



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

TAILEAH LEITE NOGUEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE UMA MISTURA DE SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DOS FRUTOS DE  
*Muntingia calabura L.***

CAMPINAS

2019

**TAILEAH LEITE NOGUEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DE UMA MISTURA DE SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DOS FRUTOS DE  
*Muntingia calabura L.***

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

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Taileah Leite Nogueira, e orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore.

CAMPINAS

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, 001

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8315-3333>

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

L536o Leite Nogueira, Taileah, 1988-  
Otimização de uma mistura de solventes para extração de compostos fenólicos antioxidantes a partir dos frutos de *Muntingia calabura* L. / Taileah Leite Nogueira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Atividade antioxidante. 2. Compostos fenólicos. 3. Planejamento de misturas. 4. Superfície de resposta (Estatística). 5. *Muntingia calabura*. I. Pastore, Glaucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Optimization of solvent mixtures for extraction of phenolic antioxidant compounds from *Muntingia calabura* L. fruits **Palavras-chave em**

**inglês:**

Antioxidant activity

Phenolic compounds

Mixture planning

Response surface (Statistics)

*Muntingia calabura*

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Títuloção:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Glaucia Maria Pastore [Orientador]

Vera Sônia Nunes da Silva

Lilian Regina Barros Mariutti

**Data de defesa:** 28-01-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glaucia Maria Pastore  
Orientadora  
DCA/FEA/UNICAMP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Sônia Nunes da Silva  
Membro Titular  
CCQA/ITAL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Regina Barros Mariutti  
Membro Titular  
DEPAN/FEA/UNICAMP

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

*Dedico este trabalho à Deus, à  
minha família e a todos que  
venham a ler esta tese: que ela  
possa trazer algum auxílio e  
benefício em prol da humanidade.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à Deus, pela graça da vida e por estar sempre comigo, me iluminando e guiando meus passos.

Aos meus pais Marilac Luzia de S. L. S. Nogueira e Jerson Ap. Sousa Nogueira por sempre terem valorizado a educação e me ensinado que estudar pode ser maravilhoso. Por todo o apoio financeiro e psicológico que me proporcionaram e me proporcionam até hoje para que eu possa continuar aprendendo e adquirindo conhecimentos. Pelo carinho, atenção e compreensão. Vocês são meu maior exemplo e meu orgulho, juntamente com minha irmã Lilian Leite Nogueira.

À minha querida irmã, Lilian, por sempre ter sido generosa e bondosa comigo, não poderia ter irmã melhor. Por sempre ter cuidado de mim desde que nasci, por muitas vezes ser uma segunda mãe, por todo apoio, por me ouvir nos momentos de desespero, pelos cafés que tomamos juntas conversando. Você é um exemplo de perseverança e bondade, sou orgulhosa da médica que se tornou.

Ao meu cunhado Fábio Pagotto Piovesani, por ser como um irmão para mim. Por ter me ouvido por diversas vezes, pelas brincadeiras e bom-humor, por cuidar bem da minha irmã. Por ser alguém em que posso confiar e por já ter me socorrido quando precisei. Sem dúvidas não poderia desejar outro cunhado. Na casa de vocês me sinto em casa.

À minhas cachorras atuais Carlota Joaquina e Lua, e minhas estrelinhas: Wendy, Dolly e Adelaide Cristina, e ao meu coelho Kiushi. Todos esses bichinhos me ensinaram sobre amor e fidelidade, e acredito que todo profissional deveria portar essas qualidades. Também pelos momentos de tristeza em que eles me acolheram com seus pelos macios deitados ao meu lado.

À minhas primas-irmãs Patrícia Nogueira Sanches e Juliana Nogueira Sanches pelo companheirismo de sempre e pelos momentos de descontração. Especialmente à Juju que nos deixou tão cedo, desejo que encontre seu caminho, estará sempre em meu coração.

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Pastore, por ter me acolhido em um momento difícil, por ser sempre tão compreensiva, por apoiar seus alunos, pelo ambiente trabalho agradável que criou, pela orientação e humildade com todo o conhecimento que tem.

Aos membros da banca: pelas orientações, sugestões e discussões produtivas ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sou grata por me fazerem refletir e pelos ensinamentos que me trouxeram, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos pela amizade, pelo clima agradável, ensinamentos e acolhimento. Posso dizer que somos verdadeiramente uma equipe, fico feliz em ver que podemos trabalhar harmoniosamente em conjunto.

Meu agradecimento especial aos colegas de laboratório: Alexandra, pelas conversas e bolachas; Nayara, por sempre se mostrar solícita em ajudar; Lívia, pelas conversas e me ouvir nos momentos de ansiedade e Ana Paula, pelas conversas e auxílio.

À Angélica (Angel) por estar sempre disposta à nos auxiliar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Henrique Silvana Arruda, por toda a ajuda que me ofereceu, pela paciência e tranquilidade que transmite.

Ao querido amigo Gustavo Araújo Pereira: não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos, conselhos, paciência e compreensão que teve comigo. Não tenho dúvidas de que será um excelente professor e pesquisador, lhe desejo todo o sucesso do mundo.

Agradeço também aos meus professores de graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da FZEA-USP, pois também devo a eles todo aprendizado e capacitação que me fizeram chegar à uma pós-graduação. Grata pelos ensinamentos.

A todos meus orientadores de Iniciação Científica ao longo de minha vida acadêmica: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Martins, Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva e à Dr<sup>a</sup>. Michele Nehemy Berteli.

À minha orientadora de estágio supervisionado Dr<sup>a</sup>. Marie-Hélène Morel pelos ensinamentos e por acreditar em minha capacidade e ao amigo que me supervisionou nessa época: Dr. Frédéric Baudoin. Fréd, jamais esquecerei nossos momentos juntos: os cafés, as risadas, toda a sua disponibilidade em me ajudar, toda troca e aprendizado. Suas lições foram além da pesquisa, foram para a vida.

A todos meus amigos que encontrei em minha jornada, por me distraírem quando precisei, pelos momentos juntos, por compreenderem das vezes que não

pude comparecer para trabalhar na tese. Por serem verdadeiramente AMIGOS. Vocês moram em meu coração.

À Universidade Estadual de Campinas e à Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, pela oportunidade e por todo o auxílio que me ofereceram.

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

*“Foi o tempo que dedicaste à tua  
rosa que a fez tão importante...”*

**Antoine de Saint-Exupéry**

## RESUMO

---

O presente trabalho teve por objetivo estudar a otimização de uma mistura de solventes (metanol, etanol e água) para a extração de compostos fenólicos antioxidantes a partir dos frutos de *Muntingia calabura L.* Uma acidificação prévia dos extratos com 0,2% de HCl foi realizada, não apresentando eficiência significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de Student. Uma análise de superfície de respostas realizada a partir dos resultados obtidos do planejamento experimental de um design de misturas simplex com pontos centróides mostrou que uma mistura de 50% de acetona e 50% de água foi a mais eficiente para a análise de Folin Ciocalteu, DPPH e taninos condensados (valores de 3.958,23 mg EAG/100g bs, 581,50  $\mu\text{mol TE/g bs}$  e 11,05 mg EC/g bs, respectivamente). Para o método de ABTS, a água foi o melhor solvente (3.331,91  $\mu\text{mol TE/g bs}$ ). Os resultados obtidos para a determinação de compostos fenólicos por CLUE-EM identificou cianidina-3-O-glicosídeo, delfinifina-3-O-glicosídeo, galocatequina, epigalocatequina, ácido elágico e ácido gálico nos extratos e sua análise de superfície de respostas mostrou que uma mistura contendo 50% de metanol e 50% de água foi mais efetiva para os compostos majoritários cianidina e galocatequina (extração de 2.065,5  $\mu\text{g/g bs}$  e 164,66  $\mu\text{g/g bs}$ , respectivamente) enquanto 100% de água foi mais eficiente na extração dos ácidos gálico e elágico (extração de 1.960,76 bs  $\mu\text{g/g}$  e 592,49  $\mu\text{g/g bs}$ , respectivamente). Para uma análise global de todos os compostos identificados a água também obteve os melhores resultados (3.434,98  $\mu\text{g/g bs}$ ). Assim, a otimização da mistura de solventes é específica para o composto fenólico alvo e análise a ser realizada. No entanto, de um modo geral, a água foi o solvente mais eficaz para a extração dos compostos fenólicos antioxidantes do fruto, trazendo um resultado promissor, pois é um solvente verde e de baixo custo quando comparado com os solventes orgânicos frequentemente usados nesse processo.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante, compostos fenólicos, planejamento de misturas, superfícies de respostas, frutos de *Muntingia calabura L.*

## ABSTRACT

---

The aim of this study was to investigate the optimization of solvent mixtures (methanol, ethanol and water) for extraction of phenolic antioxidant compounds from *Muntingia calabura L.* fruits. A previous acidification of the extracts (0.2% HCl) was performed, not showing significant efficiency ( $p < 0.05$ ) by Student's t test. The analysis of response surfaces by simplex centroid design showed that a mixture of 50% acetone and 50% water was the most efficient for Folin Ciocalteu, DPPH and condensed tannins analysis (3.958,23 mg GAE/100g dw, 581,50  $\mu\text{mol TE/g dw}$  and 11,05 mg CE/g dw, respectively). For the ABTS method, water showed the best result (3.331,91  $\mu\text{mol TE/g dw}$ ). The UHPLC-MS method identified cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, gallic acid, epigallocatechin, ellagic acid and gallic acid in *Muntingia calabura L.* fruit extracts and their response surfaces analysis showed that a mixture of 50% methanol and 50% water was the most efficient for the major compounds cyanidin and gallic acid (2.065,5  $\mu\text{g/g dw}$  and 164,66  $\mu\text{g/g dw}$  extraction, respectively) while for ellagic acid and gallic acid 100% water as solvent was more efficient (1.960,76  $\mu\text{g/g dw}$  and 592,49  $\mu\text{g/g dw}$  extraction, respectively). For an overall analysis of all the compounds identified by UHPLC-MS the 100% water as solvent also showed the best results (3.434,98  $\mu\text{g/g dw}$ ). Therefore the optimization of solvent mixtures is specific for each target phenolic compound and analysis to be performed. However, in general, water was the most effective solvent for the extraction of phenolic antioxidant compounds from the fruit. This is a promising result because water is a green solvent, and cheaper than organic solvents commonly used in extraction process.

**Keywords:** antioxidant activity, phenolic compounds, mixture planning, response surfaces, *Muntingia calabura L.* fruits.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

<b>Figura 1.</b> Previsão de crescimento (em milhões de dólares), por continente, no mercado de alimentos funcionais.....	22
<b>Figura 2.</b> A) Árvore de <i>Muntingia calabura</i> L., B) Flores, folhas e fruto ainda não maduro, C) Frutos maduros, D) Flores, E) Alterações na cor da fruta durante o processo de maturação.....	25
<b>Figura 3.</b> Principais classes de compostos fenólicos conforme sua cadeia de carbono .....	28
<b>Figura 4.</b> Estrutura das principais classes de flavonoides .....	30
<b>Figura 5.</b> Cátion flavilium com grupos hidroxilas e suas possíveis substituições .....	32
<b>Figura 6.</b> Estrutura geral e principais ácidos fenólicos benzoicos .....	33
<b>Figura 7.</b> Estrutura geral e principais ácidos fenólicos cinâmicos.....	34
<b>Figura 8.</b> Comportamento das antocianinas em diferentes valores de pH .....	45
<b>Figura 9.</b> Mudança de coloração da amostra com a adição de 0,2 % de HCl concentrado .....	47
<b>Figura 10.</b> Superfície de resposta para a análise da capacidade redutora (Folin Ciocalteu) de compostos fenólicos contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água .....	53
<b>Figura 11.</b> Superfície de resposta para a análise da capacidade antioxidante (DPPH) de compostos fenólicos contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.....	54
<b>Figura 12.</b> Superfície de resposta para a análise da capacidade antioxidante (ABTS) de compostos fenólicos contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.....	55
<b>Figura 13.</b> Coloração amarela levemente esverdeada da amostra não-acidificada (FS) e acidificada (FA) na presença de meio reacional contendo hidróxido de sódio .....	56
<b>Figura 14.</b> Superfície de resposta para a análise de taninos condensados contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água .....	58

<b>Figura 15.</b> Superfície de resposta para a análise de compostos fenólicos por CLUE-EM contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.....	60
<b>Figura 16.</b> Superfície de resposta para a análise de compostos fenólicos totais por CLUE-EM contidos nos frutos de <i>Muntingia calabura</i> a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.....	63

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Proporções de solventes utilizados em cada experimento. Em que $X_1$ = metanol, $X_2$ = acetona e $X_3$ = água deionizada .....	41
<b>Tabela 2.</b> Comparativo da capacidade redutora, antioxidante, flavonoides totais e taninos condensados entre as amostras acidificada (FA) e não-acidificada (FS) dos extratos de frutos de <i>Muntingia calabura</i> .....	48
<b>Tabela 3.</b> Comparativo de compostos fenólicos principais e totais identificados pelo método de CLUE entre as amostras acidificada (FA) e não-acidificada (FS) dos extratos de frutos de <i>Muntingia calabura</i> .....	48
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística dos modelos .....	52
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística dos modelos .....	57
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística do modelo.....	59
<b>Tabela 7.</b> Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística do modelo.....	62
<b>Tabela 8.</b> Representação de todos os resultados obtidos das análises de superfícies de respostas para a otimização de solventes.....	64

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

---

**AAPH** = [2,2-Azobis-(2-methylamidinopropane)-dihydrochloride]

**Abs** = absorbância

**ABTS** = 2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)-diammonium salt]

**ANOVA** = análise de variância

**AUC** = curva de decaimento da fluorescência com o decorrer do tempo

**bs** = base seca

**CLUE-EM** = cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à um espectrômetro de massa

**DPPH** = 2,2-Diphenil-1-picrylhydrazyl

**EAG** = equivalente de ácido gálico

**EC** = equivalente de catequina

**ET** = equivalente de Trolox

**NAUC** = curva de decaimento da fluorescência da área útil

**ORAC** = capacidade de absorção do radical oxigênio

**p** = significância estatística

**R<sup>2</sup>** = coeficiente de correlação múltipla

**TEAC** = capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	20
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1. Alimentos funcionais e visão global .....	21
3.2. <i>Muntingia calabura L</i> .....	23
3.3. Compostos fenólicos.....	26
3.3.1. Aspectos gerais .....	26
3.3.2. Classificação.....	26
3.3.3. Principais classes .....	29
3.3.3.1. Flavonóides.....	29
3.3.3.1.1. Antocianinas .....	31
3.3.3.1.2. Ácidos fenólicos .....	32
3.3.3.1.3. Taninos .....	34
3.3.4. Extração.....	35
3.3.5. Benefícios .....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras.....	39
4.2. Extração.....	39
4.2.1. Avaliação da acidificação do solvente extrator .....	39
4.2.2. Planejamento de misturas.....	40
4.3. Determinação da capacidade redutora pelo método de Folin Ciocalteau.....	41
4.4. Atividade antioxidante.....	42
4.4.1. Método DPPH .....	42
4.4.2. Método TEAC .....	42
4.5. Determinação de flavonoides totais .....	43
4.6. Determinação de taninos condensados.....	43
4.7. Determinação da composição de compostos fenólicos por CLUE-EM .....	44
4.8. Análise estatística .....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
5.1. Acidificação.....	45

5.2. Análise das superfícies de resposta para a capacidade redutora (Folin Ciocalteu) e capacidades antioxidante (DPPH e ABTS).....	51
5.3. Análise das superfícies de resposta para flavonoides totais.....	56
5.4. Análise das superfícies de resposta para taninos condensados.....	57
5.5. Análise das superfícies de resposta do perfil de compostos fenólicos da amostra.....	58
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

A demanda por alimentos que tragam benefícios à saúde e atuem na prevenção de doenças é cada vez mais expressiva no mercado global (VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO, 2017). Segundo a Food Ingredients – South America, pesquisas realizadas pela *Euromonitor International* (líder mundial em pesquisa de estratégia para mercados consumidores) revelaram que o setor de alimentos orgânicos e funcionais cresceu em 98 % no Brasil em 2014, estimando-se um crescimento de 14,8 % no setor de alimentos que tragam algum ingrediente benéfico à saúde até o final de 2018.

