avaliação do potencial antioxidante da polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.)

RESUMO

Frutos exóticos têm despertado o interesse de numerosos pesquisadores devido às suas propriedades nutricionais e funcionais. O araticum (*Annona crassiflora*) é um fruto do Cerrado rico em carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais. O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FL) e atividade antioxidante de extratos da polpa de araticum foram investigados. Dois métodos de extração foram utilizados para a obtenção dos extratos, um método clássico (extração sólido-líquido otimizado - E_{SL}) e outro moderno (extração assistida por ultrassom - E_{AU}). O extrato obtido pelo método E_{SL} apresentou os maiores conteúdos de CFT ($4,67 \pm 0,03$ g GAE.100 g⁻¹), FL ($4,00 \pm 0,15$ g CE.100 g⁻¹) e a maior atividade antioxidante para todos os ensaios realizados ($DPPH_{IC50} = 46,56 \pm 0,81$ µg.mL⁻¹; $DPPH_{Trolox} = 609,58 \pm 36,38$ µmol TE.g⁻¹; $TEAC_{ABTS} = 683,65 \pm 4,57$ µmol TE.g⁻¹ e $ORAC_{FL-T} = 1.593,72 \pm 37,50$ µmol TE.g⁻¹). Os flavonoides constituíram a classe predominante de compostos fenólicos em ambos os extratos com relação FL-CFT na ordem de $0,684 \pm 0,021$ e $0,856 \pm 0,027$ g FL.g CFT⁻¹ para os extratos obtidos pelos métodos E_{AU} e E_{SL} , respectivamente. O método E_{AU} se mostrou menos eficiente na extração de FL. Os resultados sugerem que a elevada atividade antioxidante observada pode estar relacionada principalmente à presença de compostos fenólicos. Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo indicam que a polpa de araticum apresentou elevado potencial antioxidante e fornecem suporte científico a estudos futuros *in vivo* abordando os efeitos funcionais da polpa de araticum na saúde humana.

Palavras-chave: frutos do Cerrado, compostos bioativos, compostos fenólicos, flavonoides, ensaios *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. No entanto, o consumo de oxigênio durante o metabolismo celular leva à formação de uma série de espécies reativas (ROESLER *et al.*, 2006). A geração de radicais livres em organismos vivos é controlada por vários compostos antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou obtidos por meio da dieta. Quando a disponibilidade de antioxidantes é limitada, pode ocorrer um desequilíbrio entre estas espécies e os mecanismos de defesa antioxidantes e, assim, permitir que tais radicais interajam com os sistemas biológicos de maneira citotóxica, levando a modificações oxidativas em membranas celulares ou moléculas intracelulares (enzimas e DNA) e acúmulo de peróxidos lipídicos (CARTEA *et al.*, 2011; LUZIA; JORGE, 2014). Este estresse oxidativo a nível celular ou subcelular é considerado o principal fator associado ao processo de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, catarata, câncer, diabetes tipo II e doenças neurodegenerativas (*Parkinson e Alzheimer*), assim como ao processo de envelhecimento natural (SRINIVASAN, 2014).

Frutas são notáveis fontes de antioxidantes que podem fornecer proteção contra desordens promovidas pelo estresse oxidativo (MALTA *et al.*, 2013). Antioxidantes naturais presentes em alimentos têm atraído interesse de vários setores da sociedade devido à sua segurança e potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos (RUFINO *et al.*, 2009). Nos últimos anos, várias evidências têm sugerido a associação entre a ingestão de frutas e vegetais a uma reduzida incidência de câncer e doenças crônicas e degenerativas (MALTA *et al.*, 2012).

Antioxidantes são definidos como uma família heterogênea de moléculas, que podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos por meio do sequestro de espécies reativas (inibindo a iniciação e bloqueando a propagação de reações em cadeia ou suprimindo a formação de radicais livres por meio da ligação aos íons metálicos, reduzindo peróxido de hidrogênio e quelando superóxido e

oxigênio singlete). Os antioxidantes mais abundantes em frutas são os compostos fenólicos (a maioria flavonoides), os carotenoides e as vitaminas C, A, B e E (LIM; LIM; TEE, 2007).

A caracterização de frutas tem atraído o interesse da comunidade científica, uma vez que a determinação de suas características físico-química e a identificação de seus componentes bioativos são importantes para o entendimento de seu valor nutricional e para o aumento da qualidade e valor do produto final (SOUZA *et al.*, 2012).

O Brasil apresenta maior biodiversidade que qualquer outro país no mundo, que inclui um grande número de espécies frutíferas. Entretanto, muitas espécies frutíferas brasileiras são desconhecidas e, portanto, poucas se encontram comercialmente disponíveis. O Cerrado, segundo maior bioma do Brasil ocupando cerca de 25 % do território nacional, possui muitos frutos nativos e exóticos ainda subexplorados que são de potencial interesse na agroindústria e possíveis fontes futuras de renda para a população local (ROESLER *et al.*, 2007; SILVA; VILAS BOAS; XISTO, 2013; SOUZA *et al.*, 2012). Estima-se que nas últimas três décadas, cerca de 40 a 80 % da área nativa do cerrado tenha sido convertida em áreas para pastagens ou agricultura (principalmente plantio de café e cana-de-açúcar) (ARRUDA *et al.*, 2014). Assim, a determinação do valor dos bens presentes neste bioma, bem como de formas de aplicação economicamente viáveis e ambientalmente corretas de seus recursos naturais tornam-se bastante importantes e igualmente urgentes, uma vez que está fortemente ameaçado de extinção e pode conter importantes fontes de compostos farmacológicos até então desconhecidos (MALTA *et al.*, 2012).

Os frutos nativos do Cerrado brasileiro vêm despertando crescente interesse devido às suas propriedades nutricionais e funcionais combinadas com as possibilidades de agregar valor e conservar a biodiversidade deste bioma (MALTA *et al.*, 2013). Dentre as espécies frutíferas do Cerrado, o araticum (*Annona crassiflora* Mart.) destaca-se pela marcante presença nesta região e por suas excelentes características sensoriais, muito apreciadas pela população local (SILVA; VILAS BOAS; XISTO, 2013), estando entre as 20 espécies mais utilizadas na alimentação regional (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

O araticum pertence à família *Annonaceae* e recebe diversas outras denominações populares como araticum-do-Cerrado, araticum, articum, marolo, bruto, cabeça-de-negro e pasmada (VILLELA; BATISTA; DESSIMONI-PINTO, 2013). Os frutos tipicamente são consumidos *in natura* ou utilizados no preparo de doces, geleias, sucos, licores, tortas, pães, bolos, iogurtes e sorvetes (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além disso, essa espécie é amplamente utilizada pela medicina popular no tratamento de feridas, doenças venéreas, acidentes ofídicos, doenças degenerativas, sendo usado também como antimicrobiano, antidiarreico; antitumoral, antirreumático e no combate aos piolhos. Sua polpa é muito popular e tem potencial para a indústria de alimentos, sendo rica em carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais (DRAGANO *et al.*, 2010). Apesar do grande potencial apresentado por este fruto existem poucos relatos na literatura a cerca do conteúdo de compostos bioativos e da atividade antioxidante deste fruto. Desta forma, seu potencial antioxidante deve ser melhor explorado visando a possível aplicação como antioxidante natural em cosméticos, suplementos e ingredientes funcionais para alimentos.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, assim como determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos a partir da popa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Para tanto, foram utilizados dois métodos de extração: (i) extração sólido-líquido (E_{SL} , método clássico) e (ii) extração assistida por ultrassom (E_{AU} , método moderno); e a avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada pelos ensaios de DPPH, TEAC_{ABTS} e ORAC_{FL}.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções e reagentes químicos

Os padrões analíticos de ácido gálico, catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina, miricetina, quercetina e kaempferol e os reagentes 2,2-diphenyl-1-

picrylhydrazyl (DPPH), *2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt* (ABTS), *(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid* (Trolox), *2,2'-azobis-(2-methylpropionamidine)-dihydrochloride* (APPH) e fluoresceína sódica foram fornecidos pela *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EUA). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$), obtida pelo um sistema de purificação *Milli-Q* (Millipore, Bedford, modelo CT Q3UV, MA, EUA). Todos os outros reagentes e solventes utilizados neste estudo foram de alto grau analítico. Todos os reagentes foram armazenados nas condições ideais conforme especificações dos fabricantes.

2.2. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras

Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) em completo estado de maturidade fisiológica foram coletados na área rural do município de Carmo do Paranaíba, Minas Gerais/Brasil, durante a estação de colheita (de janeiro a março de 2014), após caírem naturalmente das árvores. As amostras foram transportadas do local de coleta ao Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), São Paulo/Brasil, em caixas de poliestireno, até 36 horas após a coleta. Os frutos livres de defeitos fisiológicos e patológicos e completamente maduros foram lavados com água corrente para a remoção de sujidades superficiais. Em seguida, a polpa do fruto foi manualmente separada das sementes e casca, congelada com auxílio de nitrogênio líquido e liofilizada (*LIOTOP*, modelo L101, São Carlos, Brasil). A temperatura e a pressão da câmara de liofilização foram de $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 Pa, respectivamente. O teor de umidade encontrado para a polpa foi de $71,73 \pm 1,97 \%$. A polpa liofilizada (PAL) foi moída em moinho de facas (*Marconi*, modelo MA340, Piracicaba, Brasil) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi acondicionado e identificado em embalagens de polietileno e armazenado em ultrafreezer a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Sanyo Electric Co.*, modelo MDF-C8V1, Japão) até o momento das extrações (CARDOSO *et al.*, 2013).

2.3. Procedimento de extração

Para a obtenção dos extratos foram utilizadas duas técnicas: (i) extração sólido-líquido (E_{SL}) e (ii) extração assistida por ultrassom (E_{AU}). A E_{SL} foi desenvolvida e otimizada em nosso laboratório para a parte da fruta estudada (polpa) (ver Capítulo 2), e as melhores condições de extração foram obtidas. As condições da E_{AU} foram definidas de acordo com os protocolos de análise de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; NERI-NUMA *et al.*, 2014; PAVAN; SANCHO; PASTORE, 2014). Todos os procedimentos de extração foram realizados em triplicata e os sobrenadantes (extratos) obtidos foram transferidos para microtubos e armazenados a -80 °C (*Sanyo Electric Co., modelo MDF-C8V1, Japão*) até o momento das análises.

2.3.1. Extração sólido-líquido (E_{SL})

A PAL (3,0 g) foi misturada com 30 mL de uma solução hidroetanólica 46 % (v/v, etanol:água ultrapura) e as misturas foram mantidas em um banho de agitação (*New Brunswick Scientific Classic Series, modelo C76, EUA*) por 90 minutos a 200 rpm e 75 °C. Após o procedimento de extração as misturas foram centrifugadas (*Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R, Tuttlingen, Alemanha*) a 10.000 rpm por 11 minutos a 5 °C. As extrações foram conduzidas em *Erlenmeyer* adaptado para evitar o efeito vórtice, obtendo uma melhor mistura do sistema.

2.3.2. Extração assistida por ultrassom (E_{AU})

Para a E_{AU} , 10 mg de PAL foram transferidas para um microtubo e misturados com 1,0 mL do solvente correspondente a cada análise (Tabela 1). Em seguida as misturas foram sonificadas (*UNIQUE, modelo UCS-2850, 25 kHz, 120 W, Brasil*) durante 30 minutos a 10 °C. Após a extração, as frações obtidas foram centrifugadas (*Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R, Tuttlingen, Alemanha*) a 10.000 rpm por 11 minutos a 5 °C.

Tabela 1 - Relação de solventes utilizados na E_{AU} para cada método analítico.

Análise	Solvente Extrator
CFT	Metanol (p.a.)
FL	Água ultrapura (<i>Milli-Q</i>)
DPPH	Metanol (p.a.)
TEAC_{ABTS}	Água ultrapura (<i>Milli-Q</i>)
ORAC_{FL-H}	Tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4
ORAC_{FL-L}	RMDC 7 % (m/v; acetona água 1:1)

CFT: Compostos fenólicos totais; **FL:** Conteúdo de flavonoides totais; **DPPH:** Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•); **TEAC_{ABTS}:** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox; **ORAC_{FL}:** Capacidade de absorção do radical oxigênio; **H:** Hidrofílico; **L:** Lipofílico; **RMCD:** β-Ciclodextrina metilada randomizada.

2.4. Procedimentos analíticos

2.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) (Folin-Ciocalteu Micro-Assay)

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado espectrofotometricamente pelo método de *Folin-Ciocalteu* como descrito por Cicco *et al.* (2009), com algumas modificações. Este método envolve a redução do reagente *Folin-Ciocalteu* pelos compostos fenólicos, com concomitante formação de um complexo azul em meio básico, cuja absorbância a 760 nm aumenta linearmente com a concentração de fenólicos no meio reacional. Os extratos da fruta e os padrões da curva de calibração foram diluídos em metanol 50 % (v/v). Em seguida, 100 µL das amostras diluídas, soluções de calibração ou branco (metanol 50 %) foram pipetadas em tubos teste de 10 mL juntamente com 100 µL de reagente *Folin-Ciocalteu* 50 % (v/v). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso para atingir o equilíbrio. Após 2 minutos, 800 µL de Na₂CO₃ 5 % (m/v) foram adicionados. A mistura foi mantida em banho-maria (*New Brunswick Scientific Classic Series, modelo C76, NJ, EUA*) a 40 °C por 20 minutos. Subsequentemente, os tubos foram rapidamente resfriados em banho de gelo e a absorbância mensurada em cubetas de 1 cm utilizando um espectrofotômetro UV/Visível (*Beckman, modelo DU600, CA, EUA*)

operando a 760 nm. As soluções de metanol 50 % (v/v) e *Folin-Ciocalteu* 50 % (v/v) foram obtidas por meio da diluição em água. A curva de calibração ($y = 0,0115x + 0,0229$; $R^2 = 0,9908$) foi preparada com padrão de ácido gálico (10 - 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e o conteúdo de fenólicos totais foi expresso como g de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de fruto liofilizado (g GAE.100 g^{-1} PAL).

