

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA RAMOS PINTO SAMPAIO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE MURICI VERMELHO
(*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

CURITIBA

2015

CAMILA RAMOS PINTO SAMPAIO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE MURICI VERMELHO
(*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Hoffmann Ribani

CURITIBA

2015

S192c

Sampaio, Camila Ramos Pinto

Caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) em cinco estádios de maturação/ Camila Ramos Pinto Sampaio. – Curitiba, 2015.

102 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Rosemary Hoffmann Ribani .

Bibliografia: p. 91-102.

1. Muricí vermelho. 2. Compostos bioativos. 3. Fitoquímica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ribani, Rosemary Hoffmann. III. Título.

CDD: 583.79

CAMILA RAMOS PINTO SAMPAIO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE MURICI VERMELHO (*Byrsonima ligustrifolia*) EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora: Prof^a. Dr^a. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a. Dr^a. EDNA REGINA AMANTE
Centro de Ciências Agrárias, UFSC


Prof^a. Dr^a. MILENE OLIVEIRA PEREIRA BICUDO
Campus Dois Vizinhos, UTFPR


Dr^a. CRISTIANE VIEIRA HELM
EMBRAPA Florestas


Dr^a. FABIANE HAMERSKI
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 27 de agosto de 2015.

Dedico a todos que de alguma forma
contribuíram para a realização
deste trabalho.

*“A verdadeira ciência não é a que se
incrusta para ornato, mas a que se
assimila para a nutrição.”*

Machado de Assis

RESUMO

Murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia*) é um fruto pequeno, suculento e adstringente cuja cor muda durante o processo de maturação de verde para vermelho, vinho e, por último, roxo quase negro. Como outras *berries*, apresenta potencial para ser uma fonte de compostos bioativos. O teor desses compostos em frutas pode aumentar, diminuir ou não mudar significativamente durante o amadurecimento, e a determinação da melhor combinação de solventes é necessária para uma extração eficiente de fitoquímicos. Assim, o presente trabalho determinou a melhor combinação entre três solventes (acetona, metanol e água) para otimização da extração de compostos fenólicos, por meio do modelo estatístico *Simplex-centroid design* com três pontos axiais e triplicata no ponto central. Em seguida, a capacidade antioxidante de frutos de *B. ligustrifolia* ao longo do processo de maturação foi avaliada pelos métodos de Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH. Compostos fenólicos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de espectrometria de massa (MS/MS) e quantificados por HPLC equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). Além disso, foram analisados flavonóides totais (TF), antocianinas monoméricas totais (TMA) e ácido ascórbico (AA). Os resultados mostraram que a mistura de acetona:metanol (20:80) acidificada com 2% de ácido acético foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos. HPLC-MS/MS permitiu identificar em *B. ligustrifolia*: cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, quercetina e catequina. Seis compostos fenólicos foram quantificados por HPLC-DAD: cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico e catequina. TF e ácidos fenólicos diminuíram com o processo de maturação e apresentaram correlação positiva com a capacidade antioxidante. TMA, cianidina-3-glicosídeo e ácido gálico encontram-se em *B. ligustrifolia* em níveis que são difíceis de encontrar em outras *berries*. AA não mostrou correlação com a atividade antioxidante. Com estes resultados, pode-se afirmar que frutos de *B. ligustrifolia* apresentam potencial como alimento funcional.

Palavras-chave: *Byrsonima ligustrifolia*; maturação; otimização de extração; *simplex-centroid design*; compostos fenólicos; antocianinas; capacidade antioxidante; HPLC-MS/MS; HPLC-DAD.

ABSTRACT

Byrsonima ligustrifolia is an astringent fleshy berry fruit whose colour changes during the maturation process from green to red, vinaceous, and then purple at over-ripe. Like other berries, it can be a source of antioxidant phytochemicals. These compounds in fruits can increase, decrease or not change significantly during successive ripening, and determining the best solvents combination is necessary for an efficient extraction of these compounds. So, the present work determined the best combination between three extraction solvents (acetone, methanol, and water), using Simplex-centroid design with axial points and two replicates at the center point. After that, the antioxidant capacity of *B. ligustrifolia* fruit throughout maturation process was evaluated by Folin-Ciocalteu, ABTS, and DPPH methods, and phenolic compounds were identified by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry detector (MS/MS) and quantified by HPLC equipped with diode arrangement detector (DAD). Besides that, total flavonoids (TF), total monomeric anthocyanins (TMA), and ascorbic acid (AA) were analysed. Results showed that acetone:methanol (20:80) with acetic acid (2%) worked better in extracting phenolic compounds. HPLC-MS/MS allowed identify in *B. ligustrifolia*: cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, and catechin. Six polyphenolic compounds were quantified by HPLC-DAD: cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, and catechin. TF and phenolic acids decreased with maturation process and had positive correlation with antioxidant capacity. TMA, cyanidin-3-glucoside and gallic acid are presented in *B. ligustrifolia* in levels that are difficult to find in other berries. AA did not show correlation with antioxidant activity. With these results, there is a great potential to improve human health through consumption of *B. ligustrifolia* fruit.

Keywords: *Byrsonima ligustrifolia*; maturation; extraction optimization; simplex-centroid design; phenolic compounds; anthocyanins; antioxidant capacity; HPLC-MS/MS; HPLC-DAD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | - FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> | 17 |
| FIGURA 2 | - ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE FLAVONÓIDES | 21 |
| FIGURA 3 | - ESTRUTURA DAS PRINCIPAIS ANTOCIANIDINAS | 22 |
| FIGURA 4 | - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS BENZÓICOS (A) E CINÂMICOS (B) | 23 |
| FIGURA 5 | - EXEMPLOS DE <i>SIMPLEX-LATTICE DESIGN</i> | 25 |
| FIGURA 6 | - <i>SIMPLEX-CENTROID DESIGN</i> PARA TRÊS FATORES COM PONTOS AXIAIS | 26 |
| QUADRO 1 | - COLORAÇÃO E VARIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CULTIVARES DE SEIS ESPÉCIES DE <i>BERRIES</i> ANALISADOS POR PANTELIDIS <i>et al.</i> (2007) | 33 |
| QUADRO 2 | - COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE 14 FRUTOS ANALISADOS POR REYNERTSON <i>et al.</i> (2008) | 34 |
| QUADRO 3 | - COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE OITO FRUTOS ANALISADOS POR RUFINO <i>et al.</i> (2010) | 34 |
| QUADRO 4 | - COMPOSTOS BIOATIVOS EM NOVE <i>BERRIES</i> ANALISADAS POR CONTESSA <i>et al.</i> (2013) | 36 |
| FIGURA 7 | - MUNICÍPIO DE GUARAQUEÇABA E LOCAL DA COLHEITA | 38 |
| FIGURA 8 | - <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 39 |
| FIGURA 9 | - CÍRCULO HUE | 40 |
| FIGURA 10 | - EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 43 |
| FIGURA 11 | - FIRMEZA DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 56 |
| FIGURA 12 | - PROPORÇÃO DE SOLVENTES E VALOR ÓTIMO PREDITO PARA TMA PELO MODELO QUADRÁTICO SEM O COEFICIENTE β_{23} | 64 |
| FIGURA 13 | - PROPORÇÃO DE SOLVENTES E VALOR ÓTIMO PREDITO PARA TPC PELO MODELO QUADRÁTICO SEM O COEFICIENTE β_{23} | 65 |
| FIGURA 14 | - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO QUADRÁTICO PARA TMA SEM O COEFICIENTE β_{23} | 66 |
| FIGURA 15 | - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO QUADRÁTICO PARA TPC SEM O COEFICIENTE β_{23} | 66 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO NÃO HIDROLISADO DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS5, MONITORADO A 520 nm (SISTEMA I) E ESPECTRO UV-VIS DAS ANTOCIANINAS SEPARADAS | 78 |
| FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDOS FENÓLICOS (A), CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS EM EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS (B) E HIDROLISADOS (C) DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS1, MONITORADOS A 280 nm (SISTEMA II) | 81 |
| FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO NÃO HIDROLISADO DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS1, MONITORADO A 280 nm (SISTEMA III) | 82 |
| QUADRO 5 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE FRUTOS DE MURICI VERMELHO | 87 |
| QUADRO 6 - INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DE FRUTOS REGIONAIS BRASILEIROS | 88 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1 | - PARÂMETROS INDIVIDUAIS E TRANSIÇÕES DE CADA COMPOSTO MONITORADO PARA ANTOCIANINAS | 49 |
| TABELA 2 | - PARÂMETROS INDIVIDUAIS E TRANSIÇÕES DE CADA COMPOSTO MONITORADO PARA ÁCIDOS FENÓLICOS, ANTOXANTINAS E ESTILBENOS | 50 |
| TABELA 3 | - CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 55 |
| TABELA 4 | - DIMENSÕES DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 57 |
| TABELA 5 | - AÇÚCARES TOTAIS, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX), ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL E pH DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 58 |
| TABELA 6 | - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 59 |
| TABELA 7 | - <i>SIMPLEX CENTROID DESIGN</i> PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE TMA E TPC | 60 |
| TABELA 8 | - ANOVA DOS MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS A PARTIR DO SCD* PARA OTIMIZAÇÃO DE SOLVENTES | 62 |
| TABELA 9 | - AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS PARA TMA E TPC | 62 |
| TABELA 10 | - COEFICIENTES DE REGRESSÃO, ERROS PADRÃO E VALORES DE p ESTIMADOS NOS MODELOS QUADRÁTICOS | 63 |
| TABELA 11 | - AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS PARA TMA E TPC SEM O COEFICIENTE β_{23} | 63 |
| TABELA 12 | - COEFICIENTES DE REGRESSÃO, ERROS PADRÃO E VALORES DE p ESTIMADOS NOS MODELOS QUADRÁTICOS SEM O COEFICIENTE β_{23} | 64 |
| TABELA 13 | - VALIDAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS PARA TMA E TPC | 68 |
| TABELA 14 | - TMA E TPC DE POLPA LIOFILIZADA DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EXTRAÍDOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE AMOSTRA:SOLVENTE | 68 |
| TABELA 15 | - ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 70 |

| | |
|--|----|
| TABELA 16 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 73 |
| TABELA 17 - TEMPOS DE RETENÇÃO E INTENSIDADE DOS SINAIS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DETECTADOS EM EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 75 |
| TABELA 18 - ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 77 |
| TABELA 19 - ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZÓICO E ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 80 |
| TABELA 20 - CATEQUINA DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 82 |
| TABELA 21 - ÁCIDO ASCÓRBICO EM FRUTOS DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO | 83 |
| TABELA 22 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> | 85 |
| TABELA 23 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Byrsonima ligustrifolia</i> | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|-------------|---|--|
| ABTS | – | Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| A. Juss. | – | Adrien Henri Laurent de Jussieu |
| ANOVA | – | Análise de variância |
| AOAC | – | <i>Association of Official Agricultural Chemists</i> |
| ATT | – | Acidez total titulável |
| BHA | – | Butil hidroxianisol |
| C3G | – | Equivalente a cianidina-3-glicosídeo |
| DAD | – | Detector de diodos |
| DPPH | – | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| DW | – | Base seca (<i>dry weight</i>) |
| EDTA | – | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ESI | – | <i>Electrospray Ionization</i> (Ionização Por Spray de Elétrons) |
| FW | – | Base fresca (<i>fresh weight</i>) |
| GAE | – | Equivalente a ácido gálico |
| HAT | – | Transferência de um átomo de hidrogênio |
| HPLC | – | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| MS | – | Espectrometria de massas |
| MS/MS | – | Espectro de fragmentação de massa (<i>Tandem-MS</i>) |
| PubChem CID | – | Código de identificação da estrutura química de compostos |
| TF | – | Flavonóides totais |
| TMA | – | Antocianinas monoméricas totais |
| TPA | – | Ácidos fenólicos totais |
| TPC | – | Compostos fenólicos totais |
| SET | – | Transferência de um elétron |
| SST | – | Sólidos solúveis totais |
| SCD | – | <i>Simplex-centroid design</i> |
| SLD | – | <i>Simplex-lattice design</i> |
| RMF | – | Resíduo mineral fixo |
| RS | – | Estádio de maturação (<i>ripening stage</i>) |
| RT | – | Tempo de retenção |
| UV-Vis | – | Ultravioleta e visível |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 <i>Byrsonima ligustrifolia</i> | 16 |
| 2.2 MATURAÇÃO | 18 |
| 2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS | 19 |
| 2.3.1 Compostos fenólicos | 20 |
| 2.3.2 Flavonóides | 20 |
| 2.3.3 Antocianinas | 21 |
| 2.3.4 Ácidos fenólicos | 22 |
| 2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 24 |
| 2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE | 26 |
| 2.5.1 Folin-Ciocalteu | 28 |
| 2.5.2 Método ABTS ^{•+} | 29 |
| 2.5.3 Método DPPH [•] | 29 |
| 2.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 30 |
| 2.7 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM <i>BERRIES</i> | 32 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 MATERIAL | 38 |
| 3.2 ANÁLISES FÍSICAS | 39 |
| 3.2.1 Medida objetiva da cor | 39 |
| 3.2.2 Avaliação da firmeza | 40 |
| 3.2.3 Dimensões dos frutos | 41 |
| 3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 41 |
| 3.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 42 |
| 3.4.1 Delineamento experimental | 42 |
| 3.4.2 Procedimento de extração | 42 |
| 3.4.3 Validação do modelo estatístico | 42 |
| 3.4.4 Seleção da proporção de sólido-líquido | 42 |
| 3.5 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.6 | HIDRÓLISE DE ÁCIDOS FENÓLICOS | 44 |
| 3.7 | FLAVONOIDES TOTAIS (TF) | 44 |
| 3.8 | ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (TMA) | 45 |
| 3.9 | COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TPC) | 45 |
| 3.10 | CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS ^{•+} | 46 |
| 3.11 | CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH [•] | 46 |
| 3.12 | IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-MS/MS | 47 |
| 3.13 | QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD | 51 |
| 3.14 | DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO | 52 |
| 3.15 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 53 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 4.1 | ANÁLISES FÍSICAS | 54 |
| 4.1.1 | Medida objetiva da cor | 54 |
| 4.1.2 | Avaliação da firmeza | 55 |
| 4.1.3 | Dimensões dos frutos | 56 |
| 4.2 | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 58 |
| 4.3 | OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 60 |
| 4.3.1 | Otimização da extração por meio de <i>Simplex-centroid design</i> | 60 |
| 4.3.2 | Validação do modelo | 67 |
| 4.3.3 | Seleção da proporção de sólido-líquido | 67 |
| 4.4 | FLAVONOIDES TOTAIS (TF) | 69 |
| 4.5 | ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (TMA) | 71 |
| 4.6 | CAPACIDADE ANTIOXIDANTE | 72 |
| 4.7 | IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-MS/MS | 74 |
| 4.8 | QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD | 77 |
| 4.8.1 | Antocianinas | 77 |
| 4.8.2 | Ácidos fenólicos | 79 |
| 4.8.3 | Antoxantinas | 82 |
| 4.9 | ÁCIDO ASCÓRBICO | 82 |
| 4.10 | CORRELAÇÃO ENTRE DADOS | 84 |
| 4.11 | VALOR NUTRICIONAL | 87 |
| 5 | CONCLUSÃO | 89 |
| | REFERÊNCIAS | 91 |

1 INTRODUÇÃO

A crescente prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias, tem levado ao aumento do interesse no consumo de alimentos com alto valor nutracêutico. Frutas e vegetais são excelentes fontes de compostos bioativos, cujo consumo tem sido associado à prevenção de doenças. Este efeito protetor é, em parte, atribuído aos antioxidantes dietéticos incluindo ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e compostos fenólicos.

Frutas pequenas e coloridas conhecidas como *berries* são excelentes fontes alimentares de compostos antioxidantes. Os compostos fenólicos formam o principal grupo de fitoquímicos nesses frutos, cujos subgrupos incluem: flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos e taninos. São metabólitos secundários de plantas produzidos para a proteção contra os raios ultravioleta, insetos, vírus e bactérias, cuja composição depende de alguns fatores, como genótipo da planta, estágio de maturação, localização geográfica, condições climáticas e ambientais durante o crescimento e pós-colheita. Este perfil fitoquímico, por sua vez, influencia diretamente a capacidade antioxidante das frutas.

Murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) é um fruto subutilizado que, no Brasil, está geograficamente distribuído por toda região sudeste e sul. É um fruto pequeno, colorido, suculento e adstringente, podendo, portanto, ser classificado como *berry*.

As frutas são normalmente consumidas na fase ótima de maturação determinada por atributos sensoriais. No entanto, os frutos imaturos são geralmente ricos em compostos bioativos. Assim, se o objetivo é utilizar a fruta na indústria de alimentos como um ingrediente com propriedades funcionais, o conhecimento de alterações na composição do fruto ao longo do processo de desenvolvimento é essencial para selecionar o estágio de maturação mais adequado.

A composição e o conteúdo de compostos fenólicos, bem como a capacidade antioxidante de algumas *berries*, como cereja (*Prunus avium*), amora (*Rubus* sp.), uva (*Vitis* sp.), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), *cranberry* (*V. macrocarpon*), açai (*Euterpe oleracea*), framboesa (*R. ideaus*), acerola (*Malpighia emarginata*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e morango (*Fragaria x ananassa*), por exemplo, são

amplamente estudadas ao redor do mundo. No entanto, até a realização do presente estudo, não foram encontradas na literatura científica informações sobre caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia*).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características físico-químicas, a capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) em cinco estádios de maturação.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química de frutos de *Byrsonima ligustrifolia* em cinco estádios de maturação.
- Determinar a melhor condição para extração de compostos fenólicos de frutos de *B. ligustrifolia*.
- Definir a capacidade antioxidante de *B. ligustrifolia* em cinco estádios de maturação.
- Identificar e quantificar os compostos bioativos presentes na polpa de frutos de *B. ligustrifolia* nos cinco estádios de maturação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Byrsonima ligustrifolia*

O Brasil é um país de dimensões continentais constituído por regiões e estados famosos por sua riqueza e variedade de recursos naturais (BRASIL, 2015). No entanto, existem muitos alimentos nutritivos e saborosos que ainda são desconhecidos pela maior parte da população, não tendo suas propriedades sensoriais e nutritivas exploradas e reconhecidas. É o que muitos trabalhos científicos denominam de alimento subutilizado, destacando-se, nesse contexto, os frutos nativos do cerrado e da mata atlântica, como é o caso do murici vermelho.

Murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.¹) é uma fruta pertencente à família Malpighiaceae, da qual também faz parte a acerola (*Malpighia emarginata*), fruta amplamente conhecida especialmente pelo alto teor de vitamina C. Essa família apresenta em torno de 1300 espécies em 77 gêneros, sendo *Byrsonima* um dos maiores gêneros, com aproximadamente 150 espécies (DAVIS; ANDERSON, 2010; MARIUTTI *et al.*, 2014).

Apesar do elevado número de espécies, normalmente o gênero é conhecido devido ao fruto denominado apenas murici (*B. crassifolia*), que diferencia-se fisicamente do murici vermelho por sua coloração amarela quando maduro. Segundo Brasil (2015), murici está distribuído por toda a Amazônia brasileira, atingindo os estados de Mato Grosso e Minas Gerais, sendo encontrado em savanas, cerrado, campos e matas costeiras.

A árvore de *B. ligustrifolia* pode alcançar de 4 a 7 metros de altura e apresenta copa arredondada e ramificada, com folhas opostas, elíptico ovaladas, 4,5-8,5 cm de comprimento e 1,6-2,2 cm de largura, ápice agudo e base cuneiforme. As flores apresentam pétalas brancas com pedúnculo rosa claro (FIGURA 1).

¹ A. Juss. (ou Adr. Juss.) é a abreviatura padrão usada para indicar **Adrien Henri Laurent de Jussieu** como autoridade na descrição e classificação científica da espécie.

No Brasil, essa espécie nativa encontra-se geograficamente distribuída na Bahia, nos quatro estados da região Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e nos três da região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) (MAMEDE; FRANCENER, 2014). No Paraná, em particular, a floração ocorre de novembro a dezembro e a frutificação, de janeiro a março.

Murici vermelho é um fruto succulento e adstringente que pode ser consumido *in natura* ou ser despulpado para o preparo de sucos e doces com cor e sabor apreciáveis. Durante o processo de maturação, a cor das frutas muda do verde para o vermelho, vinho, chegando ao roxo quase negro no estágio final de desenvolvimento (FIGURA 1).



FIGURA 1 – FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia*

Coffani-Nunes, Azzolini e Morgante (2012) avaliaram a morfologia do fruto e concluíram que sua forma varia de esférica a oval, com altura entre 0,82 e 1,09 cm e diâmetro de 1,02 a 1,54 cm. Segundo, ainda, esses autores, a massa média dos frutos é $1,03 \pm 0,21$ g com a semente compreendendo apenas 10,7% desse valor.

Por ser uma fruta pequena, colorida, comestível e succulenta, murici vermelho pode ser considerado uma *berry*. Este é um termo em inglês usado para designar um grupo de frutas que apresentam essas características, do qual também fazem parte: acerola, pitanga, uva, framboesa, amora, açaí, juçara, mirtilo, cereja, dentre outras.

Muitos estudos com esse tipo de fruta têm demonstrado que *berries* (plural de *berry*) são fontes excepcionais de compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes (SZAJDEK; BOROWSKA, 2008; PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 2010; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014).

2.2 MATURAÇÃO

A fase final do desenvolvimento é marcada pelo crescente acúmulo de reservas e expansão dos tecidos, o que acarreta no aumento gradativo de massa, diâmetro e altura dos frutos (MANICA *et al.*, 2003). Uma vez encerrada a fase de desenvolvimento propriamente dita, quando o fruto e suas células adquirem o tamanho máximo, tem início o processo de maturação (KERBAUY, 2012).

O amadurecimento de frutos caracteriza-se por transformações que incluem alteração de cor, amolecimento de tecidos, transformação de amido ou ácidos em açúcares, por exemplo, tornando-os, assim, atraentes para o consumo. Essas transformações resultam de alterações na expressão de genes, nas atividades de enzimas, e em modificações no perfil de compostos fenólicos (SPEIRS; BRADY, 1991; LIMA *et al.*, 2005; AABY; REMBERG, 2014; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014; EICHHOLZ; HUYSKENS-KEIL; ROHN, 2014).

A modificação da cor, evidência mais perceptível do início da maturação, ocorre devido à degradação da clorofila e ao acúmulo de carotenóides e/ou de flavonóides. Portanto, no que diz respeito aos pigmentos, o amadurecimento pode ser caracterizado como dois movimentos simultâneos, opostos e coordenados: um biossintético e outro degradatório. A alteração da textura (amolecimento) deve-se a modificações da estrutura da parede celular (hidrólise de polímeros) e diminuição do turgor celular em resposta ao aumento na concentração de solutos nos espaços da parede celular e ao seu afrouxamento. As alterações no sabor, aroma e qualidade nutricional são decorrentes de mudanças profundas nos padrões de açúcares e ácidos, e do aumento de substâncias voláteis (KERBAUY, 2012).

São muitas e variadas as substâncias acumuladas nos frutos durante o amadurecimento, destacando-se os açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais, vitaminas, aminoácidos e proteínas. Este acúmulo de substâncias acarreta no aumento do teor de sólidos solúveis, medidos em °Brix, dissolvidos na polpa. Esta determinação muitas vezes representa uma medida indireta do teor de açúcares, que aumentam com a maturação por meio de processos sintéticos ou pela degradação de polissacarídeos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Metabólitos secundários, também denominados compostos bioativos, são produzidos ao longo do processo de maturação dos frutos, tendo como matéria-prima substâncias do metabolismo primário, e estimulados por condições de

estresse como infecções, fermentos, níveis elevados de radiação ultravioleta, ataques de organismos patogênicos, por exemplo (ROBARDS, 2003; MANACH *et al.*, 2004; ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2010). Quanto mais maduro, menos adstringente é o fruto. Isto ocorre devido ao fato dessa adstringência estar relacionada à presença de taninos, acumulados mais intensamente em frutos verdes para atuar como substâncias de defesa (KERBAUY, 2012). Desta forma, o perfil de compostos bioativos e a capacidade antioxidante dos frutos variam conforme o estágio de maturação. Porém, a literatura científica sobre o desenvolvimento desses compostos ao longo do processo de maturação ainda é escassa (EICHHOLZ; HUYSKENS-KEIL; ROHN, 2014).