Desse modo, o estudo de frutas e vegetais com potencial atividade funcional é de interesse tanto para a indústria quanto para a área acadêmica. A *Muntingia calabura* é uma fruta facilmente cultivada, que fornece frutos durante o ano inteiro (RAHMAN; SOLAIMAN; RAHMAN, 2010) e atrativa devido à sua coloração rosa avermelhada e sabor adocicado (PEREIRA et al., 2016), sendo rica em compostos fenólicos solúveis, sobretudo em ácidos fenólicos e flavonoides (LIN et al., 2017; ROTTA et al., 2017).

Estudos estão sendo efetuados comprovando e revelando a potencial atividade bioativa e farmacológica da *Muntingia* devido à presença de quantidades significativas de compostos fenólicos em sua composição, entretanto, principalmente em relação ao estudo dos frutos, os trabalhos são raros, concentrando-se em sua maior parte nas folhas (PEREIRA et al., 2016).

Os compostos fenólicos merecem atenção em específico devido aos benefícios que podem trazer à saúde, principalmente em relação as suas propriedades antioxidantes, além da sua atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e anti-histamínica (KAPRAVELOU et al., 2015; XU et al., 2016; ZHANG; TSAO, 2016; IRONDI et al., 2017; FALCÓ et al., 2018). Para a indústria alimentícia o estudo de extratos vegetais, cereais, frutas e ervas ricos em compostos fenólicos é importante por sua capacidade em retardar a degradação oxidativa de lipídeos, melhorando a qualidade e valor nutricional de alimentos industrializados (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

No entanto, a extração de compostos fenólicos provenientes de matrizes vegetais é única para cada espécie, não havendo uma padronização, pois é influenciada pela natureza química do composto alvo, tamanho das partículas e o

próprio método utilizado. A solubilidade dos fenóis depende da sua polaridade e é consequente da interação com os solventes. Além de uma possível ocorrência de ligação com outros compostos presentes na matriz do alimento (proteínas, carboidratos, entre outros) e da influência do seu grau de polimerização. Portanto, não existe um único solvente eficiente para todos os compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2006) e a otimização da extração de compostos fenólicos visando sua quantificação é um importante objeto de pesquisa (CARCIOCHI; MANRIQUE; DIMITROV, 2015; ALTEMIMI et al., 2017).

Finalmente, o estudo de um planejamento de misturas de solventes visando a otimização da extração de compostos fenólicos antioxidantes dos frutos de *Muntingia calabura L.* e obtenção da composição do perfil de compostos fenólicos do fruto fornecerá dados úteis para a definição de um protocolo de extração de seus compostos fenólicos. Almejando desse modo, futuramente quantificar seus componentes e seu possível emprego em alimentos, cosméticos e medicamentos, tratando-se, portanto, o presente trabalho relevante para o meio acadêmico, industrial e para os próprios consumidores.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral:

- Estudar a otimização de uma mistura de solventes para a extração de compostos fenólicos antioxidantes dos frutos de *Muntingia calabura L.*

### 2.2. Objetivos Específicos:

- Verificar o efeito da acidificação dos solventes na extração dos compostos fenólicos antioxidantes do fruto de *Muntingia calabura L.*
- Determinar a capacidade redutora da amostra pelo método de Folin Ciocalteau
- Determinar a capacidade antioxidante da amostra pelos métodos de DPPH e ABTS
- Quantificar os teores de flavonoides totais e taninos condensados no fruto de *Muntingia calabura L.*
- Obter o perfil de compostos fenólicos da amostra por CLUE-EM

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1. Alimentos funcionais e visão global

A função dos alimentos é fornecer os nutrientes e energia necessários para o adequado funcionamento do organismo, ou seja, são indispensáveis para o seu crescimento, manutenção e sobrevivência (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005). No entanto, nota-se uma crescente demanda por alimentos que além de exercerem o seu papel fundamental, também auxiliem na prevenção de doenças ou até mesmo no tratamento dessas (MENRAD, 2003; Agriculture and Agri-Food Canada, 2009; STRATTON et al., 2015; VICENTINI; LIBERATORE; MASTROCOLA, 2016).

Este novo conceito sobre os alimentos, que visa o fornecimento de nutrientes, energia e benefícios à saúde, teve início no Japão na década de 80 devido ao aumento da expectativa de vida da população, assim o governo japonês buscou desenvolver alimentos saudáveis que auxiliassem na manutenção da qualidade de vida dos idosos (KWAK; JUKES, 2001; ANJO, 2004; STANTON et al., 2005). Estes alimentos foram regulamentados em 1991 e denominados de “*FOODS FOR SPECIFIED HEALTH USE*” (FOSHU).

No entanto, ainda hoje não existe uma definição universal para o termo alimento funcional (SIRÓ et al., 2008; MARTIROSYAN; SINGH, 2015), variando conforme o país. No Japão, são denominados alimentos funcionais ou FOSHU aqueles que trazem benefícios à saúde devido a sua composição química, não oferecendo nenhum risco à saúde do consumidor (MORAES; COLLA, 2006).

No Reino Unido, segundo o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF) “alimentos funcionais são aqueles cujo componente incorporado oferece benefício fisiológico e não apenas nutricional” (MORAES; COLLA, 2006). Enquanto na Europa alimentos funcionais são:

“Alimentos que tenham satisfatoriamente afetado uma ou mais funções no corpo, além de possuírem efeitos nutricionais adequados de modo que seja relevante tanto para melhorar o estado de saúde quando para reduzir o risco de doenças” (VERSCHUREN, 2002).”

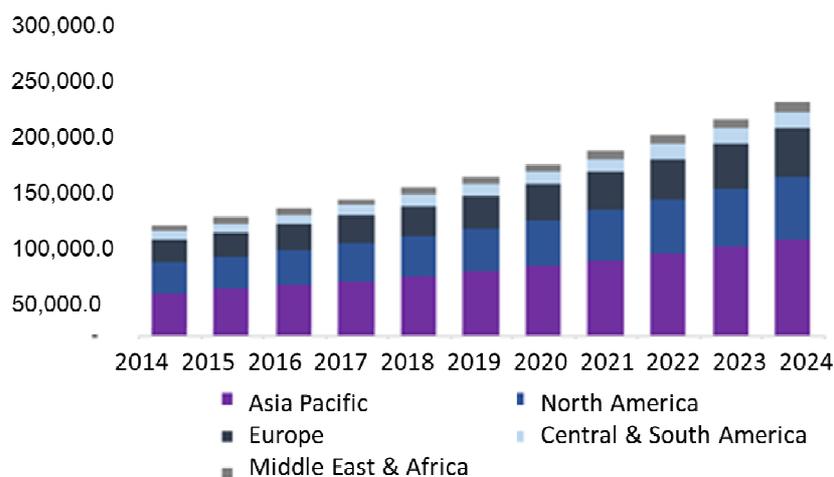
No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define alimentos funcionais como

“Aquele alimento ou ingrediente que além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte de uma dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (RDC 18/99).”

Independente da classificação e de conter componentes que afetam a atividade metabólica ou fisiológica (sejam eles acrescentados de substâncias provenientes de outros alimentos ou não) o mercado global atual em busca de produtos que tragam algum benefício à saúde através da alimentação é expressivo (VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO, 2017).

Segundo a Food Ingredients – South America, pesquisas realizadas pela Euromonitor International (líder mundial em pesquisa de estratégia para mercados consumidores) revelaram que o setor de alimentos orgânicos e funcionais cresceu em 98 % no Brasil em 2014, ao passo que o setor de alimentos e bebidas tradicionais tiveram um crescimento de 68%. Para aqueles alimentos que trazem ativos com algum benefício à saúde, espera-se um crescimento de 14,8% até o final de 2018.

A **Figura 1** demonstra a previsão de crescimento (em milhões de dólares) no mercado de alimentos funcionais para os diversos continentes, através de estimativa realizada pela Market Research Report.



**Figura 1.** Previsão de crescimento (em milhões de dólares), por continente, no mercado de alimentos funcionais (Market Research Report, 2016).

O aumento na demanda por alimentos funcionais provavelmente está relacionado com o aumento da expectativa de vida da população, mas também com o consumidor mais consciente e exigente, que busca uma alimentação saudável e que traga benefícios ao organismo (NIVA, 2007; BÜYÜKKARAGÖZ et al., 2014). Estudos conduzidos em países europeus (STEWART-KNOX et al., 2007) e no Reino Unido (CHAMBERS; LOBB, 2007) demonstraram que o nível de educação está relacionado com o consumo de alimentos funcionais.

A procura por alimentos funcionais específicos pode ser dividida por faixas etárias: em diversos países europeus, pesquisas conduzidas por Stewart-Knox et al. (2007) revelaram que pessoas jovens estão buscando alimentos funcionais para auxiliar na redução de peso, enquanto idosos buscam diminuir o colesterol e controlar a pressão arterial.

Em países asiáticos, devido à uma questão cultural, muitos alimentos estão relacionados aos benefícios que podem trazer à saúde e são considerados tão importantes quanto os medicamentos, pois acredita-se que ambos têm a mesma finalidade (WESTSTRATE; VAN POPPEL; VERSCHUREN, 2002).

### **3.2. *Muntingia calabura L.***

*Muntingia calabura L. (M. calabura)* é uma planta pertencente à família Elaeocarpaceae, conhecida popularmente como cereja das Antilhas ou pau de seda. É largamente cultivada em áreas quentes da região Asiática, originária das Antilhas, e foi introduzida no Brasil pelo Instituto Agrônomo de Campinas (I.A.C.) em 1962 adaptando-se rapidamente ao clima e espalhando-se pelo país (PEIXOTO et al., 1998). Após um ano do plantio, a árvore de *Muntingia* fornece frutos durante todo o ano, sendo sua maior florada entre abril e julho. É uma fruta climatérica, ou seja, pode ser colhida antes da sua completa maturação sem que entre em processo de senescência (RAHMAN; SOLAIMAN; RAHMAN, 2010).

A fruta madura apresenta cor rosa avermelhada, sabor doce, polpa com pequenas sementes envoltas por uma viscosa mucilagem e tem um diâmetro médio de 14 mm e peso de 1,75 g (LOPES; PEREIRA; MARTINS-FILHO, 2002; GOMATHI; ANUSUYA; MANIAN, 2013). Quando madura, este fruto contém um elevado teor de sólidos solúveis (10,24 °Brix) e baixa acidez titulável, apresentando um pH de 5,64 (PEREIRA et al., 2016).

Em relação a sua composição centesimal, a *Muntingia* contém 1,28 % de minerais, 1,75 % de fibras, 2,34 % de lipídeos, 2,64 % de proteínas e um alto teor de carboidratos, correspondente à 14,64 % de seus nutrientes (PEREIRA et al., 2016). É ainda, uma fruta rica em compostos fenólicos solúveis, sobretudo em ácidos fenólicos e flavonoides (LIN et al., 2017; ROTTA et al., 2017).

Certos povos e tribos utilizam suas folhas, flores, raízes e galhos como remédio para o tratamento de dor de cabeça, febre e resfriado. Além de usarem partes da planta como agente antidiarréico, antiespasmódico, antisséptico e abortivo (KANEDA et al., 1991; NSHIMO et al., 1993; ZAKARIA et al., 2007; OLOWA; DEMAYO, 2015).

Estudos estão sendo efetuados principalmente na Ásia e na região tropical da América comprovando e revelando a potencial atividade bioativa e farmacológica da fruta devido à presença de quantidades significativas de compostos fenólicos em sua composição. Pesquisas conduzidas com suas folhas demonstraram uma capacidade anti-inflamatória e antipirética (ZAKARIA et al., 2007), antinociceptiva (ZAKARIA et al., 2006, 2007, 2016), citotóxica (KANEDA et al., 1991; SU et al., 2003; NASIR et al. 2017), antiproliferativa e antioxidante (ZAKARIA et al., 2011) e bactericida (ZAKARIA et al., 2006, RAMASAMY et al., 2017).

Demais estudos revelaram que extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir da polpa com casca da *Muntingia calabura* exibiram atividades antimicrobianas contra patógenos alimentares (SIBI et al., 2013; MOGOLLÓN; GONZÁLEZ-CUELLO; LÓPEZ, 2018 ), propriedades antioxidantes que contribuíram para a supressão da oxidação do LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) em humanos (LIN et al., 2017) e lipopolissacarídeos indutores de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos (LIN et al., 2017).

Compostos como esteróis, flavonoides e taninos foram identificados nas folhas da *calabura* (BUHIAN et al., 2016) e diversos tipos de flavonoides já foram isolados e identificados em suas raízes e galhos (SU et al., 2003; CHEN et al., 2005; SUFIAN et al., 2013).

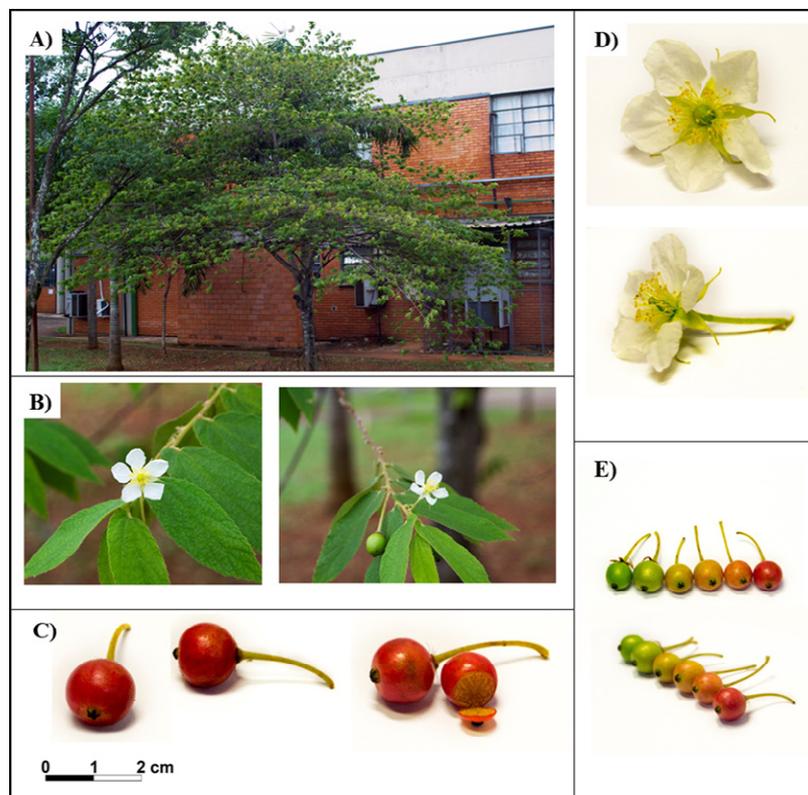
As frutas geralmente são consumidas frescas a partir de preparações caseiras. No entanto, conforme exposto nos estudos acima, a *Muntingia* apresenta um grande potencial a ser explorado pela indústria alimentícia como um alimento

funcional devido às suas propriedades físico-químicas a elevado teor de compostos antioxidantes (PEREIRA et al., 2016; LIN et al., 2017).

Contudo, ainda são escassos os dados relativos à composição química, conteúdos de compostos bioativos e aplicações tecnológicas de todas as partes da planta. Apesar de haverem alguns trabalhos sobre os compostos fenólicos solúveis da *Muntingia* (LIN et al., 2017; ROTTA et al, 2017), não há pesquisas sobre outras frações de fenólicos, o que pode gerar uma subestimação do conteúdo de compostos fenólicos da mesma e conseqüentemente de suas propriedades biológicas (PEREIRA et al., 2016). Principalmente em relação ao estudo dos frutos, os trabalhos são raros, concentrando-se em sua maior parte nas folhas.