2.4.2. Determinação dos flavonoides totais (FL)

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado por um método colorimétrico desenvolvido por Zhishen, Mengcheng & Jianming (1999) com algumas modificações. As reações foram conduzidas em microplacas de leitura transparentes, contendo 96 poços. Os extratos brutos do araticum foram diluídos em água ultrapura (*Milli-Q*) e alíquotas de 28 μL destas diluições foram homogeneizadas com 110 μL de água ultrapura (*Milli-Q*) e 8 μL de nitrito de sódio (NaNO_2) 5 % (m/v) por 2 minutos a 500 rpm em agitador de microplaca (*Eppendorf MixMate, modelo PCB-11, Hamburg, Alemanha*). Em seguida foram adicionados à mistura 8 μL de cloreto de alumínio [$\text{AlCl}_3(6.\text{H}_2\text{O})$] 10 % (m/v) com posterior homogeneização por 3 minutos a 500 rpm em agitador de microplaca. Após esta etapa foram adicionados 56 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e 67 μL de água ultrapura (*Milli-Q*) para diluir a mistura reacional. A solução obtida foi homogeneizada por 30 segundos a 500 rpm em agitador de microplaca. A absorbância das misturas foi comparada a um branco (usando água em substituição ao extrato) e mensuradas imediatamente a 510 nm em um leitor de microplaca (*NOVOstar, modelo BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*), acompanhado de um *Software* de análise de dados *MARS Data Analysis* versão 1.3 (*BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*). A curva de calibração ($y = 0,000690x - 0,001295$; $R^2 = 0,9936$) foi preparada com padrão de catequina (10 - 175 μM), e o conteúdo de flavonoides totais foi expresso como g de equivalentes de catequina (CE) por 100 g de fruto liofilizado (g CE.100 g^{-1} PAL).

2.4.3. Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•)

O ensaio DPPH foi realizado de acordo com Roesler *et al.* (2007a), com algumas adaptações, no qual os extratos foram previamente diluídos em metanol (p.a.) e 50 μL de

cada diluição foram misturados a 250 µL de solução DPPH (0,004 % m/v) em uma microplaca transparente de 96 poços. A placa com a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. O controle da reação (reagente DPPH) foi preparado de acordo com o procedimento descrito anteriormente, sem a adição de extrato e metanol (p.a.) foi usado para corrigir a linha de base. A solução de DPPH foi preparada diariamente, armazenada em frascos escuros e mantidas no escuro a 4 °C até o uso. A absorbância do DPPH remanescente foi determinada a 517 nm contra um branco (metanol p.a.) usando um leitor de microplacas (*NOVOstar, modelo BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*) e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada do seguinte modo (Equação 1):

$$\% \text{ de Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrato}})/A_{\text{DPPH}}) \times 100 \quad \textbf{Equação 1}$$

onde, A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extrato} é a absorbância da amostra.

Os resultados foram expressos em µmol TE.g⁻¹ PAL e IC₅₀. A curva de calibração ($y = 0,2867x + 3,9282$; $R^2 = 0,9933$) foi preparada com padrão de *Trolox* (10 - 250 µM) e os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de *Trolox* (TE) por g de amostra (µmol TE.g⁻¹ PAL). O valor de IC₅₀ foi determinado por regressão linear e corresponde à concentração final do extrato da amostra liofilizada em µg.mL⁻¹ requerida para decrescer ou inibir 50 % da concentração inicial do radical DPPH•.

2.4.4. Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC_{ABTS})

O ensaio TEAC_{ABTS} foi realizado conforme método descrito por Leite *et al.* (2011). A solução de ABTS•⁺ foi preparada usando 5 mL de uma solução de 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid)-diammonium salt (ABTS) 7,0 mM e 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) 145 mM. O sistema foi mantido em repouso por 12 a 16 horas a temperatura ambiente e na ausência de luz. Uma vez formado o ABTS•⁺, o mesmo foi diluído em água ultrapura (*Milli-Q*) até a obtenção de uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm utilizando um leitor de microplacas (*NOVOstar, modelo BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*). Em uma microplaca transparente de 96 poços foram adicionados 50 µL de extrato (diluídos em ultrapura) e 250 µL de ABTS•⁺. O

controle da reação (reagente ABTS^{•+}) foi preparado de acordo com o procedimento descrito anteriormente, sem a adição de extrato e ultrapura (*Milli-Q*) foi usado para corrigir a linha de base. Após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, a absorbância foi medida a 734 nm contra um branco (água ultrapura). Uma curva de calibração ($y = 0,5706x - 1,0016$; $R^2 = 0,9981$) foi preparada com padrão de *Trolox* (10 - 175 μM), e os resultados foram expressos como μmol de equivalentes de *Trolox* (TE) por g de fruto liofilizado ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$ PAL).

2.4.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC_{FL})

O ensaio ORAC_{FL} foi realizado conforme método descrito por Leite-Legatti *et al.* (2012). As reações foram realizadas em microplacas de poliestireno, específicas para reações de fluorescência, contendo 96 poços. Todos os reagentes e diluições das frações hidrofílicas ($\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$) e lipofílicas ($\text{ORAC}_{\text{FL-L}}$) dos extratos liofilizados foram preparados diariamente. O somatório das frações corresponde à capacidade de absorção de radical oxigênio total ($\text{ORAC}_{\text{FL-T}}$) da amostra.

Para o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$ foram adicionados a cada poço da microplaca 20 μL de tampão de fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4 (branco), do padrão *Trolox* ou dos extratos da fruta previamente diluídos, 120 μL de fluoresceína ($0,378 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 7,4) e 60 μL de AAPH [2,2-Azobis-(2-methylamidinopropane)-dihydrochloride] (108 mg.mL^{-1}) com posterior homogeneização. Amostra, padrões e reagentes (AAPH e fluoresceína) foram preparados ou diluídos em tampão de fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4 (tampão de trabalho).

Para o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-L}}$ foram adicionados a cada poço da microplaca 20 μL de solução de RMDC 7 % (m/v, acetona:água 1:1) (branco), do padrão *Trolox* ou dos extratos da fruta previamente diluídos, 120 μL de fluoresceína ($0,378 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 7,4) e 120 μL de AAPH [2,2-Azobis-(2-methylamidinopropane)-dihydrochloride] (108 mg.mL^{-1}) com posterior homogeneização. O preparo dos padrões de *Trolox* e a diluição das amostras foram realizados com o uso de RMCD 7 % (m/v, acetona:água 1:1). As soluções de fluoresceína e de AAPH foram preparadas em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4.

A solução de AAPH foi preparada imediatamente antes de ser utilizada. Curvas de calibração ($ORAC_{FL-H}$: $y = 0,0454x + 3,7321$; $R^2 = 0,9947$; $ORAC_{FL-L}$: $y = 0,0244x + 4,9692$; $R^2 = 0,9904$) foram preparadas com padrão de *Trolox* ($ORAC_{FL-H}$: 50 - 800 μM ; $ORAC_{FL-L}$: 65 - 1.040 μM), e os resultados foram expressos como μmol de equivalentes de *Trolox* (TE) por g de fruto liofilizado ($\mu mol TE.g^{-1} PAL$).

A cada placa lida foi preparada uma curva padrão de *Trolox* específica para a avaliação da fração hidrofílica e/ou lipofílica, seguida de diluições apropriadas. A intensidade da fluorescência foi monitorada a 37 °C logo após a adição do AAPH a cada ciclo de 60 segundos, por 80 ciclos através de leitor de microplacas (*NOVOstar, modelo BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*), com os seguintes filtros: excitação 485 nm e emissão a 520 nm, acompanhado com o *Software* de análise de dados *MARS Data Analysis* versão 1.3 (*BMG Labtech, Offenburg, Alemanha*). Os resultados foram obtidos com base na área sob a curva de decaimento da fluoresceína ao longo do tempo (AUC) e da área útil (NAUC), calculadas como descrito nas Equações 2 e 3.

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0 \quad \text{Equação 2}$$

onde, f_0 representa a fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 1 e 80 minutos.

$$NAUC = AUC_{Extrato} - AUC_{Branco} \quad \text{Equação 3}$$

onde, $AUC_{Extrato}$ é a área sob a curva para a amostra e AUC_{Branco} para o branco.

A NAUC foi plotada contra a concentração das amostras e os resultados foram comparados com a curva padrão (NAUC *versus* Concentração de *Trolox*).

2.5. Análise dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA). Quando constatada diferença estatística pelo teste F, os tratamentos foram comparados pelo teste de *Tukey* HSD. Todas as análises estatísticas foram realizadas ao

nível de 5 % de significância ($p \leq 0,05$) com o auxílio do *Software STATISTICA* versão 8.0 (*Statsoft, Oklahoma, USA*). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da triplicada de cada procedimento analítico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, foram determinados o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FL) e a atividade antioxidante da polpa de araticum, usando três diferentes métodos. O fruto selecionado para o presente estudo, conhecido popularmente como araticum ou marolo (*Annona crassiflora*) é endêmico do Cerrado. Assim como muitas frutíferas deste bioma, ainda é pouco explorado comercialmente, restringindo-se a feiras e beiras de estradas, apesar da realidade de consumo crescente, sendo assim, pouco conhecido ou apreciado fora de sua área de distribuição natural (ABADIO FINCO; SILVA; OLIVEIRA, 2012; REZENDE; CÂNDIDO; MALAFAIA, 2012). Além disso, existem poucos dados disponíveis sobre o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante desse fruto (SIQUEIRA *et al.*, 2013), sendo assim os resultados obtidos no presente estudo foram comparados com outras frutas da mesma família e/ou frutos exóticos.

3.1. Conteúdo de compostos fenólicos (CFT) e flavonoides totais (FL)

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas que apresentam uma diversidade de estruturas e propriedades fisiológicas, tais como efeitos antialérgico, antiarterogênico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, cardioprotetivo e vasodilatador. O interesse por este grupo de compostos aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres associados com o desencadeamento de várias doenças (LI *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes primários transferindo um átomo de hidrogênio e/ou um elétron ao oxidante, sendo que os produtos intermediários, formados pela ação desses antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente nessas substâncias. Por meio da redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio, estes compostos podem atuar modulando vias de sinalização celular dependentes do potencial redox e, assim modular a expressão gênica (ROSSO, 2013; LUZIA; JORGE, 2014). Ácidos fenólicos, flavonoides e taninos são considerados os principais compostos fenólicos presentes na dieta. Consequentemente, muitas pesquisas têm concentrado esforços na identificação e quantificação destes compostos em matrizes alimentícias.

O método *Folin-Ciocalteu* permite a estimativa de todos os flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos não-flavonoides, isto é, todos os compostos fenólicos presentes na amostra (ROESLER *et al.*, 2006). O conteúdo de compostos fenólicos extraídos a partir da polpa de araticum variou entre 2,62 e 4,67 g GAE.100 g⁻¹ de matéria seca (*m.s.*) e de 0,74 a 1,32 g GAE.100 g⁻¹ de matéria fresca (*m.f.*) (Tabela 2). Segundo Vasco, Ruales & Kamal-Eldin (2008) as frutas podem ser classificadas em três categorias em função do conteúdo de fenólicos totais: baixo (< 100 mg GAE.100 g⁻¹), médio (100 - 500 mg GAE.100 g⁻¹) e alto (> 500 mg GAE.100 g⁻¹) para resultados expressos em matéria fresca. Portanto, de acordo com essa classificação, a polpa de araticum se encaixa na categoria de “alto conteúdo de fenólicos totais”, indicando que este fruto é uma excelente fonte destes compostos.

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FL) na PAL.

Técnica de Extração	Análise		
	CFT (g GAE.100 g ⁻¹)*	FL (g CE.100 g ⁻¹)*	R _{FL-CFT} (g FL.g CFT ⁻¹)
<i>E_{SL}</i>	4,67±0,03 (1,32±0,01) a	4,00±0,15 (1,13±0,04) a	0,856±0,027 a
<i>E_{AU}</i>	2,62±0,11 (0,74±0,03) b	1,79±0,03 (0,51±0,01) b	0,684±0,021 b

CFT: Compostos fenólicos totais; **FL:** Conteúdo de flavonoides totais; *E_{SL}*: Extração sólido-líquido; *E_{AU}*: Extração assistida por ultrassom; **R_{FL-CFT}**: Relação entre o conteúdo de flavonoides totais e compostos fenólicos totais.

*Valores entre parênteses são referentes aos resultados obtidos na polpa de araticum *in natura*.

Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de *Tukey* (p > 0,05).

O conteúdo de CFT encontrados na polpa de araticum neste estudo foram superiores aos anteriormente observados por Souza *et al.* (2012) (739,37 mg GAE.100 g⁻¹ m.f.), Villela, Batista & Dessimoni-Pinto (2013) (423,94 mg GAE.100 g⁻¹ m.f. e 1.245,44 mg GAE.100 g⁻¹ de farinha da polpa), Damiani *et al.* (2011) (211,50 mg GAE.100 g⁻¹ m.s. no extrato hidroetanólico e 260,50 mg GAE.100 g⁻¹ m.s. no extrato aquoso), Siqueira *et al.* (2013) (580 mg.100 g⁻¹ m.s. no extrato etil acetato e 1.095 mg.100 g⁻¹ m.s. no extrato aquoso) e Roesler *et al.* (2006) (2,03 - 3,11 g GAE.100 g⁻¹ m.s. no extrato hidroetanólico e 1,69 - 1,70 g GAE.100 g⁻¹ m.s. no extrato aquoso). A variação nos conteúdos de CFT obtidos nos estudos pode ser devido a diferenças na variedade, maturidade, clima, condições geográficas de produção, manuseio durante e após a colheita, condições de preparo e armazenamento da amostra e método de extração (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008; LUZIA; JORGE, 2014).

O conteúdo de FL variou entre 1,79 e 4,00 g CE.100 g⁻¹ m.s. e de 0,51 a 1,13 g GAE.100 g⁻¹ m.f. (Tabela 2). Villela, Batista & Dessimoni-Pinto (2013) encontraram valores de 63,14 mg CE.100 g⁻¹ m.f. e 201,32 mg CE.100 g⁻¹ de farinha da polpa, enquanto Siqueira *et al.* (2013) obtiveram um conteúdo de 549,19 mg CE.100 g⁻¹ m.f., conteúdos estes muito inferiores aos encontrados no presente estudo. Julián-Loaeza *et al.* (2011) reportaram valores variando entre 107,41 e 152,04 mg CE.100 g⁻¹ m.f. em variedades de *Annona diversifolia* (ilama), enquanto Paz *et al.* (2015) encontraram conteúdo de 252 mg CE.100 g⁻¹ m.s. de *Annona muricata* (graviola).

Os flavonoides são a classe predominante de compostos fenólicos presente na polpa de araticum, o que pode ser confirmado através dos altos valores de relação FL-CFT, sendo observados valores de 0,684 e 0,856 g FL.g CFT⁻¹, para os extratos obtidos pelos métodos E_{AU} e E_{SL} , respectivamente. Desta forma, o conteúdo de FL representa mais de 50 % dos compostos fenólicos totais presentes na polpa de araticum. Relações similares foram reportadas por Julián-Loaeza *et al.* (2011) em variedades de *Annona diversifolia* (ilama) (0,831 - 0,894 g FL.g CFT⁻¹). Segundo Li *et al.* (2014), os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, sendo responsáveis por mais da metade dos 8.000 compostos fenólicos de ocorrência natural.