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos incluem uma série de compostos que variam extensamente em estrutura química (esteróis de vegetais, carotenóides, indóis e compostos fenólicos, por exemplo) e, conseqüentemente, na função biológica. Entretanto eles apresentam algumas características em comum: pertencem a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas e geralmente de baixa massa molecular e não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano. Além disso, apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas, destacando-se: atividade antioxidante, modulação de enzimas de detoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, e atividade antibacteriana e antiviral (HORST; LAJOLO, 2009).

Estudos que abordam principalmente uma dieta rica em alimentos de origem vegetal sugerem que esses são capazes de exercer influência na redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (MANACH *et al.*, 2004). Isso tem atraído a atenção, não só de pesquisadores, mas também das indústrias alimentícias que empenham esforços no desenvolvimento de alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos, conhecidos como alimentos funcionais.

2.3.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos ou polifenóis formam o principal grupo de compostos bioativos em *berries* e representam um amplo e numeroso grupo de moléculas encontradas em hortaliças, frutas, cereais e em diversos outros alimentos de origem vegetal, como chás, café, cacau, vinho, soja etc. Nas plantas, eles exercem função de fotoproteção, defesa contra microrganismos e insetos, além de serem responsáveis pela pigmentação e por algumas características sensoriais dos alimentos (MANACH *et al.*, 2004; SEERAM, 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

Com base no número de anéis de fenol e na maneira pela qual esses anéis ligam-se uns aos outros, os polifenóis são classificados em famílias: flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (MANACH *et al.*, 2004).

Esses compostos têm recebido muita atenção da comunidade científica por seus numerosos efeitos biológicos, como sequestro de espécies reativas de oxigênio, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como por seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório (HORST; LAJOLO, 2009). Além disso, são efetivos doadores de hidrogênio e essa capacidade antioxidante é dependente do número e da posição dos grupamentos hidroxilas e sua conjugação (VOLP *et al.*, 2008).

2.3.2 Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos em plantas, frutas, verduras, sementes e flores. Sua estrutura básica consiste de dois anéis aromáticos interligados via cadeia heterocíclica do pirano, ou seja, apresenta 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis (denominados A, B e C), em uma configuração 6:3:6 (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; VOLP *et al.*, 2008).

Conforme o estado de oxidação e o perfil de substituições do anel C (pirano), têm-se diferentes classes de flavonóides, como: antocianidinas, flavanóis (ou catequinas), flavonóis (rutina e quercetina, por exemplo), flavanonas, flavonas, isoflavonas entre outros (FIGURA 2). Também de acordo com a posição em que o anel B encontra-se ligado ao anel C, estes compostos podem receber o tradicional nome de: flavonóides – quando o anel B está ligado ao carbono 2 do anel C; isoflavonóides – quando o anel B está ligado ao carbono 3 do anel C; e

neoflavonóides - quando o anel B está ligado ao carbono 4 do anel C (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; MARAIS *et al.*, 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007; VOLP *et al.*, 2008).

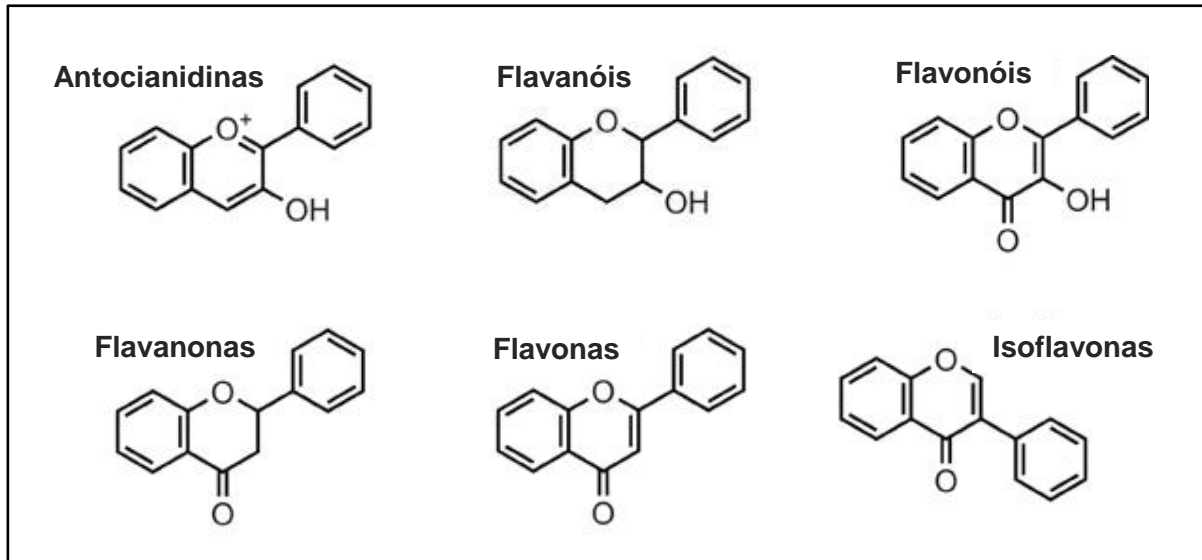


FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE FLAVONÓIDES
 FONTE: Adaptado de MARÇO, POPPI e SCARMINIO (2008)

Além de poderem estar ligados entre si, muitos flavonóides são encontrados na forma de glicoconjugados, os quais podem estar ligados a carboidratos via grupos hidroxílicos, dando origem aos O-glicosídeos, ou ainda ligados diretamente a carbonos, na forma de C-glicosídeos (JUSTESEN, 2000; ES-SAFI; GUYOT; DUCROT, 2006).

De acordo com as nuances de cores, os flavonóides podem ser classificados em dois grandes grupos: antocianinas, cujas cores variam do vermelho ao azul, e antoxantinas, variando do incolor ao amarelo (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

2.3.3 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares de muitas frutas, hortaliças, folhas e flores, responsáveis pelas colorações vermelha, púrpura e azul. As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirílium), representado na Figura 3. São glicosídeos que apresentam uma molécula de açúcar quase sempre na posição 3 do anel C. Em contraste com outras partes das plantas, as frutas são caracterizadas por uma maior

quantidade de monossacarídeos em comparação aos dissacarídeos. Como produtos de sua hidrólise, obtém-se o componente glicídico e a aglicona denominada antocianidina (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; DE-BRITO *et al.*, 2007; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008; VOLP *et al.*, 2008).

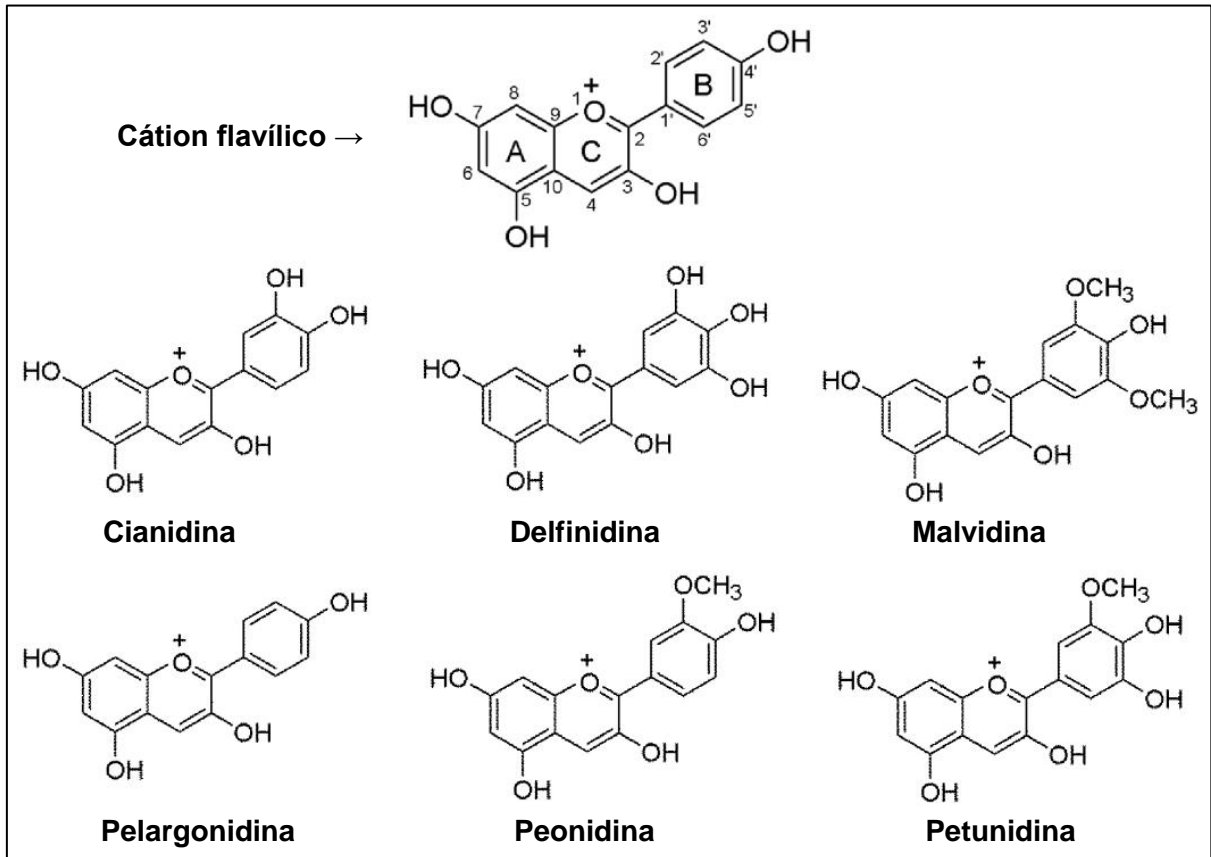


FIGURA 3 – ESTRUTURA DAS PRINCIPAIS ANTOCIANIDINAS

FONTE: Adaptado de YUAN *et al.* (2012)

As seis antocianidinas mais amplamente encontradas em alimentos de origem vegetal são: cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina (FIGURA 3), sendo cianidina a mais comum. A cor de cada tipo de antocianidina depende, fundamentalmente, da quantidade de grupos hidroxila (OH) ou metila (CH₃) ligados ao anel B da molécula (KERBAUY, 2012).

2.3.4 Ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos são considerados um dos componentes funcionais dos frutos, podendo representar cerca de um terço dos compostos fenólicos na alimentação humana. Além de inibirem a formação de radicais livres e inativarem

espécies radiculares, algumas vezes funcionam como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo e, conseqüentemente, prevenindo danos ao DNA (RAMALHO; JORGE, 2006; GRUZ *et al.*, 2011).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais, ácidos hidroxibenzoico e ácidos hidroxicinâmicos, ambos derivados de ácidos não fenólicos: benzoico e cinâmico, respectivamente. Quimicamente, estes compostos têm pelo menos um anel aromático em que pelo menos um átomo de hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (GIADA, 2013; HELENO *et al.*, 2015).

Os ácidos hidroxibenzoicos são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, sendo os principais: gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatequínico, vanílico, siríngico, gentísico e salicílico. Entre os ácidos hidroxicinâmicos, *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico são os mais comuns na natureza (GIADA, 2013). A estrutura química dos principais ácidos benzoicos e cinâmicos pode ser observada na Figura 4.

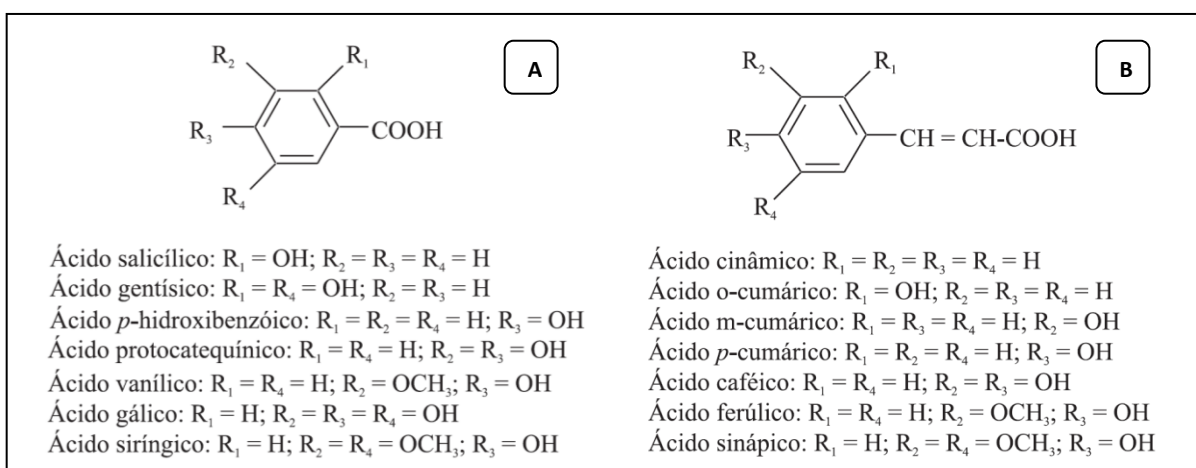


FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS ÁCIDOS BENZOICOS (A) E CINÂMICOS (B)
 FONTE: RAMALHO e JORGE (2006)

2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Extração é o primeiro e mais importante passo na determinação de compostos bioativos de frutas. O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado, quanto do método aplicado. Diversos métodos têm sido empregados para a extração de compostos fenólicos de produtos vegetais. No entanto, quando o objetivo principal é a quantificação desses compostos e/ou a determinação de sua capacidade antioxidante, a extração utilizando solventes orgânicos acidificados ainda é o método mais empregado.

Nesse caso, a concentração e a proporção entre solventes, bem como a relação entre o volume de solvente e a massa de amostra, são os parâmetros mais importantes que afetam a eficiência da extração (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; ILAIYARAJA *et al.*, 2015). Diferentes solventes têm sido empregados para a extração de compostos fenólicos de vegetais, sendo comumente utilizados: água, etanol, metanol e/ou acetona, ou a misturas destes (SUN; HO, 2005; BORGES *et al.*, 2011; BACHIR BEY *et al.*, 2014).

Na extração com solventes orgânicos acidificados, ocorre desnaturação das membranas celulares e consequente solubilização dos pigmentos antioxidantes. O ácido tende a estabilizar os compostos de interesse, mas também pode ser responsável por mudar a forma nativa do pigmento no tecido pela quebra das associações com metais, co-pigmentos e/ou outros compostos (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2003).

A otimização da extração de compostos antioxidantes pode ser alcançada por meio do emprego de métodos empíricos ou estatísticos (BACHIR BEY *et al.*, 2014). Assim, quando o objetivo é estudar a melhor combinação de solventes, que permite extrair os principais compostos de interesse, uma técnica estatística multivariada para otimização de misturas é necessária devido à possibilidade de avaliar todas as proporções de solventes (0-100%), utilizando um número reduzido de experimentos.

O experimento com misturas é diferente do usado em planejamento fatorial simples, pois no primeiro os componentes dependem da proporção dentro do conjunto, ou seja, são dependentes e no segundo são independentes. Dessa forma, o espaço experimental dimensional delimitado pelo número de componentes e sua proporção máxima e mínima pré-estabelecidas, denominado de *simplex*, tem uma

dimensão a menos do que o número de componentes ($q - 1$). Assim, um experimento com dois componentes ($q=2$) é expresso como uma reta, com três componentes ($q=3$), um triângulo e com quatro componentes ($q=4$), um tetraedro (WANG; FANG, 2010).

Dentro do espaço *simplex* são montados planejamentos de experimentos que permitem a estimativa de modelos matemáticos que irão representar o comportamento do sistema de misturas, percorrendo todo o espaço experimental.

Dois tipos diferentes de modelos são comumente empregados em experimentos com misturas: *simplex-lattice design* e *simplex-centroid design*. Ambos avaliam a superfície de resposta dos vértices e dos lados de um triângulo. Em *simplex-lattice designs*, $m+1$ proporções igualmente espaçadas são testadas para cada fator ou componente do modelo ($x_i = 0, 1/m, 2/m, \dots, 1; i = 1,2,\dots,q$) e todas as combinações de níveis de fatores são testadas. O modelo resultante é chamado de $\{q,m\}$ *simplex-lattice design* (FIGURA 5) (MONTGOMERY, 2009).

Uma alternativa para as definições introduzidas por Scheffé (1963) é o chamado *simplex-centroid design*, onde as diferentes condições testadas formam um triângulo, com componentes puros no vértice, o que representa 100% de cada solvente, os pontos médios de cada lado representam permutações das misturas binárias ($1/2 \ 1/2 \ 0; 1/2 \ 0 \ 1/2; 0 \ 1/2 \ 1/2$), e, o ponto do centro, uma mistura ternária (1:1:1). A este modelo podem ser incluídos pontos interiores (pontos axiais) que representam $2/3$ de um dos solventes e $1/6$ para os outros dois (FIGURA 6).

| $\{q=3, m=3\}$ | | | $\{q=3, m=2\}$ | | |
|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| β_1 | β_2 | β_3 | β_1 | β_2 | β_3 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 1/3 | 2/3 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0 |
| 1/3 | 0 | 2/3 | 0.5 | 0 | 0.5 |
| 0 | 1/3 | 2/3 | | | |
| 2/3 | 1/3 | 0 | | | |
| 2/3 | 0 | 1/3 | | | |
| 0 | 2/3 | 1/3 | | | |
| 1/3 | 1/3 | 1/3 | | | |

FIGURA 5 – EXEMPLOS DE *SIMPLEX-LATTICE DESIGN*

FONTE: Adaptado de MONTGOMERY (2009)

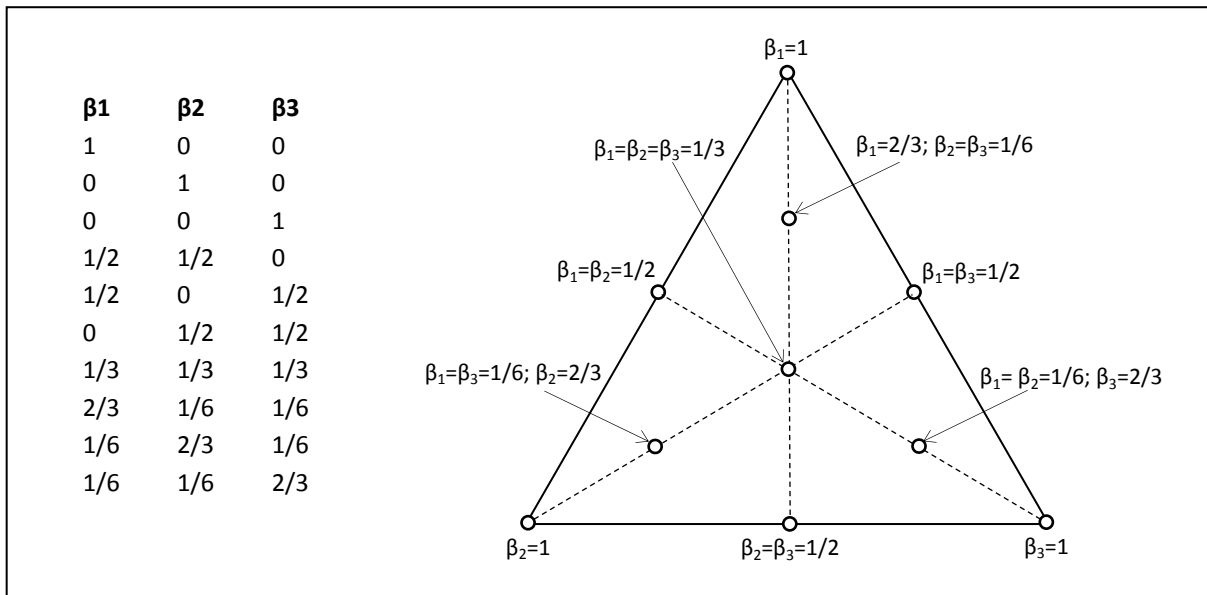


FIGURA 6 – SIMPLEX-CENTROID DESIGN PARA TRÊS FATORES COM PONTOS AXIAIS
 FONTE: Adaptado de MONTGOMERY (2009)

Esta técnica de análise estatística multivariada para otimização de misturas permite estudar todas as proporções entre os solventes (0-100%) utilizando um reduzido número de experimentos, além de permitir examinar possíveis efeitos de interação entre as variáveis (MONTGOMERY, 2009).

Este modelo permite a avaliação de modelos linear (β_1 , β_2 e β_3), quadrático (β_{12} , β_{13} e β_{23}) e cúbico (β_{123}) (Eq. (1)) para as respostas em estudo.

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad \text{Eq. (1)}$$

2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A eliminação dos radicais livres é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e isso forma as bases para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). A produção desses radicais ocorre constantemente no organismo humano devido às atividades metabólicas normais e à exposição a fatores que levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*, ROS), como poluição, fumo, estresse etc.

Os radicais livres mais prejudiciais produzidos no corpo humano são ROS e espécies reativas de nitrogênio (*Reactive nitrogen species*, RNS). O radical livre superóxido ($O_2^{\bullet-}$) também leva à formação de outras ROS como H_2O_2 , peroxinitrito

(ONOO⁻) e radicais hidroxila (OH[•]) (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). Os radicais livres gerados podem reagir com o DNA, RNA, proteínas, lipídios e outros elementos oxidáveis, propiciando danos que poderão contribuir para o envelhecimento, para os processos inflamatórios e para o aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, aterosclerose, dentre outras (RUFINO *et al.*, 2010).

Os mecanismos pelos quais esses radicais interferem nas funções celulares não estão completamente elucidados. No entanto, a peroxidação lipídica parece ser um dos mais importantes eventos, que resulta em dano da membrana celular, podendo levar à morte celular. Além disso, sabe-se que radicais livres podem atrair muitos mediadores inflamatórios, contribuindo para uma resposta inflamatória generalizada e dano tissular (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Antioxidantes podem desativar radicais livres por dois mecanismos principais: transferência de um átomo de hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) ou transferência de um elétron (*Single Electron Transfer*, SET). Métodos baseados no mecanismo HAT medem a capacidade de um antioxidante eliminar radicais livres doando hidrogênio. Já os métodos baseados em SET detectam a capacidade de um antioxidante em reduzir um composto (incluindo metais, grupamentos carbonila e radicais livres), por meio da transferência de um elétron (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Na maioria dos casos, qualquer que seja a fase da cadeia oxidativa em que a ação antioxidante é avaliada, um mecanismo comum que envolve uma reação redox se realiza (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Em sistemas biológicos existem, pelo menos, quatro fontes gerais de antioxidantes: enzimas (por exemplo, superóxido-dismutase, glutatiónaperoxidase e catalase); alguns hormônios (estrogênio angiotensina, melatonina etc.); moléculas grandes (albumina, ceruloplasmina, ferritina, outras proteínas); e moléculas pequenas (ácido ascórbico, glutatióna, ácido úrico, tocoferol, carotenóides, (poli)fenóis) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Dentre os polifenóis, por exemplo, as antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (VOLP *et al.*, 2008). A presença de grupos hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B confere uma elevada estabilidade ao radical formado e aumenta a atividade antioxidante das antocianinas. Os grupos hidroxilas

livres na posição 3 do anel C e 5 do anel A são doadores de elétrons. A presença de açúcares na molécula reduz a atividade antioxidante (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

As antocianinas podem, também, carrear diretamente o radical livre, quando são oxidadas por esses, resultando em um radical menos reativo e mais estável. Em outras palavras, esses compostos estabilizam as espécies reativas de oxigênio através de sua reação com o componente reativo do radical. Além disso, esses flavonóides podem atuar induzindo ou inibindo enzimas como cicloxigenases e lipoxigenases, ligadas a processos inflamatórios (VOLP *et al.*, 2008).

Os antioxidantes podem responder de diferentes maneiras a diferentes radicais livres ou agentes oxidantes. Por conta das múltiplas características e dos múltiplos mecanismos reacionais envolvidos na eliminação/desativação de uma ROS por um composto antioxidante, um único ensaio não reflete com precisão todas as reações envolvidas nesse sistema misto e complexo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Além disso, em um único alimento podem ocorrer diversos agentes antioxidantes, com mecanismos reacionais diferentes e, desta forma, a combinação de vários métodos de análise se faz necessária.