Assim, estudos científicos voltados para o potencial aspecto funcional do fruto da *Muntingia calabura* principalmente devido ao seu elevado teor de compostos fenólicos antioxidantes são de grande valor para as indústrias e exigências do mercado consumidor atual.

A **Figura 2** abaixo ilustra a árvore, folhas, frutos e flores da *Muntingia calabura*.



**Figura 2.** A) Árvore de *Muntingia calabura* L., B) Flores, folhas e fruto ainda não maduro, C) Frutos maduros, D) Flores, E) Alterações na cor da fruta durante o processo de maturação (PEREIRA, 2018).

### **3.3. Compostos fenólicos**

#### **3.3.1. Aspectos gerais**

Os compostos fenólicos são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas e estão relacionados ao seu gênero, família ou espécie. Apesar de não estarem envolvidos diretamente em atividades bioquímicas primárias das plantas (como processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução), são formados em grandes quantidades como uma resposta de adaptação em condições de estresse: ferimentos, radiação UV, agressão por patógenos, entre outros (FARAH; DONANGELO, 2006; RODRIGUES-MATEOS et al., 2014).

Os (poli) fenóis ou compostos fenólicos são os produtos do metabolismo secundário de maior distribuição no reino vegetal, em que aproximadamente 2 % do carbono fotossintetizado pelas plantas é convertido em flavonoides e seus compostos relacionados (LATTANZIO et al., 2008). As principais fontes destes compostos são as polpas de frutas cítricas como o limão e a laranja, sendo também encontrados em vegetais como brócolis, repolho roxo, cebola e alho, além de outras frutas como uva, cereja, pera e maçã (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis pelo aroma, adstringência, cor e estabilidade oxidativa (PELEG; BODINI; NOBLE, 1998; NACZK; SHAHIDI, 2004). Quimicamente, são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Sua estrutura é bastante variável, abrangendo desde moléculas simples (ácidos fenólicos) até moléculas de elevado grau de polimerização (proantocianidinas), além de outros milhares de compostos das mais variadas estruturas (BALASUNDRAM; SUDRAM; SAMMAN, 2006). Podem ainda apresentarem-se na forma livre ou ligados à açúcares e proteínas (BRAVO, 1998).

#### **3.3.2. Classificação**

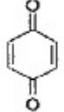
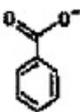
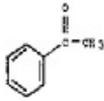
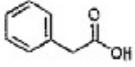
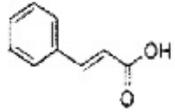
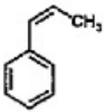
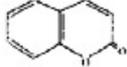
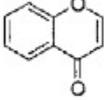
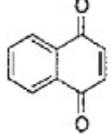
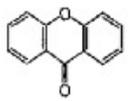
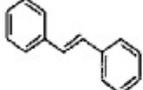
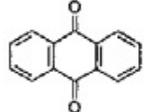
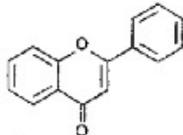
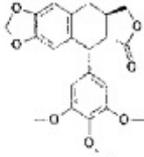
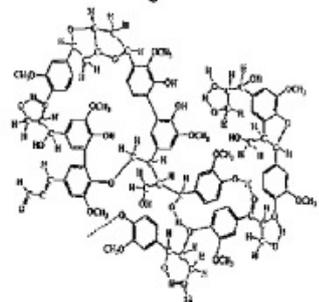
Devido à sua grande variabilidade, os compostos fenólicos podem ser classificados de diversas maneiras: de acordo com a sua cadeia de carbono, sua distribuição na natureza e em relação à sua localização na planta.

Conforme sua cadeia de carbono, os compostos fenólicos são divididos em 16 classes principais (HARBONE; DEY, 1989) que podem ser visualizadas na Figura 3.

Em relação à sua distribuição na natureza, os fenólicos são divididos em 3 classes: pouco distribuídos (fenóis simples, hidroquinona, pirocatecol, resorcinol e aldeídos derivados de ácidos benzoicos como a vanilina), amplamente distribuídos (flavonoides e seus derivados, cumarinas e ácidos fenólicos como o ácido benzoico, cinâmico e seus derivados), e polímeros (taninos e ligninas) (BRAVO, 1998).

Quanto à localização na planta, ou seja, se ligados à componentes da parede celular ou livres na fração solúvel da célula, são divididos em 2 classes: solúveis (taninos, flavonoides e fenólicos simples, de baixo e médio peso molecular que não estejam ligados à parede celular) e insolúveis (constituídos principalmente de taninos condensados, ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos de baixo peso molecular ligados à proteínas ou polissacarídeos da parede celular, formando assim complexos insolúveis estáveis) (GONZÁLEZ, 2002).

Do ponto de vista nutricional é importante ressaltar que os compostos fenólicos insolúveis não são digeridos sendo em sua maior parte defecados, enquanto os compostos fenólicos solúveis são digeridos (GONZÁLEZ, 2002). Ambos os compostos (solúveis e insolúveis) podem ser benéficos à saúde: os compostos solúveis são absorvidos no intestino delgado e conjugados com outras substâncias atingem a corrente sanguínea (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000) enquanto os compostos fenólicos insolúveis atingem o cólon, participam do processo de fermentação bacteriana e podem quimioprevenir o desenvolvimento de câncer de colón (Yi et al., 2005; GHANEMI et al., 2017).

Classe	Esqueleto	Estrutura básica
Fenóis simples	C <sub>6</sub>	
Benzoquinonas	C <sub>6</sub>	
Ácidos fenólicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetofenonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Ácido fenilacético	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Ácido hidroxicinâmico	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Fenilpropenos	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cumarinas, isocumarinas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cromonas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Estilbenos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	
Lignananas e neolignananas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	

**Figura 3.** Principais classes de compostos fenólicos conforme sua cadeia de carbono (GIADA, 2013).

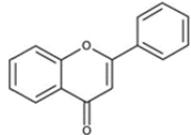
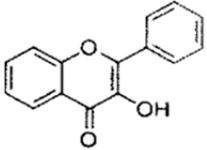
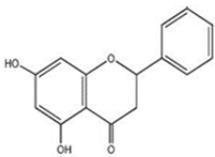
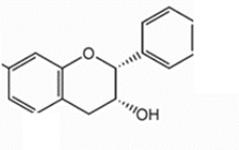
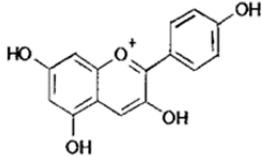
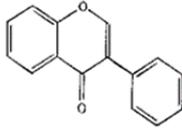
### 3.3.3. Principais classes

#### 3.3.3.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular e 15 átomos de carbono na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999). Sua estrutura é constituída de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel heterocíclico oxigenado (C) (MANACH et al., 2004).

Podem ser divididos em 13 classes conforme o grau de hidroxilação e a presença de uma dupla ligação nos carbonos C2-C3 no anel heterocíclico de pirona, sendo as classes mais importantes: flavanóis, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas e antocianidinas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; GONZÁLEZ, 2002). Ainda, podem surgir como derivados de compostos metilados e sulfatados conjugados com mono e dissacarídeos, formando complexos com oligossacarídeos, aminas, lipídeos, ácidos orgânicos e carboxílicos, compondo dessa maneira uma grande variedade de substâncias (DUTHIE; GARDNER; KYLE, 2003).

A **Figura 4** representa a estrutura química das principais classes de flavonóides.

Flavanóide	Estrutura básica
Flavonas	
Flavonóis	
Flavanonas	
Flavanóis	
Antocianidinas	
Isoflavonas	

**Figura 4.** Estrutura das principais classes de flavonoides (GIADA, 2013).

Os flavonóides são os compostos fenólicos mais amplamente distribuídos na natureza (SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016) e de maior atividade antioxidante proveniente de plantas (GONZÁLEZ, 2002). Seu alto poder antioxidante está relacionado com a presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B, o que torna possível o deslocamento de elétron deste anel. Ainda, grupos hidroxila livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, juntamente com o grupo carbonila na posição 4, são importantes para conferirem sua atividade antioxidante (GONZÁLEZ, 2002).

A capacidade antioxidante dos flavonóides pode diminuir com a substituição dos grupos hidroxilas por açúcares: a glicosilação de flavanóides diminui sua atividade antioxidante em ensaios *in vitro* (ensaios com o radical livre DPPH, radical ABTS, radical superóxido, entre outros) (XIAO, 2015). Contudo, para ensaios que avaliam a capacidade antioxidante celular, os resultados podem ser diferentes e as agliconas podem exibir uma capacidade antioxidante mais elevada do que seus glicosídeos (CHOI et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

### 3.3.3.1.1. Antocianinas

Como mencionado acima, as antocianinas constituem uma classe de flavonoides. É o maior grupo de pigmentos solúveis em água provenientes de origem vegetal (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997), responsáveis por uma coloração de tons vermelhos à azuis (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). São encontradas em qualquer parte da planta, mas estão principalmente concentradas em suas flores e frutos.

As antocianinas ocorrem na natureza na forma glicosilada como antocianidinas (agliconas) apresentando como forma básica o cátion flavilium ou ligadas à um grupo de ácidos orgânicos e outros substituintes. Em alimentos, estão sempre presentes como uma forma derivada de agliconas dos seguintes pigmentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina diferindo em relação ao número de hidroxilas e grau de metoxilação no anel B (LIMA et al., 2006)

A cor avermelhada corresponde à uma maior presença de grupos  $OCH_3$  apresentando geralmente uma maior estabilidade à oxidação e ao calor. Enquanto a coloração rosada e azul corresponde à uma maior presença de grupos hidroxila (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004).

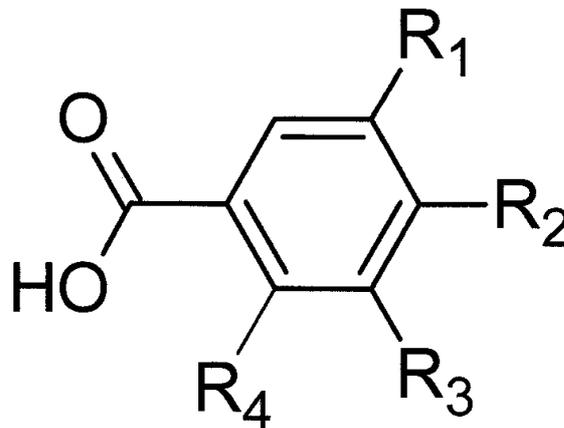
A **Figura 5** abaixo representa a estrutura geral das antocianinas.



importância: o ácido gálico, vanílico, protocatecuico, salicílico, p-hidroxibenzoico e siríngico (GONZÁLEZ, 2002; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

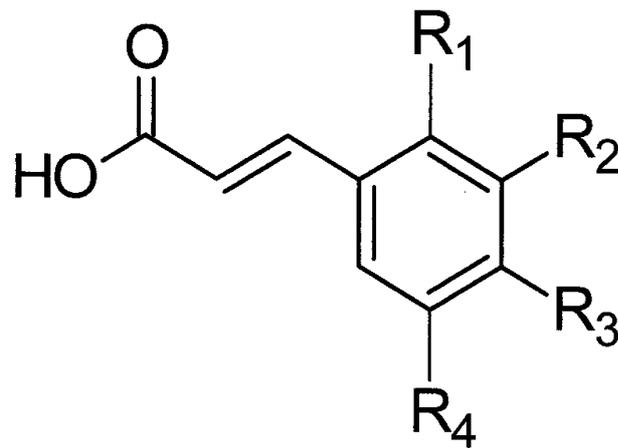
Em contrapartida, os ácidos cinâmicos são compostos de nove carbonos (C6-C3) que formam uma cadeia lateral, em vegetais normalmente apresentam sete carbonos em sua estrutura (YANG et al., 2001). Estes ácidos encontram-se nos vegetais geralmente na forma de ésteres associados à um álcool-ácido cíclico (BRAVO, 1998). Os mais expressivos são: o ácido caféico, p-cumárico, ferúlico e sináptico (YANG et al., 2001).

As **Figuras 6 e 7** abaixo representam a estrutura geral dos ácidos fenólicos benzoicos e cinâmicos, respectivamente.



Salicylic acid ( $R_4 = \text{OH}$ ,  $R_1, R_2, R_3 = \text{H}$ );  
 Gentisic acid ( $R_1, R_3 = \text{OH}$ ;  $R_2, R_4 = \text{H}$ );  
*p*-Hydroxybenzoic acid ( $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_1, R_3, R_4 = \text{H}$ );  
 Protocatechuic acid ( $R_1, R_2 = \text{OH}$ ;  $R_3, R_4 = \text{H}$ );  
 Vanillic acid ( $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ;  $R_3, R_4 = \text{H}$ );  
 Gallic acid ( $R_1, R_2, R_3 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{H}$ );  
 Syringic acid ( $R_1, R_3 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{H}$ )

**Figura 6.** Estrutura geral e principais ácidos fenólicos benzoicos (GIADA, 2013).



Cinnamic acid ( $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ )  
*o*-Coumaric acid ( $R_1 = OH$ ;  $R_2, R_3, R_4 = H$ )  
*m*-Coumaric acid ( $R_2 = OH$ ;  $R_1, R_3, R_4 = H$ )  
*p*-Coumaric acid ( $R_3 = OH$ ;  $R_1, R_2, R_4 = H$ )  
 Caffeic acid ( $R_2 = R_3 = OH$ ;  $R_1, R_4 = H$ )  
 Ferulic acid ( $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_1, R_4 = H$ )  
 Sinapic acid ( $R_2 = R_4 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_1 = H$ )

**Figura 7.** Estrutural geral e principais ácidos fenólicos cinâmicos (GIADA, 2013).

Os ácidos fenólicos e seus ésteres são conhecidos pela sua atividade antioxidante, geralmente determinada pelo número de grupos hidroxila que estes apresentam, embora outros fatores também possam contribuir. Os ácidos cinâmicos hidroxilados são agentes antioxidantes de maior potencial que os ácidos benzoicos hidroxilados (GONZÁLEZ, 2002). Este fato ocorre devido os derivados de ácidos cinâmicos apresentarem uma dupla ligação que participa na estabilidade do radical através da ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, fato que não ocorre nos derivados de ácidos benzoicos (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

### 3.3.3.3. Taninos

Os taninos são polifenóis de médio a alto peso molecular (500-3000 Da) (GONZÁLEZ, 2002) divididos em dois grupos conforme sua estrutura química: taninos hidrolisáveis e taninos não-hidrolisáveis ou condensáveis (CHUNG et al., 1998; OSZMIANSKI et al., 2007). Há uma terceira classe de taninos, os florotaninos provenientes de algas pardas, no entanto há poucos estudos sobre seu consumo, sendo mais expressivo em países asiáticos (MURRAY et al., 2017)

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos elágicos glicosilados ou ácido gálico, formados do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (KING; YOUNG, 1999). Os ésteres de ácidos elágicos formam elagitaninos como metabólitos enquanto os ésteres de ácido gálico formam galotaninos, sendo ambos metabólitos facilmente hidrolisados com ácidos, bases e enzimas. Contudo, podem também ser condensados oxidativamente em moléculas de galoil e hexahidroxidifenico, transformando-se em polímeros (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1995).

Os taninos condensáveis ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina). São substâncias não facilmente hidrolisadas em meio ácido e são as principais responsáveis pela adstringência nos vegetais (MONTEIRO et al., 2005).

#### **3.3.4. Extração de compostos fenólicos**

A otimização da extração de compostos fenólicos visando sua análise e quantificação vêm sendo objeto de estudo de grande interesse da comunidade científica, pois em sua maioria os compostos fenólicos são de alta polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas, o que dificulta o desenvolvimento de uma metodologia (KING; YOUNG, 1999).

Todo processo de extração envolvendo fenóis provenientes de matrizes vegetais é influenciado pela natureza química do composto alvo, tamanho das partículas e o próprio método utilizado. Portanto, este processo resulta em um extrato constituindo de misturas de diferentes classes de compostos fenólicos solúveis no solvente extrator. A solubilidade dos fenóis é dependente da polaridade do solvente, interação com outros compostos presentes na matriz do alimento (proteínas, carboidratos, entre outros) e grau de polimerização, não existindo um único solvente eficiente para todos os compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004, 2006).