3.2. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante de alimentos é determinada por uma mistura de diferentes antioxidantes que apresentam distintos mecanismos de ação. Desta forma, a capacidade antioxidante de produtos alimentares deve ser avaliada por mais de um método para que possam ser abordados os diferentes mecanismos de ação e, assim, obter informações úteis sobre a capacidade antioxidante de todos os compostos presentes na matriz em questão (MOO-HUCHIN *et al.*, 2014). A capacidade antioxidante de um composto e/ou misturas complexas é frequentemente avaliada por meio de métodos baseados no sequestro de radicais livres estáveis (por exemplo, DPPH• e ABTS•⁺) pelos antioxidantes e/ou na habilidade do antioxidante proteger uma molécula alvo exposta a uma fonte de radicais livres (por exemplo, ORAC_{FL}) (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

O ensaio DPPH é amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos/orgânicos de matrizes alimentares com compostos hidrofílicos e lipofílicos (MOO-HUCHIN *et al.*, 2014). Este ensaio é baseado na habilidade de os antioxidantes da amostra reduzir o radical DPPH• pela transferência de um elétron, que é medida por meio do decréscimo da absorbância a 517 nm (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Os resultados podem ser expressos em $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$ e IC_{50} . A atividade antioxidante dada pelos valores de $\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}}$ é calculada através da redução de 50 % da concentração inicial do radical DPPH•. Baixos valores de IC_{50} indicam elevada atividade antioxidante.

Os valores de $\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}}$ obtidos por meio de regressão linear para os extratos da polpa de araticum apresentaram altos coeficientes de determinação (R^2) com valores de 0,9961 para o E_{AU} e 0,9848 para o E_{SL} . A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH• ($\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}}$) variou de 46,56 - 93,76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3). Com base nos valores de $\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}}$, Gregoris *et al.* (2013) dividiram as frutas em três categorias: boas propriedades antioxidantes ($\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}} \leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), médias propriedades antioxidantes ($100 \mu\text{g.mL}^{-1} < \text{DPPH}_{\text{IC}_{50}} \leq 316 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fracas propriedades antioxidantes ($\text{DPPH}_{\text{IC}_{50}} > 316 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Portanto, de acordo com essa classificação, a polpa de araticum apresenta boas propriedades antioxidantes.

Tabela 3 - Atividade antioxidante da PAL e dos principais compostos fenólicos antioxidantes.

Amostra	DPPH _{IC50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPPH _{Trolox} ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	TEAC _{ABTS} ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	ORAC _{FL-H} ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	ORAC _{FL-L} ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	ORAC _{FL-T} ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)
<i>E_{SL}</i>	46,56±0,81 A	609,58±36,38 A	683,65±4,57 A	546,26±2,11 A	1.047,45±39,61 A	1.593,72±37,50 A
<i>E_{AU}</i>	93,76±2,74 B	306,04±9,93 B	231,79±8,65 B	337,25±5,78 B	565,02±13,25 B	902,27±11,26 B
Padrão	DPPH _{IC50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPPH (mol TE.mol padrão ⁻¹)*	TEAC _{ABTS} (mol TE.mol padrão ⁻¹)*	ORAC _{FL-H} (mol TE.mol padrão ⁻¹)*	ORAC _{FL-L} (mol TE.mol padrão ⁻¹)*	ORAC _{FL-T} (mol TE.mol padrão ⁻¹)*
GC	3,94±0,04 e	2,71±0,24 ab	6,25±0,08 ab	2,85±0,08 e	n.a.	n.a.
EGC	3,53±0,06 c	2,72±0,05 ab	5,94±0,04 b	2,80±0,11 e	n.a.	n.a.
C	4,18±0,03 f	2,10±0,06 d	4,42±0,12 c	12,96±0,70 bc	n.a.	n.a.
EC	3,72±0,06 d	2,20±0,06 cd	4,63±0,17 c	12,43±0,51 c	n.a.	n.a.
M	3,24±0,06 b	2,56±0,05 bc	6,02±0,13 b	5,53±0,30d	n.a.	n.a.
Q	3,02±0,07 a	3,10±0,28 a	6,39±0,21 a	14,02±0,11 b	n.a.	n.a.
K	7,43±0,09 g	1,10±0,04 e	1,51±0,03 d	15,60±0,37 a	n.a.	n.a.

DPPH_{IC50}: Concentração final do extrato em $\mu\text{g/mL}$ requerida para decrescer ou inibir 50 % da concentração inicial do radical DPPH•. **DPPH_{Trolox}**: Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•); **TEAC_{ABTS}**: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox; **ORAC_{FL}**: Capacidade de absorção do radical oxigênio; **H**: Hidrofílico; **L**: Lipofílico; **T**: Total; *E_{SL}*: Extração sólido-líquido; *E_{AU}*: Extração assistida por ultrassom; **GC**: Galocatequina; **EGC**: Epigallocatequina; **C**: Catequina; **EC**: Epicatequina; **M**: Miricetina; **Q**: Quercetina; **K**: Kaempferol; **n.a.**: não disponível.

*Resultado expresso em mol TE.mol de padrão⁻¹, os maiores valores representam maior atividade por parte do padrão.

Nas colunas: Letras maiúsculas comparam os valores entre as amostras e letras minúsculas comparam entre os padrões. Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os valores de $\text{DPPH}_{\text{IC50}}$ apresentados neste trabalho são muito menores que os anteriormente obtidos por Roesler *et al.* (2006) ($148,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e $1.321,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato aquoso) e Damiani *et al.* (2011) ($894 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etéreo; $1.996 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e $552 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato aquoso), indicando que os extratos obtidos no presente estudo apresentam maior atividade antioxidante que os anteriormente reportados na literatura. De acordo com Damiani *et al.* (2011), esta diferença pode estar relacionada às diferenças nos parâmetros dos processos de extração utilizados em cada estudo, tais como mecanismo de extração, relação solvente-sólido, tipo de solvente, tempo de extração e número de re-extrações.

O método $\text{DPPH}_{\text{IC50}}$ também foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante de sete compostos fenólicos possivelmente presentes na polpa de araticum (Tabela 3). A capacidade dos compostos fenólicos em sequestrar radicais $\text{DPPH}^\bullet$ apresentou a seguinte ordem: Quercetina > Miricetina > Epigallocatequina > Epicatequina > Galocatequina > Catequina > Kaempferol. Os valores de $\text{DPPH}_{\text{IC50}}$ para os padrões variaram de $3,02 - 7,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo a quercetina o composto com maior atividade antioxidante e o kaempferol o menos ativo. Estes valores foram muito menores que os encontrados para os extratos da polpa de araticum ($46,56 - 93,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, levando-se em consideração que a concentração de compostos fenólicos nos extratos do fruto é relativamente baixa quando comparada aos padrões (testados de forma pura), além da grande variedade de compostos antioxidantes presentes na polpa de araticum com distintos mecanismos de ação, os extratos obtidos podem ser considerados eficientes sequestradores de radicais livres.

A polpa de araticum também apresentou elevados valores de atividade antioxidante pelo ensaio $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$, com valores na ordem de $306,04-609,58 \mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.s.}$. Estes resultados foram condizentes com os resultados expressos em IC_{50} , uma vez que os extratos com menores valores de $\text{DPPH}_{\text{IC50}}$ (maior atividade antioxidante) também apresentaram os maiores valores de $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$. Siqueira *et al.* (2013), em estudo prévio com a polpa de araticum, reportaram valores de $54,3$ e $67,3 \mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.f.}$ para os extratos etil acetato e aquoso, respectivamente.

O TEAC_{ABTS} é outro ensaio antioxidante bastante utilizado na determinação da atividade antioxidante de extratos de matrizes alimentares, sendo indicado para a avaliação de compostos hidrofílicos (MOO-HUCHIN *et al.*, 2014). Este ensaio é baseado na habilidade de os antioxidantes da amostra reduzir o radical ABTS^{•+} por meio da transferência de um elétron e/ou átomo de hidrogênio, que é medida pelo decréscimo da absorbância a 734 nm (GÜLÇİN, 2012).

A polpa de araticum apresentou elevada atividade antioxidante pelo ensaio TEAC_{ABTS} (valores entre 231,79 e 683,65 $\mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.s.}$) (Tabela 3). Em um estudo anterior sobre a atividade antioxidante da polpa de araticum, Souza *et al.* (2012) reportaram valores de 131,58 $\mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.f.}$. Além disso, os valores de TEAC_{ABTS} encontrados no presente trabalho são similares, inferiores ou superiores, dependendo do fruto em estudo, a outros frutos tropicais não-tradicionais brasileiros ricos em antioxidantes, tais como carnaúba (16,4 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), bacuri (18,1 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), cajá (40,7 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), açaí (64,5 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), mangaba (65,6 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), umbu (77 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), caju (79,4 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), jambolão (125 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), gurguri (136 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), puçá-coroa-de-frade (161 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), murta (166 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), uvaia (182 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), jabuticaba (317 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), puçá-preto (346 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), murici (412 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), juçara (606 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$), acerola (953 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) e camu-camu (1.237 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) (RUFINO *et al.*, 2010).

Um ensaio antioxidante *in vitro* que tem ganhado atenção dos pesquisadores nos últimos anos se trata do ORAC_{FL}, uma vez que este ensaio apresenta os benefícios de ser conduzido em condições de temperatura (37 °C) e pH (7,4) fisiológicos, além de atuar sobre radicais peroxila (ROO[•]), os quais são produzidos naturalmente pelo metabolismo humano. O ORAC_{FL} é baseado em um sistema competitivo no qual antioxidante e substrato competem cineticamente pelos radicais peroxila e pode ser adaptado tanto para antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos por meio da alteração da fonte radical e solvente. Este ensaio mede a capacidade antioxidante de um composto em inibir radicais peroxila através da transferência de átomos de hidrogênio que é determinada por meio da curva de decaimento da fluorescência ao longo do tempo (GÜLÇİN, 2012).

No presente estudo foram determinadas a $ORAC_{FL}$ nas frações hidrofílica ($ORAC_{FL-H}$) e lipofílica ($ORAC_{FL-L}$) da polpa de araticum. Conforme resultados apresentados na Tabela 3, a polpa de araticum apresentou elevada atividade antioxidante tanto para o sistema hidrofílico (337,25 - 546,26 $\mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.s.}$) quanto para o lipofílico (565,02 - 1.047,45 $\mu\text{mol TE.g}^{-1} \text{ m.s.}$). Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que analisa as propriedades antioxidantes da polpa de araticum pelo ensaio $ORAC_{FL}$.

O $ORAC_{FL-L}$ apresentou maiores valores que o $ORAC_{FL-H}$, sendo assim, outros compostos antioxidantes, além dos compostos fenólicos, também podem estar contribuindo para a elevada atividade antioxidante observada. Alguns estudos já demonstraram que polpa de araticum é rica em carotenoides (licopeno, α - e β -caroteno), vitaminas antioxidantes (A, C e E), ácidos orgânicos (ácidos málico, cítrico e tartárico) e minerais (ROESLER *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2013; DAMIANI *et al.*, 2013). Diversos estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante de compostos fenólicos é influenciada por interações com outros compostos, sendo que estas interações podem ser sinérgicas ou antagônicas, dependendo das condições e compostos em estudo no sistema modelo (PAZ *et al.*, 2015).

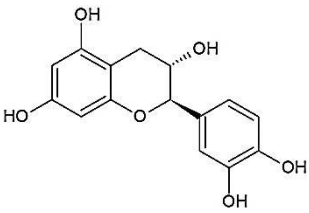
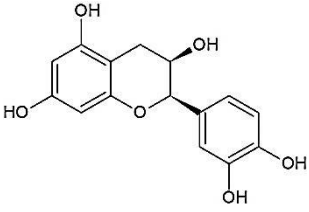
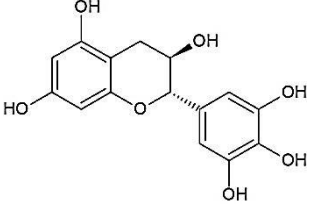
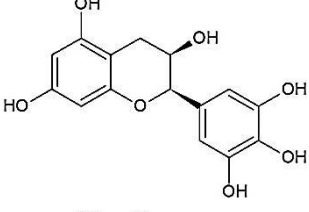
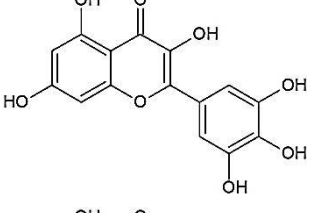
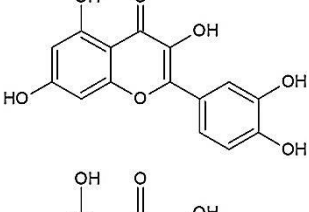
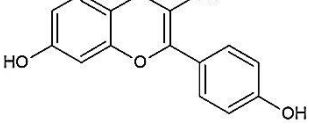
Os estudos realizados indicam a presença de compostos com alto potencial antioxidante nos extratos polpa de araticum. A relação entre concentração de CFT e a capacidade de sequestrar radicais livres dos extratos parece ser bastante significativa, visto que o extrato com maior conteúdo de CFT (E_{SL}) é justamente o extrato com maior atividade antioxidante por meio de todos os ensaios realizados (DPPH, $TEAC_{ABTS}$ e $ORAC_{FL}$). Essa relação sugere que os CFT solúveis podem ser os contribuidores mais importantes para a atividade antioxidante do fruto estudado. Vários estudos têm demonstrando uma alta correlação entre o conteúdo de CFT e atividade antioxidante (ROESLER *et al.*, 2007b; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008; RUFINO *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2011; MALTA *et al.*, 2013; LUZIA; JORGE, 2014). No entanto, outros compostos tais como carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico, que não foram determinados neste trabalho, mas podem estar presentes nos extratos estudados e contribuir para o potencial antioxidante da polpa de araticum (ALMEIDA *et al.*, 2011). Portanto, a atividade antioxidante do fruto analisado não pode ser atribuída somente ao seu conteúdo de CFT,

uma vez que também pode estar relacionada a diversos outros compostos antioxidantes presentes no fruto e a possíveis efeitos sinérgicos e antagônicos entre estes compostos ainda desconhecidos.

Comparando os valores obtidos pelos diferentes ensaios usados para a determinação da atividade antioxidante, pode-se observar que o ensaio ORAC_{FL} apresentou os maiores valores de atividade antioxidante, seguido pelo TEAC_{ABTS} e DPPH_{Trolox} que apresentaram resultados similares. Este fato pode indicar que os compostos presentes na polpa de araticum atuam mais eficientemente através do mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio do que pela transferência de elétrons (REBELLO *et al.*, 2014). Além disso, o fato de o ensaio ORAC_{FL} analisar as frações hidrofílica e lipofílica do fruto ele é capaz de avaliar uma ampla variedade de compostos com polaridades distintas, o que pode contribuir para a elevação da atividade antioxidante por meio dos efeitos sinérgicos entre estes compostos. De acordo com Roesler *et al.* (2006) e Vasco, Ruales & Kamal-Eldin (2008), as propriedades hidrofílicas ou lipofílicas do sistema teste, a polaridade e o tipo dos antioxidantes presentes no extrato e o solvente extrator podem explicar a diferença entre os resultados obtidos por diferentes ensaios. Outro fato que pode explicar os elevados valores no ensaio ORAC_{FL} é sua capacidade de conseguir mensurar a atividade antioxidante de compostos que apresentam fase *lag*, sendo assim possível determinar a atividade de compostos de ação lenta, principalmente em matrizes complexas (GÜLÇİN, 2012).