Assim, uma série de métodos foi desenvolvida para medir a eficiência de antioxidantes da dieta, quer como compostos puros ou em extratos de alimentos, bem como para determinar a atividade antioxidante do plasma como um indicador da capacidade antioxidante *in vivo* (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). O fundamento da maioria dos métodos baseia-se na mudança de coloração de uma solução na presença de um antioxidante, o que altera a absorbância em espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) (OU *et al.*, 2002).

2.5.1 Folin-Ciocalteu

O ensaio de Folin-Ciocalteu, apesar de ter sido desenvolvido para quantificar fenólicos totais, atualmente tem sido empregado na avaliação da capacidade antioxidante de extratos de amostras vegetais. Isto porque este método baseia-se na redução do reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico a um complexo de cor azul em uma solução alcalina, o que pode ocorrer não só devido à presença de compostos fenólicos, mas, também, pela ação de diversas substâncias antioxidantes não fenólicas como: o ácido ascórbico, glicose, frutose, sulfitos, aminoácidos (tirosina, triptofano) e proteínas que contêm estes aminoácidos. Desta forma, como

o método não é específico para fenólicos totais, a redução do reagente Folin-Ciocalteu por outros compostos redutores leva a uma superestimação dos resultados (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; HUANG, OU e PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; GRUZ *et al.*, 2011; MEDINA, 2011).

2.5.2 Método ABTS^{•+}

O método ABTS é um dos mais comumente utilizados para medir a capacidade antioxidante de compostos em alimentos. Este método baseia-se em uma reação SET, na qual se avalia a capacidade dos antioxidantes de capturar o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)) radical cátion (ABTS^{•+}). Este radical pode ser gerado a partir do ABTS em vários sistemas: enzimaticamente usando mioglobina e quimicamente com MnO₂, persulfato de potássio (K₂S₂O₈) ou radicais peróxido (VILLANO *et al.*, 2004).

O ensaio mioglobina/ABTS foi proposto primeiramente, sendo os antioxidantes adicionados antes da formação do radical. Essa estratégia possui a desvantagem de que os antioxidantes das amostras podem interagir com reagentes, como ocorre com o polifenol quercetina, superestimando a atividade antioxidante. Por esta razão, o radical ABTS^{•+} passou a ser desenvolvido antes da adição da amostra (VILLANO *et al.*, 2004).

A absorvância máxima (λ_{max}) do ABTS mostra-se em comprimentos de onda de 415, 645, 734 e 815 nm. Entre eles, 415 e 734 nm são adotados pela maioria dos pesquisadores para monitorar espectrofotometricamente a reação entre os antioxidantes e o ABTS. A capacidade antioxidante pode ser medida a partir do decréscimo da absorvância do ABTS na presença da amostra teste comparando-se com o decréscimo da absorvância do Trolox em um tempo fixo (4-6 min), e, então, o resultado é obtido como equivalente de Trolox (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

2.5.3 Método DPPH[•]

DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um dos poucos radicais orgânicos de nitrogênio estáveis, que possui uma cor arroxeada. Ele é disponível comercialmente e não precisa ser gerado antes do experimento como o ABTS^{•+}. Este método mede

a capacidade redutora de um antioxidante para DPPH, avaliada pelo decréscimo da absorbância a 515 nm (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O método DPPH é realizado em temperatura ambiente o que elimina o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997). É um teste simples e rápido e necessita apenas de um espectrofotômetro UV-Vis, o que provavelmente explica o seu amplo uso no rastreamento de antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Foti, Daquino e Geraci (2004) sugerem que o mecanismo fundamental do método DPPH é o SET e que a reação do tipo HAT teria uma escassa contribuição devido a mesma ser produzida lentamente em solventes que são receptores do H como o metanol e o etanol. No entanto, alguns autores continuam classificando este método como SET e HAT, por considerarem que o DPPH pode ser neutralizado pelos dois mecanismos, simultaneamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A porcentagem de DPPH[•] remanescente (DPPH[•]_{REM}) é proporcional à concentração de antioxidantes e é calculada por meio da seguinte equação: $\%DPPH^{\bullet}_{REM} = 100 \times [DPPH^{\bullet}]_{REM}/[DPPH^{\bullet}]_{t=0}$ (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998) introduziram um novo parâmetro para expressar a capacidade antioxidante: eficiência antiradical (AE) = $1/(EC_{50} \times t_{EC50})$; onde EC₅₀ é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical; e t_{EC50} é o tempo que essa concentração necessita para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical. Quanto maior for o AE, o antioxidante exercerá sua ação em menor concentração e em menos tempo (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

2.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Em ambos os estudos de perfil e quantificação, as abordagens mais bem sucedidas têm sido baseadas em cromatografia (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). Com o avanço da tecnologia analítica, as análises e identificação de compostos bioativos evoluíram de cromatografia em camada delgada e cromatografia em papel para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD), e, em seguida, HPLC com espectrometria de massas (MS/MS) (WU; PRIOR, 2005).

HPLC-MS/MS é uma excelente ferramenta para a análise qualitativa de compostos fenólicos em extratos de frutos (SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2004; WU; PRIOR, 2005). Sendo uma técnica de alta sensibilidade e rápida análise, costuma ser a primeira escolha nos processos analíticos onde se pretende caracterizar estruturalmente biomoléculas, pois dela é possível obter informações sobre o padrão de fragmentação dos compostos e, por conseguinte, informações sobre a sua estrutura e substituintes (LOPES-DA-SILVA *et al.*, 2002; SOUZA, 2008).

Um espectrômetro de massas é composto por três módulos principais: (1) fonte de íons: responsável pelo processo de ionização das moléculas; (2) analisadores de massas: responsáveis pela separação dos íons de acordo com seu m/z , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos; e (3) detectores: responsável pela detecção e amplificação dos íons (SOUZA, 2008).

Diversas fontes de ionização têm sido utilizadas na identificação de compostos bioativos, incluindo ionização eletrônica, ionização química, ionização química a pressão atmosférica, ionização por dessorção a laser assistida por matriz e ionização por spray de elétrons (ESI – *Electrospray Ionization*) (WU; PRIOR, 2005; SOUZA, 2008). Dentre elas, a ESI-MS tem sido preferida pela maioria dos pesquisadores porque fornece o íon molecular intacto, assim como os íons dos fragmentados. No entanto, espectros de massa por si só não são 100% eficazes na identificação de compostos com o mesmo espectro de massa. Nestes casos, devem ser combinadas outras informações para a identificação de pico (WU; PRIOR, 2005).

Neste contexto, o emprego de HPLC-DAD torna-se uma ferramenta útil para auxiliar a caracterização de compostos bioativos. No caso das antocianinas, por exemplo, os espectros UV-Vis desses compostos permitem obter informações no que diz respeito à natureza da antocianidina e do padrão de substituição da molécula de açúcar: antocianinas apresentam duas principais bandas de absorção, a 499-528 nm e a 270-280 nm. Além disso, as características de retenção na cromatografia de fase reversa estão intimamente relacionadas com a polaridade desses compostos e proporcionam informações sobre a natureza dos açúcares e dos substituintes do anel B. Assim, a ordem de eluição segue o decréscimo na polaridade das antocianidinas na seguinte sequência: delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvinidina. Um dissacarídeo ligado ao carbono 3 do anel C influencia menos a polaridade do que a presença de dois

monossacarídeos nas posições C-3 e C-5 (LOPES-DA-SILVA *et al.*, 2002; MESKIN; BIDLACK; RANDOLPH, 2008).

2.7 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM *BERRIES*

A literatura científica apresenta diversos trabalhos que avaliaram compostos bioativos e a capacidade antioxidante em frutas pequenas e coloridas (*berries*). Alguns desses estudos publicados nos últimos dez anos, com seus principais resultados, estão citados a seguir.

Wu e Prior (2005) identificaram antocianinas em *berries* (framboesa preta, amora, mirtilo, uva Concord, *cranberry*, *marionberry*, framboesa, uva vermelha, morango e cereja doce) por HPLC-MS/MS, e concluíram que cianidina foi encontrada em todas as amostras analisadas e que a glicose foi o monossacarídeo predominante, ligado a agliconas (antocianidinas) para formar antocianinas.

Lima *et al.* (2005) analisaram fenólicos totais em 12 variedades de frutos de acerola (*Malpighia emarginata*) em três estádios de maturação, colhidas em duas estações do ano: seca e chuvosa. Os frutos maduros colhidos na estação seca apresentaram os níveis mais altos de fenólicos totais, variando de 896 a 1888 mg equivalente a catequina em 100 g de fruta fresca (FW = *fresh weight*), dependendo da variedade. Fenólicos totais sofreram degradação ao longo do processo de maturação: a variedade 05, por exemplo, colhida na estação seca, apresentou 3517 e 1508 mg equivalente a catequina/100 g FW, para frutos verdes e maduros, respectivamente.

Mattila, Hellström e Törrönen (2006) determinaram o conteúdo de ácidos fenólicos solúveis e totais em amostras de 29 *berries* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os maiores teores de ácidos fenólicos totais foram encontrados em *rowanberry* (103 mg/100 g FW), *chokeberry* (96 mg/100 g FW), mirtilo (85 mg/100 g FW), *sweet rowanberry* (75 mg/100 g FW) e *saskatoon berry* (59 mg/100 g FW).

Empregando HPLC-DAD, cinco antocianinas foram identificadas, com base no espectro UV-Vis e no tempo de retenção, em frutos de cereja (*Prunus avium*): cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, peonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Pantelidis *et al.* (2007) determinaram o teor de ácido ascórbico, antocianinas e compostos fenólicos totais (TPC) em diferentes cultivares de seis *berries*: framboesa (*Rubus idaeus*), amora preta (*Rubus fruticosus*), híbrido de framboesa x amora preta, *red currant* (*Ribes sativum*), *gooseberry* (*Ribes glossularia*) e *Cornelian cherry* (*Cornus mas*). Os valores mínimos e máximos, por espécie, dos resultados observados para os compostos bioativos citados anteriormente, bem como a coloração desses frutos, dependente da variedade, estão resumidos no Quadro 1.

| Fruto | Coloração | AA ¹ | TA ² | TPC ³ |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Framboesa (<i>Rubus idaeus</i>) | Amarela a vermelha | 16,8 a 37,7 | 1,3 a 49,1 | 1459 a 2494 |
| Amora preta (<i>Rubus fruticosus</i>) | Vermelha-preta | 14,3 a 17,5 | 126 a 152 | 1703 a 2349 |
| Híbrido de framboesa x amora preta | Vermelha a preta | 18,4 a 28,0 | 104 a 198 | 1891 a 2611 |
| <i>Red currant</i> (<i>Ribes sativum</i>) | Amarela a vermelha | 35,6 a 40,0 | 1,4 a 7,8 | 657 a 1193 |
| <i>Gooseberry</i> (<i>Ribes glossularia</i>) | Amarela a vermelha | 20,3 a 24,0 | 2,4 a 43,3 | 127 a 1321 |
| <i>Cornelian cherry</i> (<i>Cornus mas</i>) | Vermelha | 103,3 | 223 | 1592 |

QUADRO 1 – COLORAÇÃO E VARIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CULTIVARES DE SEIS ESPÉCIES DE *BERRIES* ANALISADOS POR PANTELIDIS *et al.* (2007)

FONTE: Adaptado de PANTELIDIS *et al.* (2007)

Nota: ¹ AA = ácido ascórbico (mg/100 g FW); ² TA = antocianinas totais (mg C3G/100 g FW); ³ TPC = compostos fenólicos totais (mg GAE/100 g DW).

Mezadri *et al.* (2008) avaliaram ácido ascórbico (AA), TPC por Folin-Ciocalteu e antocianinas monoméricas totais (TMA) em frutos de acerola, apresentando valores que variaram de 94,4 a 180 mg de AA/100 g FW, de 805 a 1150 mg equivalente ao ácido gálico (GAE)/100 g FW (para TPC) e 4,69 a 5,23 mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo (C3G)/100 g FW (para TMA). Para Silva *et al.* (2014), acerola apresentou, em 100 g de massa seca (DW = *dry weight*), 144,27 mg C3G e 29093 mg GAE, para TMA e TPC, respectivamente.

O Quadro 2 apresenta os valores para antocianinas totais, TPC e capacidade antioxidante pelo método DPPH de 14 espécies de frutas pequenas e coloridas pertencentes à família Myrtaceae, estudadas por Reynertson *et al.* (2008).

Rufino *et al.* (2010) estudaram a capacidade antioxidante e quantificaram compostos bioativos em frutos brasileiros subutilizados, dentre os quais: açaí (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia emarginata*), camu-camu (*Myrciaria dúbia*), jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*), jambolão (*Syzygium cumini*), juçara (*Euterpe edulis*),

murici (*Byrsonima dealbata*) e murta (*Blepharocalyx salicifolius*). Os principais resultados para esses frutos em base fresca (FW) estão apresentados no Quadro 3.

| Fruto | TA ¹ | TPC ² | DPPH ³ |
|--|-----------------------------|------------------|-------------------|
| <i>Eugenia aggregata</i> | 1,26 ± 0,45 | 84,6 ± 2,63 | 84,6 ± 2,63 |
| <i>Eugenia brasiliensis</i> | 8,37 ± 0,23 | 42,7 ± 5,92 | 42,7 ± 5,92 |
| <i>Eugenia luschnathiana</i> | ND* | 38,0 ± 4,86 | 38,0 ± 4,86 |
| <i>Eugenia reinwardtiana</i> | 0,08 ± 0,03 | 110 ± 8,31 | 110 ± 8,31 |
| <i>Myrciaria cauliflora</i> | 2,78 ± 0,17 | 19,4 ± 0,28 | 19,4 ± 0,28 |
| <i>Myrciaria dubia</i> | TR** | 57,2 ± 5,61 | 57,2 ± 5,61 |
| <i>Myrciaria vexator</i> | 6,84 ± 0,36 | 38,6 ± 2,40 | 38,6 ± 2,40 |
| <i>Syzygium cumini</i> | 6,33 ± 0,10 | 389 ± 36,0 | 389 ± 36,0 |
| <i>Syzygium curranii</i> | 12,1 ± 0,53 | 33,4 ± 2,52 | 33,4 ± 2,52 |
| <i>Syzygium jambos</i> | ND* | 92,0 ± 8,24 | 92,0 ± 8,24 |
| <i>Syzygium javanicum</i> | 0,09 ± 4 x 10 ⁻³ | 81,4 ± 6,24 | 81,4 ± 6,24 |
| <i>Syzygium malaccense</i> | TR** | 269 ± 7,66 | 269 ± 7,66 |
| <i>Syzygium samarangense</i> | 0,07 ± 0,03 | 77,5 ± 4,19 | 77,5 ± 4,19 |
| <i>Syzygium samarangense</i> var. <i>Taiwan pink</i> | 1,35 ± 0,10 | 157 ± 13,0 | 157 ± 13,0 |

QUADRO 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE 14 FRUTOS ANALISADOS POR REYNERTSON *et al.* (2008)

FONTE: REYNERTSON *et al.* (2008)

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão; ¹ TA = antocianinas totais (mg C3G/g DW); ² TPC = compostos fenólicos totais (mg GAE/g DW); ³ DPPH expresso em EC₅₀ (µg/mL); * ND = não detectado; ** TR: traço (< 0,01 mg/g).

| Fruto | AA ¹ | TA ² | YF ³ | TPC ⁴ | DPPH ⁵ | ABTS ⁶ |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Açaí | 84,0 | 111 | 91,3 | 454 | 4264 | 15,1 |
| Acerola | 1357 | 18,9 | 9,6 | 1063 | 670 | 96,6 |
| Camu-camu | 1882 | 42,2 | 20,1 | 1176 | 478 | 153 |
| Jaboticaba | 238 | 58,1 | 147 | 440 | 1472 | 37,5 |
| Jambolão | 112 | 93,3 | 70,9 | 185 | 3025 | 29,7 |
| Juçara | 186 | 192 | 375 | 755 | 1711 | 78,3 |
| Murici | 148 | 0,5 | 13,8 | nd | nd | nd |
| Murta | 181 | 143 | 207 | 610 | 936 | 49,1 |

QUADRO 3 – COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE OITO FRUTOS ANALISADOS POR RUFINO *et al.* (2010)

FONTE: Adaptado de RUFINO *et al.* (2010)

Nota: ¹ AA = ácido ascórbico (mg/100 g FW); ² TA = antocianinas totais (mg/100 g FW); ³ YF = flavonóides amarelos (*yellow flavonoids*) (mg/100 g FW); ⁴ TPC = compostos fenólicos totais (mg GAE/100 g FW); ⁵ DPPH expresso em EC₅₀ (g FW/g DPPH); ⁶ ABTS expresso em µmol trolox/g FW; nd = não detectado.

Celli, Pereira-Netto e Beta (2011) avaliaram TPC e a capacidade antioxidante pelo método DPPH em duas variedades (vermelha e roxa) de pitanga (*Eugenia uniflora*) ao longo do processo de maturação. TPC variou de 2,13 a 4,14 g equivalente ao ácido ferúlico (FAE)/100 g de fruta (DW) para a variedade vermelha, e de 2,49 a 5,81 g FAE/ 100 g de fruta para a variedade roxa, dependendo da fase de desenvolvimento do fruto. Os frutos no estágio de maturação verde apresentaram maior atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH: 17,18 e 18,13 mmol Trolox equivalentes/100 g de fruta seca para as variedades vermelha e roxa, respectivamente.

Almeida *et al.* (2011) avaliaram os teores de ácido ascórbico (11,8 mg/100 g FW) e de compostos fenólicos (159,9 mg GAE/ 100 g) e a atividade antioxidante (1573 μ mol equivalente a Trolox/100 g para ABTS) de frutos de murici (*Byrsonima crassifolia*). No mesmo ano, Gordon *et al.* avaliaram compostos antioxidantes em frutos de murici (*B. crassifolia*) e concluíram que esses frutos apresentavam 255 mg equivalente a ácido gálico/100 g do fruto (DW), para TPC por Folin-Ciocalteu; no entanto, o teor de ácido ascórbico foi não quantificável. Em 2012, Souza *et al.* também avaliaram a capacidade antioxidante e quantificaram compostos bioativos em frutos de murici (*B. crassifolia*), encontrando, em 100 g de fruta fresca, valores de 47,44 mg de ácido ascórbico, 334,37 mg equivalente a ácido gálico (GAE) para TPC por Folin-Ciocalteu e 5725 μ mol equivalente a Trolox para ABTS. A capacidade antioxidante desses frutos por TPC e ABTS foram avaliadas, ainda, por Ribeiro *et al.* (2013): 243,42 mg GAE/100 g FW e 680 μ mol equivalente a Trolox/100 g FW, respectivamente.

Antocianinas e fenólicos totais em nove *berries* foram investigados por Contessa *et al.* (2013) e os valores estão apresentados no Quadro 4.

Bicudo, Ribani e Beta (2014) estudaram o teor de antocianinas (TMA), ácidos fenólicos totais (TPA), TPC e capacidade antioxidante em frutos de juçara (*Euterpe edulis*) ao longo do processo de maturação, bem como identificaram, por HPLC-MS/MS, antocianinas e ácidos fenólicos nesses frutos. Com base na análise dos resultados, esses autores puderam concluir que, com o amadurecimento, TMA (91,52-236,19 mg C3G/100 g DW) e a capacidade antioxidante pelo método DPPH (655,89-745,32 μ mol TE/g DW) aumentaram, enquanto que TPA (44,27-30,95 mg/100 g DW) e TPC (81,69-49,09 mg GAE/g DW) diminuíram. As principais antocianinas identificadas foram cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo,

seguidas por pelargonidina-3-rutinosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-rutinosídeo, sendo que essas três últimas foram identificadas pela primeira vez em frutos de juçara nesse estudo. A análise por HPLC-MS/MS indicou a presença dos seguintes ácidos: gálico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, clorogênico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, sináptico e ferúlico.

| Fruto | Antocianinas totais (mg C3G/100 g FW) | Fenólicos totais (mg GAE/100 g FW) |
|--|--|---------------------------------------|
| Amora preta (<i>Rubus ulmifolius</i>) | 149 | 257 |
| Highbush blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>) | 130 | 320 |
| Black currant (<i>Ribes nigrum</i>) | 177 | 493 |
| White currant (<i>Ribes rubrum</i>) | 361 | 362 |
| Gooseberry (<i>Ribes grossularia</i>) | 291 | 197 |
| Black mulberry (<i>Morus nigra</i>) | 40,7 | 343 |
| White mulberry (<i>Morus alba</i>) | 21,9 | 95,9 |
| Framboesa (<i>Rubus idaeus</i>) | 250 | 321 |
| Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>) | 53,1 | 399 |

QUADRO 4 – COMPOSTOS BIOATIVOS EM NOVE *BERRIES* ANALISADAS POR CONTESSA *et al.* (2013)

FONTE: Adaptado de CONTESSA *et al.* (2013)

Paz *et al.* (2015) encontraram valores de atividade antioxidante pelo método DPPH de 1574 e 3987 mg equivalente a Trolox em 100 g DW, para açaí e acerola, respectivamente. Além disso, esses autores determinaram TPC e flavonóides totais (TF) apresentando, respectivamente, 1808 mg GAE/100 g DW e 672 mg equivalente a epicatequina/100 g DW para açaí, e 12466 mg GAE/100 g DW e 158 mg equivalente a epicatequina/100 g DW para acerola.

Observando as informações levantadas dos artigos científicos analisados, percebe-se que, para uma mesma espécie de fruto, são encontrados diferentes valores para um mesmo parâmetro avaliado. Isso ocorre porque o teor de compostos bioativos em espécies vegetais, bem como a sua capacidade antioxidante, são largamente influenciados pelas condições climáticas, manejo do solo, período de colheita, região geográfica etc. Desta forma, se na literatura não são encontrados trabalhos que realizaram as mesmas determinações com a mesma espécie, torna-se ainda mais difícil a comparação de resultados entre frutos de

espécies diferentes, sendo necessária a escolha de frutos do mesmo gênero, ou da mesma família, com características mais semelhantes às da matriz em estudo.

Além disso, a dificuldade na comparação dos resultados, ainda que o método de análise seja o mesmo, em grande parte existe devido a múltiplas variações que podem ser empregadas em cada um dos ensaios, como: manipulação da amostra, temperatura do ensaio, variedade da amostra, tempo de exposição dos compostos bioativos aos reagentes, homogeneização da amostra, metodologia empregada na extração etc. Além disso, os resultados para um mesmo método podem ser expressos de diversas formas (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Amostras de *Byrsonima ligustrifolia* A. Juss. foram coletadas na cidade de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil), localizada na Microrregião Metropolitana de Paranaguá, a uma distância de 174 km da capital do Estado, Curitiba. As frutas, em diferentes estádios de maturação, foram colhidas manualmente, em março de 2014, de árvores situadas em localidade de coordenadas geográficas 25°17'50" latitude Sul 48°19'8" longitude Oeste do meridiano de Greenwich (FIGURA 7).

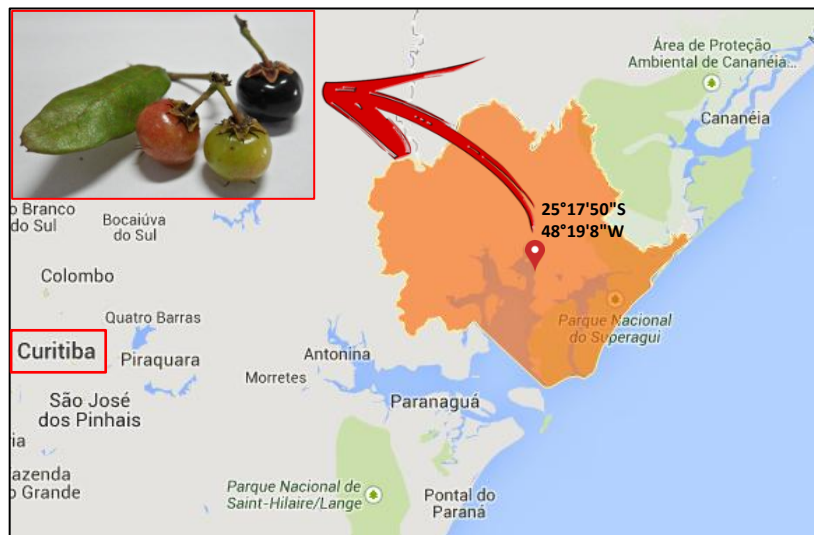


FIGURA 7 – MUNICÍPIO DE GUARAQUEÇABA E LOCAL DA COLHEITA

A identificação oficial da espécie foi conduzida pelo Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba (Paraná, Brasil) e uma espécie (exsicata) foi depositada no Herbário desse museu, registrada sob o número 388371.