Duas classes de métodos podem ser utilizadas no processo de extração: métodos convencionais ou clássicos (como o Soxhlet e a hidrodestilação) e não-convencionais ou modernos (como o ultrassom, o micro-ondas e a extração supercrítica) (WIJNGAARD et al., 2012).

Os métodos clássicos são vantajosos em relação à simplicidade e baixo custo de operação, contudo, apresentam limitações por serem processos longos, que degradam componentes termolábeis e despendem grande quantidade de solvente. Devido à estas problemáticas, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de métodos modernos que sejam mais rápidos, eficientes e menos agressivos ao meio ambiente (WANG; WELLER, 2006; IGNAT; VOLF; POPA, 2011; AZMIR et al., 2013; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Independentemente do método empregado, vários fatores influenciam o rendimento da extração: pH, temperatura, tamanho da partícula, agitação, tempo de contato, tipo de solvente e sua relação com o sólido (R-SS) (TAKEUCHI et al., 2009). Os efeitos de cada um desses parâmetros no processo de transferência de massa durante a extração são específicos para cada matriz vegetal, sendo assim, as características químicas do material a ser extraído também devem ser consideradas na escolha do método e dos parâmetros de extração (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Ressalta-se, portanto, que não existe um protocolo universal para a extração de compostos fenólicos: para cada composto alvo se faz necessário desenvolver e otimizar um método (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010). Assim, inúmeros estudos estão sendo realizados sobre o efeito dos parâmetros de extração a partir de matrizes vegetais para a obtenção de compostos ricos em fenóis (TAKEUCHI et al., 2009).

A viabilidade econômica de um processo de extração está baseada em combinações das condições que maximize a eficiência da operação. O método clássico consiste em variar um fator (R-SS, solvente, temperatura, pH) por vez (one-at-a-time), mantendo os demais fatores constantes. Contudo, este método apesar de eficiente demanda uma grande quantidade de experimentos, gerando um custo.

Visando minimizar gastos e economizar tempo, pesquisadores têm utilizado o planejamento fatorial associado à Análise de Superfície de Resposta, método que permite avaliar o efeito das interações entre os fatores estudados, seus efeitos sinérgicos e antagônicos e otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo de forma segura (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Quando se deseja otimizar as proporções dentro de um mesmo fator, como por exemplo as melhores proporções de uma mistura de solventes, estudos recentes têm demonstrado que um design de misturas simplex com pontos centroides

é um método rápido, eficiente e seguro (MEINHART et al., 2017; OUSSAID et al., 2017).

A extração de compostos fenólicos a partir de frutas e seus subprodutos estão particularmente em alta no meio acadêmico e industrial, pois há uma preocupação da sociedade em adquirir cada vez mais produtos saudáveis e com propriedades funcionais, como os antioxidantes (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; ALBERTI et al., 2014; TSAMO et al., 2015).

### **3.3.5. Benefícios**

Os compostos fenólicos vêm recebendo cada vez mais atenção tanto pelas indústrias quanto pela população em geral devido aos benefícios que podem trazer à saúde, principalmente em relação as suas propriedades antioxidantes.

Os antioxidantes são compostos químicos capazes de prevenir ou reduzir danos oxidativos em biomoléculas gerados por espécies reativas. Tais espécies reativas são produzidas naturalmente pelo metabolismo aeróbico e a sua interação com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos provoca danos em diferentes tecidos, o que pode contribuir para o aparecimento de doenças crônicas e degenerativas (PEREIRA, 2015). A produção de espécies reativas no organismo é controlada tanto por antioxidantes endógenos (ex: superóxido dismutase, glutathione peroxidase) quanto por antioxidantes exógenos obtidos através da dieta (ex: compostos fenólicos, vitamina C, carotenoides) (LIM; LIM; TEE, 2007; LUZIA; JORGE, 2014).

Os compostos fenólicos antioxidantes agem inibindo à ação de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e regulação e/ou proteção dos sistemas de defesa endógenos, quelando metais de transição e sequestrando ou suprimindo espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (APAK et al., 2007; PERRON; BRUMAGHIM, 2009; LUZIA; JORGE, 2014).

Além das propriedades antioxidantes dos fenóis, estudos já demonstraram sua potencial atividade anti-inflamatória (CHEN; TAIT; KITTS, 2016; ZHEN et al., 2016), antibacteriana (GULLON et al., 2016; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2016), antiviral (KARIMI et al., 2016; FABRA et al., 2018) e anti-histamínica (MLCEK et al., 2016; PENNESI et al., 2017). Podem ainda atuar como prebióticos, auxiliando no controle da pressão sanguínea através do favorecimento do

crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (WEICHSELBAUM; BUTTRISS, 2010; LANDETE, 2012).

Ainda, o consumo de antioxidantes provenientes de fontes naturais como os compostos fenólicos podem auxiliar na prevenção de câncer do trato gastrointestinal (BISHAYEE et al., 2015), na incidência de diabetes (ZEMESTANI; RAFRAF; ASGHARI-JAFARABADI, 2016) e na diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GRIFFITHS et al. 2016). Pesquisas *in vitro* comprovaram que os compostos fenólicos podem inibir a proliferação de células cancerígenas e a oxidação do LDL colesterol, melhorarem a secreção de insulina, a vasodilatação e protegerem neurônios de processos oxidativos (WEICHSELBAUM; BUTTRISS, 2010; HAMINIUK et al., 2012; LANDETE, 2012).

Dessa maneira, há um grande interesse pela comunidade científica nos estudos de compostos fenólicos devido ao seu potencial funcional e terapêutico. Contudo, ainda não se sabe os mecanismos pelos quais suas atividades biológicas atingem determinadas regiões do corpo, bem como a concentração necessária para conseguir esses benefícios (SCHAUSS, 2013).

Devido à sua propriedade antioxidante, os compostos fenólicos também podem ser empregados na conservação de alimentos. Alguns trabalhos estudaram a eficiência de fenólicos obtidos de matriz vegetal como conservantes atuando na inibição da peroxidação lipídica de óleos de peixes e vegetais, mostrando serem mais eficazes que alguns conservantes sintéticos (BHT e BHA) em diversos sistemas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Demais pesquisas utilizaram extratos de plantas ricas em polifenóis em embalagem de queijo auxiliando no controle da sua deterioração causada tanto por contaminação bacteriana ou oxidação de lipídios e proteínas (MUSHTAQ et al., 2018) e em produtos cárneos visando a inibição da oxidação de lipídeos e proteínas com a finalidade de aumentar a vida de prateleira (TURGUT; SOYER; IŞIKÇI, 2016).

Assim, no que se refere à tecnologia de alimentos, o estudo de extratos vegetais, cereais, frutas e ervas ricos em compostos fenólicos também vêm atraindo o interesse da indústria por sua capacidade em retardar a degradação oxidativa de lipídeos, melhorando a qualidade e valor nutricional de alimentos industrializados (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras

As amostras de *Muntingia calabura L.* foram coletadas de uma árvore presente na própria faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP (latitude corresponde à 22° 48' 36.95" S e longitude à 47° 4' 36.42" W) no período de junho a julho de 2016. Depositadas no Herbário do Instituto de Biologia (Herbário UEC) e registradas no sistema SisGen em 2018 sob o número AEE5573. A quantidade correspondente a 1 kg de frutos maduros livres de defeitos foi padronizada visualmente em relação ao tamanho e a cor, colhida manualmente e lavada em água corrente e água deionizada. Os frutos foram partidos ao meio, congelados, liofilizados e, após este procedimento, foram moídos em um moinho de facas até a obtenção de um pó fino e armazenados em sacos plásticos escuros no freezer à -4 °C até a sua utilização.

### 4.2. Extração

#### 4.2.1. Avaliação da acidificação do solvente extrator

Realizaram-se duas extrações utilizando as mesmas proporções da mistura de solventes metanol, acetona e água (7:7:6, v/v/v) conforme proposto por Ayoub, Camargo e Shahidi (2016), no entanto, o experimento 1 foi realizado em meio acidificado com 0,2% de ácido clorídrico concentrado em relação à concentração final e o experimento 2 foi realizado em meio não acidificado. As concentrações do extrato foram de 66,7 mg/ml para a amostra não acidificada e de 62,5 mg/ml para a amostra acidificada. Os demais experimentos do planejamento de misturas (item 4.2.2) foram realizados em meio acidificado ou não, conforme os resultados obtidos dos experimentos 1 e 2.

Os solventes escolhidos foram os mais frequentemente usados na extração de compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Apesar da toxicidade do metanol e sua inviabilidade para o uso alimentício e farmacêutico, o mesmo foi utilizado no presente trabalho apenas para uma análise analítica e comparação de eficiência com solventes menos agressivos (etanol e água).

A concentração e ácido empregados foram determinados conforme protocolo e resultados apresentados por Chirinos et al. (2007).

#### 4.2.2. Planejamento de misturas

Para a obtenção dos extratos de *Muntingia calabura*, 1 g da amostra previamente liofilizada e moída foi homogeneizada com 15 mL de solvente em agitador vortex e submetida à ultrassom por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, efetuou-se uma centrifugação por 15 minutos à velocidade de 4000 g e temperatura de 5 °C, o sobrenadante foi coletado e o resíduo submetido à nova extração. Este procedimento foi repetido três vezes e os três sobrenadantes foram misturados.

A mistura dos três sobrenadantes foi evaporada à vácuo à 40 °C em rotaevaporador e centrifugada (velocidade de 4000 g, tempo de 5 minutos e temperatura de 5 °C) novamente para a remoção de possíveis precipitados.

Foram efetuadas 10 extrações, conforme a **Tabela 1** abaixo, obtida através de um design de misturas simplex com pontos centroides a partir do *software* Statistica 10 (*Statsoft, Oklahoma, EUA*):

**Tabela 1.** Proporções de solventes utilizados em cada ensaio. Em que  $X_1$  = metanol,  $X_2$  = acetona e  $X_3$  = água deionizada.

	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	$X_3$ (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,3	33,3	33,3
8	66,67	16,67	16,67
9	16,67	66,67	16,67
10	16,67	16,67	66,67

#### 4.3. Determinação da capacidade redutora pelo método de Folin Ciocalteu

A determinação da capacidade redutora foi realizada conforme o método de Folin Ciocalteu descrito por Cicco et. al (2009).

Foram adicionados 100  $\mu$ L da amostra previamente diluída em eppendorfs de 1,0 mL, 100  $\mu$ L do reagente Folin Ciocalteu 50% (v/v) e 800  $\mu$ L de carbonato de sódio 5% (p/v). Os ensaios foram mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida à 660 nm (Beckman UV/VIS, model DU-640, USA).

Etanol 40% foi utilizado como solução padrão e para a diluição dos extratos. Ácido gálico foi utilizado como padrão espectrofotométrico e o resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico (g EAG/100 g de amostra liofilizada).

## 4.4. Atividade antioxidante

### 4.4.1. Método DPPH

O método utilizado neste ensaio foi baseado em Roesler et al. (2007). Para tanto, uma solução de DPPH (0,004% m/v) foi preparada diariamente pesando 4 mg de DPPH e completando o volume para 100 mL com etanol (p.a). Após o preparo da solução, esta foi submetida em ultrassom por 30 minutos e armazenada em frasco âmbar. Esta solução foi o controle e sua absorvância foi aferida à 517 nm, (Beckman UV/VIS, model DU-640, USA), realizando diluições necessárias até que a sua diferença com o branco (neste caso, etanol) apresentou o valor de 0,9.

O sistema de reação foi feito adicionando 1000 µL desta solução de DPPH (0,004%) previamente preparada em eppendorfs de 1,5 mL contendo 200 µL da amostra. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente e no escuro durante 30 minutos e absorvância aferida à 517 nm (Beckman UV/VIS, model DU-640, USA). A capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada considerando o ensaio em branco e a curva de calibração foi preparada com padrão de trolox, sendo o resultado expresso em equivalentes de trolox (µmol ET/g de amostra liofilizada).

### 4.4.2. Método TEAC

A determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox foi efetuada conforme o método descrito por Leite et al. (2011).

Uma solução de ABTS •+ foi previamente preparada adicionando 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 140 mM à 5 mL de uma solução de ABTS ((2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid)-diammonium salt]) 7mM. A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente e ausência de luz por 12 a 16 horas.

Após a formação do radical ABTS •+, 800 µL desta solução foi diluída em um balão de 50 mL com água Milli-Q e submetida à ultrassom por 10 minutos. Retirada do ultrassom, a solução de ABTS •+ permaneceu em repouso ao abrigo de luz por mais 60 minutos e em seguida a absorvância foi aferida à 734 nm (Beckman UV/VIS, model DU-640, USA) e diluições foram efetuadas até que a diferença de

leitura entre esta solução controle e o branco (água ultrapura) apresentou o valor de  $0,7 \pm 0,002$ .

O sistema de reação foi realizado adicionando 1000  $\mu\text{L}$  desta solução de ABTS  $\bullet+$  à 200  $\mu\text{L}$  de amostra em eppendorfs de 1,5 mL. Foram aguardados 6 minutos e a absorbância foi mensurada à 734 nm (Beckman UV/VIS, model DU-640, USA).

A curva de calibração foi preparada com padrão de trolox, os resultados foram calculados considerando o ensaio em branco e expressos em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol ET/g}$  de amostra liofilizada).

#### **4.5. Determinação de flavonoides totais**

A determinação de flavonoides totais da amostra foi efetuada conforme o método proposto por Zhishen et al. (1999). Para tanto, foram adicionados em eppendorfs de 1,5 mL: 400  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída e 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  5% (m/v). Os ensaios permaneceram em repouso à temperatura ambiente e ausência de luz durante 5 minutos, e após este período foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  10% (m/v). Após mais 6 minutos de repouso, foram acrescentados à reação 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M e 240  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.

A absorbância foi mensurada à 510 nm (Beckman, modelo DU600, CA, EUA) e comparada ao branco (água ultrapura). A curva de calibração foi construída com catequina e os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (mg EC/ 100g de amostra liofilizada).

#### **4.6. Determinação de taninos condensados**

A determinação de taninos condensados foi efetuada adicionando em eppendorfs de 1,5 mL 30  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em metanol, 900  $\mu\text{L}$  de vanilina 4% (m/v) em metanol e 450  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado. O sistema de reação permaneceu ao abrigo de luz e temperatura ambiente por 20 minutos e foi submetido à leitura de absorbância à 500 nm (Beckman, modelo DU600, CA, EUA). A curva de calibração foi construída com catequina e os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (mg EC/g de amostra liofilizada).

#### 4.7. Determinação da composição de compostos fenólicos por CLUE-EM

Os compostos fenólicos das amostras foram identificados e quantificados utilizando um sistema de CLUE conectado à um espectrômetro de massa quadripolar triplo equipado com uma fonte de electrospray de ionização (ESI) conforme o método descrito por Bataglione et. al (2015). Para tanto, foi utilizada uma coluna Shim-pack XR-ODS III à temperatura de 40 °C com o amostrador automático mantido à 10 °C e foram injetadas 10 µL da amostra.

A fase móvel foi constituída de 0,1% de ácido fórmico diluído em água (eluente A) e metanol (eluente B) numa vazão de 0,40 mL/min. As condições de eluição foram: 0-1 min., 5% B; 1-4 min., 5-60% B; 4-7 min., 60-70 % B; 7-10 min., 70-100% B; 10-10,50 min., 100% B; 10,50-11 min., 100-5% B; 11-15 min., 5% B.

A fonte ESI foi operada no modo de íon negativo com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 3.5 kV, temperatura de 300 °C, temperatura da linha de dessolvatação de 250 °C, vazão de gás (nitrogênio) de secagem de 20 L/min., vazão de gás (nitrogênio) de nebulização de 3L/min., pressão do gás (argônio) indutor de dissociação por colisão de 224 kPa.