Com o propósito de avaliar o potencial antioxidante e o comportamento de cada composto individualmente frente aos diversos métodos antioxidantes disponíveis, os ensaios DPPH_{Trolox}, TEAC_{ABTS} e ORAC_{FL}-H também foram realizados com sete padrões de referência possivelmente presentes na polpa de araticum (Tabela 3), cujas estruturas encontram-se apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Estrutura molecular dos padrões de referência analisados.

Composto Fenólico	FM	PM (g.mol ⁻¹)	Estrutura Molecular
(+)-Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	
(-)-Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	
(-)-Galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,27	
(-)-Epigallocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,27	
Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,24	
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,24	

FM: Fórmula Molecular; **PM:** Peso Molecular.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos pelo ensaio $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$ apresentou a seguinte ordem: Quercetina $\geq$ Epigallocatequina = Galocatequina $\geq$ Miricetina $\geq$ Epicatequina $\geq$ Catequina $>$ Kaempferol. Para o ensaio $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ a ordem observada foi a seguinte: Quercetina $\geq$ Galocatequina $\geq$ Epigallocatequina = Miricetina $>$ Epicatequina = Catequina $>$ Kaempferol; enquanto que, para o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$ foi: Kaempferol $>$ Quercetina $\geq$ Catequina $\geq$ Epicatequina $>$ Miricetina $>$ Galocatequina = Epigallocatequina. Os flavonoides estão entre os antioxidantes vegetais mais potentes por apresentarem uma ou mais dos seguintes elementos estruturais que contribuem para a atividade antioxidante: (i) um grupo *o*-difenólico no anel B; (ii) uma ligação dupla (2-3) conjugada com uma função 4-oxo; e (iii) grupos hidroxila nas posições 3 e 5 (LANDETE, 2012). A eficiência de compostos fenólicos como antioxidantes depende grandemente de sua estrutura química (Tabela 4), sendo que a atividade antioxidante destes compostos aumenta com o grau de hidroxilação e de substituição de átomos de hidrogênio por grupos etil ou *n*-butil, dependendo ainda da orientação dos grupos hidroxila (impedimento estérico) (HUR *et al.*, 2014).

Pode-se notar que os antioxidantes apresentaram comportamentos similares nos ensaios $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$ e $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$, embora tenham mostrado maiores valores de atividade antioxidante pelo ensaio $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ (aproximadamente 2 vezes maior, com exceção do kaempferol). Por outro lado, não houve relação entre os valores e o comportamento das atividades antioxidantes dos padrões entre o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$ e os demais ($\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$ e $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$).

Os menores valores de atividade antioxidante apresentados pelo ensaio $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$ em comparação ao $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ podem ser explicados por duas razões. Primeiramente, o mecanismo de ação do ensaio DPPH que é influenciado pela conformação estrutural do antioxidante, assim, pequenas moléculas que possuem um melhor acesso ao sítio ativo do radical apresentam uma maior atividade antioxidante por meio deste teste (ALMEIDA *et al.*, 2011). A segunda explicação é que os radicais DPPH• podem reagir de forma reversível com certos compostos fenólicos, resultando em baixos valores de atividade antioxidante (MOO-HUCHIN *et al.*, 2014).

O comportamento similar das atividades antioxidantes dos padrões pelos ensaios $\text{DPPH}_{\text{Trolox}}$ e $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ pode ser devido ao mecanismo de ação envolvido nestes ensaios, uma vez que ambos são baseados na transferência de elétrons, ao passo que o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$ baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio. Apak *et al.* (2007) relataram que métodos baseados na transferência de elétrons não podem ser comparados a métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio. Além disso, o ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL-H}}$ apresenta algumas particularidades em relação aos demais métodos que podem influenciar os resultados, sendo eles: pH e temperatura fisiológicos; atua de forma competitiva (antioxidante compete com o substrato pelos radicais), ou seja, medem o grau de proteção de uma molécula alvo da ação dos radicais livres, enquanto os demais métodos atuam diretamente sobre um radical de referência; na quantificação dos resultados combina tempo de inibição e grau de inibição do radical livre, ao passo que outros métodos similares utilizam tempo de inibição a um grau de inibição fixo ou o grau de inibição a um tempo fixo; e as medidas são realizadas através de curvas de decaimento da fluorescência, sendo que nos demais utiliza-se a absorbância à um comprimento de onda fixo (APAK *et al.*, 2007; GÜLÇİN, 2012).

Segundo Vasco, Ruales & Kamal-Eldin (2008), os compostos fenólicos reagem de diferentes maneiras nestes ensaios, uma vez que as reações dependem da hidrofiliabilidade e do tipo de composto analisado, da polaridade dos diferentes sistemas teste e da fonte radicalar (por exemplo, alguns compostos que são altamente reativos com radicais peróxila, podem reagir lentamente ou nem reagir com o radical $\text{DPPH}^\bullet$).

Os resultados do presente estudo dão suporte à necessidade da utilização de mais de um método na avaliação das propriedades antioxidantes de produtos alimentares para que possam ser abordados os diferentes mecanismos de ação e, assim, obter informações úteis sobre a capacidade antioxidante de todos os compostos presentes na matriz em questão.

3.3. Influência das condições de extração na quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Com a finalidade de avaliar o conteúdo de CFT e FL e a atividade antioxidante da polpa de araticum, foram utilizados dois métodos de extração para a obtenção dos extratos, um método clássico (extração sólido-líquido: E_{SL}) e outro moderno (extração assistida por ultrassom: E_{AU}) (SZYDŁOWSKA-CZERNIAK; TUŁODZIECKA, 2014). Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, o extrato obtido por meio do método de extração E_{SL} apresentou os maiores valores de CFT, FL e atividade antioxidante por todos os ensaios realizados.

A recuperação de compostos antioxidantes durante o procedimento de extração é influenciada por vários fatores como a parte da planta usada como material de partida, o solvente utilizado na extração, o processo de extração, a relação solvente-sólido, o binômio tempo/temperatura, entre outros (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). As condições do sistema extrator utilizadas em cada método encontram-se sumarizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições do sistema extrator para os métodos de extração empregados.

Condições	E_{SL}	E_{AU}
Princípio	Difusão e lixiviação	Cavitação
Temperatura (°C)	75	10
Tempo (min)	90	30
Solvente	46 % (v/v, etanol:água)	Água (FL e TEAC _{ABTS}) Metanol (p.a.) (CFT e DPPH) Tampão fosfato de potássio (ORAC _{FL} -H) RMDC 7 % (m/v; acetona água 1:1) (ORAC _{FL} -L)
R _{SS}	10:1	100:1

CFT: Compostos fenólicos totais; **FL:** Conteúdo de flavonoides totais; **DPPH:** Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•); **TEAC_{ABTS}:** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox; **ORAC_{FL}:** Capacidade de absorção do radical oxigênio; **H:** Hidrofílico; **L:** Lipofílico; **RMCD:** β-Ciclodextrina metilada randomizada; **R_{SS}:** Relação solvente-sólido.

A influência de alguns fatores envolvidos na extração sobre a recuperação de compostos antioxidantes a partir de matrizes alimentares encontra-se brevemente resumidas a seguir:

- (i) *Temperatura*: a elevação da temperatura promove um aumento na extração de compostos antioxidantes que pode ser atribuído ao aumento da solubilidade destes compostos no sistema, principalmente das frações poliméricas, e à rápida transferência de massa (ou taxa de difusão) devido à redução da viscosidade do solvente e à aceleração do movimento das moléculas (mobilidade molecular) (HUR *et al.*, 2014).
- (ii) *Solvente extrator*: a polaridade do solvente exerce um papel fundamental no aumento da solubilidade dos compostos antioxidantes (MARTÍNEZ *et al.*, 2012), sendo assim, o solvente extrator adequado dependerá da polaridade dos compostos antioxidantes presentes na matriz estudada.
- (iii) *Tempo*: o tempo de extração de compostos antioxidantes pode ser influenciado pelo grau de polimerização e solubilidade destes compostos e por sua interação com a matriz estudada. Geralmente, o aumento do tempo de contato entre o solvente e o material leva a uma maior quantidade de compostos antioxidantes extraídos. Porém, uma duração ótima pode ser estabelecida, uma vez que longo tempo de extração a altas temperaturas pode levar à degradação destes compostos. De acordo com a segunda lei da difusão de *Fick*, o equilíbrio final entre as concentrações do soluto na matriz sólida e no solvente geralmente é alcançado após 1 - 2 horas de extração (WONG *et al.*, 2014; GHITESCU *et al.*, 2015).
- (iv) *Relação solvente-sólido (R_{SS})*: geralmente, um aumento na relação solvente-sólido promove uma elevação na difusão dos compostos para o solvente extrator por aumentar o gradiente de concentração entre o material sólido e solvente, levando à exaustão do material extraído (CELHAY *et al.*, 2014). No entanto, relações solvente-sólido muito altas podem diminuir a recuperação destes compostos, uma vez que aumentam a força motriz necessária à transferência de

massa. Além disso, à medida que a relação solvente-sólido aumenta mais impurezas são dissolvidas (SHI; DING; XU, 2014).

- (v) *Princípio da técnica:* a E_{AU} é baseada no princípio da cavitação que envolve ciclos de expansão e compressão causados por pressões negativas e positivas sobre o solvente extrator. O ciclo de expansão produz uma pressão negativa que afasta uma molécula da outra levando à formação de bolhas no líquido que crescem e, em seguida, entram em colapso. Nas proximidades de uma fronteira sólida, o colapso das bolhas ocorre de forma assimétrica e envolve jatos de alta velocidade que exercem forte impacto sobre a superfície do sólido. Dessa forma, a ultrassonificação aumenta a penetração do solvente no sólido aumentando a transferência de massa, além de destruir a parede celular facilitando a liberação dos compostos (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2013; BAIANO, 2014). Por outro lado, a E_{SL} é baseada nos princípios de difusão (transferência de massa através dos poros do sólido) e lixiviação (dissolução dos solutos da superfície do sólido para o solvente) os quais são ditados pela diferença de concentração do soluto entre o sólido e o solvente, o que faz com que as moléculas do soluto se difundam de um para o outro (ABIDIN *et al.*, 2013).

Todos os fatores acima mencionados afetam a recuperação de compostos antioxidantes a partir de matrizes alimentares e, por essa razão, devem ser considerados na escolha do procedimento de extração a ser empregado. Verifica-se que o método de extração E_{SL} foi mais eficiente na recuperação de compostos antioxidantes da polpa de araticum quando comparado ao E_{AU} , o que pode ser explicado pela combinação de um maior número de condições favoráveis neste método que atuaram sinergicamente sobre a matriz estudada aumentando a extração dos compostos nela presentes. Desta forma, estes resultados indicam que, para a extração seletiva de antioxidantes naturais, é de grande importância e necessário um estudo sobre as condições de extração mais adequadas para cada matriz vegetal.

4. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, vários estudos têm investigado o papel de antioxidantes naturais presentes na dieta na prevenção de doenças. Compostos fenólicos têm mostrado elevada atividade antioxidante e, portanto, tem sido sugerido que eles são responsáveis pela redução no risco de doenças associadas ao estresse oxidativo. O presente estudo investigou o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides e a atividade antioxidante de dois extratos da polpa de araticum. Os resultados demonstraram que, quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos, maior é a atividade antioxidante mensurada pelos diferentes ensaios (DPPH, TEAC_{ABTS} e ORAC_{FL}). Compostos lipofílicos, como os carotenoides e tocoferóis, também podem contribuir para os elevados valores de atividade antioxidante, uma vez que os maiores valores foram observados no ensaio ORAC_{FL} da fração lipofílica. O método de extração sólido-líquido otimizado foi mais eficiente na extração de compostos antioxidantes quando comparado à extração assistida por ultrassom, demonstrando a importância da escolha e do estudo da técnica de extração na caracterização e quantificação destes compostos em distintas matrizes. Ao melhor do nosso conhecimento, os conteúdos de compostos fenólicos (2,62 - 4,67 GAE.100 g⁻¹ PAL) e flavonoides totais (1,79 - 4,00 CE.100 g⁻¹ PAL) e os valores de atividade antioxidante por todos os ensaios realizados (DPPH_{IC50} = 46,56 - 93,76 µg.mL⁻¹; DPPH_{Trolox} = 306,04 - 609,58 µmol TE.g⁻¹ PAL; TEAC_{ABTS} = 231,79 - 683,65 µmol TE.g⁻¹ PAL; ORAC_{FL}-T = 902,27 - 1.593,72 µmol TE.g⁻¹ PAL) foram significativamente superiores aos até então reportados pela literatura, sendo que este é o primeiro estudo que analisa as propriedades antioxidantes da polpa de araticum pelo ensaio ORAC_{FL}. Estes resultados demonstram que o araticum é uma fonte de antioxidantes naturais, e assim apresenta grande potencial para a indústria alimentos no desenvolvimento de novos produtos com apelo funcional. No entanto, futuros estudos devem ser conduzidos com a polpa de araticum a fim de verificar seus efeitos funcionais na saúde do ser humano, bem como sua aplicação tecnológica na formulação de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIO FINCO, F. D. B.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, R. B. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of three native fruits from Brazilian savannah (Cerrado). **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 179–185, 2012.
- ABIDIN, Z. Z. *et al.* Solid–Liquid Extraction in Biorefinery. In: RAMASWAMY, S.; HUANG, H.-J.; RAMARAO, B. V. (Eds.). **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2013. p. 351–374.
- ALBUQUERQUE, T. G. *et al.* Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, (in press) 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.
- APAK, R. *et al.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496–1547, 2007.
- ARRUDA, H. S. *et al.* Ação extencionista para fortalecer a importância alimentar e ambiental dos frutos do Cerrado em Rio Paranaíba (MG). **Revista Conexão UEPG**, v. 10, n. 2, p. 264–277, 2014.
- BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes - a review. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14821–14842, 2014.
- CARDOSO, L. DE M. *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, v. 68, n. 2, p. 121–134, 2013.
- CARTEA, M. E. *et al.* Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251–280, 2011.
- CAVALCANTE, T. R. M. *et al.* Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 235–240, 2008.
- CELHAY, C. *et al.* Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 3, p. 204–211, 2014.

CICCO, N. *et al.* A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 107–110, 2009.

DAMIANI, C. *et al.* Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 723–729, 2011.