No mesmo dia da colheita, as frutas foram selecionadas, descartando-se as com injúrias mecânicas, ataque de insetos, ou outros defeitos visuais, lavadas e classificadas em cinco estádios de maturação de acordo com a coloração do epicarpo (cor externa) (FIGURA 8).

Parte da amostra foi direcionada para as análises com a fruta *in natura* e as frutas restantes foram, então, pesadas, liofilizadas inteiras, acondicionadas em

embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD), seladas a vácuo, e armazenadas em freezer a -20°C até o momento das análises.



FIGURA 8 – *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

Nota: RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

3.2 ANÁLISES FÍSICAS

3.2.1 Medida objetiva da cor

A coloração dos frutos, após a separação nos diferentes estádios de maturação (antes da liofilização), foi avaliada utilizando espectrofotômetro de reflectância MiniScan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Inc., Naperville, IL, E.U.A.). Para as análises cromáticas, foi utilizado o Sistema CIE (*Commission International de L'Eclairage*), no qual valores de L^* , a^* e b^* foram medidos para descrever um espaço de cor tridimensional, interpretados como: L^* indica luminosidade, cuja leitura varia de 0 (completamente opaco ou “preto”) a 100 (completamente transparente ou “branco”); valores positivos de a^* indicam tonalidade vermelha ($-a^*$, tonalidade verde); e valores positivos de b^* , tonalidade amarela ($-b^*$, tonalidade azul) no círculo hue (FIGURA 9) (VOSS, 1992; HUTCHINGS, 1994).

O ângulo Hue ($^{\circ}$) expressa tonalidade, sendo calculado conforme as seguintes equações (VOSS, 1992):

$$\text{hue} = \arctg(b^*/a^*) \times 180/\pi \quad (a^* \text{ e } b^* \text{ positivos}) \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{hue} = 180 + (\arctg(b^*/a^*) \times 180/\pi) \quad (a^* \text{ negativo e } b^* \text{ positivo}) \quad \text{Eq. (3)}$$

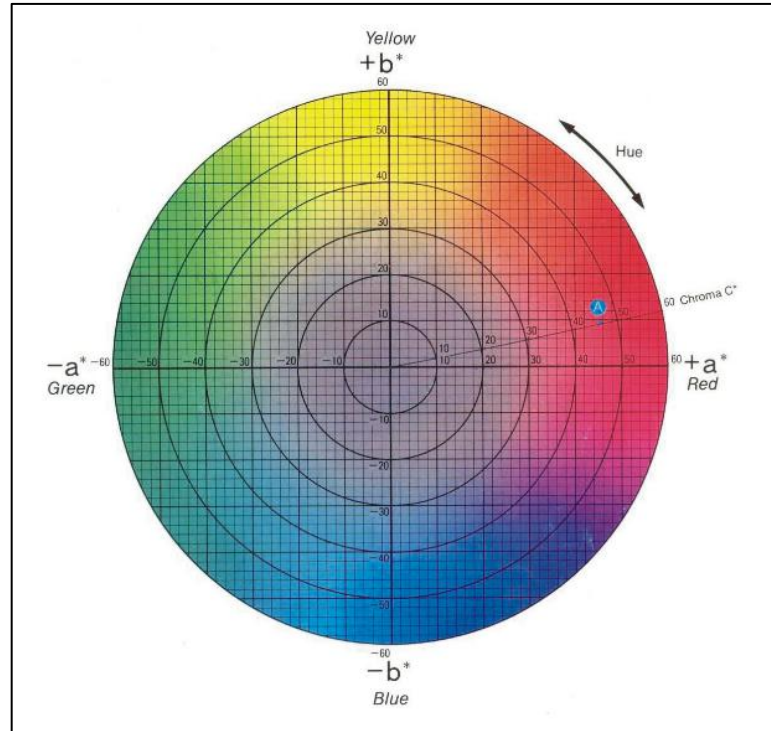


FIGURA 9 – CÍRCULO HUE
 FONTE: PINHEIRO (2009)

Os valores de Hue são definidos como: 0° ou 360°, vermelho-roxo; 90°, amarelo; 180°, verde-azulado; e 270°, azul (McGUIRE, 1992).

Os valores de C* (croma), que indica o grau de pureza ou a saturação da cor, foram calculados conforme a equação abaixo (VOSS, 1992):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Eq. (4)}$$

Os dados representam uma média do que foi medido em uma amostra aleatória de 20 frutas de cada estágio de maturação.

3.2.2 Avaliação da firmeza

A avaliação da firmeza dos frutos em cada estágio de maturação foi realizada por compressão, utilizando um texturômetro Brookfield CT3 *Texture Analyzer* (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, E.U.A.), com probe de punção cilíndrico TA-39 (aço inoxidável, 20 mm comprimento x 2 mm diâmetro) e base retangular TA-BT-KIT. A velocidade do teste foi de 0,5 mm.s⁻¹ e a distância de penetração de 2,0 mm, com força de contato de 10 g. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, com o fruto fresco (antes da liofilização), e os resultados (n = 6) expressos em gramas (g).

3.2.3 Dimensões dos frutos

Frutos frescos (n = 30) de cada estágio de maturação foram pesados em balança analítica e mediu-se diâmetro e altura utilizando-se paquímetro. A polpa foi removida, e foram feitas medidas de massa, diâmetro e altura da semente.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas realizadas nos frutos frescos, em triplicata, foram: teores de umidade, proteínas, extrato etéreo e resíduo mineral fixo (RMF) pelos métodos AOAC (2005): (940.26), (920.152), (933.05) e (940.26), respectivamente. A determinação de fibra alimentar total foi realizada conforme o método enzimático-gravimétrico (985.29) publicado na 16ª edição da AOAC (1997). Carboidratos foram obtidos por diferença: $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ extrato etéreo} + \% \text{ RMF} + \% \text{ fibra alimentar})$.

Os sólidos solúveis totais foram determinados por meio de leitura direta do suco da fruta espremida em refratômetro digital, a 20°C (IAL, 2005). O pH foi determinado a 25°C, com um medidor digital de pH, calibrado com tampões de pH 4 e 7 (AOAC, 2005). A acidez total titulável (ATT) foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 mol/L e expressa como g ácido cítrico/100 g em base fresca (IAL, 2005).

Os açúcares totais foram determinados a partir do método colorimétrico proposto por Dubois *et al.* (1956). Este método baseia-se no princípio de que soluções contendo açúcares, que apresentam potenciais grupos redutores, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, sofrem alteração na sua coloração para amarelo/alaranjado. A reação é sensível e a coloração é estável, tendo a absorbância determinada em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 490 nm. Foi realizada uma curva padrão de glicose (Sigma-Aldrich; PubChem CID¹: 54670067) com intervalo de 0,25 a 1,0 mg/mL e os resultados expressos em mg/100 g em base fresca e base seca.

¹ PubChem é um banco de dados online (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) de estrutura química de compostos em que cada composto possui um código de identificação (CID = *Compound Identifier*).

3.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

3.4.1 Delineamento experimental

O modelo estatístico *Simplex-centroid design* com pontos axiais e triplicata no ponto central foi escolhido para determinar a combinação de solventes (acetona, metanol e água) mais eficiente para a extração de antocianinas monoméricas totais (TMA) e compostos fenólicos totais (TPC), cuja metodologia de análise para quantificação desses compostos está descrita nos itens 3.7 e 3.8, respectivamente. Todas as condições testadas estão apresentadas na Tabela 7.

3.4.2 Procedimento de extração

Para os experimentos de otimização da extração, foi utilizada polpa liofilizada de murici vermelho no estágio de maturação (RS3) em que havia maior quantidade de frutos. A extração foi conduzida com polpa em pó (0,5 g) e 15 mL das misturas de solventes, definidas na etapa anterior, acidificadas com 2% de ácido acético, sob agitação, por 40 minutos. Após esse período, os extratos foram centrifugados (4000 rpm por 15 min) e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico (25 mL), completando o volume com a solução extratora.

3.4.3 Validação do modelo estatístico

Para a validação dos modelos obtidos para antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais, foram realizadas extrações com novas proporções de solventes e com as melhores condições obtidas para cada modelo (TABELA 13), empregando os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.2.

3.4.4 Seleção da proporção de sólido-líquido

Para maximizar a extração de antocianinas e compostos fenólicos, foi estudada a proporção ideal da solução extratora em relação à quantidade de amostra. A extração foi conduzida com polpa em pó (0,5 g) sob agitação por 40 minutos com a combinação de solventes que proporcionou a melhor resposta nas

etapas anteriores, nas proporções de 1:10, 1:20, 1:30, 1:60, 1:90, 1:120 e 1:150, em triplicata. Como nos demais procedimentos de extração, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico, completando o volume com a solução extratora.

3.5 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A polpa liofilizada (0,5 g), moída até obtenção de um pó visualmente homogêneo (50 mesh), foi extraída com 15 mL da solução extratora estabelecida na otimização da extração, acidificada com 2% de ácido acético e adicionada do antioxidante butil hidroxianisol (BHA) (2 g/L). A extração ocorreu em sonicador (37 kHz) por 40 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, os extratos foram centrifugados (4000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante transferido para outro frasco. O precipitado foi submetido à nova extração, utilizando os mesmos procedimentos. Os sobrenadantes foram misturados e o solvente foi evaporado sob vácuo (350 mmHg) a 30°C. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em 10 mL de metanol grau cromatográfico e 5 mL (extrato não hidrolisado contendo ácidos fenólicos solúveis) foram filtrados em membrana de nylon (0,45 µm) e estocados a -20°C até o momento das análises. Os 5 mL restantes foram submetidos à etapa posterior de hidrólise básica seguida de ácida. A Figura 10 ilustra os extratos não hidrolisados dos frutos de *B. ligustrifolia* nos cinco estádios de maturação avaliados.

O procedimento completo foi realizado, também, apenas com a solução extratora, como um branco, visto que foi adicionado aos solventes composto com atividade antioxidante (BHA).

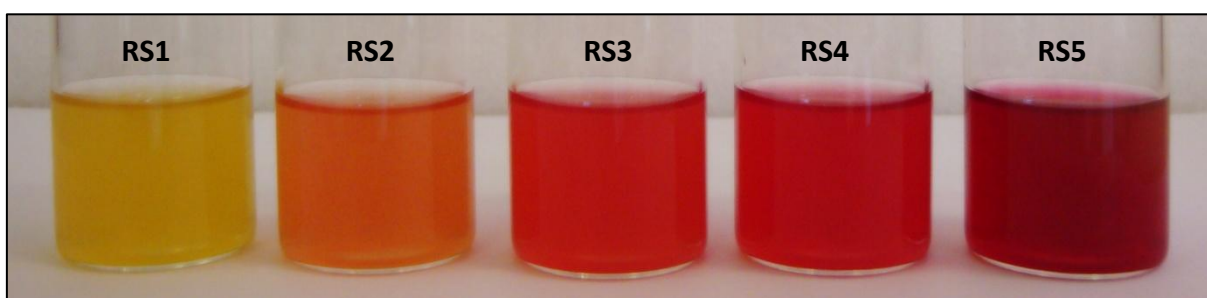


FIGURA 10 – EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

Nota: RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

3.6 HIDRÓLISE DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos foram hidrolisados de acordo com Mattila, Hellström e Törrönen (2006), com pequenas modificações. Brevemente, em 5 mL do extrato obtido na etapa anterior, foram adicionados 6,7 mL de água destilada, contendo 1% de ácido ascórbico e 0,42% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e 2,8 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mol/L. Esta mistura foi fechada hermeticamente sob atmosfera de nitrogênio (N₂) e mantida em agitação (30 rpm) por 16 horas a 20°C.

Após esse período, o pH da solução foi ajustado para 2 com ácido clorídrico (HCl) concentrado (2,3 mL), e os ácidos fenólicos hidrolisados foram extraídos com uma mistura gelada de éter etílico e acetato de etila (1:1) (3 x 8,33 mL). As três camadas orgânicas foram combinadas e reservadas.

A hidrólise ácida foi realizada com a adição de 2,5 mL de HCl concentrado na camada aquosa remanescente e incubação em banho-maria a 85°C por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada e a extração dos ácidos fenólicos hidrolisados se deu da mesma forma que na hidrólise alcalina.

As camadas orgânicas das hidrólises alcalinas e ácidas foram combinadas, evaporadas sob vácuo a 30°C e o resíduo foi, então, dissolvido em 5 mL de metanol grau cromatográfico, filtrado em membrana de nylon (0,45 µm) e estocado a -20°C até o momento das análises, sendo denominado extrato hidrolisado. Nessas condições, os extratos apresentavam-se na concentração de 50 mg de polpa liofilizada/mL de metanol.

Este procedimento completo também foi realizado apenas com a solução extratora, como um branco, visto que foram adicionados aos solventes compostos com atividade antioxidante (BHA, EDTA e ácido ascórbico).

3.7 FLAVONÓIDES TOTAIS (TF)

O conteúdo de flavonóides totais (TF) foi determinado nos extratos não hidrolisados e hidrolisados de acordo com o método descrito por Gonzalez-Aguilar *et al.* (2007). Brevemente, 500 µL dos extratos na concentração de 0,5 mg/mL foram adicionados a 2 mL de água destilada e 150 µL de solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 5% por 5 minutos. Após o equilíbrio, 150 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 10% foi adicionada e, após um minuto, adicionou-se 1

mL de NaOH 1 mol/L. O volume final foi completado para 5 mL com água destilada, agitado e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis a 415 nm. A concentração de flavonóides totais nas frutas foi calculada com base em uma curva padrão de quercetina (Sigma-Aldrich; PubChem CID: 5280343) (0-60 ppm) e os valores foram expressos em mg equivalentes a quercetina (QEs) por 100 g de polpa de fruta em base seca (DW).

3.8 ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (TMA)

O teor de TMA foi determinado nos extratos não hidrolisados por meio do método espectrofotométrico de pH diferencial (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). Os extratos foram diluídos até concentrações que variavam de 2,5 a 20 mg/mL, em tampões de KCl (cloreto de potássio, 0,025 mol/L, pH 1,0) e CH₃COONa (acetato de sódio, 0,4 mol/L, pH 4,5), a fim de que permanecessem dentro da faixa de 20 a 3000 mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/L. Absorbância foi medida a 520 e 700 nm e TMA foi calculada de acordo com a equação cinco (Eq. (5)) e os resultados foram expressos como mg equivalentes a cianidina-3-glicosídeo (C3G) por g de polpa liofilizada ou por 100 g de polpa de fruta em base seca (DW).

$$TMA = (A \times MW \times DF \times 10^3) / (\epsilon \times l) \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$MW \text{ (molecular weight ou massa molecular)} = 449.2 \text{ g mol}^{-1}$$

DF = *dilution factor* ou fator de diluição

10³ = fator de conversão de g para mg

ε = coeficiente molar: 26900 M⁻¹ cm⁻¹

l = caminho óptico (cm).

3.9 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TPC)

TPC foram determinados nos extratos não hidrolisados e hidrolisados por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton e Rossi (1965). Brevemente, 500 µL dos extratos na concentração de 0,5 mg/mL foram adicionados a 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu recém diluído 10 vezes e, em seguida, 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após 120 minutos de

reação no escuro, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Ácido gálico (Sigma-Aldrich; PubChem CID: 370) foi utilizado como padrão e os resultados expressos em mg equivalentes a ácido gálico (GAE) por g de polpa liofilizada ou por 100 g de polpa de fruta em base seca (DW).

3.10 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS^{•+}

O método ABTS^{•+} empregado foi baseado na metodologia desenvolvida por Miller *et al.* (1993) com modificações. O radical cátion ABTS^{•+} foi produzido pela mistura da solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (140 mmol/L), a qual permaneceu reagindo por 16 horas no escuro a temperatura ambiente. Após esse período, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Os extratos (não hidrolisados e hidrolisados) das amostras foram dissolvidos em três diferentes concentrações (500, 250 e 125 ppm), e a 30 μ L desses extratos foram adicionados 3 mL de solução diluída de ABTS^{•+} e as absorbâncias foram medidas (734 nm) após 6 minutos. O mesmo foi realizado com o padrão de Trolox, diluído em etanol em concentrações que variaram de 100 a 2000 μ M, para obtenção da curva padrão, sendo os resultados expressos como μ mol/L de Trolox por 100 g de polpa de fruta em base seca (DW).

3.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada nos extratos não hidrolisados e hidrolisados pelo método DPPH[•] (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) com modificações. Preparou-se uma solução metanólica contendo 0,06 mmol/L de DPPH[•]. Após ajustar o branco com metanol, uma alíquota de 100 μ L dos extratos diluídos em três diferentes concentrações (500, 250 e 125 mg/L) foi adicionada a 3,9 mL da solução de DPPH[•] 0,06 mmol/L. O decréscimo da absorbância foi monitorado em espectrofotômetro UV/Vis a 515 nm a cada um minuto para os primeiros 10 minutos e, então, com intervalos de 5 minutos até estabilização, o que ocorreu após 120 minutos. A capacidade antioxidante foi expressa como a concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de radical DPPH[•] (EC50) em g de polpa de fruta (DW) por g de DPPH[•].

3.12 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-MS/MS

Por não terem sido encontrados dados publicados na literatura sobre compostos bioativos em frutos de *Byrsonima ligustrifolia* e por existir um grande número desses compostos na natureza, o primeiro passo para a identificação dos mesmos na matriz em estudo foi a realização da análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS). Esta técnica permitiu identificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos não hidrolisados dos frutos de murici vermelho nos cinco estádios de maturação, por meio das informações a respeito da massa molecular e do padrão de fragmentação de compostos, de acordo com dados disponíveis na literatura (KAMMERER *et al.*, 2004; WU; PRIOR, 2005; BYSTROM *et al.*, 2008; DE ROSSO *et al.*, 2008).

As análises de HPLC-MS/MS foram realizadas em cromatógrafo líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), que foi mantido a temperatura ambiente durante as análises. Acetonitrila e metanol foram utilizados separadamente como solvente de limpeza no gerenciador de amostras. O sistema HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, EUA) e fonte de ionização por electrospray (ESI).

A fonte de ESI foi operada em modo positivo para o monitoramento de antocianinas e em modo negativo, para o monitoramento de ácidos fenólicos, antoxantinas e estilbenos. Em ambos os métodos, a separação foi conduzida em uma coluna XBridge C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e a temperatura da coluna foi mantida na temperatura de 25°C.

Para o modo de ionização positivo, a fase móvel consistiu de um gradiente de água/ácido fórmico/acetoneitrila (fase A) (95:2:3, v/v/v) e água/ácido fórmico/acetoneitrila (fase B) (48:2:50, v/v/v), com taxa de fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente de eluição empregado foi: t_0 : A = 90%; $t_{0-10 \text{ min}}$: A = 75%; $t_{10-15 \text{ min}}$: A = 69%; $t_{15-20 \text{ min}}$: A = 60%; $t_{20-25 \text{ min}}$: A = 54%; $t_{25-25.10 \text{ min}}$: A = 10%; $t_{25.10-28 \text{ min}}$: A =

10%; $t_{28-31 \text{ min}}$: A = 90%. O volume de injeção da amostra na concentração de 10 mg/mL foi de 25 μL .

Para o modo de ionização negativo, a fase móvel consistiu de um gradiente de água/ácido acético (fase A) (98:2, v/v) e 0,5% de ácido acético em água/acetonitrila (fase B) (50:50, v/v/v), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O gradiente de eluição empregado foi: t_0 : A = 90%; $t_0-10 \text{ min}$: A = 85%; $t_{10-20 \text{ min}}$: A = 75%; $t_{20-30 \text{ min}}$: A = 65%; $t_{30-32 \text{ min}}$: A = 0%; $t_{32-37 \text{ min}}$: A = 0%; $t_{37-41 \text{ min}}$: A = 90%. O volume de injeção da amostra na concentração de 10 mg/mL foi de 20 μL .

Os dados obtidos pelo espectrômetro de massas foram processados pelo software Analyst 1.4 (ABI/Sciex). As análises foram realizadas no modo de operação Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), mantendo o período de tempo para varredura de cada íon-precursor e seus fragmentos (*dwell time*) em 300 ms para ambos os modos de ionização (positivo e negativo).

Os parâmetros da fonte de ionização utilizados para o modo positivo foram: gás de interface (CUR), 10 psi; gás de colisão (CAD), 5 psi; voltagem do capilar (ISV), 5500 V; gás de nebulização (GS1), 50 psi; gás auxiliar (GS2), 50 psi; e temperatura, 500°C. Os parâmetros da fonte de ionização utilizados para o modo negativo foram: gás de interface (CUR), 10 psi; gás de colisão (CAD), 3 psi; voltagem do capilar (ISV), -4500 V; gás de nebulização (GS1), 50 psi; gás auxiliar (GS2), 50 psi; e temperatura, 600°C.

Os parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto – incluindo energia de colisão (CE), potencial de entrada na cela de colisão (CEP), potencial de saída da cela de colisão (CXP), potencial de desagrupamento (DP) e potencial de entrada (EP) – estão resumidos nas Tabelas 1 e 2. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1, GS2 e CAD foi produzido por um gerador de nitrogênio da *Peak Scientific Instruments* (Chicago, IL, EUA).

TABELA 1 – PARÂMETROS INDIVIDUAIS E TRANSIÇÕES DE CADA COMPOSTO MONITORADO PARA ANTOCIANINAS

| Modo de ionização | Composto | Íon molecular (m/z) | Íon de transição (m/z) | CE ^a (eV) | CXP ^b (V) | CEP ^c (V) | DP ^d (V) | EP ^e (V) |
|--|---|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Positivo [M+H] ⁺ | Cianidina-3-glicosídeo | 449 | 449 → 287 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Pelargonidina-3-glicosídeo | 433 | 433 → 271 | 25 | 3,8 | 21 | 40 | 10 |
| | Peonidina-3-glicosídeo | 463 | 463 → 301 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Cianidina-3-ramnosídeo | 433 | 433 → 287 | 25 | 3,8 | 21 | 40 | 10 |
| | Delfinidina-3-glicosídeo | 465 | 465 → 303 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Pelargonidina-3-ramnosídeo | 417 | 417 → 271 | 25 | 3,8 | 21 | 40 | 10 |
| | Petunidina-3-glicosídeo | 479 | 479 → 317 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Malvidina-3-glicosídeo | 493 | 493 → 331 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Peonidina-3-acetilglicosídeo | 505 | 505 → 301 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Delfinidina-3-acetilglicosídeo | 507 | 507 → 303 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Petunidina-3-acetilglicosídeo | 521 | 521 → 317 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Malvidina-3-acetilglicosídeo | 535 | 535 → 331 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| | Cianidina-3-rutinosídeo | 595 | 595 → 449 595 → 287 | 25 | 3,8 | 27 | 40 | 10 |
| | Peonidina-3-rutinosídeo | 609 | 609 → 463 609 → 301 | 25 | 3,8 | 27 | 40 | 10 |
| | Petunidina-3- <i>p</i> -coumaroilglicosídeo | 625 | 625 → 317 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 |
| Malvidina-3- <i>p</i> -coumaroilglicosídeo | 639 | 639 → 331 | 25 | 3,8 | 20 | 40 | 10 | |

Nota: ^a CE, energia de colisão; ^b CXP, potencial de saída da cela de colisão; ^c CEP, potencial de entrada na cela de colisão; ^d DP, potencial de desagrupamento; ^e EP, potencial de entrada.