Os compostos fenólicos foram caracterizados através de comparação entre os padrões de fragmentação e tempo de retenção obtidos a partir da análise e os valores de padrões autênticos. A quantificação dos compostos fenólicos foi obtida por comparação entre a curva de calibração para cada padrão.

Os dados foram adquiridos e processados por um software (Labsolution 5.53 SP2, Shimadzu) e os resultados expressos em µg/g de amostra liofilizada.

#### 4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos dos ensaios citados acima foram representados através de superfícies de resposta e analisados estatisticamente pelo método de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o software STATISTICA 10 (Statsoft, Oklahoma, EUA).

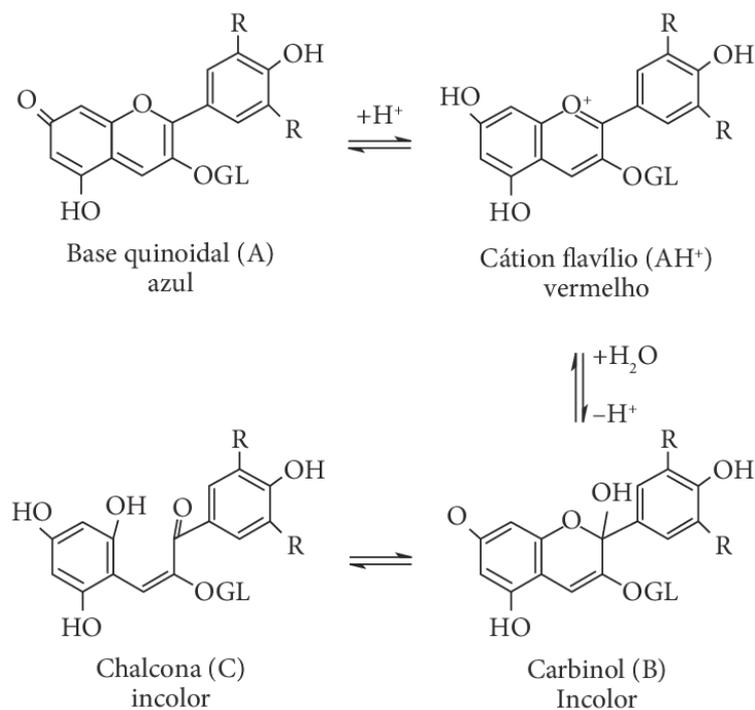
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Acidificação

O teste de acidificação foi realizado devido à possível presença de antocianinas na amostra. Antocianinas são pigmentos da classe dos flavonoides que tem tanto sua coloração quanto a sua estabilidade alteradas dependendo do pH em que se encontram.

Em relação à coloração, em soluções ácidas as antocianinas apresentam uma coloração mais avermelhada e em soluções básicas uma coloração mais azulada. Estudos conduzidos por Marçõ e Scarminio (2007) demonstraram que conforme ocorria uma variação no pH, também ocorria uma mudança nos máximos de absorção do espectro, interferindo na dosagem desses metabólitos a partir da matéria-prima estudada.

A **Figura 8** ilustra o comportamento das antocianinas em soluções aquosas em diferentes valores de pH.



**Figura 8.** Comportamento das antocianinas em diferentes valores de pH (BORDIGNON Jr. et al., 2009).

A presença de grupos acila inibe a hidrólise do cátion flavilium da antocianina para formar a base carbitol (incolor), dando preferência a formação da base quinoidal (azul). Esta ação inibidora da acidificação torna as antocianinas menos susceptíveis às alterações sofridas pelo pH (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

Um estudo conduzido por Dangles et al. (1993) quantificou o efeito da acidificação da pelargonidina 3-soforosídeo-5-glucosídeo acilada com ácido cafeico. Os resultados obtidos mostraram um aumento na velocidade da constante de hidratação com a acilação da molécula, tornando os pigmentos mais resistentes à reação de hidratação e evitando a perda de coloração.

Demais estudos realizados com antocianinas provenientes do arroz negro e seu farelo exibiram uma maior degradação das antocianinas com o aumento do pH, indicando uma maior estabilidade em meio ácido (SUI; DONG; ZHOU, 2014; LOYPIMAI; MOONGNGARM; CHOTTANOM, 2016). Outra pesquisa estudou o efeito do pH em antocianinas provenientes de diversas fontes, concluindo que o teor de antocianinas das amostras diminuiu com o aumento do pH de 3 a 7 (EKICI et al., 2014).

Dessa forma, a prévia acidificação do extrato de *Muntinga calabura L.* foi efetuada para verificar se uma provável estabilização das antocianinas interferiria nos resultados das análises.

A acidificação da amostra com 0,2% de ácido clorídrico concentrado foi confirmada visualmente com a mudança de coloração da amostra de levemente amarelada para rosada (**Figura 9**) e com um papel indicador de pH.



**Figura 9.** Mudança de coloração da amostra com a adição de 0,2 % de HCl concentrado.

Os resultados das análises da capacidade redutora pelo método de Folin Ciocalteu, capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS, quantidade de flavonoides totais, taninos condensados e CLUE comparativos entre as amostras acidificada e não-acidificada estão nas **Tabelas 2 e 3**, respectivamente.

**Tabela 2.** Comparativo da capacidade redutora, antioxidante, flavonoides totais e taninos condensados entre as amostras acidificada (FA) e não-acidificada (FS) dos extratos de frutos de *Muntingia calabura*.

Análise	Resultados	
	FS	FA
Folin Ciocalteau (mg EAG/100 g bs)	2.237,59 ± 59,31 a	1896,17 ± 62,97 a
DPPH (µmol ET/g bs)	298,53 ± 13,41 a	284,11 ± 6,37 b
ABTS (µmol ET/g bs)	245,45 ± 4,03 a	221,46 ± 2,62 a
Flavonoides totais (mg EC/100 g bs)	n.d.	n.d.
Taninos condensados (µg EC/mg bs)	0,13 ± 0,00 a	0,14 ± 0,01 b

Resultados apresentados como média (n = 3) ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p < 0,05) entre as amostras FS e FA pelo Teste t pareado de *Student*.

Em que EAG: equivalente de ácido gálico, EC: equivalente de catequina e ET: equivalente de Trolox

**Tabela 3.** Comparativo de compostos fenólicos principais e totais identificados pelo método de CLUE entre as amostras acidificada (FA) e não-acidificada (FS) dos extratos de frutos de *Muntingia calabura*.

Composto	Resultados (µg/g bs)	
	FS	FA
Cianidina-3-O-glicosídeo	580,04 ± 6,09 a	422,22 ± 2,50 a
Ácido gálico	150,58 ± 21,12 a	73,66 ± 10,03 a
Galocatequina	88,82 ± 6,12 a	59,31 ± 1,96 a
Ácido elágico	380,5243 ± 62,94 a	188,5079 ± 33,75 a
Fenóis totais	1245,71 ± 82,45 a	776,12 ± 45,77 a

Resultados apresentados como média (n = 4) ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p < 0,05) entre as amostras FS e FA pelo Teste t pareado de *Student*.

Conforme indicado nas Tabelas 2 e 3 apenas a análise da capacidade antioxidante das amostras pelo método de DPPH e a análise de taninos condensados apresentaram uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de Student. No entanto, a amostra não-acidificada (FS) apresentou uma capacidade antioxidante média de 298,53  $\mu\text{mol ET/g bs}$ , valor maior do que o da amostra acidificada, com uma média de 284,11  $\mu\text{mol ET/g bs}$ .

Para a análise de taninos condensados a amostra acidificada apresentou um valor maior. No entanto, mesmo havendo uma diferença estatística significativa entre elas, o fruto contém pouco deste composto em sua constituição (média de 0,14  $\mu\text{g EC/mg bs}$  para a amostra acidificada contra 0,13  $\mu\text{g EC/mg bs}$  para a amostra não acidificada). A análise de taninos só foi possível utilizando o extrato em sua concentração máxima de 66,7  $\text{mg/mL bs}$  para a amostra não acidificada e 62,5  $\text{mg/mL bs}$  para a amostra acidificada, indicando que este composto fenólico não é majoritário na calabura, visto que em frutas esse valor pode alcançar o valor de 1,84  $\mu\text{g/mg bs}$  de taninos condensados (LAMY et al., 2016).

Para as análises de Folin Ciocalteau, ABTS e compostos fenólicos identificados pelo CLUE não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras analisadas. Ainda, para todas as análises a amostra não-acidificada apresentou um melhor resultado.

A extração de compostos fenólicos antioxidantes geralmente é efetuada com solventes orgânicos acidificados, sendo a eficiência deste procedimento já demonstrada em diversos trabalhos. (MATTILA; ASTOLA; KUMPULAINEN, 2000; CABRERA; GIMÉNEZ; LÓPEZ, 2003; JU; HOWARD, 2003).

Um estudo conduzido visando a otimização da extração de compostos fenólicos antioxidantes de túberculos de Mashua (tubérculo comestível andino) verificou a influência da acidificação dos solventes com ácido clorídrico, concluindo que a maior eficiência de extração ocorreu com uma acidificação de 0,10% e/ou 0,15% de HCl (CHIRINOS et al., 2007).

Outro estudo utilizou um design fatorial para otimizar a extração de polifenóis presentes em sementes de uva, no qual foi verificado um decaimento na eficácia da extração de compostos fenólicos totais com o aumento do pH e uma otimização na extração das proantocianidinas em pH baixo (KARVELA et al., 2009), concordando com o resultado obtido no presente trabalho para a extração de taninos

condensados (proantocianidinas), que obteve um melhor resultado em meio acidificado.

Apesar da maioria das análises de compostos fenólicos antioxidantes deste estudo não apresentar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a extração em solvente orgânico acidificado ou não, o que à princípio contradiz a literatura, a efetividade deste procedimento vai depender de cada composição química e estrutural dos compostos fenólicos.

Ainda, o íon  $\text{Cl}^-$  do HCl pode ter rompido a estrutura nativa das antocianinas induzindo a formação de outros complexos contendo o pigmento (MOORE; FRANCIS; CLYDESDALE, 1982). Outro fator a ser considerado é a possível interação da acidificação com o ultrassom. Embora bastante empregado na extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais, o tratamento por ultrassom pode ter sua eficiência afetada por diversas variáveis como a composição do solvente e o pH (TENG; LEE; CHOI, 2013; KATSAMPA et al., 2015; ESPADA-BELLIDO et al., 2017).

O ultrassom pode induzir alterações tanto nas propriedades físicas quanto químicas de um composto, principalmente devido à cavitação. Durante o tratamento com ultrassom há geração de bolhas de gás que se expandem e colapsam após vários ciclos de compressão e descompressão, ocasionando nanoexplosões que podem alterar estruturas de proteínas e da membrana celular (SORIA; VILLAMIEL, 2010). Assim, compostos fenólicos na forma nativa que estão ligados na parede celular ou estocados no vacúolo celular podem interagir com outros compostos, como polissacarídeos, devido ao rompimento da membrana causado por este tratamento (HERRERA; DE CASTRO, 2004; CAPOTE; DE CASTRO, 2007).

Alguns trabalhos já realizados também mostraram que a acidificação de diversas combinações de solventes orgânicos não aumentou a capacidade de extração de compostos antioxidantes em relação ao não acidificados (KIM et al., 2006; MICHIELS et al., 2012; BOEING et al., 2014). Outro estudo apresentou resultados mostrando que apesar de geralmente a elevação do pH aumentar consideravelmente a oxidação de polifenóis, em folhas de oliveira este fator não apresentou influência significativa, sendo seus compostos bastante estáveis em pH 6 (MYLONAKI et al., 2008). Ainda, uma pesquisa que quantificou antocianinas do milho roxo através da técnica de HPLC teve melhores resultados quando a acidificação não foi empregada (LAO; GIUSTI, 2016).

Sendo assim, baseado nos resultados obtidos no presente trabalho e dos fatores abordados anteriormente, as análises do planejamento experimental foram realizadas sem a acidificação das amostras. Futuramente, visa-se realizar um planejamento para estudar a eficácia ou não de diferentes concentrações de ácido no processo de extração, assim como analisar se há diferença entre resultados de amostras acidificadas que sejam ou não tratadas com ultrassom.

## **5.2. Análise das superfícies de resposta para a capacidade redutora (Folin Ciocalteu) e capacidades antioxidante (DPPH e ABTS)**

A extração de compostos fenólicos antioxidantes pode ser influenciada por diversos parâmetros, dentre eles o solvente utilizado (NACZK; SHAIDI, 2004). As matrizes vegetais são constituídas por compostos fenólicos de grande variedade estrutural e conseqüentemente de polaridade também variada, não existindo um solvente padrão universal mais eficiente para este processo (AL-FARSI; LEE, 2008). Os solventes mais empregados segundo a literatura são a acetona, o etanol, o metanol e a água, bem como suas misturas (NACZK; SHAHIDI, 2006; THOURI et al., 2017).

A otimização de uma mistura de solventes pode potencializar consideravelmente o rendimento da extração de compostos fenólicos antioxidantes provenientes de uma dada matriz vegetal. Portanto, o presente trabalho estudou possíveis combinações de solventes orgânicos (acetona e metanol) e água visando o melhor rendimento na extração de compostos fenólicos antioxidantes provenientes dos frutos de *Muntingia calabura*.

A partir dos valores experimentais obtidos das análises da capacidade redutora pelo método de Folin Ciocalteu e da capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS modelos matemáticos foram ajustados às respostas e os coeficientes de regressão foram calculados e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). A **Tabela 4** mostra os modelos, os valores de  $R^2$  (coeficientes de correlação múltipla), o teste F (análise de variância-ANOVA) e de p (significância estatística ao nível de 5%) para cada equação.

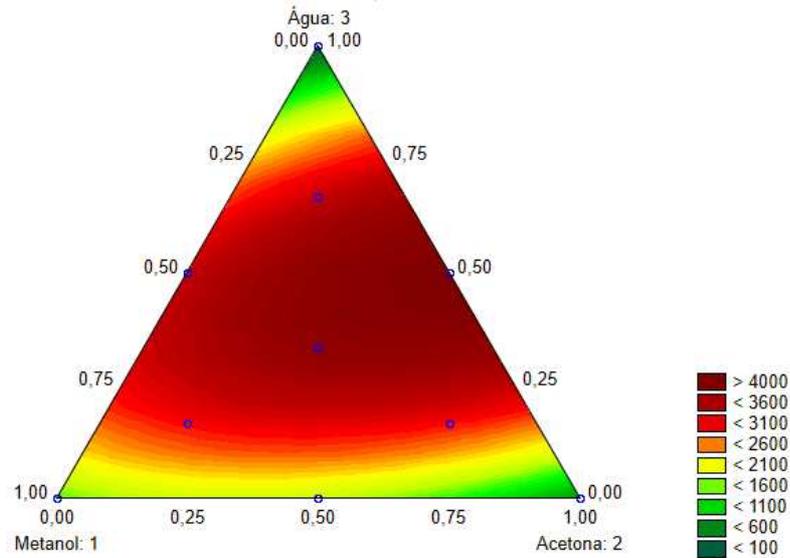
**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística dos modelos.

Análise	Modelo	Equação	F	R <sup>2</sup>	p-valor
Folin Ciocalteau (mg EAG/100 g)	Quadrático	$Y = 1490,72x_1 + 631,10x_2 + 89,70x_3 + 2910,28x_1x_2 + 10107,92x_1x_3 + 15239,48x_2x_3$	12,36	0,90	< 0,05
DPPH (μmol ET/g)	Quadrático	$Y = 205,15x_1 + 95,94x_2 + 151,42x_3 + 469,07x_1x_2 + 1165,71x_1x_3 + 2006,09x_2x_3$	7,50	0,86	< 0,05
ABTS (μmol ET/g)	Linear	$Y = 118,50x_1 + 133,70x_2 + 2724,63x_3$	8,76	0,81	< 0,05

Em que  $x_1$  = metanol,  $x_2$  = acetona,  $x_3$  = água, EAG = equivalente de ácido gálico e ET = equivalente de Trolox.