DAMIANI, C. *et al.* Stability of frozen marolo pulp during storage. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 713–721, 2013.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction and in situ derivatization. **Journal of chromatography A**, v. 1296, p. 226–234, 2013.

DRAGANO, N. R. V. *et al.* Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319–325, 2010.

GHITESCU, R.-E. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 535–541, 2015.

GREGORIS, E. *et al.* Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

HUR, S. J. *et al.* Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

JULIÁN-LOAEZA, A. P. *et al.* Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1262–1268, 2011.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936–948, 2012.

LEITE, A. V. *et al.* Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LI, T. *et al.* Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 8, p. 1805–1817, 2014.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1003–1008, 2007.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Study of antioxidant activity of non-conventional Brazilian fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1167–1172, 2014.

MALTA, L. G. *et al.* *In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 604–611, 2012.

MALTA, L. G. *et al.* Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 417–425, 2013.

MARTÍNEZ, R. *et al.* Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1520–1526, 2012.

MOO-HUCHIN, V. M. *et al.* Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 152, p. 508–515, 2014.

NERI-NUMA, I. A. *et al.* Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1233–1238, 2014.

OLIVEIRA, K. A. DE M. *et al.* Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 277–281, 2008.

PAVAN, V.; SANCHO, R. A. S.; PASTORE, G. M. The effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and *Annona marcgravii*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1247–1251, 2014.

PAZ, M. *et al.* Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015.

REBELLO, L. P. G. *et al.* Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. **Food Research International**, v. 55, p. 397–403, 2014.

REZENDE, M. L.; CÂNDIDO, P. DE A.; MALAFAIA, G. C. Sistemas agroalimentares localizados: uma abordagem para a exploração do marolo (*Annona Crassiflora* Mart.) na região de Alfenas, Minas Gerais. **Scientia Plena**, v. 8, n. 8, p. 1–7, 2012.

ROESLER, R. *et al.* Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. C102–C107, 2006.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007a.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2007b.

ROSSO, V. V. DE. Bioactivities of Brazilian fruits and the antioxidant potential of tropical biomes. **Food and Public Health**, v. 3, n. 1, p. 37–51, 2013.

RUFINO, M. *et al.* Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693–695, 2009.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SHI, D.; DING, H.; XU, S. Optimization of microwave-assisted extraction of wedelolactone from *Eclipta alba* using response surface methodology. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 34–42, 2014.

SILVA, E. P. DA; VILAS BOAS, E. V. DE B.; XISTO, A. L. P. R. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 666–675, 2013.

SIQUEIRA, E. M. DE A. *et al.* Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 1–7, 2013.

SOARES JÚNIOR, M. S. *et al.* Filmes plásticos e ácido ascórbico na qualidade de araticum minimamente processado. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1779–1785, 2007.

SOUZA, V. R. DE *et al.* Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012.

SRINIVASAN, K. Antioxidant potential of spices and their active constituents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 352–372, 2014.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; TUŁODZIECKA, A. Antioxidant Capacity of Rapeseed Extracts Obtained by Conventional and Ultrasound-Assisted Extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 12, p. 2011–2019, 2014.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816–823, 2008.

VILLELA, P.; BATISTA, Â. G.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Nutritional composition of *Annona crassiflora* pulp and acceptability of bakery products prepared with its flour. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 417–423, 2013.

WONG, Y. S. *et al.* Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 257–265, 2014.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS NO FRUTO DO CERRADO ARATICUM (*Annona crassiflora* MART.)

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Henrique Silvano Arruda^{1*}, Gustavo Araujo Pereira¹ e Glaucia Maria Pastore¹

¹Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – FEA/UNICAMP.

*hsilvanoarruda@gmail.com

Influência da concentração de etanol na extração de oligossacarídeos no fruto do Cerrado araticum (*Annona crassiflora* Mart.)

RESUMO

Oligossacarídeos são carboidratos de cadeia curta pobremente absorvidos pelo intestino delgado. Estes compostos podem proporcionar uma gama de efeitos benéficos à saúde humana o que tem atraído o interesse de pesquisadores, consumidores e indústrias de alimentos em todo o mundo. O araticum é um fruto do Cerrado brasileiro rico em açúcares e fibras dietéticas, apresentando potencial uso como fonte de ingredientes funcionais. O presente estudo determinou os conteúdos de mono- (frutose e glicose), di- (sacarose e maltose) e oligossacarídeos (fruto-, malto-, galacto- e xilo-oligossacarídeos) na polpa de araticum, bem como avaliou a influência da concentração de etanol na recuperação dos mesmos. Quatro soluções hidroetanólicas (0, 20, 50 e 80 % de etanol v/v) foram utilizadas e o conteúdo de mono-, di- e oligossacarídeos foi determinado por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência acoplada ao Detector Amperométrico Pulsado (CTAAE-DAP). O sistema solvente contendo 50 % de etanol (v/v) apresentou a maior eficiência extratora. Os resultados demonstraram que o fruto apresentou quantidades similares de frutose (116,087 - 132,908 mg.g⁻¹ PAL) e glicose (108,977 - 125,923 mg.g⁻¹ PAL). Seis oligossacarídeos foram identificados: 1-cestose (GF_2), 1F- β -frutofuranosilnistose (GF_4), maltotriose (G_3), xilotriose (X_3), xilopentaose (X_5) e xilo-hexaose (X_6). Dentre os oligossacarídeos identificados, os maiores conteúdos foram observados para o GF_2 (2,667 - 3,004 mg.g⁻¹ PAL), ao passo que o GF_4 (0,130 - 0,245 mg.g⁻¹ PAL) apresentou os menores conteúdos. Assim, o araticum pode contribuir para a ingestão dietética de oligossacarídeos prebióticos e, portanto, pode ser explorado como um potencial ingrediente na formulação de alimentos funcionais.

Palavras-chave: extração, alimentos funcionais, prebióticos, conteúdo de carboidratos, cromatografia de troca aniônica de alta eficiência.

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão mais conscientes da relação entre dieta, saúde e prevenção de doenças e, dessa forma, esperam que os alimentos que ingerem sejam, além de saborosos e atrativos, também seguros e saudáveis a fim de melhorar seu bem-estar físico e mental (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009; CORRADINI; LANTANO; CAVAZZA, 2013). Neste contexto, há um crescente interesse nos chamados “alimentos funcionais” que são definidos como alimentos naturais ou processados, consumidos como parte da dieta habitual que, além da função básica de nutrir, contêm conhecidos compostos biologicamente ativos que, quando administrados em quantidade e qualidade definidas, fornecem benefícios à saúde clinicamente comprovados e documentados, sendo assim, uma importante fonte na prevenção, gerenciamento e tratamento de doenças crônicas nos tempos modernos (DI BARTOLOMEO; STARTEK; VAN DEN ENDE, 2013).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e cobre uma área de aproximadamente 2 milhões de km², correspondendo a 25 % do território brasileiro. A flora deste bioma possui diversas espécies frutíferas com grande potencial de exploração alimentar, pois além de apresentarem atrativos sensoriais (como cor, sabor e aromas peculiares e intensos) que gera grande aceitação popular, possuem elevados teores de proteínas, vitaminas, minerais e fibras, podendo ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes e geleias (ARRUDA *et al.*, 2014).

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.), também conhecido como marolo ou panã, é um fruto exótico do Cerrado brasileiro que apresenta elevado potencial nutricional e tecnológico (CARDOSO *et al.*, 2013) e está entre as 20 espécies mais utilizadas na alimentação regional (CAVALCANTE *et al.*, 2008). Recentemente, este fruto tem atraído a atenção de consumidores e pesquisadores devido às suas características sensoriais tais como cor, sabor e aroma e, principalmente, pelo seu conteúdo de compostos fenólicos (flavonoides e isoflavonas), oligossacarídeos (tais como os fruto-oligossacarídeos), carotenoides e ácido ascórbico (SILVA *et al.*, 2014). De acordo com Cardoso *et al.* (2013), 100 gramas de araticum contêm 6,80 g de fibra dietética; 4,98 mg de carotenoides (2,98;

1,97 e 0,02 mg de α - e β -caroteno e licopeno, respectivamente); 288,79 RAE de vitamina A; 5,23 mg de ácido ascórbico; 494,04 μ g de vitamina E e 27,36 μ g de folatos. Assim, o araticum apresenta potencial uso como uma fonte de ingredientes funcionais para fornecer nutrientes que podem prevenir doenças relacionadas à nutrição e melhorar o bem-estar físico e mental dos consumidores.

Uma importante classe de compostos bioativos presentes em alimentos funcionais são os carboidratos não-digeríveis tais como as fibras dietéticas, oligossacarídeos e amido resistente, os quais apresentam várias funções fisiológicas, sendo que seus efeitos promovidos no bem-estar, melhoria da saúde e redução do risco de doenças têm sido bem investigados. Dentre estes compostos, os oligossacarídeos funcionais apresentam importantes propriedades físico-químicas e fisiológicas benéficas à saúde dos consumidores e, por esta razão, seu uso como ingredientes alimentares tem crescido rapidamente (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009). Oligossacarídeos são definidos como carboidratos de baixo peso molecular com grau de polimerização (número de unidades de monossacarídeos ligadas) variando entre 2 e 10 (GÄNZLE; FOLLADOR, 2012). A glicose, galactose, frutose e xilose são os monossacarídeos mais comumente presentes na estrutura dos oligossacarídeos (MORRIS; MORRIS, 2012).

Por resistirem à digestão e absorção no trato gastrointestinal (intestino delgado), os oligossacarídeos podem atingir o intestino grosso e atuarem como prebióticos, onde são fermentados pela microbiota intestinal estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias colônicas e alterando o equilíbrio da microbiota colônica no sentido de uma composição mais saudável (DWIVEDI *et al.*, 2014). Outros efeitos benéficos à saúde atribuídos aos oligossacarídeos incluem a não-cariogenicidade; baixo valor calórico; melhoria da função imune e da integridade colônica; redução tanto da incidência quanto da duração de infecções intestinais; regulação da resposta alergênica; melhoria da digestão e eliminação; protonação de amônia e aminas potencialmente tóxicas; alívio da constipação; saciedade; melhoria na absorção de minerais como cálcio, magnésio, zinco e ferro; redução dos níveis séricos e hepáticos de triglicérides, fosfolípidios e colesterol e aumento da razão HDL-colesterol/LDL-colesterol;

redução do ganho de peso e consumo de energia; redução da incidência de câncer colônico, diarreia e inflamações; e diminuição dos níveis sanguíneos de glicose (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2011; GÄNZLE, 2012; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; GULLÓN *et al.*, 2013).

Devido às diversas alegações científicas acerca dos efeitos benéficos desses carboidratos à saúde intestinal, a indústria de alimentos tem aumentado a inclusão de oligossacarídeos em seus produtos (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2014). Os oligossacarídeos podem ser obtidos pela extração direta de fontes naturais ou produzidos pela hidrólise química ou enzimática de polissacarídeos ou ainda pela síntese química ou enzimática a partir de mono- e dissacarídeos (KHALILI; ABDULLAH; MANAF, 2014). Porém, o consumo de fontes naturais de oligossacarídeos, tais como frutas e vegetais, tem a vantagem do menor custo em comparação a produtos industrializados, além de oferecem valores altamente agregados por associarem a ingestão de outros nutrientes tais como compostos bioativos, fibras, vitaminas e minerais (DER AGOPIAN *et al.*, 2008). Dessa forma, a popularidade dos oligossacarídeos aumentou fortemente, sobretudo nos últimos anos. Como consequência, várias pesquisas têm sido realizadas visando a descoberta de novos oligossacarídeos, fontes e propriedades biológicas, bem como o desenvolvimento de novos produtos que contenham estes compostos.

Dados relacionados à composição química e conteúdo de compostos bioativos do araticum são raros na literatura. O conhecimento da composição de frutos consumidos no Brasil, incluindo este fruto, é essencial, uma vez que estes dados dão suporte à condução de pesquisas sobre a relação entre dieta e doença e no desenvolvimento de novos produtos (CARDOSO *et al.*, 2013). Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo determinar o conteúdo de mono- (frutose e glicose), di- (sacarose e maltose) e oligossacarídeos (fruto-, malto-, galacto- e xilo-oligossacarídeos) na polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), bem como avaliar a influência da concentração de etanol presente no solvente extrator sobre a recuperação destes compostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções e reagentes químicos

Os padrões de grau cromatográfico: monossacarídeos (frutose e glicose), dissacarídeos (sacarose e maltose), galacto-oligossacarídeos (*GOS*: estaquiose e rafinose), isomalto-oligossacarídeo (*IMOS*: isomaltotriose), fruto-oligossacarídeos (*FOS*: 1-cestose - *GF*₂; nistose - *GF*₃ e 1F-β-frutofuranosilnistose - *GF*₄) e malto-oligossacarídeos (*MOS*: maltotriose - *G*₃; maltotetraose - *G*₄; maltopentaose - *G*₅; malto-hexaose - *G*₆ e malto-heptaose - *G*₇) foram fornecidos pela *Sigma-Aldrich* (*St. Louis, EUA*), enquanto que os xilo-oligossacarídeos (*XOS*: arabinose, celobiose, xilose - *X*₁, xilobiose - *X*₂, xilotriose - *X*₃, xilotetraose - *X*₄, xilopentaose - *X*₅ e xilo-hexaose - *X*₆) foram fornecidos pela *Megazyme* (*Wicklow, Irlanda*). A solução de hidróxido de sódio 50 % e o aceto de sódio, ambos grau cromatográfico, foram fornecidos pela *Merck* (*Frankfurt, Alemanha*). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ.cm⁻¹), obtida pelo um sistema de purificação *Milli-Q* (*Millipore, Bedford, modelo CT Q3UV, MA, EUA*). Todos os outros reagentes e solventes utilizados neste estudo foram de alto grau analítico. Todos os reagentes foram armazenados nas condições ideais conforme especificações dos fabricantes.

2.2. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras

Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), em completo estado de maturidade fisiológica, foram coletados na área rural do município de Carmo do Paranaíba, Minas Gerais/Brasil, durante a estação de colheita (de janeiro a março de 2014), após caírem naturalmente das árvores. As amostras foram transportadas do local de coleta ao Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), São Paulo/Brasil, em caixas de poliestireno, até 36 horas após a coleta. Os frutos livres de defeitos fisiológicos e patológicos e completamente maduros foram lavados com água corrente para a remoção de sujidades superficiais. Em seguida, a polpa do fruto foi manualmente separada das sementes e casca, congelada com auxílio de nitrogênio líquido e liofilizada (*LIOTOP*,

modelo L101, São Carlos, Brasil). A temperatura e a pressão da câmara de liofilização foram de -40 °C e 250 Pa, respectivamente. O teor de umidade encontrado para a polpa foi de $71,73 \pm 1,97$ %. A polpa liofilizada (PAL) foi moída em moinho de facas (*Marconi, modelo MA340, Piracicaba, Brasil*) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi acondicionado e identificado em embalagens de polietileno e armazenado em ultrafreezer a -80 °C (*Sanyo Electric Co., modelo MDF-C8V1, Japão*) até o momento das extrações (CARDOSO *et al.*, 2013).