TABELA 2 – PARÂMETROS INDIVIDUAIS E TRANSIÇÕES DE CADA COMPOSTO MONITORADO PARA ÁCIDOS FENÓLICOS, ANTOXANTINAS E ESTILBENOS

| Modo de ionização | Composto | Íon molecular (m/z) | Íon de transição (m/z) | CE ^a (eV) | CXP ^b (V) | CEP ^c (V) | DP ^d (V) | EP ^e (V) | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----|
| Negativo [M-H] ⁻ | Ácido protocatequínico | 153 | 153 → 109 | -25 | -2,5 | -12,0 | -40 | -10 | |
| | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 137 | 137 → 93 | -25 | -2,5 | -9,5 | -40 | -10 | |
| | Procianidina | | 577 | 577 → 425 | -25 | -2,5 | -26,5 | -40 | -10 |
| | | | | 577 → 407 | | | | | |
| | Ácido fertárico | 325 | 325 → 193 | -25 | -2,5 | -16,8 | -40 | -10 | |
| | Catequina | 289 | 289 → 245 | -25 | -2,5 | -15,4 | -40 | -10 | |
| | Ácido cafeico | 179 | 179 → 135 | -25 | -2,5 | -11,2 | -40 | -10 | |
| | Ácido gálico | 169 | 169 → 125 | -25 | -2,5 | -11,0 | -40 | -10 | |
| | Ácido <i>p</i> -cumárico | 163 | 163 → 119 | -25 | -2,5 | -10,5 | -40 | -10 | |
| | Quercetina-3-glicosídeo | 463 | 463 → 301 | -25 | -2,5 | -22,1 | -40 | -10 | |
| | Quercetina-3-ramnosídeo | 447 | 447 → 301 | -25 | -2,5 | -21,5 | -40 | -10 | |
| | Rutina | 609 | 609 → 301 | -25 | -2,5 | -27,8 | -40 | -10 | |
| | Quercetina | | 301 | 301 → 179 | -25 | -2,5 | -15,9 | -40 | -10 |
| | | | | 301 → 151 | | | | | |
| | Ácido ferúlico | 193 | 193 → 134 | -25 | -2,5 | -11,7 | -40 | -10 | |
| | Ácido siríngico | | 197 | 197 → 182 | -25 | -2,5 | -11,8 | -40 | -10 |
| | | | | 197 → 153 | | | | | |
| | Ácido sinápico | | 223 | 223 → 208 | -25 | -2,5 | -12,8 | -40 | -10 |
| | | | | 223 → 164 | | | | | |
| <i>Coutaric acid</i> | 295 | 295 → 163 | -25 | -2,5 | -15,6 | -40 | -10 | | |
| Ácido caftárico | 311 | 311 → 179 | -25 | -2,5 | -16,3 | -40 | -10 | | |
| <i>Resveratrol derivative</i> | 535 | 535 → 227 | -25 | -2,5 | -24,9 | -40 | -10 | | |

Nota: ^a CE, energia de colisão; ^b CXP, potencial de saída da cela de colisão; ^c CEP, potencial de entrada na cela de colisão; ^d DP, potencial de desagrupamento; ^e EP, potencial de entrada.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

Cromatógrafo líquido Agilent 1200 Series, G1311A, controlado pelo software EZChrom Elite, com injetor automático de amostras, detector de arranjo de diodos (DAD), bomba quaternária, pré-coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm) e coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm de tamanho de partícula) foram empregados na separação de antocianinas, ácidos fenólicos e antoxantinas presentes nos extratos não hidrolisados (item 3.5) e de ácidos fenólicos presentes nos extratos hidrolisados (item 3.6) dos frutos de murici vermelho nos cinco estádios de maturação.

Para cada uma das classes de compostos fenólicos, a separação ocorreu sob diferentes condições quanto a composições de fases móveis (A e B), gradientes, tempo total de corrida, volume de injeção, comprimentos de onda monitorados e taxa de fluxo, apresentando, desta forma, três sistemas diferentes, descritos a seguir.

Sistema I (antocianinas): a fase móvel consistiu de um gradiente de água/ácido fórmico/acetoneitrila (fase A) (95:2:3, v/v/v) e água/ácido fórmico/acetoneitrila (fase B) (48:2:50, v/v/v), com taxa de fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente de eluição empregado foi: t_0 : A = 90%; $t_0 - 10$ min: A = 75%; $t_{10} - 15$ min: A = 69%; $t_{15} - 20$ min: A = 60%; $t_{20} - 25$ min: A = 54%; $t_{25} - 26$ min: A = 10%; $t_{26} - 28$ min: A = 90%. O tempo total de corrida foi de 30 minutos e o volume de injeção da amostra (sem diluição: 50 mg/mL) foi de 25 µL. O comprimento de onda monitorado foi 520 nm.

Sistema II (ácidos fenólicos): a fase móvel consistiu de um gradiente de água/ácido acético (fase A) (98:2, v/v) e 0,5% de ácido acético em água/acetoneitrila (fase B) (50:50, v/v), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O gradiente de eluição empregado foi: t_0 : A = 90%; $t_0 - 10$ min: A = 85%; $t_{10} - 13$ min: A = 85%; $t_{13} - 25$ min: A = 45%; $t_{25} - 30$ min: A = 0%; $t_{30} - 34$ min: A = 0%; $t_{34} - 37$ min: A = 90%. O tempo total de corrida foi de 40 minutos e o volume de injeção da amostra, na concentração de 25 mg/mL, foi de 15 µL. As respostas foram monitoradas, simultaneamente, nos comprimentos de onda de 280 nm (ácidos hidroxibenzoicos) e 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos).

Sistema III (antoxantinas: flavonóis e flavanóis): a fase móvel consistiu de um gradiente de água/ácido acético (fase A) (98:2, v/v) e 0,5% de ácido acético em água/acetoneitrila (fase B) (50:50, v/v), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O gradiente

de eluição empregado foi: t_0 : A = 90%; $t_{0-20 \text{ min}}$: A = 76%; $t_{20-40 \text{ min}}$: A = 70%; $t_{40-60 \text{ min}}$: A = 45%; $t_{60-75 \text{ min}}$: A = 0%; $t_{75-83 \text{ min}}$: A = 0%; $t_{83-85 \text{ min}}$: A = 90%. O tempo total de corrida foi de 86 minutos e o volume de injeção da amostra (sem diluição: 50 mg/mL) foi de 15 μL . As respostas foram monitoradas, simultaneamente, nos comprimentos de onda de 280 nm (flavanóis) e 370 nm (flavonóis).

A confirmação dos compostos separados por cromatografia ocorreu por meio de: (I) comparação entre os tempos de retenção dos componentes das amostras e dos padrões individuais disponíveis; (II) adição de uma concentração conhecida de cada padrão nas amostras (fortificação da amostra); e (III) comparação dos espectros UV/Vis (λ_{max}) dos componentes da amostra com os espectros dos padrões ou, na ausência dos mesmos, com os espectros dos compostos de interesse disponíveis na literatura.

A quantificação ocorreu utilizando curvas de calibração com os padrões correspondentes aos compostos cuja separação foi efetiva. Os seguintes padrões de compostos fenólicos individuais foram adquiridos da Sigma-Aldrich: cianidina-3-glicosídeo (PubChem CID: 441667), ácido gálico (PubChem CID: 370), ácido cafeico (PubChem CID: 689043), ácido *p*-hidroxibenzóico (PubChem CID: 135), ácido protocatequínico (PubChem CID: 72), ácido *p*-cumárico (PubChem CID: 637542), quercetina (PubChem CID: 5280343) e (+)-catequina (PubChem CID: 9064).

3.14 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

A extração de ácido ascórbico (AA) foi realizada com solução ácido oxálico (4%). 50 mL dessa solução foi adicionada a 0,5 g de polpa liofilizada em pó. A mistura permaneceu em agitação por 15 minutos, foi filtrada, transferida para balão volumétrico (50 mL), cujo volume foi completado com a solução extratora. A solução final foi filtrada em membrana de nylon (0,45 μm), antes da injeção no cromatógrafo.

O conteúdo de ácido ascórbico nas amostras de *B. ligustrifolia* nos diferentes estádios de maturação foi determinado empregando-se cromatografia de fase reversa de acordo com Mazurek e Jamroz (2015), com pequenas modificações. O mesmo equipamento e coluna, empregados na análise quantitativa de compostos fenólicos, foram utilizados na determinação de AA por HPLC-DAD.

O volume de injeção da amostra (sem diluição: 50 mg/mL) foi 20 μL . A fase móvel consistiu de uma solução de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) com pH 2,5; a taxa

de fluxo foi de 0,5 mL/min; e as respostas foram monitoradas no comprimento de onda de 244 nm.

A concentração de AA foi calculada utilizando uma curva de calibração com o padrão de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich; PubChem CID: 54670067). A identificação do AA ocorreu por meio de: (I) comparação entre o tempo de retenção do padrão e dos componentes das amostras; (II) adição de uma concentração conhecida do padrão na amostra; e (III) comparação dos espectros UV/Vis (λ_{max}) dos componentes da amostra com o espectro do padrão.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os procedimentos de extração foram realizados em triplicata e duas amostras de cada extrato foram submetidas às análises descritas anteriormente. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Software Statistica 8.0 (StatSoft).

Com exceção da etapa 3.4.1 (aplicação do modelo *simplex-centroid design* para otimização da extração), os resultados das demais análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, havendo diferença estatística significativa, submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5%. As correlações entre os dados foram realizadas a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r^2).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FÍSICAS

4.1.1 Medida objetiva da cor

A cor é um dos indicadores mais importantes de maturidade e qualidade em muitos frutos (GONÇALVES *et al.*, 2007). Antocianinas são pigmentos responsáveis pelas cores vermelho, azul, roxo e violeta de muitas frutas, vegetais e grãos (SEERAM, 2006). Esses pigmentos são responsáveis pela cor dos frutos de *B. ligustrifolia*, que, de rosa claro, no estágio de maturação RS2, chega ao roxo quase negro, em RS5.

O sistema colorimétrico CIE (*Commission International de L'Eclairage*) é amplamente utilizado na quantificação e caracterização das propriedades cromáticas das antocianinas e na avaliação da qualidade de cor e de suas alterações durante a maturação e o processamento de alimentos de origem vegetal. Além disso, esta é uma técnica simples, rápida e não destrutiva que pode ser empregada na correlação com os teores de antocianinas em frutos e, conseqüentemente, na predição dos efeitos benéficos da ingestão desses frutos, visto que antocianinas são compostos com atividade antioxidante (GONÇALVES *et al.*, 2007).

As características cromáticas do fruto estudado ao longo de seu desenvolvimento estão apresentadas na Tabela 3. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada em L^* , croma e ângulo hue entre os cinco estádios de maturação.

Nos estádios de maturação RS4 e RS5, *B. ligustrifolia* apresentou os menores valores de L^* , croma (C^*) e ângulo hue. A perda da luminosidade é verificada pela redução do valor de L^* , pois este representa o parâmetro fotométrico proporcional à luz refletida pelo objeto. O decréscimo no parâmetro C^* ocorre devido ao aumento da tonalidade dos frutos ao longo do processo de amadurecimento, que do verde claro (em RS1) chega ao roxo quase negro (em RS5). Ou seja, valores de L^* , C^* e ângulo hue maiores em frutos não maduros significam coloração menos avermelhada, o que pode estar relacionado com baixo conteúdo de antocianinas.

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Estádios de maturação | Coordenadas cromáticas | | | Croma C^*_{ab} | Ângulo hue h_{ab} |
|-----------------------|------------------------|---------------|---------------|------------------|---------------------|
| | L^* | a^* | b^* | | |
| RS1 | 40,48 ± 1,02a | -4,29 ± 0,51d | 29,88 ± 0,89a | 30,19 ± 0,94a | 98,15 ± 0,81a |
| RS2 | 39,43 ± 3,75a | 19,24 ± 2,42b | 14,55 ± 0,54b | 24,21 ± 1,84b | 37,44 ± 4,00b |
| RS3 | 23,30 ± 1,32b | 28,25 ± 1,95a | 12,96 ± 0,52c | 31,09 ± 1,80a | 24,71 ± 1,71c |
| RS4 | 13,70 ± 0,88c | 18,72 ± 1,51b | 6,51 ± 0,85d | 19,82 ± 1,70c | 19,12 ± 0,94d |
| RS5 | 12,18 ± 0,91c | 7,29 ± 0,74c | 1,49 ± 0,30e | 7,44 ± 0,78d | 11,46 ± 1,20e |

Nota: resultados expressos como média (n = 10) ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. L^* : luminosidade (0 = completamente opaco ou “preto”; 100 = completamente transparente ou “branco”). Valores positivos de a^* indicam tonalidade vermelha ($-a^*$, tonalidade verde). Valores positivos de b^* , tonalidade amarela ($-b^*$, tonalidade azul). RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Valor de a^* negativo indica tonalidade verde e, positivo, tonalidade vermelha. Como observado na Figura 8, os frutos com epicarpo de coloração verde foram classificados em RS1 e, a partir de RS2, os frutos passavam a apresentar diferentes tonalidades de vermelho. A degradação da clorofila presente nos cloroplastos da célula vegetal e a biossíntese de pigmentos antociânicos ao longo do processo de amadurecimento dos frutos de murici vermelho levaram ao aumento do valor do parâmetro a^* até o estágio de maturação intermediário (RS3) e à diminuição do mesmo nos estádios RS4 e RS5. A presença de uma “área de inversão” ocorre quando o aumento da concentração do pigmento acarreta o escurecimento da amostra. Quando isto ocorre, as escalas de cor e transmitância luminosa não se correlacionam mais linearmente, bem como os valores de L^* , a^* e b^* e o aumento na concentração de pigmentos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

4.1.2 Avaliação da firmeza

A firmeza avaliada instrumentalmente apresentou diferenças estatísticas (p<0,05) entre os cinco estádios de maturação estudados (FIGURA 11). Como já relatado, os frutos de *B. ligustrifolia* foram classificados nos diferentes estádios de maturação em função da cor do epicarpo. No entanto, com relação à dureza (g), os estádios RS2 e RS3 não diferiram estatisticamente, apesar de apresentarem

colorações diferentes. Da mesma forma, os estádios RS4 e RS5 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para firmeza.

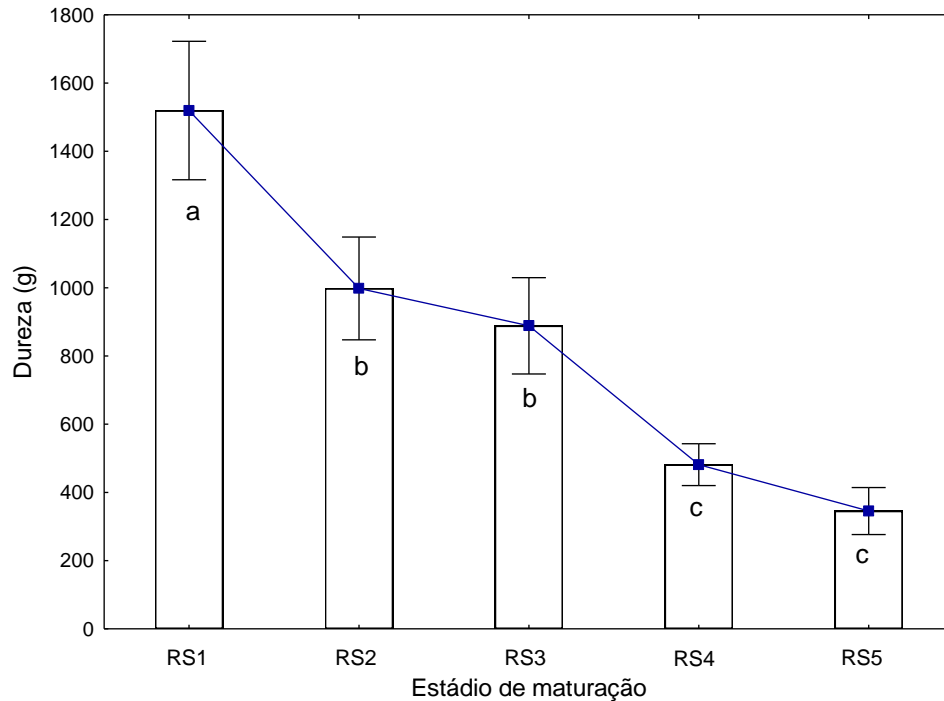


FIGURA 11 - FIRMEZA DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Quanto mais maduro está o fruto, menor é a sua firmeza. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), este amolecimento ocorre em decorrência de atividade de enzimas hidrolíticas, que promovem intensa solubilização das pectinas, constituintes da parede celular, ou da hidrólise do amido, ou, ainda, pode ser resultante da perda de água dos tecidos, com diminuição da pressão de turgescência.

4.1.3 Dimensões dos frutos

A Tabela 4 apresenta os valores de altura, diâmetro e massa dos frutos de murici vermelho nos cinco estádios de maturação. Há diferença estatisticamente significativa nos três parâmetros avaliados entre os estádios de maturação. Após o primeiro estágio (RS1) não houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na altura dos frutos, e após RS2 o diâmetro e a massa dos frutos não diferiram estatisticamente

ao nível de 5% de probabilidade. Com relação à semente, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) para os valores de altura e diâmetro entre as cinco fases do processo de maturação e, com relação à massa, RS1, RS2 e RS3 foram estatisticamente iguais e inferiores a RS4 e RS5, que, também, não apresentaram diferença estatística entre si.

Com base nessas informações, pôde-se inferir que o desenvolvimento do fruto ocorreu até o estágio RS2, visto que o aumento de massa, diâmetro e altura dos frutos é característico da fase final do desenvolvimento, quando ocorre aumento no acúmulo de reservas e expansão dos tecidos (MANICA *et al.*, 2003).

TABELA 4 – DIMENSÕES DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Parâmetros | Estádios de maturação | | | | |
|----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | RS1 | RS2 | RS3 | RS4 | RS5 |
| Altura (mm) | | | | | |
| Fruta inteira | 10,33 ± 0,71b | 11,40 ± 1,05a | 11,44 ± 0,67a | 11,65 ± 0,89a | 11,42 ± 0,69a |
| Semente | 6,63 ± 0,55a | 6,71 ± 0,49a | 6,47 ± 0,55a | 6,69 ± 0,70a | 6,59 ± 0,40a |
| Diâmetro (mm) | | | | | |
| Fruta inteira | 12,50 ± 1,07c | 13,98 ± 0,71b | 14,75 ± 0,80a | 14,98 ± 0,73a | 14,54 ± 0,76ab |
| Semente | 6,57 ± 0,45a | 6,31 ± 0,43a | 6,39 ± 0,40a | 6,66 ± 0,68a | 6,59 ± 0,40a |
| Massa | | | | | |
| Fruta inteira (g) | 1,01 ± 0,24c | 1,35 ± 0,20b | 1,50 ± 0,22ab | 1,59 ± 0,24a | 1,54 ± 0,20a |
| Semente (g) | 0,17 ± 0,03c | 0,16 ± 0,02c | 0,17 ± 0,03bc | 0,21 ± 0,06a | 0,20 ± 0,03ab |
| (%*) | 17,15 ± 1,33a | 12,07 ± 0,97c | 11,62 ± 0,48c | 12,97 ± 1,15b | 13,20 ± 0,60b |
| Polpa (g) | 0,84 ± 0,21c | 1,19 ± 0,18b | 1,33 ± 0,19ab | 1,38 ± 0,20a | 1,34 ± 0,18ab |
| (%*) | 82,85 ± 1,33c | 87,93 ± 0,97a | 88,38 ± 0,48a | 87,03 ± 1,15b | 86,80 ± 0,60b |

Nota: resultados expressos como média (n=30) ± desvio padrão. * % em relação à fruta inteira. Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-rosa; RS5 = epicarpo rosa-negro.

Coffani-Nunes, Azzolini e Morgante (2012) avaliaram a morfologia de frutos de *Byrsonima ligustrifolia* em diferentes fases do processo de maturação. Esses autores concluíram que a altura apresentou variação entre 8,20 e 10,90 mm e o diâmetro entre 10,20 a 15,40 mm. Esses valores assemelham-se aos do presente estudo, porém, tanto a altura quanto o diâmetro aqui avaliados apresentaram uma variação menor: altura de 10,33 a 11,65 mm e diâmetro de 12,50 a 14,98 mm. Isto acarretou uma diferença considerável entre a massa média dos frutos apresentada por aqueles autores (1,03 ± 0,21 g, com a semente compreendendo apenas 10,7%)

e o valor apresentado no presente estudo ($1,39 \pm 0,31$ g, com a semente correspondendo, em média, a 13,0% desse valor).

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O acúmulo de substâncias durante o processo de amadurecimento dos frutos de *Byrsonima ligustrifolia* é evidenciado com o aumento do teor de sólidos solúveis, medidos em °Brix (TABELA 5). Esta determinação apresentou correlação positiva altamente significativa ($r^2 = 0,965$; $p < 0,01$) com o conteúdo de açúcares, podendo, então, representar uma medida indireta do teor de açúcares nesses frutos. Estudos sobre qualidade de diferentes frutos frequentemente encontram boa correlação entre aceitação por parte do consumidor e os parâmetros de °Brix e acidez. Isso porque esses parâmetros normalmente representam indicadores de maturação e a aceitação de frutos é altamente dependente do nível de maturação dos mesmos (JAYASENA; CAMERON, 2008).

TABELA 5 – AÇÚCARES TOTAIS, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRUX), ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL E pH DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Parâmetros | Estádio de maturação | | | | |
|--------------------------|----------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| | RS1 | RS2 | RS3 | RS4 | RS5 |
| Açúcares ¹ | 0,38 ± 0,01d | 0,43 ± 0,02cd | 0,48 ± 0,05c | 0,57 ± 0,01b | 0,66 ± 0,01a |
| SST (°Brix) ² | 8,22 ± 0,38b | 8,07 ± 0,50b | 9,47 ± 0,48b | 9,92 ± 1,16b | 11,52 ± 0,84a |
| ATT ³ | 0,15 ± 0,001a | 0,15 ± 0,01a | 0,14 ± 0,01ab | 0,13 ± 0,002bc | 0,13 ± 0,003c |
| pH | 3,31 ± 0,02b | 3,30 ± 0,03b | 3,30 ± 0,02b | 3,32 ± 0,02b | 3,44 ± 0,08a |

Nota: resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão. ¹ açúcares totais expressos em g/100 g de amostra em base fresca; ² SST = sólidos solúveis totais em °Brix; ³ ATT = Acidez Total Titulável expressa em g de ácido cítrico/100 g de amostra em base fresca. Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-rosa; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Embora uma grande variedade de ácidos orgânicos possa estar presente nos frutos, os mais abundantes são os ácidos cítrico e málico. O decréscimo observado na ATT ao longo da maturação está relacionado à diminuição do teor de ácidos orgânicos, uma vez que estes são utilizados como substratos no processo respiratório (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Conseqüentemente à redução da acidez, ocorreu um aumento no pH dos frutos de murici vermelho. Esses resultados corroboram com Manica *et al.* (2003), pois, segundo estes autores, no

amadurecimento de frutos, normalmente, observa-se a diminuição da acidez e, conseqüentemente, a elevação do pH.

A maior ou menor presença de ácidos orgânicos acumulados nos vacúolos exerce influência sobre a acidez dos frutos. Uma das alterações que ocorre nos frutos ao longo do processo de amadurecimento é a transformação de ácidos em açúcares (KERBAUY, 2012). Desta forma, como observado no presente estudo (TABELA 5), quanto maior é o teor de açúcares, menor é a acidez da fruta. Essa observação pode ser reafirmada com o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, que se mostrou altamente significativo e negativo ($r^2 = -0,983$; $p < 0,01$).