As equações exibiram valores de R<sup>2</sup> de 0,81, 0,86 e 0,90 para os métodos ABTS, DPPH e de Folin Ciocalteau, respectivamente. Esses resultados indicam que as equações foram capazes de explicar de 81% a 90% da variação dos resultados. Conseqüentemente, todos os modelos foram adequados para prever as respostas de atividade redutora e antioxidante, visto que todos apresentaram um valor de R<sup>2</sup> superior a 0,70, indicando uma boa adequação estatística aos modelos propostos.

As **Figuras 10, 11 e 12** representam as superfícies de respostas para cada uma das equações correspondente às análises efetuadas, possibilitando a visualização dos efeitos das variáveis independentes e suas interações. Cada fator (solvente) está representado em uma extremidade do triângulo equilátero, sendo cada ponto dentro do triângulo condizente a uma proporção diferente dos componentes da mistura. A porcentagem máxima de cada componente considerado pela regressão está na sua extremidade correspondente, o mínimo está no meio do lado oposto do triângulo, e o centro do triângulo representa a mistura dos três solventes em iguais proporções.



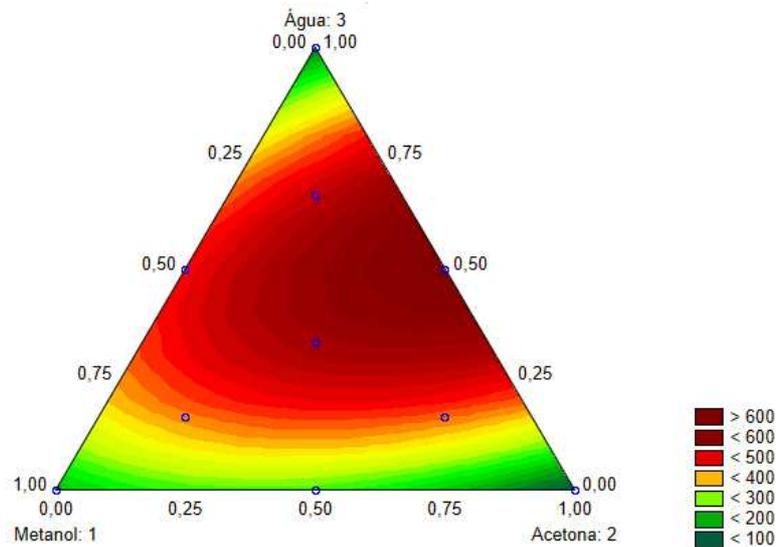
**Figura 10.** Superfície de resposta para a análise da capacidade redutora (Folin Ciocalteu) de compostos fenólicos contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

Conforme apresentado na **Figura 10**, para o método de análise da capacidade redutora por Folin Ciocalteu uma mistura dos solventes acetona e água em uma proporção de 50% foi a mais eficiente obtendo um valor de 3.958,23 mg EAG/100g bs. Misturas contendo metanol e água também se mostraram significativas, apesar de menos eficientes do que o solvente contendo apenas acetona e água. Para todas as outras combinações de solventes os resultados obtidos não foram significativos para  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com demais estudos efetuados para outros frutos. Uma pesquisa conduzida com berries (amora preta, amora silvestre e morango) visando avaliar a eficiência do efeito de solventes (etanol, metanol, acetona e água) na extração de compostos fenólicos revelou que a mistura de acetona e água foi a mais eficiente para todas as berries analisadas (BOEING et al., 2014).

A análise de Folin Ciocalteu permite estimar a quantidade de flavonoides, taninos e compostos fenólicos não flavonoides na amostra (ROESLER et al., 2006), ou seja, é um método de determinação mais abrangente que engloba uma série de compostos que apresentem capacidade redutora. Portanto, para uma análise global preditiva da capacidade redutora de compostos fenólicos do fruto, a mistura de acetona e água demonstrou ser um bom solvente.

A **Figura 11** ilustra a superfície de resposta para a equação correspondente à análise antioxidante pelo método de DPPH.



**Figura 11.** Superfície de resposta para a análise da capacidade antioxidante (DPPH) de compostos fenólicos contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

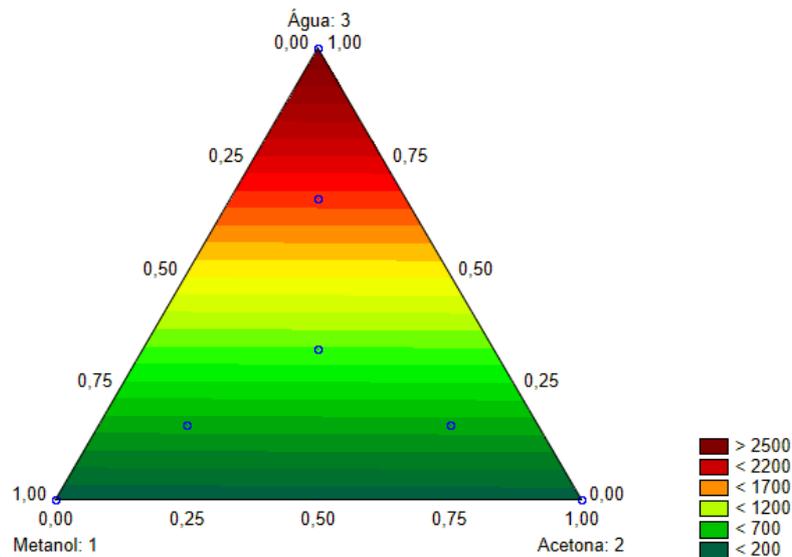
Os resultados obtidos para a análise de DPPH foram significativos apenas para a mistura de solventes contendo acetona e água ( $p < 0,05$ ). Assim como para a análise da capacidade redutora pelo método de Folin Ciocalteu, a melhor proporção de solventes para a extração de compostos fenólicos antioxidantes pelo método de DPPH foi uma mistura de aproximadamente 50% de acetona e 50% de água, com um valor de 581,50  $\mu\text{mol ET/g bs}$ .

O estudo conduzido por Boeing et al. (2014) com berries apresentou resultados semelhantes para a análise de DPPH, concluindo que uma mistura de 50% de acetona e 50% de água obteve a melhor eficiência na extração de compostos fenólicos antioxidantes para amostras de amoras pretas, amoras silvestres e morangos.

Apesar da acetona ter uma baixa eficiência de solvatação (moléculas de acetona são apenas aceptoras de prótons), na presença de água sua eficiência aumenta devido as interações de pontes de hidrogênio entre os sítios polares das moléculas antioxidantes e do solvente. Segundo Alothman, Bhat e Karim (2009) uma mistura de solventes contendo acetona e água oferece bons resultados na extração de compostos fenólicos antioxidantes polares.

No presente trabalho, o fato de as amostras não terem sido acidificadas, apresentando um pH mais elevado, pode ter promovido uma maior solubilidade dos polifenóis a partir da dissociação da maioria dos grupos -OH dos ácidos fenólicos, os tornando mais polares (MYLONAKI et al., 2008) e conseqüentemente favorecendo sua extração na mistura de solventes acetona e água.

A **Figura 12** ilustra a superfície de resposta para a equação correspondente à análise antioxidante pelo método de ABTS.



**Figura 12.** Superfície de resposta para a análise da capacidade antioxidante (ABTS) de compostos fenólicos contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

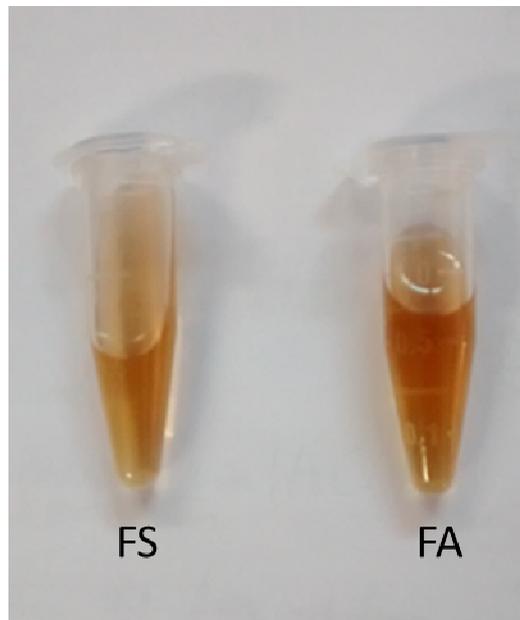
Para a análise da capacidade antioxidante pelo método de ABTS apenas a água como solvente mostrou um resultado significativo ( $p < 0,05$ ), apresentando um valor de 3.331,91  $\mu\text{mol ET/g bs}$ . Este resultado foi divergente em relação ao método de DPPH em que se obteve uma maior eficiência da capacidade antioxidante da amostra para a mistura de solventes de água e acetona.

No entanto, é importante considerar que cada método de análise possui suas próprias particularidades e serão influenciados pelos diversos tipos de radicais e sítios de ação das moléculas, bem como pela polaridade, solubilidade e ação quelante de metais. Ainda, o radical ABTS é mais reativo que o radical DPPH (em que algumas reações secundárias podem levar horas para atingir o estado estacionário) (PEREIRA, 2010).

Por fim, analisando os resultados obtidos pelos três ensaios: Folin Ciocalteu, DPPH e ABTS foi possível concluir que para uma análise global de compostos fenólicos antioxidantes dos frutos de *Muntingia calabura* é aconselhável o uso de uma mistura de solventes de acetona e água numa proporção próxima de 50%.

### 5.3. Análise das superfícies de resposta para flavonoides totais

As amostras analisadas não apresentaram resultado positivo para a presença de flavonoides totais. A averiguação foi feita pela coloração formada, não característica da complexação de flavonoides com cloreto de alumínio, mas sim de provável presença de antocianinas, conforme já averiguado no teste de acidificação (item 5.1). Pois na presença do meio reacional (contendo hidróxido de sódio), tanto a amostra acidificada quanto a amostra não-acidificada apresentaram uma mudança de coloração para amarelo levemente esverdeado (**Figura 13**).



**Figura 13.** Coloração amarela levemente esverdeada da amostra não-acidificada (FS) e acidificada (FA) na presença de meio reacional contendo hidróxido de sódio.

#### 5.4. Análise das superfícies de resposta para taninos condensados

A partir dos valores experimentais obtidos da análise de taninos condensados, a **Tabela 5** contendo o modelo matemático, o coeficiente de regressão, o teste F e os valor de p foi construída.

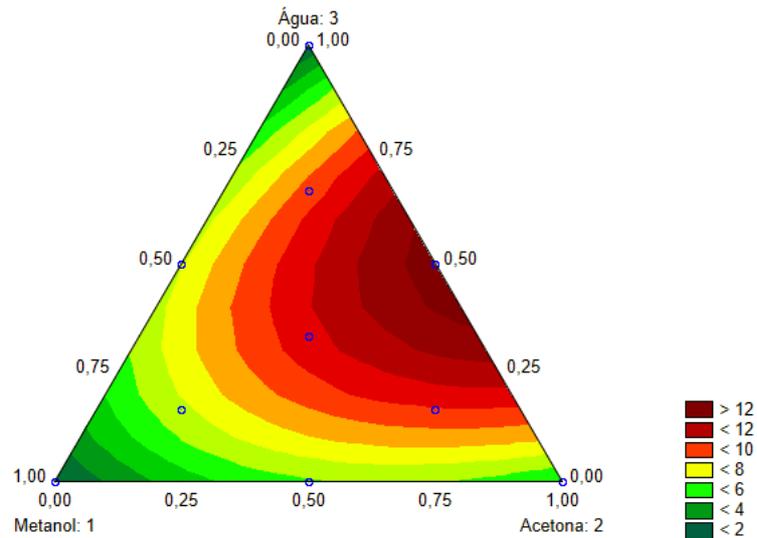
**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística dos modelos.

Análise	Modelo	Equação	F	R <sup>2</sup>	p-valor
Taninos condensados (mg EC/g)	Quadrático	$Y = 1,87x_1 + 4,91x_2 + 2,19x_3 + 9,86x_1x_2 + 19,54x_1x_3 + 39,96x_2x_3$	4,81	0,81	< 0,1

Em que  $x_1$  = metanol,  $x_2$  = acetona,  $x_3$  = água e EC = equivalente de catequina.

O modelo que melhor se ajustou foi o modelo quadrático exibindo um valor de R<sup>2</sup> de 0,81. No entanto, sua probabilidade de significância foi de apenas 10%, quando o ideal e utilizado para as demais análises foi de 5%. A baixa significância estatística provavelmente se deve ao fato de as amostras apresentarem pouca quantidade de taninos condensados em sua composição, sendo necessário utilizá-las em sua concentração máxima para se obter um valor mínimo necessário para a análise.

A **Figura 14** ilustra a superfície de resposta para a equação correspondente à análise de taninos condensados.



**Figura 14.** Superfície de resposta para a análise de taninos condensados contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

Os resultados obtidos para a análise de taninos condensados foram significativos ( $p < 0,10$ ) apenas para a mistura de solventes contendo acetona e água, sendo a melhor proporção corresponde à 50% de cada componente, apresentando um valor de 11,95 mg EC/g bs. Este resultado está em concordância com um estudo que analisou a influência de solventes na extração de taninos condensados em bagaços de uva, demonstrando que maiores rendimentos foram obtidos com misturas aquosas de acetona (BOSSO; GUAITA; PETROZZIELLO, 2016).

### 5.5. Análise das superfícies de resposta do perfil de compostos fenólicos da amostra

O perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de *Muntingia calabura L.* foram identificados utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à um espectrômetro de massa quadripolar triplo equipado com uma fonte de electrospray de ionização (ESI).

A análise foi efetuada em quadruplicata, inicialmente para os compostos de maior concentração na amostra (cianidina-3-O-glicosídeo, galocatequina, ácido elágico e ácido gálico) visando obter as condições ótimas de operação, sendo os demais compostos identificados posteriormente.

Assim como para as demais análises deste trabalho, a partir dos valores experimentais obtidos do perfil de compostos fenólicos por CLUE-EM modelos matemáticos foram ajustados às respostas e os coeficientes de regressão foram calculados e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). A **Tabela 6** mostra o modelo, o coeficiente de correlação múltipla, o teste F e a significância estatística ao nível de 5% para a análise dos compostos fenólicos majoritários dos extratos de *Muntingia*.

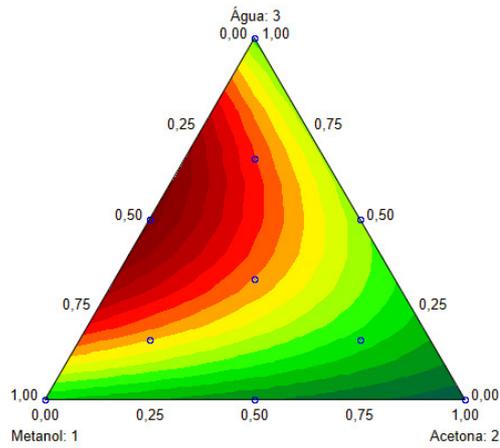
**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística do modelo.

Composto ( $\mu\text{g/g}$ )	Modelo	Equação	F	R <sup>2</sup>	p-valor
Cianidina-3-O-glicosídeo	Quadrático	$Y = 499,49x_1 + 129,82x_2 + 662,64x_3 + 4661,73x_1x_3 + 1353,06x_2x_3$	6,58	0,82	< 0,05
Galocatequina	Quadrático	$Y = 120,93x_1 + 50,59x_2 + 92,340x_3 + 209,50x_1x_3 + 264,08x_2x_3$	3,03	0,70	= 0,1
Ácido elágico	Linear	$Y = 220,49x_1 + 215,04x_2 + 746,55x_3$	9,44	0,73	< 0,05
Ácido gálico	Quadrático	$Y = 225,68x_1 + 117,70x_2 + 1833,03x_3 - 2927,40x_1x_3 - 3060,58x_2x_3$	9,40	0,92	< 0,05

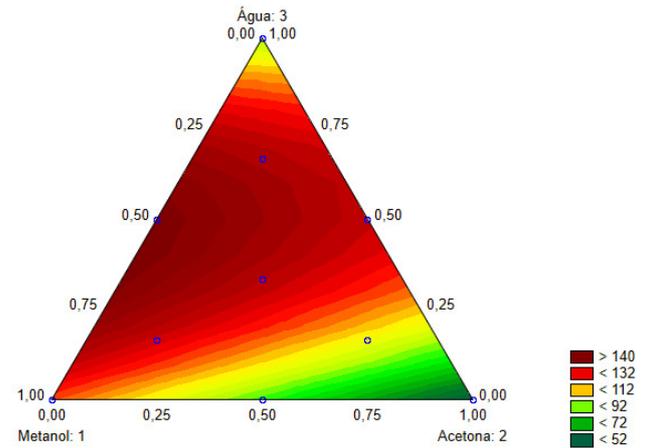
Em que  $x_1$  = metanol,  $x_2$  = acetona e  $x_3$  = água.