2.3. Procedimento de extração

Para avaliar a influência do solvente sobre a extração dos açúcares, o araticum liofilizado foi extraído com 4 diferentes soluções hidroetanólicas: água ultrapura (*Milli-Q*), 20 % de etanol (v/v), 50 % de etanol (v/v) e 80 % de etanol (v/v). A extração dos açúcares foi realizada conforme métodos descritos por Jovanovic-Malinovska, Kuzmanova & Winkelhausen (2014) e Khalili, Abdullah & Manaf (2014) com algumas modificações. A PAL (3,0 g) foi misturada com 30 mL das soluções hidroetanólicas citadas anteriormente e as misturas foram mantidas a 50 °C em um banho de agitação (*New Brunswick Scientific Classic Series, modelo C76, EUA*) a 200 rpm por 60 minutos. As extrações foram conduzidas em *Erlenmeyer* adaptado para evitar o efeito vórtice, obtendo uma melhor mistura do sistema durante a extração. Alíquotas das amostras foram coletadas após 1 (homogeneização manual), 15, 30, 45 e 60 minutos (banho de agitação) do início da extração para o monitoramento da cinética de extração dos açúcares. Após cada extração, as amostras foram transferidas para microtubos e em seguida centrifugadas (*Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R, Tuttlingen, Alemanha*) a 10.000 rpm por 11 minutos a 5 °C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em ultrafreezer a -80 °C (*Sanyo Electric Co., modelo MDF-C8V1, Japão*) até o momento das análises.

2.4. Determinação cromatográfica dos açúcares

2.4.1. Instrumentação e condições cromatográficas

Os tipos e quantidades de açúcares presentes na PAL foram analisados e quantificados por meio de Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência acoplada ao Detector Amperométrico Pulsado (CTAAE-DAP) de acordo com métodos estabelecidos por Der Agopian *et al.* (2008) e Otieno & Ahring (2012), com algumas adaptações. As análises foram realizadas utilizando um sistema *Dionex ICS-5000* consistindo de uma bomba *Single Grad Degas*, um autoamostrador, um detector eletroquímico (ED) com eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência Ag/AgCl. O processo cromatográfico foi controlado e monitorado pelo *Software* de Automação Cromatográfica *Chromeleon* versão 7.0 (*Dionex, CHM-1, EUA*). Os extratos e os padrões foram diluídos em água ultrapura (*Milli-Q*) e filtrados através de filtros de membrana 0,22 µm antes da injeção. As amostras (30 µL) foram injetadas usando um autoamostrador. O fluxo da fase móvel através da coluna foi de 1,0 mL por minuto e a temperatura da coluna mantida constante em 30 °C. As demais condições cromatográficas utilizadas para a separação de cada grupo de açúcares estão dispostas na Tabela 1.

2.4.2. Identificação e quantificação dos açúcares

A identificação dos açúcares foi realizada usando duas técnicas: (i) comparando o tempo de retenção do pico do analito com o tempo de retenção de misturas de padrões autênticos; e (ii) por meio da co-injeção da mistura de padrões autênticos à amostra analisada (co-cromatografia). A quantificação de cada açúcar foi realizada por meio de curva de calibração externa usando soluções padrão em diferentes concentrações. As curvas de calibração (Tabela 2) foram construídas plotando as áreas dos picos contra as concentrações de cada padrão e os dados foram processados usando o *Software* de Automação Cromatográfica *Chromeleon* versão 7.0 (*Dionex, CHM-1, USA*). O conteúdo dos açúcares foi expresso em mg por g de fruto liofilizado (mg. g⁻¹ PAL).

Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas na separação dos açúcares da PAL.

Açúcares analisados	Coluna	Eluentes	Programa de Eluição	Tempo de corrida
FOS (<i>GF₂-GF₄</i>) e MOS (<i>G₃-G₇</i>)	PC: CarboPac PA-100 (50 x 4 mm) CA: CarboPac PA-100 (250 x 4 mm)*	A: NaOH 100 mM B: Acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM	CI: 97 % de A e 3 % de B por 5 min GL: 3 - 40 % de B por 20 min CS: 100 % de B por 5 min RE: Condições iniciais da corrida por 5 min	35 min
XOS (<i>X₁-X₆</i>)	PC: CarboPac PA-100 (50 x 4 mm) CA: CarboPac PA-100 (250 x 4 mm)*	A: NaOH 200 mM B: Acetato de sódio 1 M em NaOH 200 mM C: Água ultrapura	GL: 100 - 0 % de A, 0 - 11 % de B e 0 - 89 % de C por 13 min CS: 50 % de B e 50 % de C por 5 min RE: Condições iniciais da corrida por 7 min	25 min
GOS (Est , Raf), Gli , Fru , Sac , Mal e Imal	PC: CarboPac PA-1 (50 x 4 mm) CA: CarboPac PA-1 (250 x 4 mm)**	A: NaOH 200 mM) B: Água ultrapura	GL: 40 - 69 % de A por 25 min CS: 100 % de A por 5 min RE: Condições iniciais da corrida por 5 min	35 min

FOS: Fruto-oligossacarídeos; **MOS:** Malto-oligossacarídeos; **XOS:** Xilo-oligossacarídes; **GOS:** galacto-oligossacarídeos; **Gli:** Glicose; **Fru:** Frutose; **Sac:** Sacarose; **Mal:** Maltose; **Est:** Estaquiase; **Raf:** Rafinose; **Imal:** Isomaltotriose; **PC:** Pré-coluna; **CA:** Coluna analítica; **CI:** Corrida isocrática; **GL:** Gradiente linear; **CS:** *Cleaning step*; **RE:** Re-equilíbrio.

*Resina CarboPac PA-100: 8,5 µm de diâmetro pelicular, constituída de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno funcionalizada com micropérolas de 275 nm de amônio quaternário.

**Resina CarboPac PA-1: 10 µm de diâmetro pelicular, constituída de poliestireno/divinilbenzeno funcionalizada com micropérolas de 580 nm de amônio quaternário.

2.5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA). Quando constatada diferença estatística pelo teste *F* os tratamentos foram comparados pelo teste de *Tukey* HSD. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de 5 % de significância ($p \leq 0,05$) com o auxílio do *Software* *STATISTICA* versão 8.0 (*Statsoft, Oklahoma, EUA*). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da triplicata.

Tabela 2 - Dados da regressão linear e faixa de linearidade dos analitos investigados.

Analito	Regressão	R ²	Faixa linear (µg.mL ⁻¹)
Glicose	$y = 3,2837x - 0,6441$	0,9992	2,0 - 40,0
Frutose	$y = 1,3259 + 0,1709$	0,9989	2,0 - 40,0
Sacarose	$y = 1,2470x - 0,6499$	0,9994	2,0 - 40,0
Maltose	$y = 1,2233x - 1,3915$	0,9992	2,0 - 40,0
Estaquiase	$y = 1,4281x - 0,3448$	0,9999	2,0 - 40,0
Rafinose	$y = 1,0297x + 0,0051$	0,9998	2,0 - 40,0
Isomaltotriose	$y = 1,5064x - 1,2075$	0,9993	2,0 - 40,0
1-Cestose (GF_2)	$y = 1,3773x - 0,3960$	0,9994	1,0 - 40,0
Nistose (GF_3)	$y = 1,0888x + 0,6951$	0,9969	1,0 - 30,0
1F-β-frutofuranosilnistose (GF_4)	$y = 1,0544x + 0,6057$	0,9976	1,0 - 30,0
Maltotriose (G_3)	$y = 1,0718x - 1,0155$	0,9988	1,0 - 40,0
Maltotetraose (G_4)	$y = 1,0081x - 0,2513$	0,9978	1,0 - 40,0
Maltopentaose (G_5)	$y = 0,9126x + 0,2483$	0,9972	1,0 - 20,0
Malto-hexaose (G_6)	$y = 0,9882x + 0,0483$	0,9994	1,0 - 30,0
Malto-heptaose (G_7)	$y = 0,8693x + 0,0622$	0,9997	1,0 - 30,0
Arabinose	$y = 0,4139x - 0,1476$	0,9964	2,0 - 30,0
Celobiose	$y = 1,3467x - 1,8721$	0,9975	2,0 - 30,0
Xilose (X_1)	$y = 1,0787x - 1,3078$	0,9983	2,0 - 30,0
Xilobiose (X_2)	$y = 1,3479x - 1,3872$	0,9966	2,0 - 30,0
Xilotriose (X_3)	$y = 1,0823x - 0,5583$	0,9985	2,0 - 30,0
Xilotetraose (X_4)	$y = 0,8209x - 0,1062$	0,9995	2,0 - 30,0
Xilopentaose (X_5)	$y = 1,4075x + 0,2014$	0,9993	2,0 - 30,0
Xilo-hexaose (X_6)	$y = 0,7805x + 0,1412$	0,9993	2,0 - 30,0

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A linearidade, a regressão e as faixas de linearidade dos 23 analitos foram determinadas usando o método CTAAE-DAP. Os dados indicaram que as curvas de calibração dos 23 analitos apresentaram boa linearidade ($R^2 > 0,99$) (Tabela 2).

3.1. Efeito de fatores únicos na extração de oligossacarídeos

Materiais vegetais apresentam uma natureza complexa, assim a extração de substâncias neles contidas é influenciada pelas condições do processo tais como tipo de solvente extrator, concentração do solvente, temperatura de extração, mecanismo de ação (pressão e agitação, por exemplo), tempo de contato, relação solvente-sólido e solubilização dos compostos-alvo que é dependente da polaridade do solvente e das condições físico-químicas (TAKEUCHI *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2014).

Os efeitos de diferentes tempos de extração e concentrações de etanol na eficiência de recuperação de oligossacarídeos na polpa de araticum foram estudados e os resultados são apresentados nas Figuras 1 e 2. Os resultados foram plotados em função da área total dos oligossacarídeos extraídos, levando-se em consideração inclusive aqueles que não foram identificados pelo método devido à indisponibilidade de padrões analíticos.

3.1.1. Efeito do tempo de extração

A seleção do tempo de extração adequado é um parâmetro de extrema importância e seu impacto na eficiência, mão-de-obra e custo energético deve ser considerado (YILMAZ; KARAASLAN; VARDIN, 2014). Para avaliar a influência do tempo, o conteúdo de oligossacarídeos extraídos foi monitorado ao longo de 60 minutos. O efeito do tempo na liberação de oligossacarídeos é apresentado na Figura 1. A área total de oligossacarídeos extraídos não foi afetada pelo tempo de extração, com exceção do ensaio conduzido com 20 % de etanol, no qual foi notado um aumento na área total com o tempo e o máximo foi atingido no 15º minuto. Depois disso, a área foi praticamente constante e o aumento na duração do processo não foi significativo ($p > 0,05$). Esta observação pode ser

explicada pela segunda lei da difusão de *Fick*, que afirma que o equilíbrio final entre as concentrações do soluto na matriz sólida e no solvente é atingido após certo tempo (WONG *et al.*, 2014). Assim, um tempo de extração excessivo não promove aumento na extração de oligossacarídeos. Apesar de não ter sido notada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos 1 e 15 minutos para os demais ensaios (0, 50 e 80 % de etanol), pode-se observar um ligeiro aumento na área total de oligossacarídeos no tempo 15 minutos em relação ao tempo 1 minuto para os ensaios realizados com 50 e 80 % de etanol. Levando em conta estes fatos, foi selecionado o tempo de 15 minutos para a sequência do estudo.

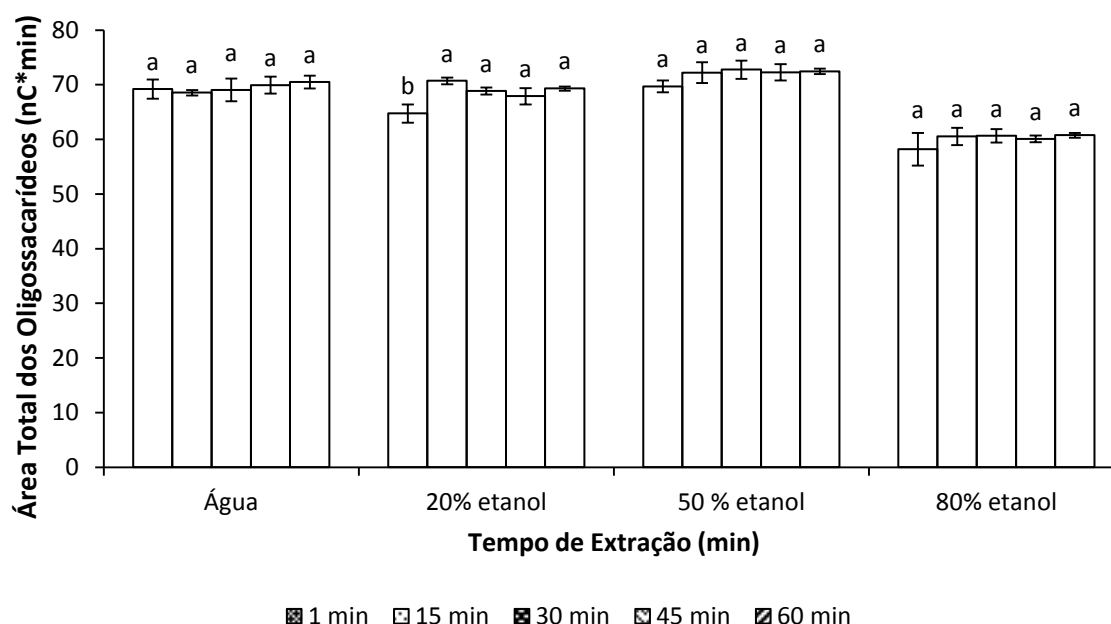


Figura 1 – Efeito do tempo de extração na eficiência de recuperação de oligossacarídeos na polpa de araticum. Valores marcados por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0.05$).

3.1.2. Efeito da concentração de etanol

A seleção do solvente extrator é um dos primeiros passos em qualquer procedimento de extração por ser um dos parâmetros mais importantes envolvido em qualquer técnica de extração utilizada, uma vez que a maioria delas é baseada na modificação das propriedades físico-químicas do solvente a fim de reduzir a tensão superficial, aumentar a solubilidade do soluto e promover maiores taxas de difusão e,

algumas vezes, modificar a polaridade do solvente (TAKEUCHI *et al.*, 2009). Desta forma, a escolha do solvente adequado é crítica para o processo, visto que irá determinar a quantidade e o tipo de oligossacarídeos a serem extraídos (JOVANOVIĆ-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015).