A composição centesimal dos frutos de *B. ligustrifolia* nos cinco estádios de maturação está apresentada na Tabela 6. O aumento do teor de umidade observado até RS3, estádio em que a fruta atingiu seu ponto máximo de desenvolvimento, demonstra que, com o desenvolvimento do fruto, ocorreu acúmulo de água. Após esse estádio, o acúmulo de reservas levou ao aumento do teor de matéria seca e à diminuição do teor de umidade.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Parâmetros (g/100 g) | Estádio de maturação | | | | |
|-------------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | RS1 | RS2 | RS3 | RS4 | RS5 |
| Umidade | 88,40 ± 0,59b | 89,64 ± 0,31a | 89,19 ± 0,45ab | 88,32 ± 0,29b | 86,85 ± 0,53c |
| RMF* | 6,82 ± 0,10a | 6,67 ± 0,07a | 6,02 ± 0,25b | 5,66 ± 0,22bc | 5,06 ± 0,02c |
| Proteínas* | 5,02 ± 0,32a | 4,42 ± 0,23ab | 3,96 ± 0,16bc | 3,38 ± 0,18c | 3,28 ± 0,16c |
| Lipídios* | 0,41 ± 0,07a | 0,38 ± 0,05a | 0,37 ± 0,05a | 0,32 ± 0,06ab | 0,18 ± 0,04b |
| Fibras totais* | 70,75 ± 1,23a | 64,53 ± 1,97b | 60,30 ± 0,39b | 51,73 ± 0,40c | 45,34 ± 1,33d |
| Carboidratos* | 17,00 | 24,00 | 29,35 | 38,91 | 46,14 |

Nota: valores expressos como média (n=3) ± desvio padrão. * em relação à massa seca. RMF = resíduo mineral fixo. Carboidratos foram calculados por diferença. Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Decréscimo significativo foi observado nos teores de resíduo mineral fixo, proteínas, lipídios e fibras totais ao longo da maturação. A diminuição no teor de fibras decorre da degradação dos componentes da parede celular, ou seja, despolimerização de pectinas, celulose e hemicelulose (KERBAUY, 2012).

Correlação positiva altamente significativa foi observada entre os teores de carboidratos e açúcares ($r^2 = 0,996$; $p < 0,01$) e entre os teores de carboidratos e SST

($r^2 = 0,947$; $p < 0,01$). E o teor de carboidratos apresentou correlação negativa altamente significativa com a acidez ($r^2 = -0,991$; $p < 0,01$).

4.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

4.3.1 Otimização da extração por meio de *Simplex-centroid design*

Todas as combinações de solventes (acetona, metanol e água) testadas e avaliadas estatisticamente por meio do modelo matemático *Simplex-centroid design* (SCD) com pontos axiais e triplicata no ponto central, bem como os resultados das extrações de antocianinas monoméricas totais (TMA) e compostos fenólicos totais (TPC), estão apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7 – *SIMPLEX CENTROID DESIGN* PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE TMA E TPC

| Nº ensaio | Variáveis independentes | | | Respostas | |
|-----------|-------------------------|-------------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | % Acetona (β_1) | % Metanol (β_2) | % Água (β_3) | TMA ^a | TPC ^b |
| 14 | 100 | 0 | 0 | 0,30 | 41,94 |
| 02 | 0 | 100 | 0 | 1,87 | 126,02 |
| 18 | 0 | 0 | 100 | 1,13 | 64,62 |
| 09 | 50 | 50 | 0 | 1,93 | 111,16 |
| 08 | 50 | 0 | 50 | 1,50 | 93,61 |
| 01 | 0 | 50 | 50 | 1,70 | 98,03 |
| 16 | 33,33 | 33,33 | 33,33 | 1,88 | 108,63 |
| 13 | 66,67 | 16,67 | 16,67 | 1,48 | 103,20 |
| 04 | 16,67 | 66,67 | 16,67 | 1,80 | 112,76 |
| 10 | 16,67 | 16,67 | 66,67 | 1,42 | 85,89 |
| 12 | 100 | 0 | 0 | 0,39 | 36,96 |
| 15 | 0 | 100 | 0 | 1,93 | 108,90 |
| 06 | 0 | 0 | 100 | 1,27 | 73,50 |
| 11 | 50 | 50 | 0 | 1,65 | 112,37 |
| 05 | 50 | 0 | 50 | 1,42 | 105,94 |
| 17 | 0 | 50 | 50 | 1,45 | 88,41 |
| 07 | 33,33 | 33,33 | 33,33 | 1,75 | 110,20 |
| 03 | 33,33 | 33,33 | 33,33 | 1,66 | 105,63 |

Nota: ^a TMA = antocianinas monoméricas totais expresso como mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo/g de amostra liofilizada; ^b TPC = compostos fenólicos totais expresso como mg equivalente a ácido gálico/g de amostra liofilizada.

Os valores de compostos fenólicos totais (TPC) foram obtidos a partir de uma curva de calibração com padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich), com sete pontos (de 10 a 70 µg/mL), que apresentou um coeficiente de regressão igual a 0,9992. O coeficiente de variação da curva de calibração variou de 1,05% a 2,10%.

Os menores valores médios de antocianinas ($0,35 \pm 0,06$ mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo (C3G)/g de amostra liofilizada) e composto fenólicos ($39,45 \pm 3,52$ mg equivalente ao ácido gálico (GAE)/g de amostra liofilizada) foram obtidos na extração com acetona pura (ensaios 12 e 14) e os maiores valores médios foram obtidos para metanol puro (Média dos ensaios 2 e 15: $1,90 \pm 0,04$ mg C3G/g para TMA e $117,46 \pm 12,10$ mg GAE/g para TPC). No entanto, ensaios com os solventes na mesma proporção (ensaios 3, 7 e 16) resultaram em valores médios elevados de antocianinas ($1,76 \pm 0,11$ mg C3G/g) e TPC ($108,16 \pm 2,32$ mg GAE/g). Não obstante, as extrações com acetona e metanol (ensaios 9 e 11) e o ponto axial correspondente ao ensaio 4 (1:4:1, acetona:metanol:água, respectivamente) produziram, também, bons resultados.

A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos modelos de regressão obtidos (linear, quadrático e especial cúbico) a partir do SCD para cada uma das respostas estudadas (TMA e TPC). Para ambas as respostas, apenas os modelos linear e quadrático foram significativos (Valor de p para o modelo quadrático: $2,0 \times 10^{-6}$ para TMA e $0,2 \times 10^{-5}$ para TPC). Desta forma, o ajuste dos modelos quadráticos para TMA e TPC foi avaliado e encontra-se na Tabela 9. Como não apresentaram falta de ajuste (Valor de p da falta de ajuste: 0,574 para TMA e 0,350 para TPC), os dois modelos propostos puderam ser utilizados para a realização das predições.

TABELA 8 – ANOVA DOS MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS A PARTIR DO SCD* PARA OTIMIZAÇÃO DE SOLVENTES

| Modelos | SQ | GL | Valor-F | Valor-p | R ² |
|------------------|-------------------------|----|---------|------------------------|----------------|
| TMA ^a | | | | | |
| Linear | 2,096 | 2 | 9,463 | 0,002 | 0,558 |
| Quadrático | 1,504 | 3 | 38,161 | 2,0 x 10 ⁻⁶ | 0,958 |
| Cúbico | 1,07 x 10 ⁻⁴ | 1 | 0,007 | 0,933 | 0,958 |
| TPC ^b | | | | | |
| Linear | 4818,88 | 2 | 6,441 | 9,6 x 10 ⁻³ | 0,462 |
| Quadrático | 5064,30 | 3 | 37,062 | 0,2 x 10 ⁻⁵ | 0,948 |
| Cúbico | 7,46 | 1 | 0,152 | 0,704 | 0,948 |

Nota: * SCD = *Simplex-centroid design*; ^a TMA = antocianinas monoméricas totais; ^b TPC = compostos fenólicos totais; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade.

TABELA 9 – AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS PARA TMA E TPC

| Modelos | SQ | GL | Valor-F | Valor-p |
|------------------|---------|----|---------|------------------------|
| TMA ^a | | | | |
| Modelo | 3.599 | 5 | 54.813 | 0,1 x 10 ⁻⁶ |
| Erro total | 0,158 | 12 | | |
| Falta de ajuste | 0,044 | 4 | 0,771 | 0,574 |
| Erro puro | 0,114 | 8 | | |
| TPC ^b | | | | |
| Modelo | 9883,17 | 5 | 43,397 | 0,1 x 10 ⁻⁶ |
| Erro total | 546,57 | 12 | | |
| Falta de ajuste | 214,40 | 4 | 1,291 | 0,350 |
| Erro puro | 332,18 | 8 | | |

Nota: ^a TMA = antocianinas monoméricas totais; ^b TPC = compostos fenólicos totais; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade.

Os coeficientes de regressão, os erros padrão e os valores de p estimados nos modelos polinomiais quadráticos obtidos para TMA e TPC estão apresentados na Tabela 10. Foram obtidos coeficientes significativos para as variáveis estudadas (β_1 , β_2 e β_3), e a interação entre acetona e metanol (β_{12}) e entre acetona e água (β_{13}) mostraram um importante efeito sinérgico. No entanto, a interação entre metanol e água (β_{23}) não foi significativa para ambos os modelos das respostas estudadas (Valor de p : 0,949 para TMA e 0,726 para TPC). Devido a isso, este último coeficiente foi removido do modelo antes das predições.

TABELA 10 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO, ERROS PADRÃO E VALORES DE p ESTIMADOS NOS MODELOS QUADRÁTICOS

| Modelo quadrático | Variável | Coefficiente estimado | Erro padrão | Valor- p |
|-------------------|--------------|-----------------------|-------------|----------------------|
| TMA ^a | β_1 | 0,368 | 0,079 | $5,6 \times 10^{-4}$ |
| | β_2 | 1,888 | 0,079 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_3 | 1,182 | 0,079 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_{12} | 2,675 | 0,359 | $0,8 \times 10^{-5}$ |
| | β_{13} | 2,744 | 0,359 | $0,6 \times 10^{-5}$ |
| | β_{23} | 0,023 | 0,359 | 0,949 |
| TPC ^b | β_1 | 41,39 | 4,66 | $0,1 \times 10^{-5}$ |
| | β_2 | 117,26 | 4,66 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_3 | 67,85 | 4,66 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_{12} | 132,12 | 21,17 | $4,3 \times 10^{-5}$ |
| | β_{13} | 178,93 | 21,17 | $0,2 \times 10^{-5}$ |
| | β_{23} | -7,58 | 21,17 | 0,726 |

Nota: ^a TMA = antocianinas monoméricas totais; ^b TPC = compostos fenólicos totais.

Assim, o ajuste dos modelos propostos para TMA e TPC sem o coeficiente β_{23} está apresentado na Tabela 11 e a Tabela 12 exhibe os coeficientes de regressão estimados, os erros padrão e os valores de p dos modelos sem o coeficiente β_{23} .

TABELA 11 – AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS PARA TMA E TPC SEM O COEFICIENTE β_{23}

| Modelos | SQ | GL | Valor-F | Valor- p |
|------------------|---------|----|---------|----------------------|
| TMA ^a | | | | |
| Modelo | 3,599 | 4 | 74,199 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| Erro total | 0,158 | 13 | | |
| Falta de ajuste | 0,044 | 5 | 0,617 | 0,691 |
| Erro puro | 0,114 | 8 | | |
| TPC ^b | | | | |
| Modelo | 9877,33 | 4 | 58,110 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| Erro total | 552,42 | 13 | | |
| Falta de ajuste | 220,24 | 5 | 1,061 | 0,447 |
| Erro puro | 332,18 | 8 | | |

Nota: ^a TMA = antocianinas monoméricas totais; ^b TPC = compostos fenólicos totais; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade.

TABELA 12 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO, ERROS PADRÃO E VALORES DE p ESTIMADOS NOS MODELOS QUADRÁTICOS SEM O COEFICIENTE β_{23}

| Modelo quadrático | Variável | Coefficiente estimado | Erro padrão | Valor- p |
|-------------------|--------------|-----------------------|-------------|----------------------|
| TMA ^a | β_1 | 0,368 | 0,076 | $3,2 \times 10^{-4}$ |
| | β_2 | 1,890 | 0,069 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_3 | 1,185 | 0,069 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_{12} | 2,676 | 0,345 | $0,3 \times 10^{-5}$ |
| | β_{13} | 2,745 | 0,345 | $0,2 \times 10^{-5}$ |
| TPC ^b | β_1 | 41,48 | 4,50 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_2 | 116,54 | 4,07 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_3 | 67,13 | 4,07 | $0,1 \times 10^{-6}$ |
| | β_{12} | 132,07 | 20,44 | $2,1 \times 10^{-5}$ |
| | β_{13} | 178,88 | 20,44 | $0,1 \times 10^{-5}$ |

Nota: ^a TMA = antocianinas monoméricas totais; ^b TPC = compostos fenólicos totais.

As Figuras 12 e 13 apresentam o perfil da resposta otimizada para TMA e TPC, respectivamente. O valor ótimo previsto para TMA foi 1,93 mg C3G/g de fruta liofilizada para a proporção de acetona, metanol e água de 30%, 60,87% e 9,13%, respectivamente, e para TPC foi 122,66 mg GAE/g com 20% de acetona e 80% de metanol.

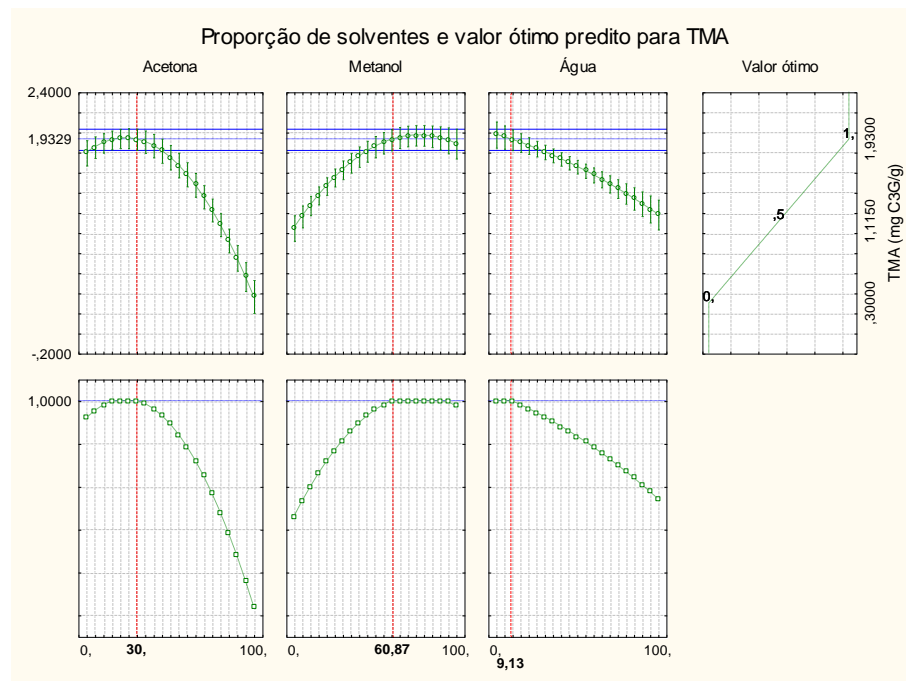


FIGURA 12 – PROPORÇÃO DE SOLVENTES E VALOR ÓTIMO PREDITO PARA TMA PELO MODELO QUADRÁTICO SEM O COEFICIENTE β_{23}

Nota: TMA = antocianinas monoméricas totais.

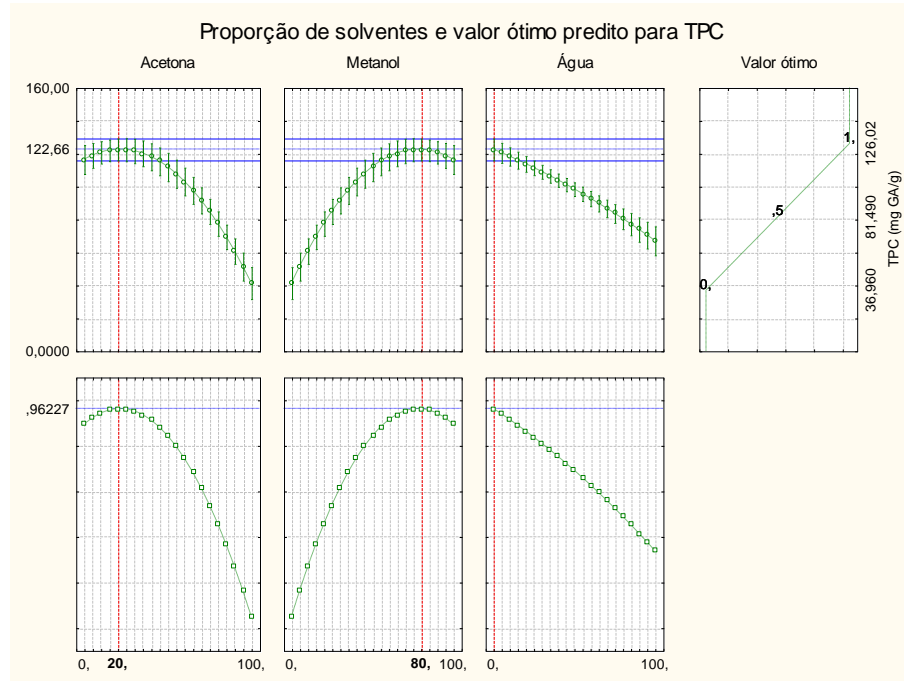


FIGURA 13 – PROPORÇÃO DE SOLVENTES E VALOR ÓTIMO PREDITO PARA TPC PELO MODELO QUADRÁTICO SEM O COEFICIENTE β_{23}

Nota: TPC = compostos fenólicos totais.

O gráfico com a superfície de resposta do modelo quadrático para TMA apenas com os coeficientes significativos está representado na Figura 14. A equação correspondente a este modelo, com um valor de $R^2 = 0,958$, apresenta-se a seguir:

$$\text{TMA} = 0,368*\beta_1 + 1,890*\beta_2 + 1,185*\beta_3 + 2,676*\beta_{12} + 2,745*\beta_{13} \quad \text{Eq. (6)}$$

O gráfico com a superfície de resposta do modelo quadrático para TPC sem a interação β_{23} está representado na Figura 15. A equação correspondente a este modelo, com um valor de $R^2 = 0,947$, apresenta-se a seguir:

$$\text{TPC} = 41,48*\beta_1 + 116,54*\beta_2 + 67,13*\beta_3 + 132,07*\beta_{12} + 178,88*\beta_{13} \quad \text{Eq. (7)}$$

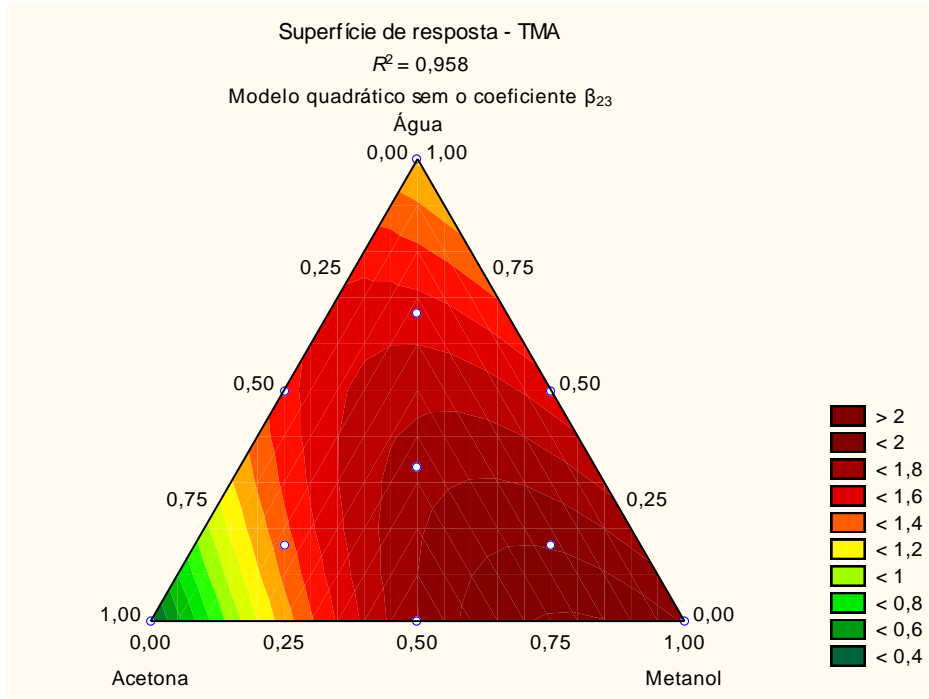


FIGURA 14 – GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO QUADRÁTICO PARA TMA SEM O COEFICIENTE β_{23}

Nota: TMA = antocianinas monoméricas totais.

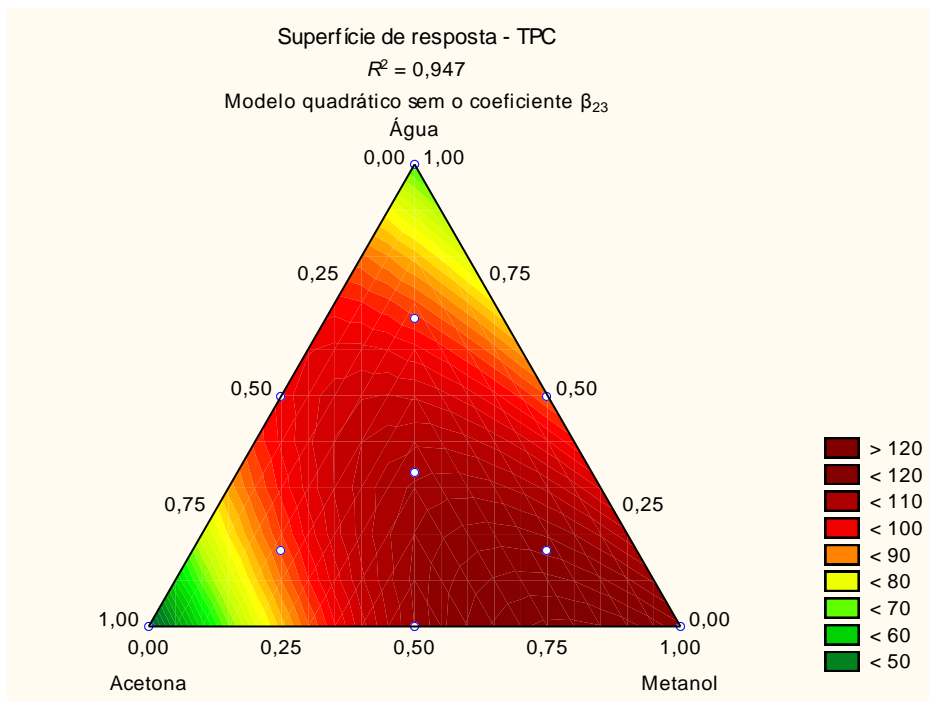


FIGURA 15 – GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO QUADRÁTICO PARA TPC SEM O COEFICIENTE β_{23}

Nota: TPC = compostos fenólicos totais.

4.3.2 Validação do modelo

Para verificar a efetividade dos modelos obtidos, foram realizadas sete novas extrações, cuja proporção de solventes e os resultados estão apresentados na Tabela 13. O ensaio A apresentou a combinação de solventes que representou a melhor condição para extração de antocianinas, e a proporção de solventes do experimento B foi aquela otimizada para TPC.

Todos os resultados obtidos para TMA encontraram-se de acordo com as predições do modelo e dentro do intervalo de confiança (95%). No entanto, para TPC, o resultado da condição de extração E ficou fora do intervalo de confiança de 95%.

Os resultados dos ensaios A e B, tanto para TMA quanto para TPC, não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Os valores preditos e experimentais de TMA e TPC do experimento B foram numericamente maiores do que os valores correspondentes no ensaio A. Com isso, para simplificar os experimentos seguintes, a proporção de solventes apresentada em B foi estabelecida.

4.3.3 Seleção da proporção de sólido-líquido

Sabendo-se que a proporção da solução extratora em relação à quantidade de amostra afeta a eficiência da extração, foi estudada a melhor relação sólido-líquido (g/mL) necessária para maximizar a extração de antocianinas e compostos fenólicos e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na extração de TMA e TPC para os ensaios com proporção de amostra:solvente de 1:30 a 1:150 (g/mL). Isto significa que proporções de solventes em relação à amostra maiores do que 1:30 não aumentam a extração desses compostos. Desta forma, a proporção de 1:30 (g amostra:mL solvente) foi estabelecida para os experimentos seguintes.