Conforme apresentado na **Tabela 6**, os compostos cianidina-3-O-glicosídeo e ácido gálico obtiveram um melhor ajuste matemático com valores de R<sup>2</sup> de 0,82 e 0,92, respectivamente. Enquanto a galocatequina e o ácido elágico apresentaram ajustes matemáticos que explicam apenas 70% e 73% da variação dos resultados, respectivamente. A análise da galocatequina só foi possível com uma probabilidade de significância de 10%, sendo este o composto majoritário presente em menor quantidade na amostra.

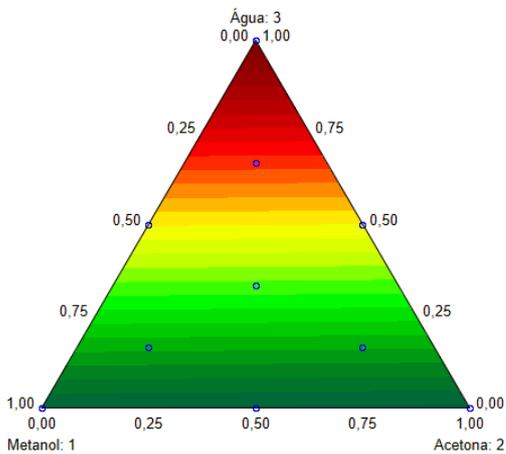
As análises das superfícies de resposta para as equações correspondente aos compostos encontram-se na **Figura 15**.



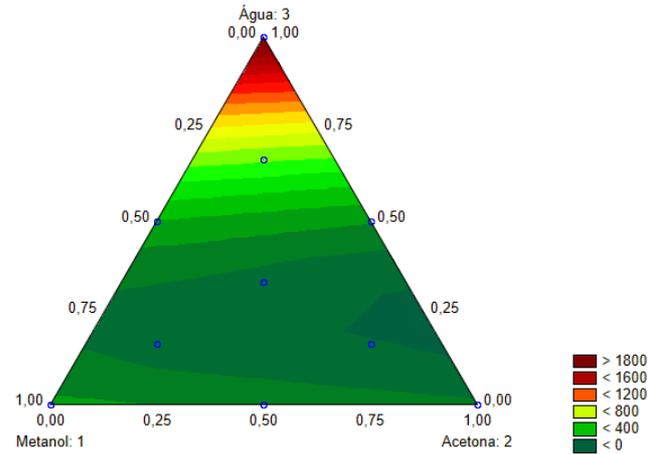
cianidina-3-O-glicosídeo



galocatequina



ácido elágico



ácido gálico

**Figura 15.** Superfície de resposta para a análise de compostos fenólicos por CLUE-EM contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

Para a cianidina-3-O-glicosídeo, apenas a mistura de solventes contendo água e metanol foi significativa ( $p < 0,05$ ) na extração do composto, apresentando um valor ótimo quando a mistura contém 50% de cada componente, obtendo 2.063,50  $\mu\text{g/g}$  bs de cianidina-3-O-glicosídeo. Este resultado foi semelhante para a galocatequina, que também teve seu ponto ótimo de extração em torno de 50% da mistura de cada solvente, com um valor de 164,66  $\mu\text{g/g}$  bs. No entanto, para este composto a mistura da água com a acetona também se mostrou efetiva.

Já para os ácidos elágico e gálico os resultados foram mais expressivos utilizando apenas a água como solvente, obtendo uma extração de 592,49 µg/g bs de ácido elágico e 1.960,76 µg/g bs de ácido gálico. A extração utilizando apenas acetona não foi capaz de extrair uma quantidade significativa de ácido gálico, obtendo um valor próximo de zero.

A eficiência da mistura de solventes contendo metanol e água para a extração da cianidina corrobora com o trabalho conduzido por Dranca e Oroian (2016), que visou a otimização da extração de antocianinas em tratamento com ultrassom, concluindo que uma mistura contendo 54,4% de metanol em água obteve o melhor resultado. As antocianinas são pigmentos fenólicos solúveis em água pertencentes a classe dos flavonóides, o que explica a potencialização da extração por metanol conjuntamente com a água.

A galocatequina é uma proantocianidina (tanino condensado) pertencente à classe dos flavan-3-ol (catequina), ou seja, um produto da biossíntese de flavonóides (MONTEIRO et al., 2005). Visto que ambos os compostos, cianidina-3-O-glicosídeo e galocatequina tem como origem flavonóides, o resultado da otimização da extração ter sido semelhante para ambos sugere que o fator da eficiência do solvente está relacionado à interação entre o solvente e a estrutura química do composto fenólico alvo.

Esta sugestão pode ser confirmada com os resultados obtidos para os ácidos elágico e gálico que também apresentaram resultados semelhantes para a extração (ótima utilizando apenas água como solvente). Ambos os ácidos são compostos pertencentes à mesma classe: ácidos fenólicos capazes de originarem taninos hidrolisáveis a partir da esterificação de grupos hidroxila de açúcares quando glicosilados (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1995).

A eficiência da extração para estes ácidos usando apenas a água como solvente pode ser um resultado promissor, visto que a água é considerada um solvente verde: não tóxica e não agressiva ao meio ambiente.

A otimização da mistura de solventes para a obtenção destes compostos fenólicos majoritários no fruto da calabura é de grande interesse devido às propriedades antioxidantes e funcionais dos mesmos. Dentre os diversos benefícios que estes compostos podem trazer à saúde, a cianidina-3-O-glicosídeo pode apresentar efeitos neuroprotetores multifuncionais (dentre elas propriedades anti-iscêmicas e anti-inflamatórias) e seu consumo crônico tem sido correlacionado

como um auxiliar no declínio cognitivo e neurodegeneração devido ao envelhecimento (KANG et al., 2006; GAO et al., 2012; KRIKORIAN et al., 2012).

Um estudo recente mostrou que a galocatequina pode ser eficiente na prevenção e tratamento de diabetes (WU et al., 2018) enquanto outro estudou sua atividade anti-adipogênica obtendo resultados significativos (LI et al., 2017).

Pesquisas conduzidas com o ácido elágico demonstraram um efeito anti-mutagênico e anti-carcinogênico em ratos (ZHAO et al., 2013), prevenção de doenças cardiovasculares e arterosclerose (GARCÍA-NIÑO; ZAZUETA, 2015) e estimulação da cicatrização de feridas e elasticidade da pele (BAE et al., 2010). O ácido gálico demonstrou ter propriedades antidiabéticas (OBOH et al., 2016), anti-carcinogênicas (VELURI et al., 2006) e anti-hipertensiva (KANG et al., 2015).

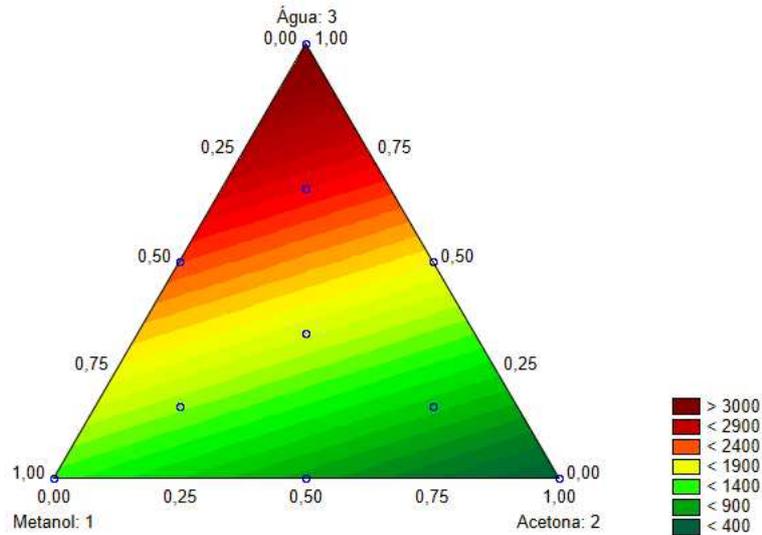
Após a análise desses quatro compostos fenólicos majoritários no extrato, também foram identificados os compostos delphinidina-3-O-glicosídeo e epigalocatequina e um modelo matemático foi ajustado à resposta da soma do total de fenólicos identificados por CLUE-EM, ou seja: cianidina, delphinidina, galocatequina, epigalocatequina, ácido elágico e ácido gálico. A **Tabela 7** mostra o modelo, o coeficiente de correlação múltipla, o teste F e a significância estatística ao nível de 5% para a análise do perfil de compostos fenólicos totais identificados nos extratos de Muntingia.

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística do modelo.

Análise	Unidade	Modelo	Equação	F	R <sup>2</sup>	p-valor
CLUE-EM (fenólicos totais)	µg/g	Linear	$Y = +1345,11x_1$ $+ 366,29x_2$ $+ 3475,35x_3$	14,37	0,80	< 0,05

Em que  $x_1$  = metanol,  $x_2$  = acetona e  $x_3$  = água

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 7**, conclui-se que o modelo matemático linear foi adequado para explicar 80% da variação dos resultados, demonstrando um bom ajuste. A superfície de respostas obtida está ilustrada na **Figura 16**.



**Figura 16.** Superfície de resposta para a análise de compostos fenólicos totais por CLUE-EM contidos nos frutos de *Muntingia calabura* a partir da mistura de solventes metanol, acetona e água.

A análise da superfície de resposta mostrou que tanto a água quanto o metanol apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) na determinação de compostos fenólicos totais por CLUE-EM. No entanto, o valor ótimo e correspondente à 3.434,98  $\mu\text{g/g}$  bs foi obtido quando se usou unicamente a água como solvente.

Este resultado em conjunto com os demais obtidos para os compostos fenólicos majoritários do extrato permite concluir que a otimização do solvente é específica para cada composto. No entanto, para a obtenção da composição de ácidos fenólicos totais por CLUE-EM a água se mostrou mais eficiente que a acetona, o metanol e suas combinações.

## 5.6. Tabela representativa dos resultados

Os resultados obtidos de todas as análises de superfície de respostas para a otimização da mistura de solventes (metano, etanol e água) estão representados na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Representação de todos os resultados obtidos das análises de superfícies de respostas para a otimização de solventes.

<b>Água</b>	<b>Acetona/Água (50%)</b>	<b>Metano/Água (50%)</b>
ABTS	Folin Ciocalteau	Cianidina-3-O-glicosídeo
Ácido elágico	DPPH	Galocatequina
Ácido gálico	Taninos condensados	
Fenólicos totais (CLUE)		

Conforme exposto na **Tabela 8**, de um modo geral a água se mostrou um solvente bastante eficiente na extração da maioria dos compostos fenólicos antioxidantes analisados. Tanto para a análise de extração de fenólicos totais por CLUE quanto para a análise da capacidade antioxidante da amostra pelo método ABTS, a água apresentou melhores resultados em comparação com o metanol e a acetona, bem como suas combinações. Sendo ainda eficiente na extração de ácidos fenólicos.

Estes resultados são significativos e promissores, pois a água é um solvente verde, ou seja, não poluente e atóxico. Outra vantagem relevante é o seu baixo custo em comparação com os solventes orgânicos.

## 6. CONCLUSÃO

---

A acidificação dos extratos dos frutos de *Muntingia calabura L.* com 0,2% de ácido clorídrico concentrado não apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na extração dos compostos fenólicos antioxidantes utilizando os métodos empregados no presente trabalho. No entanto, uma análise aprofundada de diferentes concentrações de ácido clorídrico e sua interação com o tratamento por ultrassom durante o processo de extração pode ser interessante.

A combinação ótima de solventes dependerá tanto do método quanto dos compostos alvos a serem analisados nos frutos. Contudo, como resultado geral, a água foi o solvente mais eficaz na extração de compostos fenólicos antioxidantes. Este é um resultado promissor, pois além de ser um solvente verde, a água possui um baixo custo comparada com os solventes orgânicos frequentemente utilizados em processos de extração.

A análise do perfil de compostos fenólicos da *Muntingia calabura L.* por CLUE-EM obteve uma quantidade significativa de antocianinas e ácidos fenólicos presentes no fruto. Compostos estes, que podem auxiliar na prevenção e/ou tratamento de doenças. Assim, apesar da *Muntingia* ainda ser pouco explorada comercialmente, estudos que comprovem seu potencial funcional e viabilizem a extração de seus compostos fenólicos antioxidantes são relevantes tanto para a indústria quanto para a população.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

---

- Avaliar a interação entre o tratamento com ultrassom e a acidificação
- Estudar o efeito de diferentes concentrações de ácido clorídrico na extração
- Viabilizar comercialmente a extração de compostos fenólicos a partir dos frutos de *Muntingia calabura L.*
- Efetuar estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial farmacológico do ácido gálico
- Investigar os efeitos do consumo dos compostos fenólicos do fruto na prevenção e/ou tratamento de doenças

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução nº 18, 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, 1999.

Agriculture and Agri-Food Canada – AAFC. Consumer trends: functional foods. **Market analyses report**, n. 11061. Ottawa: Agriculture and Agri-Food Canada.

ALBERTI, A. et al. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–158, 2014.

AL-FARSI, M. A.; LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 977–985, 2008.

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.

ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, 2017.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

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.

AYOUB, M.; CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. **Food Chemistry**, v.197, p. 221-232, 2016.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAE, J-Y. et al. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 8, p. 182-190, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, n. 1, p. 280-287, 2015.

BELITZ, H-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3. ed. Garching: Springer, 2004.

BISHAYEE, A. et al. Potential benefits of edible berries in the management of aerodigestive and gastrointestinal tract cancers: preclinical and clinical evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1753-1775, 2015.

BOEING, J. S. et al. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from de berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, 2014.

BORDIGNON Jr., C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183-188, 2009.

BOSSO, A.; GUAITA, M.; PETROZZIELLO, M. Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. **Food Chemistry**, v. 207, p. 162-169, 2016.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 103-109, 1997.

BUHIAN, W. P. C. et al. Bioactive metabolite profiles and antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Muntingia calabura* L. leaves and stems. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 682-685, 2016.

BÜYÜKKARAGÖZ, A. et al. "Consumers awareness, acceptance and attitudes towards functional foods in Turkey". **International Journal of Consumer Studies**, v. 38, n. 6, p. 628-635, 2014.

CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; LÓPEZ, M. C. Determination of tea components with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4427-4435, 2003.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, n. 3, p. 219–224, 1997.

CAPOTE, F. P.; DE CASTRO, M. D. L. Ultrasound in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 249-257, 2007.

CARCIOCHI, R. A.; MANRIQUE, G. D.; DIMITROV, K. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4396-4404, 2015.

CHAMBERS, S.; LOBB, A. Consumer acceptance of functional foods: Soft fruit and lamb. Developments in science & health claims, **ILSI international symposium on functional foods in Europe**, 2007.

CHEN, J. J. et al. Cytotoxic chalcones and flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. **Planta Medica Journal**, v. 71, n. 10, p. 970-973, 2005.

CHEN, X-M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2016.

CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217-225, 2007.

CHOI, J. S. et al. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*). **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 587-595, 2012.