A água é o melhor solvente para a extração de carboidratos de baixo peso molecular, tais como os oligossacarídeos, a partir de matrizes vegetais (JOHANSEN; GLITSØ; BACH KNUDSEN, 1996). Porém, a água também facilita a interferência de outras substâncias hidrossolúveis como alguns polissacarídeos e proteínas (LI *et al.*, 2013). Assim, para contornar esta limitação soluções hidroetanólicas têm sido frequentemente utilizadas pela maioria dos métodos convencionais de extração de oligossacarídeos (EKVALL; STEGMARK; NYMAN, 2007). Além disso, o etanol é um solvente versátil, de baixo custo, atóxico, de caráter polar (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010; CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012), preferido pelas indústrias de alimentos e recomendados pelo *US Food and Drug Administration* para propósitos de extração por ser categorizado como *GRAS (Generally Recognized as Safe)* (CHEN; ZHAO; YU, 2015). Adicionalmente, o etanol apresenta comprovado efeito inativador de enzimas hidrolíticas que podem atuar sobre os oligossacarídeos (CHIDOUH; AOUDADI; HEYRAUD, 2014), evitando assim a modificação da composição dos açúcares pela ação destas enzimas durante a extração (JOHANSEN; GLITSØ; BACH KNUDSEN, 1996).

O efeito da concentração de etanol (água, 20, 50 e 80 % de etanol v/v) na recuperação dos oligossacarídeos presentes na polpa de araticum foi investigado e é apresentado na Figura 2. A área total dos oligossacarídeos aumentou com a elevação da concentração de etanol até 50 % de etanol (v/v). Após este ponto, a área total de oligossacarídeos diminuiu drasticamente. Como pode ser observado na Figura 2, a eficiência dos solventes na extração de oligossacarídeos presentes na polpa de araticum apresentou a seguinte ordem: 50 % de etanol $\geq$ 20 % de etanol $\geq$ água > 80 % de etanol ($p \leq 0,05$). Desta forma, elevadas concentrações de etanol não asseguram uma boa recuperação dos oligossacarídeos. A significativa redução na recuperação de oligossacarídeos utilizando 80 % etanol (v/v) pode ser explicada pela desnaturação de certas proteínas que levam à

formação de precipitados os quais podem impedir estericamente a difusão dos oligossacarídeos para a solução alcoólica (EKVALL; STEGMARK; NYMAN, 2007). Resultados similares aos aqui reportados (máxima extração em média concentração de etanol) foram observados em outros estudos relacionados à extração de oligossacarídeos (EKVALL; STEGMARK; NYMAN, 2007; LI *et al.*, 2013; JOVANOVIĆ-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015).

Apesar de o ensaio com 50 % de etanol ter apresentado um conteúdo de oligossacarídeos significativamente maior que os demais (área total de $72,21 \pm 1,90$ nC*min) ($p \leq 0,05$), não diferindo apenas do ensaio conduzido com 20 % de etanol (área total de $70,69 \pm 0,61$ nC*min), a quantificação dos açúcares foi conduzida com os extratos obtidos pelos 4 ensaios contendo diferentes concentrações de etanol a fim de se avaliar a influência da concentração de etanol sobre a recuperação individual de cada açúcar.

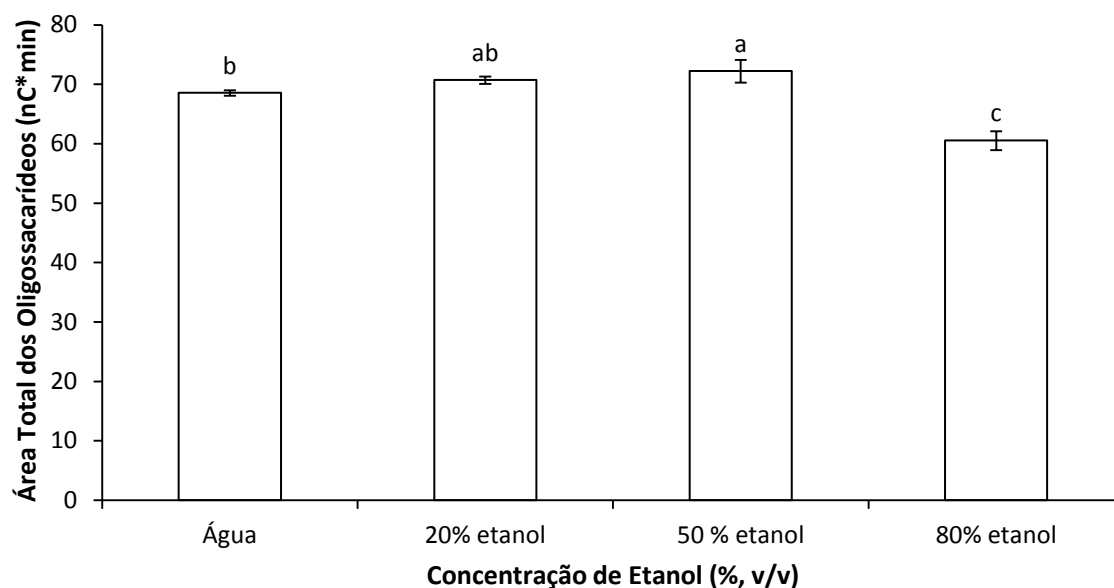


Figura 2 - Efeito da concentração de etanol na eficiência de recuperação de oligossacarídeos na polpa de araticum para o tempo de 15 minutos de extração. Valores marcados por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0.05$).

3.2. Quantificação de açúcares na polpa de araticum

O interesse na modulação da ingestão dietética de vários carboidratos de cadeia curta que escapam da digestão e/ou absorção no intestino delgado tem crescido nos últimos anos devido aos benefícios promovidos à saúde decorrente de seus efeitos osmóticos e prebióticos (BARRETT, 2013). Assim, numerosos estudos têm focado esforços na determinação destes compostos em matrizes alimentares a fim de determinar seu consumo diário e os efeitos fisiológicos associados. Além disso, estas informações podem ser utilizadas como um guia para pessoas que buscam aumentar a ingestão destes carboidratos prebióticos a partir de fontes naturais (MUIR *et al.*, 2008). É importante ressaltar que não existem dados na literatura acerca da quantificação de oligossacarídeos na polpa de araticum.

No entanto, a identificação e quantificação dos açúcares e oligossacarídeos em frutas e vegetais é uma área desafiadora, uma vez que estes alimentos possuem uma complexa mistura de carboidratos com grau de polimerização variando de 2 a 60 unidades (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2014).

A identificação e quantificação dos açúcares presentes na PAL foram realizadas por meio de CTAAE-DAP. O perfil de eluição e os açúcares identificados na PAL podem ser observados nos cromatogramas obtidos, conforme apresentado na Figura 3. O conteúdo dos açúcares investigados e identificados na PAL encontra-se sumarizado na Tabela 3. Dos 23 açúcares analisados via CTAAE-DAP, 10 foram identificados, sendo eles: os monossacarídeos glicose e frutose; os dissacarídeos sacarose e maltose; os *FOS* 1-cestose (GF_2) e 1F- β -frutofuranosilnistose (GF_4); o *MOS* maltotriose (G_3); e os *XOS* xilotriose (X_3), xilopentaose (X_5) e xilo-hexaose (X_6). No entanto, outros açúcares e oligossacarídeos podem estar presentes na polpa de araticum, uma vez que xilose e xilobiose apresentam tempos de retenção muito próximos à glicose/frutose e sacarose, respectivamente. Como glicose, frutose e sacarose são os açúcares majoritários em frutas, os picos dos mesmos apresentam base mais alargada podendo sobrepor os picos de outros compostos com tempo de retenção próximo a estes e, assim, dificultando a identificação. Além disso, apenas

aproximadamente 13 % da área total dos oligossacarídeos separados pelo método foi identificada devido a indisponibilidade de padrões analíticos, sendo assim, o conteúdo de oligossacarídeos na polpa de araticum pode ser significativamente maior do que o aqui encontrado.

Testes estatísticos foram conduzidos para avaliar a influência da concentração de etanol sobre a recuperação individual de cada açúcar, os resultados estão reportados na Tabela 3. A eficiência da recuperação de mono- (glicose e frutose) e dissacarídeos (sacarose e maltose) foi similar para os extratos obtidos com água, 20 e 50 % de etanol ($p > 0,05$). No entanto, os maiores conteúdos de sacarose foram obtidos nas maiores concentrações de etanol (50 e 80 % de etanol). Água, 20 e 50 % de etanol foram igualmente eficientes na extração do *FOS* 1F- β -frutofuranosilnístose (GF_4), do *MOS* maltotriose (G_3) e do *XOS* xilotriose (X_3) ($p > 0,05$); ao passo que, 20 e 50 % de etanol foram igualmente eficientes na extração do *FOS* 1-cestose (GF_2) e do *XOS* xilo-hexaose (X_6) ($p > 0,05$); enquanto 50 % de etanol foi o solvente com maior eficiência na recuperação dos *XOS* xilopentaose (X_5) ($p \leq 0,05$). Desta forma, pode-se notar que, de forma geral, 50 % de etanol foi o solvente mais eficiente na recuperação dos diversos açúcares analisados, enquanto a solução contendo 80 % de etanol foi a menos eficiente.

A frutose foi o açúcar predominante na PAL (116,087 - 132,908 mg.g⁻¹ PAL), seguida pela glicose (108,977 - 125,923 mg.g⁻¹ PAL), sacarose (85,565 - 96,766 mg.g⁻¹ PAL) e maltose (11,154 - 12,505 mg.g⁻¹ PAL). Dentre os oligossacarídeos identificados, verificou-se que o *FOS* 1-cestose (GF_2) apresentou os maiores conteúdos (2,667 - 3,004 mg.g⁻¹ PAL), enquanto que os menores conteúdos foram observados para o também *FOS* 1F- β -frutofuranosilnístose (GF_4) (0,130 - 0,245 mg.g⁻¹ PAL). O conteúdo de GF_2 aqui encontrado foi consideravelmente superior aos anteriormente obtidos em maçãs, pêras (L'HOMME *et al.*, 2001), bananas (DER AGOPIAN *et al.*, 2008), melões, uvas, ameixas e diversas *berries* (CAMPBELL *et al.*, 1997). Por outro lado, o conteúdo de G_3 foi similar ao reportado por Khalili, Abdullah & Manaf (2014) em pitaia branca e mamão papaia. Conteúdos similares de *FOS* total ($GF_2 + GF_3 + GF_4$) foram reportados em frutas altamente consumidas mundialmente tais como maçã, damasco, groselha, figo, uva, melão,

ameixa, morango e romã (JOVANOVIĆ-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2014).

Tabela 3 - Composição e conteúdo de açúcares e oligossacarídeos separados via CTAAE-DAP na polpa de araticum.

Açúcar (mg.g ⁻¹ PAL)	Água	20 % de etanol	50 % de etanol	80 % de etanol
Glicose	125,923±6,107a	123,061±4,180a	120,654±4,323ab	108,977±3,539b
Frutose	132,908±6,805a	129,783±4,659a	127,336±4,358ab	116,087±3,578b
Sacarose	85,565±4,090b	86,808±2,928b	96,766±2,932a	89,485±2,207ab
Maltose	12,390±0,624a	12,035±0,425ab	12,505±0,366a	11,154±0,254b
Mono- e Dissacarídeos Totais	356,786±17,324a	351,687±12,187a	357,261±11,970a	325,703±9,541a
1-Cestose (<i>GF</i> ₂)	2,817±0,022b	2,903±0,019ab	3,004±0,085a	2,667±0,064c
1F-β-frutofuranosilnistose (<i>GF</i> ₄)	0,230±0,011a	0,232±0,004a	0,245±0,017a	0,130±0,015b
Maltotriose (<i>G</i> ₃)	0,692±0,004a	0,694±0,012a	0,698±0,012a	0,613±0,011b
Xilotriose (<i>X</i> ₃)	0,487±0,014a	0,484±0,002a	0,492±0,005a	0,354±0,002b
Xilopentose (<i>X</i> ₅)	0,777±0,029b	0,783±0,011b	0,935±0,012a	0,813±0,028b
Xilo-hexaose (<i>X</i> ₆)	1,377±0,054b	1,410±0,026ab	1,467±0,008a	1,097±0,009c
Oligossacarídeos Totais	6,380±0,076b	6,507±0,027b	6,842±0,089a	5,673±0,062c

A absorção da frutose através do epitélio das vilosidades inclui seus próprios transportadores (difusão facilitada mediada pelo transportador GLUT5) e mecanismos pelos quais glicose e aminoácidos podem aumentar sua absorção (BARRETT, 2013). A presença de glicose luminal aumenta significativamente a absorção de frutose provavelmente mediada pelo transportador facultativo GLUT2 (JIANG *et al.*, 2001). Portanto, o grau de absorção da frutose depende tanto da quantidade ingerida quanto das substâncias co-ingéridas (MUIR *et al.*, 2008). Assim, é importante conhecer a quantidade de frutose presente em excesso em relação à glicose em um alimento pra prever o potencial de mal-absorção, uma vez que o excesso de frutose não absorvida é rapidamente fermentado pela microbiota colônica produzindo gases (H₂, CO₂ e CH₄) que podem desencadear uma série de sintomas (tais como distensão abdominal, desconforto ou dor abdominal e alteração no trânsito intestinal) associados à síndrome do intestino irritável e outras desordens intestinais (BIESIEKIERSKI *et al.*, 2011). Como pode ser observado na

Tabela 3 a relação glicose:frutose é de aproximadamente 1:1. De acordo com Muir *et al.* (2008), frutas e vegetais com a relação glicose:frutose de 1:1 ou maior são melhor toleradas devido à completa absorção da frutose. A similaridade entre as quantidades de glicose e frutose presentes na polpa de araticum pode ser explicada, em parte, pela ação da invertase sobre a sacarose (KHALILI; ABDULLAH; MANAF, 2014).

O conteúdo de oligossacarídeos totais ($GF_2 + GF_4 + G_3 + X_3 + X_5 + X_6$) obtido foi de $6,842 \pm 0,089 \text{ mg.g}^{-1}$ PAL. Como pode ser observado na Figura 3, outros oligossacarídeos podem estar presentes na polpa de araticum (picos marcados com *), visto que apenas aproximadamente 13 % da área total foi identificada e quantificada. Assim, o conteúdo de oligossacarídeos na polpa de araticum pode ser consideravelmente maior. Desta forma, o araticum pode contribuir com a ingestão dietética de oligossacarídeos prebióticos e, assim, proporcionar diversos benefícios à saúde do consumidor a eles associados, tais como estímulo do crescimento de bactérias benéficas no cólon, redução da microbiota patogênica, melhora na resposta do sistema imune, aumento da absorção de minerais, baixo valor calórico, não-cariogenicidade, entre outros (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). Apesar disso, apenas a população local consome esta fruta *in natura* ou na forma de sucos, sorvetes, geleias e compotas (SILVA *et al.*, 2014). A fim de superar esta limitação, alguns estudos já têm sido realizados com o objetivo de utilizar este fruto no desenvolvimento de produtos, sendo que formulações de pães (VILLELA; BATISTA; DESSIMONI-PINTO, 2013), barras para lanche (SILVA *et al.*, 2014), sorvete (MORZELLE *et al.*, 2012), iogurte (OLIVEIRA *et al.*, 2008; LUCIA *et al.*, 2012) e néctar (MORZELLE *et al.*, 2011) apresentaram elevada aceitabilidade em testes sensoriais, o que demonstra o potencial deste fruto para ingressar na indústria de alimentos.