TABELA 13 – VALIDAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS PARA TMA E TPC

| Ensaio | Acetona (β1) % | Metanol (β2) % | Água (β3) % | TMA ^a | | | TPC ^b | | | | |
|--------|-------------------|-------------------|----------------|---------------------|--|------|--------------------------|---------------------|--|--------|--------------------------|
| | | | | Valores preditos | Intervalo de confiança - 95% + 95% | | Valores experimentais | Valores preditos | Intervalo de confiança - 95% + 95% | | Valores experimentais |
| A* | 30 | 60,87 | 9,13 | 1,93 | 1,83 | 2,04 | 1,85 ± 0,07ab | 118,53 | 112,28 | 124,78 | 116,79 ± 4,21a |
| B** | 20 | 80 | 0 | 2,01 | 1,90 | 2,13 | 2,03 ± 0,09a | 122,66 | 116,00 | 129,32 | 122,31 ± 2,70a |
| C | 0 | 45 | 55 | 1,50 | 1,41 | 1,60 | 1,42 ± 0,02c | 89,37 | 83,84 | 94,89 | 86,79 ± 2,94b |
| D | 35 | 65 | 0 | 1,97 | 1,83 | 2,10 | 1,84 ± 0,04ab | 120,31 | 112,46 | 128,17 | 117,63 ± 0,60a |
| E | 35 | 40 | 25 | 1,80 | 1,71 | 1,88 | 1,77 ± 0,20b | 112,06 | 107,17 | 116,95 | 120,26 ± 3,98a |
| F | 10 | 90 | 0 | 1,98 | 1,86 | 2,09 | 1,86 ± 0,09ab | 120,92 | 114,13 | 127,72 | 115,58 ± 0,82a |
| G | 15 | 80 | 5 | 1,97 | 1,87 | 2,07 | 1,98 ± 0,15ab | 120,00 | 113,94 | 126,06 | 116,95 ± 1,52a |

Nota: valores experimentais expressos como média ± desvio padrão; ^a TMA = antocianinas monoméricas totais expresso como mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo/g de amostra liofilizada; ^b TPC = compostos fenólicos totais expresso como mg equivalente a ácido gálico/g de amostra liofilizada. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey * Melhor condição para extração de TMA; ** Melhor condição para extração de TPC.

TABELA 14 – TMA E TPC DE POLPA LIOFILIZADA DE *Byrsonima ligustrifolia* EXTRAÍDOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE AMOSTRA:SOLVENTE

| Respostas | Amostra:solvente (g:mL) | | | | | | |
|------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1:10 | 1:20 | 1:30 | 1:60 | 1:90 | 1:120 | 1:150 |
| TMA ^a | 1,10 ± 0,03c | 1,69 ± 0,03b | 1,97 ± 0,04a | 2,00 ± 0,05a | 1,94 ± 0,03a | 1,91 ± 0,03a | 1,95 ± 0,08a |
| TPC ^b | 104,77 ± 5,06b | 116,72 ± 2,48a | 121,56 ± 1,69a | 123,32 ± 2,49a | 122,83 ± 1,76a | 119,72 ± 1,88a | 122,05 ± 2,93a |

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão; ^a TMA = antocianinas monoméricas totais expresso como mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo/g de amostra liofilizada; ^b TPC = compostos fenólicos totais expresso como mg equivalente a ácido gálico/g de amostra liofilizada. Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

4.4 FLAVONÓIDES TOTAIS (TF)

Compostos fenólicos representam o maior grupo de fitoquímicos em *berries*, do qual fazem parte os subgrupos: flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavanóis, por exemplo), estilbenos, taninos e ácidos fenólicos (SEERAM, 2006).

Apesar da coloração amarela dos alimentos normalmente ser atribuída à presença de carotenóides, em alguns frutos esta cor deve-se aos flavonóides não antociânicos (FENNEMA, 2010). Os flavonóides são o grupo de compostos fenólicos mais comum e amplamente encontrados nos vegetais (BAKAR *et al.*, 2009). Esses compostos chamam a atenção da comunidade acadêmica e da indústria interessada em bioativos devido às suas propriedades relacionadas com a saúde, que são baseadas em sua atividade antioxidante.

O conteúdo de flavonóides totais (TF) pode ser determinado espectrofotometricamente em extratos de amostras, pois eles reagem com nitrito de sódio, gerando um complexo colorido com cloreto de alumínio que pode ser monitorado a 415 nm (BAKAR *et al.*, 2009).

TF foram avaliados nos extratos de polpa de *Byrsonima ligustrifolia* nos cinco estádios de maturação, apresentando um decréscimo significativo ao longo do processo de amadurecimento (TABELA 15). Por outro lado, em cada estágio de maturação não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os valores de TF dos extratos não hidrolisados e dos hidrolisados. Isto denota que o procedimento realizado com o objetivo de hidrolisar os ácidos fenólicos não provocou perdas significativas nos teores de TF.

TF dos extratos no estágio de maturação em que a fruta normalmente é consumida (RS5) apresentaram valores próximos ao reportado para caju vermelho (834 mg quercetina/100 g DW), *purple star apple* (844 mg quercetina/100 g DW) (MOO-HUCHIN *et al.*, 2015) e uva vermelha (881 mg quercetina/100 g DW) (MOLINA-QUIJADA *et al.*, 2010).

TABELA 15 – ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Estádios de maturação | TMA ^a (mg/100 g DW) | | TF ^b (mg/100 g DW) | | TPC ^c (g/100 g DW) | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--|
| | Extrato não hidrolisado | Extrato não hidrolisado | Extrato hidrolisado | Extrato não hidrolisado | Extrato hidrolisado | |
| RS1 | 21,6 ± 1,2E | 2126,5 ± 91,6Aa | 1994,8 ± 135,5Aa | 19,14 ± 0,91Aa | 19,64 ± 0,79Aa | |
| RS2 | 113,1 ± 1,9D | 1727,1 ± 75,2Ba | 1510,4 ± 110,8Ba | 16,27 ± 0,40Ba | 16,55 ± 0,75Ba | |
| RS3 | 375,4 ± 5,5C | 1687,6 ± 39,3Ba | 1439,4 ± 48,5Ba | 14,98 ± 0,28Ba | 15,17 ± 0,17Ba | |
| RS4 | 720,7 ± 18,1B | 1166,3 ± 94,5Ca | 846,0 ± 55,4Ca | 11,18 ± 0,29Ca | 10,61 ± 0,13Ca | |
| RS5 | 1729,8 ± 30,2A | 1002,8 ± 76,2Ca | 806,2 ± 49,2Ca | 10,28 ± 0,39Ca | 9,98 ± 0,49Ca | |

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão; ^a TMA = antocianinas monoméricas totais expresso como mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo/100 g de amostra (DW: base seca); ^b TF = flavonóides totais expresso como mg equivalente a quercetina/100 g de amostra (DW); ^c TPC = compostos fenólicos totais expresso como mg equivalente a ácido gálico/100 g de amostra (DW). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna denotam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras minúsculas iguais na mesma linha denotam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os extratos hidrolisados e não hidrolisados de um mesmo teste. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

4.5 ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (TMA)

As antocianinas, compostos responsáveis por grande parte da coloração vermelha, azul e roxo de frutas, têm sido amplamente estudadas devido à sua ampla gama de propriedades bioativas, incluindo antioxidante, anticancerígena, e anti-inflamatórias (SEERAM, 2006; SEERAM, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2014; HELENO *et al.*, 2015). Esses compostos são especialmente abundantes em frutas classificadas como *berries*, que, recentemente, têm recebido mais atenção por serem consideradas fontes de antioxidantes fenólicos (REYNERTSON *et al.*, 2008).

Os valores de TMA dos extratos de *Byrsonima ligustrifolia* em cinco estádios de maturação estão apresentados na Tabela 15. A análise estatística revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de antocianinas entre todos os cinco estágios de desenvolvimento. Os resultados exibem um aumento significativo da TMA durante o amadurecimento.

O amadurecimento dos frutos está associado a importantes mudanças bioquímicas que modificam a cor, textura, sabor e outras características de qualidade. A mudança na cor do fruto é a evidência mais visível do início da maturação, e a cor avermelhada dos frutos maduros é resultado do acúmulo de antocianinas e da diminuição no teor de clorofila (KERBAUY, 2012).

Estudando acerolas, Lima *et al.* (2003) encontraram quantidades de antocianinas totais variando entre 3,79 e 59,74 mg/100 g FW, dependendo das variedades, que apresentavam cores que variavam do amarelo ao vermelho. Para o mesmo fruto, Mezadri *et al.* (2008), Rufino *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2014) apresentaram valores de antocianinas totais de 4,98 mg/100 g FW, 18,9 mg/100 g FW e 144,27 mg/100 g DW, respectivamente. Apesar de ser da mesma família, *B. ligustrifolia* em seu estágio mais avançado de maturação (RS5) apresentou um teor de antocianina (1730 mg/100 g DW ou 227,5 mg/100 g FW, considerando a umidade de 86,85%) maior do que o da acerola.

Byrsonima crassifolia (murici), apesar de pertencer ao mesmo gênero de *B. ligustrifolia*, é uma fruta amarela quando madura com teor de antocianinas (1,02 mg/100 g FW) (ALMEIDA *et al.*, 2011) inferior ao de murici vermelho.

O teor de antocianinas monoméricas totais de murici vermelho no estágio de desenvolvimento RS5 pode ser comparado ao da groselha negra (225 mg/100 g FW) (CONTESSA *et al.*, 2013), *Cornelian cherry* (223 mg/100 g FW) (PANTELIDIS

et al., 2007), *highbush blueberry* (222 mg/100 g FW) (CONTESSA *et al.*, 2013) e juçara (192 mg/100 g FW) (RUFINO *et al.*, 2010).

4.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação de TPC por Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico a um complexo de cor azul em uma solução alcalina. Esta reação pode sofrer interferência de antioxidantes não-fenólicos e substâncias redutoras tais como o ácido ascórbico, glicose, frutose, sulfitos, aminoácidos (tirosina, triptofano) e proteínas que contêm estes aminoácidos. Desta forma, esse ensaio tem sido considerado um método de análise de capacidade antioxidante e não mais uma ferramenta para determinação quantitativa de compostos fenólicos em alimentos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; GRUZ *et al.*, 2011; MEDINA, 2011).

Os resultados mostraram uma diminuição significativa nos valores TPC (TABELA 15) durante o processo de maturação, o que está de acordo com outros trabalhos que estudaram alterações no teor de fenólicos totais ao longo dos estágios de desenvolvimento da cereja brasileira (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011), framboesa vermelha (WANG; CHEN; WANG, 2009), amora, morango (WANG; LIN, 2000) e acerola (LIMA *et al.*, 2005), concluindo que o amadurecimento reduz TPC nesses frutos.

Almeida *et al.* (2011), De Souza *et al.* (2012) e Ribeiro *et al.* (2013) determinaram TPC por Folin-Ciocalteu em extratos de frutos de *Byrsonima crassifolia* (murici), encontrando os resultados: 160 mg GAE/100 g FW, 334 mg/100 g FW e 243 mg/100 g FW, respectivamente. Esses são inferiores ao valor encontrado no presente estudo para frutos maduros de *B. ligustrifolia* (RS5 = 10.283 mg GAE/100 g DW ou 1.322 mg/100 g FW), o qual pode ser comparado a acerola (PAZ *et al.*, 2015; RUFINO *et al.*, 2010) e camu-camu (RUFINO *et al.*, 2010; REYNERTSON *et al.*, 2008).

Uma vez que as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante podem sofrer a ação de interferentes, propõe-se, atualmente, a utilização de duas ou mais técnicas, pois um único ensaio não é capaz de refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG; OU; PRIOR,

2005). Neste contexto, determinou-se a capacidade antioxidante empregando também os métodos ABTS e DPPH, que estão apresentados na Tabela 16.

Em todos os métodos estudados, a capacidade antioxidante mais elevada foi observada no estágio de desenvolvimento RS1, e o valor mais baixo em todos os ensaios realizados correspondeu a RS5. Assim, a quantidade de polpa de fruta necessária para reduzir o radical DPPH em 50% (EC_{50}) foi progressivamente maior em cada estágio de maturação. Quando avaliada pelo método ABTS, murici vermelho apresentou variações de 2543 a 1296 μ M trolox equivalente/g DW (de RS1 a RS5, respectivamente). Este resultado demonstra uma diminuição significativa na capacidade antioxidante ao longo do processo de maturação. Rufino *et al.* (2010) determinaram a atividade antioxidante pelo método ABTS de 18 frutas tropicais brasileiras, não-tradicionais. Camu-camu foi o fruto com maior capacidade antioxidante (1237 μ mol TE/g DW) e o único que pode ser comparado ao resultado em RS5.

TABELA 16 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Estádios de maturação | ABTS (μ mol TE/g DW) | | DPPH EC_{50} (g DW/g DPPH) | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| | Extrato não hidrolisado | Extrato hidrolisado | Extrato não hidrolisado | Extrato hidrolisado |
| RS1 | 2543 \pm 82,2Aa | 490 \pm 27,4Ab | 29,3 \pm 3,7Db | 83,8 \pm 10,9Ba |
| RS2 | 2147 \pm 26,0Ba | 317 \pm 44,8Bb | 64,4 \pm 3,8Cb | 101,9 \pm 9,1Ba |
| RS3 | 1477 \pm 26,7Ca | 177 \pm 20,6Cb | 81,9 \pm 2,8Bb | 103,7 \pm 11,2Ba |
| RS4 | 1391 \pm 21,5CDa | 98,3 \pm 19,2Cdb | 97,3 \pm 5,4ABb | 142,8 \pm 12,2Ba |
| RS5 | 1296 \pm 23,2Da | 41,0 \pm 11,3Db | 111,3 \pm 4,8Ab | 222,0 \pm 23,5Aa |

Nota: resultados expressos como média \pm desvio padrão; TE = equivalente ao Trolox; DW = base seca; EC_{50} = Concentração do antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de radical livre. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna denotam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras minúsculas iguais na mesma linha denotam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os extratos hidrolisados e não hidrolisados de um mesmo teste. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-MS/MS

A espectrometria de massas é utilizada em análises qualitativas de identificação de compostos em misturas, que pode ser alcançada por meio da determinação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos (SOUZA, 2008). A identificação dos principais metabólitos presentes em extratos de *B. ligustrifolia* foi realizada empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas (HPLC-MS/MS). Dos 34 compostos fenólicos monitorados, 12 foram detectados nos extratos de *B. ligustrifolia*. O tempo de retenção encontrado para cada um dos metabólitos está apresentado na Tabela 17, bem como a intensidade do sinal (em cps: contagem por segundo) observada em cada estágio de maturação.

A identificação dos compostos ocorreu por meio da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, que é definida pela movimentação do composto através de um campo elétrico (ESI – *Electrospray Ionization* ou ionização por spray de elétrons). Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass to charge ratio*). O processo de ionização é seguido por sucessivas clivagens conhecidas como fragmentação, resultando em um espectro de massas contendo apenas fragmentos iônicos, formados a partir da molécula original. Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula, e de seus respectivos fragmentos, é possível inferir sua composição química elementar e, com isso, determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998).

Em moléculas que apresentam ligações glicosídeas, os principais pontos de clivagens são as próprias ligações, e, portanto, são formados fragmentos com o equivalente a massa de um açúcar a menos. No caso de hexoses, de massa molecular de 180 Da, pela remoção de uma unidade de água, essas moléculas passam a ter massa de 162 Da (SOUZA, 2008).

A ionização em modo positivo gerou um íon molecular principal de m/z 449, correspondente à molécula de cianidina-3-glicosídeo, com seu fragmento observado em m/z 287, referente à molécula de cianidina aglicona, gerada pela perda de uma unidade de glicose (162 Da).

TABELA 17 – TEMPOS DE RETENÇÃO E INTENSIDADE DOS SINAIS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DETECTADOS EM EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Nº. | Compostos | RT (min) | Intensidade do Sinal (cps = contagem por segundo) | | | | |
|--|---------------------------------|----------|---|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | | RS1 | RS2 | RS3 | RS4 | RS5 |
| Antocianinas | | | | | | | |
| 1 | Cianidina-3-glicosídeo | 8,00 | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●●● ⁶ | ●●●●●● ⁶ | ●●●●●● ⁶ |
| 2 | Pelargonidina-3-glicosídeo | 9,72 | ●●● ³ | ●●● ³ | ●●●● ⁴ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ |
| 3 | Peonidina-3-glicosídeo | 10,64 | ●●● ³ | ●●● ³ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 4 | Delfinidina-3-glicosídeo | 15,15 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| Ácidos fenólicos e antoxantinas | | | | | | | |
| 5 | Ácido protocatequínico | 3,00 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 6 | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 4,59 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 7 | Catequina | 8,51 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 8 | Ácido cafeico | 9,17 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 9 | Ácido gálico | 16,40 | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ |
| 10 | Ácido <i>p</i> -cumárico | 24,83 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |
| 11 | Quercetina-3-glicosídeo | 28,05 | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ | ●●●●● ⁵ |
| 12 | Quercetina | 33,44 | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ | ●●●● ⁴ |

Nota: RT = tempo de retenção em minutos; ³ intensidade na ordem de 10³ cps; ⁴ intensidade na ordem de 10⁴ cps; ⁵ intensidade na ordem de 10⁵ cps; ⁶ intensidade na ordem de 10⁶ cps. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Os íons moleculares de outros três compostos foram m/z 433, 463 e 465, com seus fragmentos observados em m/z 271, 301 e 303, respectivamente, o que indica a perda de uma massa molecular de 162 Da, correspondente a uma molécula de glicose. Portanto, estes compostos puderam ser identificados como pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo, respectivamente.

De acordo com a intensidade do sinal, pode-se estimar que cianidina-3-glicosídeo é a principal antocianina nesta fruta. O aumento da intensidade do sinal dos íons moleculares e dos fragmentos correspondentes a cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo, ao longo dos estádios de maturação, mostra que estes compostos possivelmente são sintetizados com o amadurecimento.

Os resultados estão de acordo com Wu e Prior (2005) que identificaram e caracterizaram antocianinas em frutas (framboesa preta, amora, mirtilo, uva Concord, cranberry, marionberry, framboesa, uva vermelha, morango e cereja doce) por HPLC-MS/MS e concluíram que, entre todas as seis antocianinas amplamente distribuídas (delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina), cianidina foi encontrada em todas as amostras, sendo uma das principais em quase todas, e a glicose foi o monossacarídeo dominante, estando ligado a antocianinas (agliconas) para formar antocianinas.

Em acerolas (*Malpighia emarginata*), De Rosso *et al.* (2008) e Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005) identificaram cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo como as principais antocianinas presentes nessa fruta.

Malta *et al.* (2013) analisaram extratos *Byrsonima verbascifolia* por HPLC-MS e identificaram resveratrol e ácido ferúlico como os principais constituintes fenólicos. De acordo com o íon molecular e do fragmento correspondente ao ácido ferúlico (m/z 193→134) e ao resveratrol (m/z 535→227), o presente estudo não identificou esses compostos em *B. ligustrifolia*.

HPLC-MS/MS mostrou que o principal ácido fenólico em *B. ligustrifolia* é o ácido gálico, seguido dos ácidos protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, cafeico e *p*-cumárico. Entre as antoxantinas, foram identificadas quercetina e catequina.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

HPLC-MS/MS é capaz de identificar compostos a partir de valores de massas do íon-molecular e de seu respectivo fragmento por meio da obtenção do espectro de massas. No entanto, para verificar a existência de compostos diferentes com o mesmo espectro de massa, outras informações devem ser combinadas a fim de se obter a confirmação do analito separado (WU; PRIOR, 2005).

4.8.1 Antocianinas

A Figura 16 mostra o cromatograma do extrato não hidrolisado de polpa de murici vermelho no estágio de maturação RS5 (epicarpo roxo-preto), monitorado a 520 nm (Sistema I). A principal antocianina, identificada em todas as cinco fases de desenvolvimento, foi cianidina-3-O-glicosídeo (FIGURA 16, pico 1). Intensa biossíntese desse composto ocorreu ao longo do processo de maturação, variando de 16,98 a 1678,92 mg/100 g DW, tornando-se 100 vezes mais concentrado (TABELA 18). Este composto foi confirmado por co-cromatografia com o padrão cianidina-3-O-glicosídeo e analisando os espectros UV-Vis do composto separado e do padrão, que foram caracterizados por duas bandas principais de absorção: λ_{max} 279 e 515 nm (FIGURA 16).

TABELA 18 – ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| | Cianidina-3-O-glicosídeo (mg/100 g DW)* | Pelargonidina-3-O-glicosídeo (mg/100 g DW)* |
|----------|--|--|
| RT (min) | 9,27 ± 0,20 | 11,04 ± 0,05 |
| RS1 | 16,98 ± 0,90E | ND |
| RS2 | 106,45 ± 6,02D | ND |
| RS3 | 346,80 ± 14,69C | ND |
| RS4 | 699,67 ± 10,70B | 9,57 ± 0,19B |
| RS5 | 1678,92 ± 13,79A | 40,43 ± 0,10A |

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão; * mg equivalente a cianidina-3-O-glicosídeo/100 g de amostra em base seca (DW). RT = tempo de retenção em minutos. ND = não detectado. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

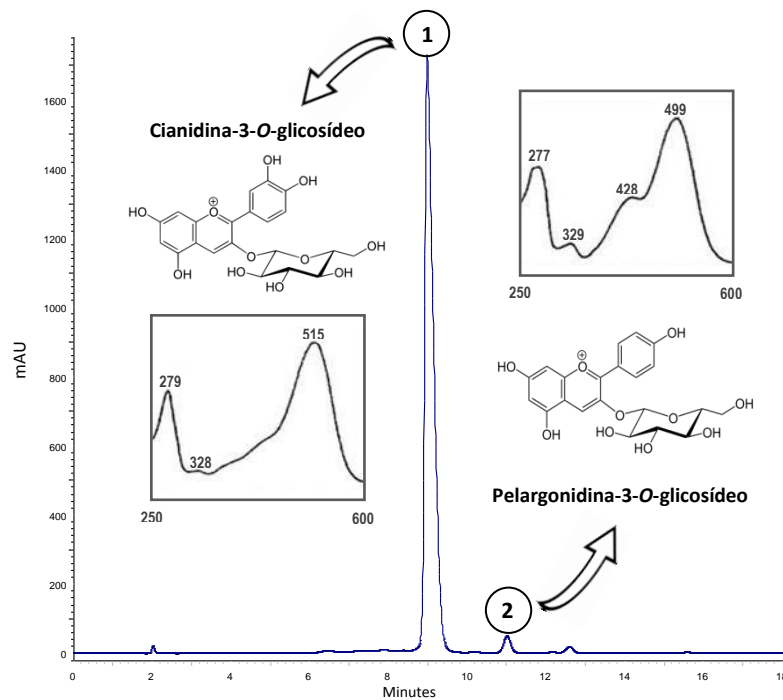


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO NÃO HIDROLISADO DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS5, MONITORADO A 520 nm (SISTEMA I) E ESPECTRO UV-VIS DAS ANTOCIANINAS SEPARADAS

Nota: pico 1 = cianidina-3-O-glicosídeo; pico 2 = pelargonidina-3-O-glicosídeo.

De acordo com Seeram (2006) cianidina é a mais ubíqua entre as seis antocianidinas mais comuns (cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, petunidina e peonidina), e, de acordo com Wu e Prior (2005), cianidina é uma das principais antocianidinas em *berries*, como framboesa preta, amora, mirtilo, uva Concord, cranberry, marionberry, framboesa, uva vermelha e cereja doce; e glicose é o monossacarídeo dominante que encontra-se ligada a agliconas (antocianidinas) para formar as antocianinas.

Há um grande número de estudos que quantificaram antocianinas individuais em *berries*, mas é difícil encontrar uma fruta que apresente valor de uma única antocianina tão alto como *B. ligustrifolia*. Por exemplo, Veberic *et al.* (2015) determinaram a composição antociânica de 24 espécies de *berries*, e apenas uma espécie (*Eastern shadbush*) apresentou quantidade de cianidina-3-glicosídeo (219 mg/100 g FW) semelhante a de murici vermelho em RS5; uma outra (*Cultivated elderberry*) apresentou teor desta antocianina maior do que o apresentado por *B. ligustrifolia* neste trabalho; *chokeberry* apresentou 248 mg/100 g FW de cianidina-3-

galactosídeo; e as outras 21 *berries* apresentaram valores de antocianinas individuais muito mais baixos do que o valor de cianidina-3-glicosídeo do presente estudo (221 mg/100 g FW).