CHUNG, K. T. et al. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

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

CONSTANTINO, C.; PAPAS, A.; CONSTANTINO, A. I. Vitamin E and cancer: an insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 4, p. 739-752, 2008.

DANGLES, O. et al. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. **Journal American Chemical Society**, v. 115, p. 3125-3132, 1993.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena L.*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 637-646, 2016.

DUTHIE, G. G.; GARDNER, P. T.; KYLE, J. A. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 3, p. 599-603, 2003.

EKICI, L. et al. Effects of temperature, time, and pH on the stability of anthocyanin extracts: prediction of total anthocyanin content using nonlinear models. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 1328-1336, 2014.

ESPADA-BELLIDO, E. et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23-32, 2017.

FABRA, M. J. et al. Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 96-103, 2018.

FALCÓ, I. et al. Fostering the antiviral activity of green tea extract for sanitizing purposes through controlled storage conditions. **Food Control**, v. 84, p. 485-492, 2018.

FARAH, A; DONAGELO, C. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 2006.

Food Ingredients-South America. **Alimentos naturais e funcionais conquistam consumidor e indústria no Brasil.** Disponível em: <http://www.fi-events.com.br/pt/multimedia/618-alimentos-naturais-e-funcionais-conquistam-consumidor-e-industria-no-brasil>. Acesso em: 14 jul. 2017.

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

GAO, X. et al. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, p. 1138-1145, 2012.

GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, v. 97, n. 1, p. 84-103, 2015.

GHANEMI, F. Z. et al. Carob leaf polyphenols trigger intrinsic apoptotic pathway and induce cell cycle arrest in colon cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 112-121, 2017.

GIADA, M-L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: SMALL, D. M.; GOBE, G. C. **Biochemistry, genetics and molecular biology: “oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants”**. Intech. 2013.

GOMATHI, R.; ANUSUYA, N.; MANIAN, S. A dietary antioxidant supplementation of Jamaican cherries (*Muntingia calabura L.*) attenuates inflammatory related disorders. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 787-794, 2013.

GONZÁLEZ, C. S-M. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria**, n. 329, p. 19-28, 2002

GONZÁLEZ, C. S-M. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, n. 329, p. 29-40, 2002.

GRIFFITHS, K. et al. Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. **Diseases**, v. 4, n. 3, 2016.

GUINAZ, M. et al. Tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and eggs. **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2009.

GULLON, B. et al. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. **Food Control**, v. 59, p. 94-98, 2016.

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.

HAN, J. et al. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1589–1594, 2011.

HARBORNE, J. B; DEY, P. M. Methods in plant biochemistry. **Academic Press**: London, 1989.

HARBORNE, J. B; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis. 1999.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990.

HEREDIA, F. J. F. et al. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes, pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 491-498, 1998.

HERRERA, M. C.; DE CASTRO, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 7, p. 1106-112, 2004.

HIGDON, J. Vitamin E. Oregon State University-Micronutrient Information Center. Disponível em: < <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-E#antioxidant-activity>>. Acesso em: 29 de setembro de 2018.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.

IRONDI, E. A. et al. Blanching influences the phenolics composition, antioxidant activity, and inhibitory effect of *Adansonia digitata* leaves extract on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and aldose reductase. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 233-242, 2017.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KANEDA, N. et al. Plant anticancer agents, XLVII. New cytotoxic flavonoids from *Muntingia calabura* roots. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 1, p. 196-206, 1991.

KANG, T. J. et al. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-*O*- $\beta$ -d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 391, n. 3, p. 122-126, 2006.

KANG, N. et al. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 764-772, 2015.

KAPRAVELOU, G. et al. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of *in vitro* and *in vivo* experiments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1207-1216, 2015.

KARIMI, A. et al. Determination of antioxidant activity, phenolic contents and antiviral potential of methanol extract of *Euphorbia spinidens* Bornm (Euphorbiaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 759-764, 2016.

KARVELA, E. et al. Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 5, p. 731-742, 2009.

KATSAMPA, P. et al. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 535-543, 2015.

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

KIM, K-H. et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466-473, 2006.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRIKORIAN, R. et al. Concord Grape Juice Supplementation and Neurocognitive Function in Human Aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5736-5742, 2012.

KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, p. 99–107, 2001.

LAMY, E. et al. Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects. In: Combs CA (ed). *Tannins: biochemistry, food sources and nutritional properties*. Nova Science Publishers Inc: Nova Iorque, USA, p. 29-58, 2016.

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.

LAO, F.; GIUSTI, M. Quantification of purple corn (*Zea mays L.*) anthocyanins using spectrophotometric and HPLC approaches: method comparison and correlation. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1367-1380, 2016.

LATTANZIO, V. et al. Chapter 1: Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. In: DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent Advances in Polyphenol Research**. United States: Oxford: Wiley-Blackwell Publishing. 2008.

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.

LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LI, K. K. et al. Gallocatechin gallate (GCG) inhibits 3T3-L1 differentiation and lipopolysaccharide induced inflammation through MAPK and NF- $\kappa$ B signalling. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 159-167, 2017.

LIMA, V. L. A. G. et al. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 927-935, 2006.

- 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.
- LIN, J. T. et al. Molecular mechanisms of the effects of the ethanolic extract of *Muntingia calabura* Linn. fruit on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators in macrophages. **Food and Function**, v. 8, n. 3, p. 1245-1253, 2017.
- LIN, J. T. et al. Effective compounds in the fruit of *Muntingia calabura* Linn. cultivated in Taiwan evaluated with scavenging free radicals and suppressing LDL oxidation. **Food and Function**, v. 8 n. 4, p. 1504-1511, 2017.
- LOPES, J. C.; PEREIRA, M. D.; MARTINS-FILHO, S. Germinação de sementes de calabura (*Muntingia calabura* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n.1, p. 59-66, 2002.
- LOYPIMAI, P.; MOONGNGARM, A.; CHOTTANOM, P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 461-470, 2016.
- 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.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca. 2005.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.
- MARÇO, P. H.; SCARMINIO, I. S. Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, n. 1, p. 138-146, 2007.

Market Research Report. **Functional foods market analysis by product (carotenoids, dietary fibers, fatty acids, minerals, prebiotics & probiotics, vitamins), by application, by end-use (sports nutrition, weight management, immunity, digestive health) and segment sorecasts, 2014 to 2024.** 2016.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209-223, 2015.

MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5834-5841, 2000.

MEINHART, A. et al. Optimization of frying oil composition rich in essential fatty acids by mixture design. **Food Science and Technology**, v. 84, p. 795-803, 2017.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 181-188, 2003.

MICHIELS, J. A. et al. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4., p. 986-993, 2012.

MYLONAKI, S. et al. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 977, p. 2.353-2.359, 2008.

MLCEK, J. et al. Quercetin and its anti-allergic immune response. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 623-637, 2106.

MOGOLLÓN, O. F. C.; GONZÁLEZ-CUELLO, R. E.; LÓPEZ, J. S. G. In vitro antibacterial and antioxidant activity of *Muntingia calabura* fruits extract. **Contemporary Engineering Sciences**, v. 11, n. 18, p. 881-890, 2018.

MOLLET, B.; ROWLAND, I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 483-485, 2002.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOORE, A. B.; FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. Changes in chromatographic profile of anthocyanins of red onion during extraction. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 8., p. 738-743, 1982.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MURRAY, M. et al. An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: marine algal polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 1342-1358, 2017.

MUSHTAQ, M. et al. Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 48, p. 25-32, 2018.

MYLONAKI, S. et al. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 977, p. 2353-2359, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NIVA, M. 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. **Appetite**, v. 48, n. 3, p. 384–393, 2007.

NSHIMO, C. M. et al. Cytotoxic constituents of *Muntingia calabura* leaves and stems collected in Thailand. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n.1, p. 77-81, 1993.

NASIR, N. L. M. et al. Anticarcinogenic activity of *Muntingia calabura* leaves methanol extract against the azoxymethane-induced colon cancer in rats involved modulation of the colonic antioxidant system partly by flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 2102-2109, 2017.

OBOH, G. et al. Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 627-634, 2016.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Hydrolyzable tannins and related polyphenols. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 66, p. 1-117, 1995.

OLOWA, L.; DEMAYO, C. G. Ethnobotanical uses of medicinal plants among the Muslim Maranaos in Iligan city, Mindanao, Philippines. **Advances in Environmental Biology**, v. 9, n. 27, p. 204-215, 2015.

OUSSAID, S. et al. Optimization of the extraction of phenolic compounds from *Scirpus holoschoenus* using a simplex centroid design for antioxidant and antibacterial applications. **Food Science and Technology**, v. 86, p. 635-642, 2017.

OSZMIANSKI, J. et al. Antioxidant tannins from *Rosaceae* plant roots. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 579-583, 2007.

PEIXOTO, A. M. et al. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1998.

PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PENNESI, C. M. et al. Use of isoquercetin in the treatment of Prurigo Nodularis. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 16, n. 11, p. 1156-1158, 2017.

PEREIRA, M. O. S. **Estudo comparativo de métodos de avaliação da capacidade antioxidante de compostos bioativos**. Dissertação de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, 2010.

PEREIRA, G. **Estudo dos parâmetros de extração de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da banana (*MUSA sp.*)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciência de Alimentos, 2015.

PEREIRA, G. A. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante do fruto calabura (*Muntingia calabura L.*). **Brazilian Journal of Food Research**, v. 7, n. 2, p. 67-79, 2016.

PEREIRA, G. A. et al. Carbohydrates, volatile and phenolic compounds composition, and antioxidant activity of calabura (*Muntingia calabura L.*) fruit. **Supplementary material**. Bioflavors and Bioactive Compounds Laboratory, Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, 2018.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75–100, 2009.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela. 2005.

PRATT, D. D.; ROBINSON, R. A synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. **Journal of the Chemical Society**, v. 121, 1992.

RAGAN, M. A.; GLOMBITZA, K. Phlorotannin: brown algal polyphenols. **Progress in Physiological Research**, v. 4, p. 177-241, 1986.

RAHMAN, M.; SOLAIMAN, A. F.; RAHMAN, M. Fruit growth of China Cherry (*Muntingia calabura*). **Botany Research International**, v. 3, n. 2, p. 56-60, 2010.

RAMASAMY, R. et al. Screening of antibacterial activity of *Muntingia calabura* leaves extracts against bacterial pathogens. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 5, p. 313-316, 2017.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.

update. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 10, p. 1803–1853, 2014.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. **Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 1564-1573, 2016.

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. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007

ROTTA, E. M. et al. Determination of antioxidant activity and phenolic compounds of *Muntingia calabura* Linn. peel by HPLC-DAD and UPLC-ESI-MS/MS. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 4, p. 954-963, 2017.

SAINI, R. K.; KEUM, Y-S. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: a review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. **Food Research International**, v. 82, p. 59-70, 2016.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073-2085, 2000.

SCHAUSS, A. G. Polyphenols and Inflammation. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**. San Diego: Academic Press. 2013.

SEPPANEN, C. M.; SONG, Q.; CSALLANY, A. S. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 5, p. 469-481, 2010.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

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

SIBI, G. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Muntingia calabura* fruit extracts against food borne pathogens. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 3, p. 135-136, 2013.

SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 144-158, 2016.

SIRÓ, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-a review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Food Technology**, v. 5., n. 6, p. 679-687, 1994.

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

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of foof: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7., p. 323-331, 2010.

SOUZA, V. T. et al. Characterization of the antioxidant activity of aglycone and glycosylated derivatives of hesperetin: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 2, p. 80-87, 2016.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2007.

STANTON, C. et al. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n. 2, p. 198–203, 2005.

STEWART-KNOX, B. et al. Consumer uptake of functional foods in Europe. International developments in science & health claims. **ILSI international symposium on functional foods in Europe**, 2007.

STRATTON, L. M. et al. Food neophobia is related to factors associated with functional food consumption in older adults. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 133-140, 2015.

SU, B. N. et al. Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, p. 335-341, 2003.

SUFIAN, A. et al. Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 198-204, 2013.

SUI, X.; DONG, X.; ZHOU, W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, v. 163, p. 163-170, 2014.

TAKEUCHI, T. M. et al. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2009.

TENG, H.; LEE, W. Y.; CHOI, Y. H. Optimization of microwave-assisted extraction for anthocyanins, polyphenols, and antioxidants from raspberry (*Rubus Coreanus* Miq) using response surface methodology. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 18, 2013.

THOURI, A. et al. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arehti). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 248, 2017.

TSAMO, C. V. P. et al. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa sp*). **Food chemistry**, v. 167, p. 197–204, 2015.

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

VELURI, R. et al. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-1453, 2006.

VERSCHUREN, P. M. Functional foods-scientific and global perspectives. **ILSI-International Life Sciences Institute**, 2002.

VICENTINI, A.; LIBERATORE, L.; MASTROCOLA, D. Functional foods: trends and development of the global market. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, n. 2, p. 338-351, 2016.

VIEIRA, A. C. P.; CORNÉLIO, A. R.; SALGADO, J. M. Alimentos funcionais: aspectos relevantes para o consumidor. **Jus Navigandi**, ano 10, n.1123, 2011.

Disponível em:

<

<http://jus2.uol.com.br/doutrina/texto.asp?id=8702>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

XAVIER, M. F. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis, 2004.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1874-1905, 2015.

XU, Y. et al. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. **Food Science and Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 125-133, 2016.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WEICHSELBAUM, E.; BUTTRISS, J. L. Polyphenols in the diet. **Nutrition Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 157–164, 2010.

WESTSTRATE, J. A.; VAN POPPEL, G.; VERSCHUREN, P. M. Functional foods, trends and future. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 233-235, 2002.

WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food byproducts of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012.

WU, X. et al. Exploring inhibitory mechanism of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase relevant to postprandial hyperglycemia. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 200-209, 2018.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YI, W. et al. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7320-7329, 2005.

YOUNG, Y. **Functional foods and the European consumer**. In: BUTTRISS, J.; SALTMARSH, M. *Functional foods. II: Claims and evidence*. London: The Royal Society of Chemistry, 2000.

ZAKARIA, Z. A. et al. The in vitro antibacterial activity of *Muntingia calabura* extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 290-293, 2006.

ZAKARIA, Z.A. et al. The antinociceptive activity of *Muntingia calabura* aqueous extract and the involvement of L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in its observed activity in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 365-372, 2006.

ZAKARIA, Z. A. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Muntingia calabura* aqueous extract in animal models. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 443-448, 2007.

ZAKARIA, Z. A. et al. Effects of various nonopioid receptor antagonist on the antinociceptive activity of *Muntingia calabura* extracts in mice. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, v. 29, n. 8, p. 515-520, 2007.

ZAKARIA, Z. A. et al. The antinociceptive action of aqueous extract from *Muntingia calabura* leaves: the role of opioid receptors. **Medical Principles and Practice**, v. 16, n.2, p. 130-136, 2007.

ZAKARIA, Z. A. et al. In vitro antiproliferative and antioxidant activities of the extracts of *Muntingia calabura* leaves. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, n. 1, p. 183-200, 2011.

ZAKARIA, Z. A. et al. Antinociceptive effect of semi-purified petroleum ether partition of *Muntingia calabura* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, 2016.

ZEMESTANI, M.; RAFRAF, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M. Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus. **Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 66-72, 2016.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHAO, M. et al. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. **Cancer Letters**, v. 337, n. 2, p. 210-217, 2013.

ZHEN, J. et al. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673-680, 2016.

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.

## 8. ANEXOS

---



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº AEE5573**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	<b>AEE5573</b>
Usuário:	<b>Taileah Leite Nogueira</b>
CPF/CNPJ:	<b>369.054.138-79</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa</b>
<b>Espécie</b>	
<b>Muntingia calabura</b>	<b>Otimização de uma mistura de solventes para extração de compostos fenólicos antioxidantes a partir dos frutos de Muntingia calabura L.</b>
<b>Equipe</b>	
<b>Taileah Leite Nogueira</b>	<b>UNICAMP</b>
Data do Cadastro:	<b>18/10/2018 17:26:02</b>
Situação do Cadastro:	<b>Concluído</b>



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:22** de **02/12/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**