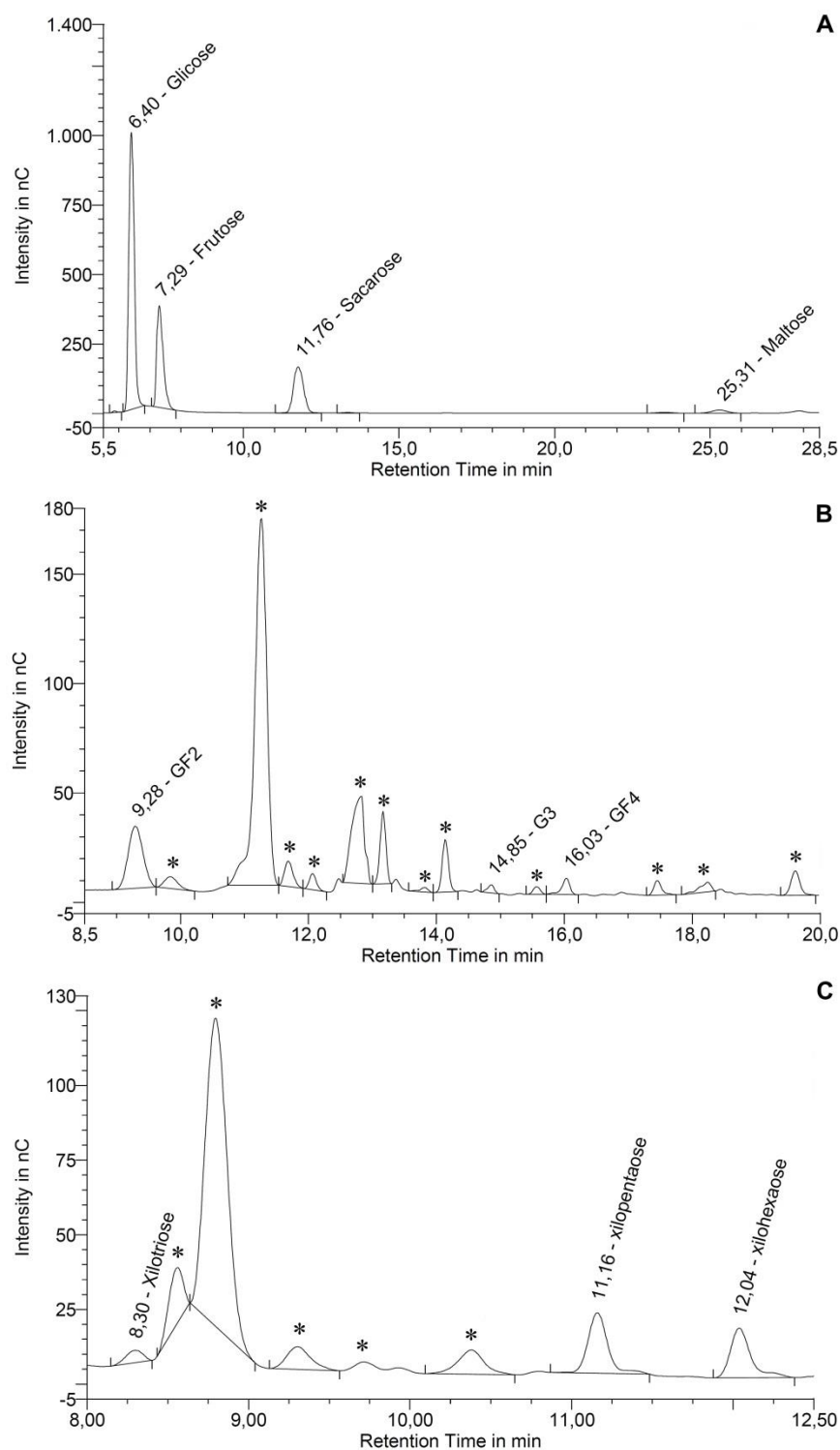


Figura 3 - Perfil CTAAE-DAP dos mono- e dissacarídeos (A), FOS e MOS (B) e XOS (C) extraídos da polpa de araticum nas melhores condições de extração (Etanol 50 % v/v, 50 °C e 15 minutos de extração). (*) Picos de possíveis oligossacarídeos não identificados pelo método.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu informações sobre o conteúdo de mono-, di- e oligossacarídeos na polpa de araticum, expandindo consideravelmente a compreensão da composição deste fruto. Este é o primeiro relato sobre a análise qualitativa e quantitativa de oligossacarídeos na polpa de araticum. O método CTAAE-DAP desenvolvido foi preciso e específico, podendo também ser utilizado para a análise de mono-, di- e oligossacarídeos em outras matrizes vegetais. A recuperação de oligossacarídeos a partir da polpa de araticum foi dependente do sistema solvente utilizado, sendo o etanol 50 % (v/v) o sistema mais eficiente. Os resultados revelaram que este fruto pode contribuir com a ingestão dietética oligossacarídeos prebióticos e, portanto, pode ser explorado como uma potencial fonte de oligossacarídeos por pessoas que buscam aumentar sua ingestão a partir de fontes naturais a fim de prevenir doenças crônicas. Estudos futuros são necessários para identificar e quantificar outros oligossacarídeos que não puderam ser identificados pelo método aqui utilizado e avaliar o potencial prebiótico deste promissor fruto do Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, H. S. *et al.* Ação extencionista para fortalecer a importância alimentar e ambiental dos frutos do Cerrado em Rio Paranaíba (MG). **Revista Conexão UEPG**, v. 10, n. 2, p. 264–277, 2014.

BARRETT, J. S. Extending our knowledge of fermentable, short-chain carbohydrates for managing gastrointestinal symptoms. **Nutrition in clinical practice**, v. 28, n. 3, p. 300–306, 2013.

BIESIEKIERSKI, J. R. *et al.* Quantification of fructans, galacto-oligosaccharides and other short-chain carbohydrates in processed grains and cereals. **Journal of human nutrition and dietetics**, v. 24, n. 2, p. 154–176, 2011.

CAMPBELL, J. M. *et al.* Selected fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1F- β -Fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3076–3082, 1997.

CARDOSO, L. DE M. *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, v. 68, n. 2, p. 121–134, 2013.

CAVALCANTE, T. R. M. *et al.* Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 235–240, 2008.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627 2012.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from *sugar beet molasses*. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.

CHIDOUH, A.; AOUDI, S.; HEYRAUD, A. Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 733–739, 2014.

CORRADINI, C.; LANTANO, C.; CAVAZZA, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 13, p. 4591–4605, 2013.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 11, p. 353–361, 1996.

DER AGOPIAN, R. G. *et al.* Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3305–3310, 2008.

DI BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J. B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? **Phytotherapy research**, v. 27, n. 10, p. 1457–1473, 2013.

DWIVEDI, S. *et al.* Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 238–245, 2014.

EKVALL, J.; STEGMARK, R.; NYMAN, M. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 1, p. 13–18, 2007.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: a review of the literature. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 248–266, 2011.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 8, p. 1148–1155, 2010.

GANAIIE, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12–17, 2013.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 116–122, 2012.

GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 1–15, 2012.

GULLÓN, B. *et al.* Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 2, p. 153–161, 2013.

JIANG, L. *et al.* GLUT-5 expression in neonatal rats: crypt-villus location and age-dependent regulation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver**, v. 281, n. 3, p. 666–674, 2001.

JOHANSEN, H. N.; GLITSØ, V.; BACH KNUDSEN, K. E. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant

materials by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1470–1474, 1996.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; KUZMANOVA, S.; WINKELHAUSEN, E. Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 5, p. 949–965, 2014.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; KUZMANOVA, S.; WINKELHAUSEN, E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 446–453, 2015.

KHALILI, R. M. A.; ABDULLAH, A. B. C.; MANAF, A. A. Isolation and characterization of oligosaccharides composition in organically grown red pitaya, white pitaya and papaya. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 131–136, 2014.

L'HOMME, C. *et al.* Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 920, n. 1-2, p. 291–297, 2001.

LI, J. *et al.* Determination of fructooligosaccharides in burdock using HPLC and microwave-assisted extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5888–5892, 2013.

LUCIA, F. D. *et al.* Acceptability of yoghurt with Marolo pulp (*Annona crassiflora* Mart.) in the traditional and diet/light formulations. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 85–92, 2012.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 237–248, 2012.

MORZELLE, M. C. *et al.* Desenvolvimento e avaliação sensorial de néctar de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e araticum (*Annona crassiflora*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 131–135, 2011.

MORZELLE, M. C. *et al.* Nutritional and sensory characteristics of ice cream from savana fruits. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 387, p. 70–78, 2012.

MUIR, J. G. *et al.* Measurement of short-chain carbohydrates in common australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 554–565, 2009.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.

OLIVEIRA, K. A. M. *et al.* Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 277–281, 2008.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannoooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 285–292, 2012.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435–441, 2009.

SILVA, E. P. DA *et al.* Developing fruit-based nutritious snack bars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 52–56, 2014.

TAKEUCHI, T. M. *et al.* Low-Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). . **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2009. p. 137–218.

VILLELA, P.; BATISTA, Â. G.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Nutritional composition of *Annona crassiflora* pulp and acceptability of bakery products prepared with its flour. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 417–423, 2013.

WONG, Y. S. *et al.* Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 257–265, 2014.

YILMAZ, F. M.; KARAASLAN, M.; VARDIN, H. Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é um fruto nativo do bioma Cerrado que tem atraído crescente interesse mundial devido à presença de importantes nutrientes como as proteínas, carboidratos, sais minerais, carotenoides, vitaminas (principalmente C e do complexo B) e vários compostos bioativos com destaque para os antioxidantes e prebióticos. Tradicionalmente, esta frutífera tem sido utilizada pela medicina popular na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças. Porém, existe escassa informação na literatura acerca da identificação e quantificação de seus compostos bioativos, bem como de suas propriedades funcionais.

Diversos fatores podem afetar a eficiência de extração de compostos bioativos em matrizes vegetais tais como método de extração, tamanho de partícula, tempo de contato, temperatura de extração, composição e polaridade do solvente, pH, relação solvente-sólido e número de re-extrações. As variáveis temperatura de extração e concentração de etanol exerceram significativa influência sobre a recuperação de compostos fenólicos a partir da polpa de araticum e as condições de equilíbrio do processo foram atingidas entre 75 e 90 minutos. As condições ótimas obtidas pelo modelo matemático gerado a partir da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para a extração dos compostos fenólicos presentes na polpa de araticum foram: temperatura de extração de 75 °C, concentração de etanol de 46 % (v/v) e 90 minutos. O CFT obtido no sistema de extração sob estas condições foi de 4,67 g GAE.100 g⁻¹ PAL.

O método de extração influenciou significativamente o conteúdo de compostos antioxidantes extraídos (compostos fenólicos e flavonoides) a partir da polpa de araticum e, conseqüentemente, a atividade antioxidante (DPPH, TEAC_{ABTS} e ORAC_{FL}) dos extratos obtidos. O método de extração sólido-líquido nas condições otimizadas citadas anteriormente foi mais eficiente na extração de compostos antioxidantes quando comparado

à extração assistida por ultrassom, demonstrando a importância da escolha e do estudo da técnica de extração na caracterização e quantificação destes compostos em distintas matrizes. Verificou-se ainda que quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos, maior a atividade antioxidante dos mesmos, mensurada pelos diferentes ensaios (DPPH, TEAC_{ABTS} e ORAC_{FL}).

A recuperação de oligossacarídeos a partir da polpa de araticum foi dependente do sistema solvente utilizado, sendo o sistema contendo 50 % de etanol (v/v) o mais eficiente para este propósito. O método CTAAE-DAP desenvolvido foi preciso e específico, podendo também ser utilizado para a análise de mono-, di- e oligossacarídeos em outras matrizes vegetais. O conteúdo de oligossacarídeos totais ($GF_2 + GF_4 + G_3 + X_3 + X_5 + X_6$) obtido foi de 6,842 mg.g⁻¹ PAL.

O araticum pode contribuir com a ingestão dietética de compostos antioxidantes e oligossacarídeos prebióticos e, portanto, pode ser utilizado como uma potencial fonte destes compostos bioativos por pessoas que buscam aumentar sua ingestão a partir de fontes naturais a fim de melhorar seu bem-estar físico e mental e prevenir doenças crônicas e neurodegenerativas. Além disso, pode ser explorado pelas indústrias de alimentos como um potencial ingrediente na formulação de alimentos funcionais.

Este foi o primeiro estudo realizado reportando a análise quantitativa de mono-, di- e oligossacarídeos (*FOS*, *MOS*, *GOS* e *XOS*) na polpa de araticum e a otimização das condições de extração de compostos fenólicos na polpa de araticum.

Futuros estudos devem ser conduzidos com este promissor fruto do Cerrado a fim de identificar e quantificar seus compostos bioativos, verificar seus efeitos funcionais na saúde do ser humano, bem como sua aplicação tecnológica na formulação de alimentos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar o manuseio pós-colheita do fruto a fim de evitar perdas nutricionais, sensoriais e de compostos funcionais.
- Analisar a atividade de enzimas presentes na polpa do fruto, por exemplo, polifenoloxidasas e peroxidases, para verificar a estabilidade do processo de extração em relação à atividade dessas enzimas sobre os compostos de interesse.
- Utilizar a polpa de araticum e/ou seu extrato no desenvolvimento de produtos alimentícios, farmacêuticos ou cosméticos.
- Avaliar os efeitos do consumo da polpa de araticum na prevenção e/ou tratamento de doenças.
- Otimizar a obtenção de compostos bioativos a partir de outras partes do fruto, como casca e semente, que são usualmente descartadas.
- Identificar os principais compostos fenólicos presentes na polpa de araticum e seus mecanismos de ação na prevenção e/ou tratamento de doenças.
- Desenvolver um método cromatográfico capaz de separar e quantificar, em uma única corrida cromatográfica, todos os oligossacarídeos estudados.
- Identificar os picos de possíveis oligossacarídeos presentes na polpa de araticum que não puderam ser identificados por meio do método CTAAE-DAP, utilizando metodologias mais sofisticadas como espectrometria de massas.
- Avaliar a atividade prebiótica da polpa de araticum por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*.