O pico 2 (FIGURA 16) foi detectado apenas nos estádios RS4 e RS5. Este pico foi identificado como pelargonidina-3-O-glicosídeo, uma vez que o espectro de UV-Vis é típico do presente composto, apresentando duas bandas principais de absorção: λ_{max} 277 e 499 nm, tal como indicado por Santiago *et al.* (2014).

De acordo com Veberic *et al.* (2015), framboesa apresenta valores de pelargonidina-3-glicosídeo (3 mg/100 g FW) semelhante ao encontrado em murici vermelho no estágio de maturação RS5 (5,3 mg / 100 g FW).

Com este simples perfil de antocianinas, *Byrsonima ligustrifolia* pode ser considerada uma boa fonte de cianidina-3-glicosídeo, uma das antocianinas mais importantes devido à sua capacidade antioxidante (CHEN *et al.*, 2014).

4.8.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos têm sido amplamente estudados principalmente devido às suas atividades bioativas: propriedades antioxidante, antitumoral e antimicrobianas (HELENO *et al.*, 2015). Eles estão presentes em alimentos de origem vegetal principalmente na forma ligada, como ésteres ou glicosídeos conjugados com outros compostos naturais, tais como flavonóides, álcoois, ácidos graxos, esteróis e glicosídeos (MATTILA; HELLSTRÖM; TÖRRÖNEN, 2006).

Neste trabalho, três ácidos fenólicos foram identificados e quantificados em polpa liofilizada de frutos *Byrsonima ligustrifolia*: dois ácidos hidroxibenzóicos (gálico e *p*-hidroxibenzóico) e um ácido hidroxicinâmico (*p*-cumárico) (TABELA 19). A Figura 17 apresenta o cromatograma dos padrões de ácidos fenólicos (A), o cromatograma de ácidos fenólicos no extrato não hidrolisado (B) e o cromatograma de ácidos fenólicos no extrato hidrolisado (C) de murici vermelho em RS1 (Sistema II). Mesmo com a diminuição da concentração ao longo do processo de desenvolvimento do fruto, o ácido gálico foi o mais abundante nos cinco estádios de maturação, seguido dos ácidos *p*-cumárico e *p*-hidroxibenzóico.

Essa gradual diminuição pode estar relacionada a um aumento da atividade da enzima polifenoloxidase, a transformações (polimerização e reações de oxidação) de ácidos fenólicos e a redução do metabolismo primário na fruta muito

madura, que resulta numa falta de substratos necessários para a biossíntese de compostos fenólicos (GRUZ *et al.*, 2011).

TABELA 19 – ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZÓICO E ÁCIDO *p*-CUMÁRICO DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| | Ácido gálico (mg/100 g DW) | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (mg/100 g DW) | Ácido <i>p</i> -cumárico (mg/100 g DW) |
|----------|-------------------------------|--|---|
| RT (min) | 2,86 ± 0,02 | 9,54 ± 0,05 | 20,46 ± 0,10 |
| RS1 | 3060,32 ± 58,77A | 282,41 ± 3,59A | 526,52 ± 16,74A |
| RS2 | 2722,11 ± 45,72B | 205,92 ± 6,80B | 450,19 ± 16,31BC |
| RS3 | 2589,02 ± 30,12B | 200,75 ± 4,63B | 421,91 ± 16,78CD |
| RS4 | 1630,70 ± 15,99C | 127,27 ± 2,04C | 385,98 ± 9,56D |
| RS5 | 1418,53 ± 16,99D | 100,86 ± 2,72D | 289,82 ± 10,40E |

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão e em mg/100 g de amostra em base seca (DW). RT = tempo de retenção em minutos. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

Estudando os perfis de ácidos fenólicos de seis frutas classificadas como *berries*, Zadernowski, Naczka e Nesterowicz (2005) encontraram valores de ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido *p*-cumárico mais baixos do que o resultado para *B. ligustrifolia* no estágio RS5. A quantidade de ácido gálico na casca da uva (de 56 a 146 mg/100 g DW; MOLINA-QUIJADA *et al.*, 2010) e em *Goji berry* (15,31 mg/100 g FW; DONNO *et al.*, 2014) também foi inferior ao valor encontrado nesse estudo para a fruta madura (RS5 = 1419 mg ácido gálico/100 g DW ou 187 mg ácido gálico/100 g FW). Por outro lado, de acordo com Li *et al.* (2009), o morango apresenta 12,4 mg de ácido *p*-hidroxibenzóico por 100 g (FW), similar ao encontrado neste estudo (13,26 mg/100 g FW).

Diversas atividades bioativas do ácido gálico são relatadas na literatura, tais como propriedades anti-neoplásicas, bacteriostáticas, antimelanogênica e antioxidantes. O ácido *p*-cumárico também apresenta atividade antioxidante contra os radicais livres, atividades antitumorais e atividade antimicrobiana contra diversas bactérias patogênicas e fungos. A literatura também relata a ocorrência de atividades antioxidante contra os radicais livres e atividades antimicrobianas contra bactérias patogênicas e fungos para o ácido *p*-hidroxibenzóico, dentre outras atividades bioativas, tais como propriedades estrogênicas e antimutagênicas (HELENO *et al.*, 2015).

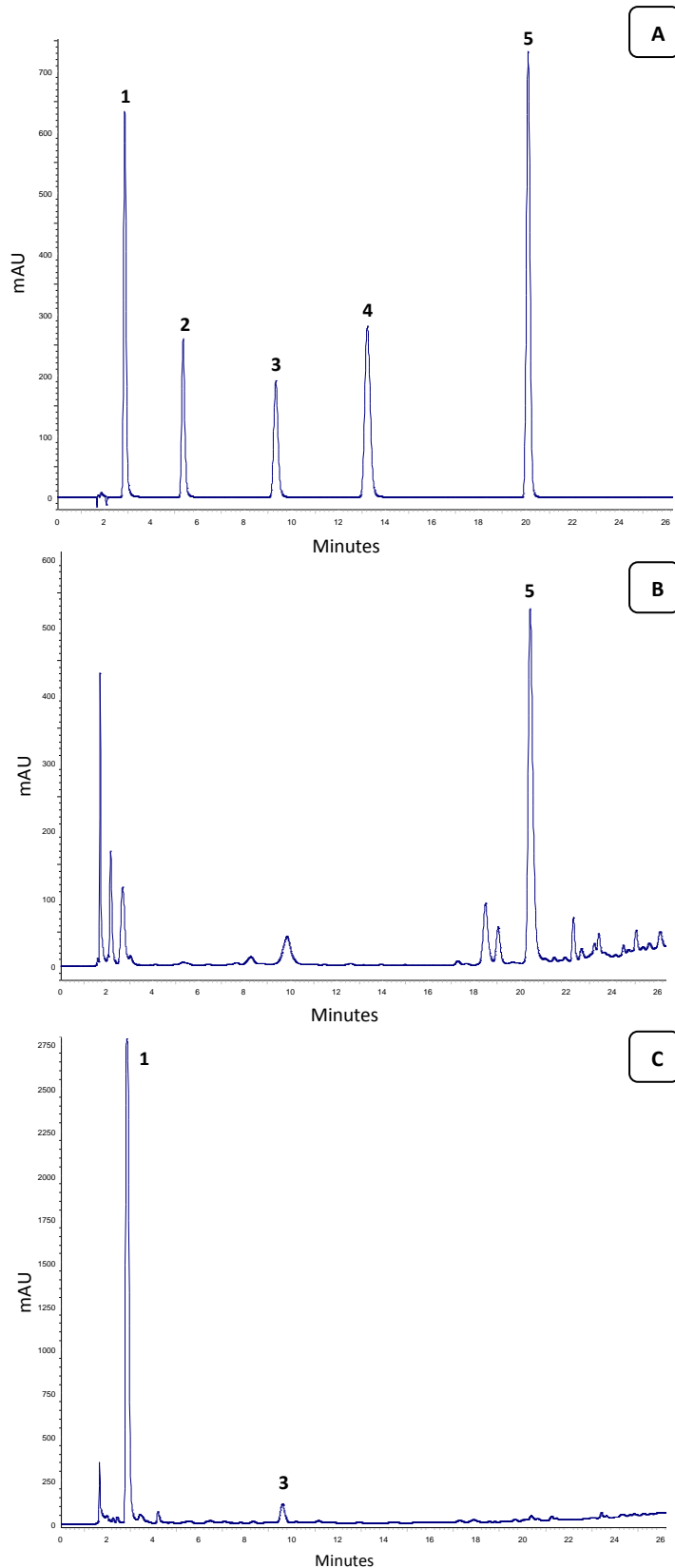


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDOS FENÓLICOS (A), CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS EM EXTRATOS NÃO HIDROLISADOS (B) E HIDROLISADOS (C) DE FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS1, MONITORADOS A 280 nm (SISTEMA II)

Nota: pico 1 = ácido gálico; pico 2 = ácido protocatequínico; pico 3 = ácido *p*-hidroxibenzoico; pico 4 = ácido cafeico; pico 5 = ácido *p*-cumárico.

4.8.3 Antoxantinas

Os resultados para catequina estão apresentados na Tabela 20 e o cromatograma (Sistema III – antoxantinas) do extrato de murici vermelho não hidrolisado no estágio de maturação RS1 está representado na Figura 18. Tsanova-Savova, Ribarova e Gerova (2005) analisaram a presença de catequina em 15 frutas (dentre elas, oito eram *berries*) e todos os resultados (de 0,3 a 10,8 mg/100 g FW) foram menores do que os valores de catequina do murici vermelho (de 34,08 mg/100 g FW, em RS1, a 21,45 mg/100 g FW, em RS5).

TABELA 20 – CATEQUINA DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| | Catequina (mg/100 g DW) |
|----------|----------------------------|
| RT (min) | 10,53 ± 0,50 |
| RS1 | 293,81 ± 14,79A |
| RS2 | 233,78 ± 7,39B |
| RS3 | 232,66 ± 5,08B |
| RS4 | 229,18 ± 9,56B |
| RS5 | 163,13 ± 4,15C |

Nota: resultados expressos como média ± desvio padrão; DW = base seca; RT = tempo de retenção. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-rosa; RS5 = epicarpo roxo-negro.

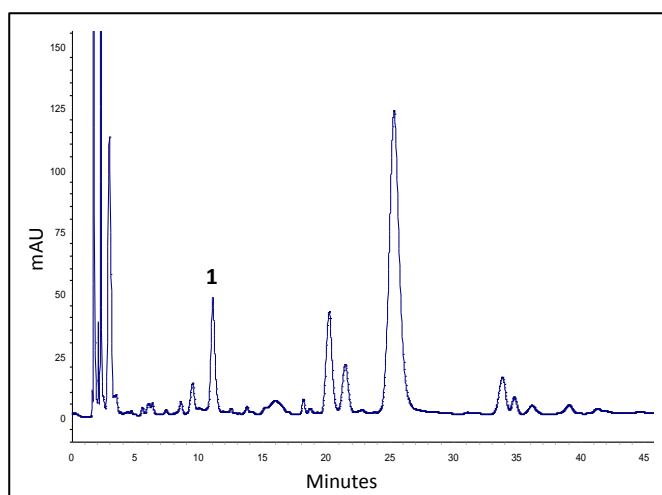


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO NÃO HIDROLISADO DE *Byrsonima ligustrifolia* NO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO RS1, MONITORADO A 280 nm (SISTEMA III)

Nota: pico 1 = catequina.

4.9 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (AA), conhecido como vitamina C, é uma das mais importantes vitaminas solúveis em água, presentes naturalmente nos alimentos, especialmente em frutas e vegetais (VALENTE *et al.*, 2011; MAIEVES *et al.*, 2015). O AA exerce importantes funções metabólicas e antioxidante, tornando a sua incorporação na dieta humana essencial, uma vez que os seres humanos não são capazes de sintetizá-lo (CRUZ-RUS *et al.*, 2011). No organismo humano, o AA pode atuar como um antioxidante em um grande número de reações enzimáticas e não-

enzimáticas, e, também, é ativo na regeneração não-enzimática de outras moléculas antioxidantes, tais como α -tocoferol (vitamina E) (COCETTA *et al.*, 2012).

As concentrações de AA avaliadas em todas as cinco fases do amadurecimento de *B. ligustrifolia* estão apresentadas na Tabela 21. RS1 mostrou o menor teor de AA, em relação à massa fresca, e, durante o processo de amadurecimento, após RS2, o nível de AA manteve-se relativamente estável, sem diferença estatística ($p < 0,05$) entre os estágios de maturação. No entanto, quando o resultado da análise foi expresso em base seca, RS3 apresentou o maior valor de teor de AA, sendo estatisticamente diferente de RS1 e RS5, o que sugere que a biossíntese deste composto em murici vermelho aumenta com o desenvolvimento do fruto, uma vez que RS3 é o estágio de desenvolvimento em que o fruto encontra-se maduro (tamanho e massa não mudam após esta fase de maturação).

TABELA 21 – ÁCIDO ASCÓRBICO EM FRUTOS DE *Byrsonima ligustrifolia* EM CINCO ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

| Estádios de maturação | Ácido ascórbico (mg/100 g) | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------|
| | FW | DW |
| RS1 | 22,54 \pm 1,87B | 194,36 \pm 16,10C |
| RS2 | 26,80 \pm 0,77A | 258,68 \pm 7,40A |
| RS3 | 28,90 \pm 0,57A | 267,36 \pm 5,26A |
| RS4 | 28,29 \pm 1,64A | 242,15 \pm 14,05AB |
| RS5 | 30,01 \pm 0,42A | 228,18 \pm 3,23B |

Nota: resultados expressos como média \pm desvio padrão. FW = base fresca; DW = base seca. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. RS1 = epicarpo verde; RS2 = epicarpo rosa claro; RS3 = epicarpo vermelho; RS4 = epicarpo vermelho-roxo; RS5 = epicarpo roxo-negro.

O teor de AA em frutos é determinado principalmente pelo genótipo, mas também é influenciado pela maturação (COCETTA *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo concordam com os dados obtidos para uvas e morango, em que os níveis de AA aumentaram durante o desenvolvimento desses frutos (CRUZ-RUS; BOTELLA; GOMEZ-JIMENEZ, 2010; CRUZ-RUS *et al.*, 2011).

O resultado para RS5 (30 mg/100 g FW) pode ser comparado ao teor de AA de cereja doce (28 mg/100 g FW) (SERRANO *et al.*, 2005), alguns cultivares de framboesa (28 a 32 mg/100 g FW) (PANTELIDIS *et al.*, 2007), pomelo (32 mg/100 g FW) (FRANKE *et al.*, 2004), *cape-gooseberry* (33 mg/100 g FW) (VALENTE *et al.*, 2011), *grapefruit* (29 a 36 mg/100 g FW) (FRANKE *et al.*, 2004; VALENTE *et al.*,

2011) e maracujá (30 a 40 mg/100 g FW) (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008; ZERAIK *et al.*, 2010; VALENTE *et al.*, 2011).

4.10 CORRELAÇÃO ENTRE DADOS

Ao longo do processo de maturação ocorreu aumento no teor de antocianinas e decréscimo no parâmetro C^* devido ao aumento da tonalidade dos frutos, que do verde claro (em RS1) chega ao roxo quase negro (em RS5). Este aumento está relacionado à síntese de antocianinas durante o processo de maturação desses frutos. Desta forma, coroma apresentou correlação negativa ($r^2 = -0,923$; $p < 0,05$) com os níveis totais de antocianinas.

Há um grande número de diferentes tipos de compostos que podem contribuir para a capacidade antioxidante total, de modo que não é claro quais os componentes responsáveis pelo efeito antioxidante observado. Assim, para explorar a influência dos componentes fitoquímicos sobre a capacidade antioxidante de frutos de *Byrsonima ligustrifolia* em diferentes estádios de maturação, determinou-se a correlação entre os ensaios de atividade antioxidante (Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH) e os compostos que apresentam essa atividade (AA, TMA e TF) (TABELA 22).

A análise estatística aplicada (Correlação de Pearson) mostra correlações altamente significativas ($p < 0,01$) entre TPC e ABTS ($r^2 = 0,963$, para os extratos hidrolisados) e entre TPC e DPPH ($r^2 = -0,973$, para os extratos não hidrolisados), o que confirma a ideia de que TPC por Folin-Ciocalteu pode ser considerado um ensaio de poder redutor.

Para todos os extratos de murici vermelho, a capacidade antioxidante mais elevada foi observada na primeira fase de maturação (RS1), e a mais baixa correspondeu ao estágio RS5. Esta tendência de diminuição na capacidade antioxidante pode estar intimamente relacionada ao conteúdo de flavonóides, levando em consideração os coeficientes de correlação de Pearson: TF(1)-TPC(1) = 0,995 (r^2), TF(2)-ABTS(2) = 0,957 (r^2) e TF(1)-DPPH(1) = -0,960 (r^2), por exemplo, onde (1) significa extrato não hidrolisado e (2), extrato hidrolisado.

Não houve correlação entre os ensaios empregados para avaliar a atividade antioxidante (Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH) e o teor de vitamina C, e esses três ensaios apresentaram correlação negativa com TMA (TABELA 22).

TABELA 22 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *Byrsonima ligustrifolia*

| | AA | TMA | TF(1) | TF(2) | TPC(1) | TPC(2) | ABTS(1) | ABTS(2) | DPPH(1) |
|---------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| TMA | -0,025 | | | | | | | | |
| TF(1) | -0,261 | -0,886* | | | | | | | |
| TF(2) | -0,330 | -0,832 | 0,994** | | | | | | |
| TPC(1) | -0,295 | -0,871* | 0,995** | 0,995** | | | | | |
| TPC(2) | -0,285 | -0,860* | 0,993** | 0,996** | 0,999** | | | | |
| ABTS(1) | -0,500 | -0,759 | 0,882* | 0,901* | 0,922* | 0,916* | | | |
| ABTS(2) | -0,470 | -0,820 | 0,947* | 0,957* | 0,969** | 0,963** | 0,984** | | |
| DPPH(1) | 0,469 | 0,839 | -0,960** | -0,965** | -0,973** | -0,967** | -0,964** | -0,996** | |
| DPPH(2) | -0,029 | 0,992** | -0,898* | -0,843 | -0,872 | -0,862 | -0,721 | -0,803 | 0,831 |

Nota: (1) = extrato não hidrolisado; (2) = extrato hidrolisado. TMA = antocianinas monoméricas totais; TF = flavonóides totais; TPC = compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu). *p<0,05; **p<0,01.

A capacidade antioxidante do *B. ligustrifolia* parece ser influenciada em grande parte pelos ácidos fenólicos, uma vez que correlações lineares altamente significativas ($p < 0,01$) foram observadas: ácido gálico e TPC(2) = 0,985 (r^2); ácido *p*-hidroxibenzóico e ABTS(2) = 0,959 (r^2); e *p*-cumárico e DPPH(1) = -0,959 (r^2) (TABELA 23).

Assim, os ácidos fenólicos e os flavonóides não antociânicos parecem ser os principais fitoquímicos responsáveis pela capacidade antioxidante de frutos de *Byrsonima ligustrifolia*.

TABELA 23 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *Byrsonima ligustrifolia*

| | TPC(1) | TPC(2) | ABTS(1) | ABTS(2) | DPPH(1) | DPPH(2) |
|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| Ácido gálico | 0,983** | 0,985** | 0,850 | 0,911* | -0,919* | -0,907* |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 0,992** | 0,989** | 0,896* | 0,959** | -0,974** | -0,881* |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 0,948* | 0,936* | 0,883* | 0,941* | -0,959** | -0,947* |
| Catequina | 0,870 | 0,852 | 0,811 | 0,882* | -0,915* | -0,907* |
| Cianidina-3-glicosídeo | -0,871 | -0,860 | -0,755 | -0,818 | 0,837 | 0,993** |

Nota: (1) = extrato não hidrolisado; (2) = extrato hidrolisado. TPC = compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

No entanto, uma outra classe de compostos fenólicos não investigada no presente estudo, os taninos, podem, também, exercer forte influência sobre a capacidade antioxidante dos frutos de murici vermelho. Esses compostos podem ser divididos em dois grupos principais (taninos hidrolisáveis e taninos não-hidrolisáveis ou condensados), os quais podem apresentar atividade antioxidante de 15 a 30 vezes maior do que os compostos fenólicos simples. Além disso, o grau de polimerização dos taninos está diretamente relacionado com a sua capacidade antioxidante (GIADA, 2013).

Os taninos hidrolisáveis são prontamente hidrolisados com ácidos, bases ou enzimas. O tanino hidrolisável mais conhecido é o ácido tânico, que pode ser esterificado com cinco unidades de ácido gálico. Os taninos condensados não são facilmente hidrolisados por tratamento com ácido, e constituem a fração fenólica principal responsável pelas características de adstringência dos frutos (GIADA, 2013).

4.11 VALOR NUTRICIONAL

Levando em consideração que não foram encontrados dados publicados na literatura sobre o teor de nutrientes de murici vermelho, e que, conseqüentemente, esta informação também não está disponível nas tabelas de composição química de alimentos, a caracterização físico-química desse fruto foi fundamental para o conhecimento do valor nutricional do mesmo. O Quadro 5 apresenta a tabela de informação nutricional com base em 100 g de frutos maduros de murici vermelho (base fresca).

| INFORMAÇÃO NUTRICIONAL | |
|---------------------------------|---------|
| Porção de 100 g de fruta fresca | |
| Valor energético | 26 kcal |
| Carboidratos | 6,07 g |
| Proteínas | 0,43 g |
| Gorduras totais | 0,02 g |
| Fibra alimentar | 6,07 g |
| Vitamina C | 30 mg |

QUADRO 5 – INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE FRUTOS DE MURICI VERMELHO

O valor energético e os nutrientes apresentados para frutos de murici vermelho (QUADRO 5) assemelham-se com essas informações de alguns frutos regionais brasileiros: camu-camu (*Myrciaria dubia*), jambo (*Syzygium malaccense*), acerola (*Malpighia glabra*), pitomba (*Talisia esculenta*), umbu (*Spondias tuberosa*), pitanga (*Eugenia uniflora* L.), morango (*Fragaria x ananassa*) e uva (*Vitis* sp.) (QUADRO 6) (BRASIL, 2015).

No entanto, a importância de um alimento vai além das informações de nutrientes e valor energético, permeando, também, questões relativas aos componentes bioativos e à sua capacidade antioxidante. Além disso, a escolha de alimentos deve relacionar-se, também, com a defesa da biodiversidade de espécies e o estímulo ao consumo de alimentos regionais, valorizando uma agricultura mais sustentável, mantendo o equilíbrio do ambiente e respeitando o conhecimento local (BRASIL, 2015).

| Valores para 100 g de fruta fresca | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Camu-camu | Jambo | Acerola | Pitomba | Umbu | Pitanga | Morango | Uva |
| Valor energético | 31 kcal | 27 kcal | 33 kcal | 34 kcal | 37 kcal | 41 kcal | 30 kcal | 38 kcal |
| Carboidratos | 6,9 g | 6,0 g | 8,0 g | 8,8 g | 9,4 g | 10 g | 6,8 g | 9,6 g |
| Proteínas | 0,5 g | 1,0 g | 0,9 g | 0,4 g | 0,8 g | 1,0 g | 0,9 g | 0,8 g |
| Gorduras totais | 0,2 g | Tr | 0,2 g | 0,1 g | Tr | Tr | 0,3 g | 0,1 g |
| Fibra alimentar | nd | 5,1 | 1,5 g | 2,0 g | 2,0 g | 3,2 g | 1,7 g | 0,9 g |
| Vitamina C | nd | 3,8 mg | 941 mg | 33 mg | 24 mg | 25 mg | 63,6 mg | 48,8 mg |

QUADRO 6 – INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DE FRUTOS REGIONAIS BRASILEIROS

FONTE: BRASIL (2015)

Nota: nd = não disponível; Tr = traços.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo determinou a composição físico-química, otimizou a extração de compostos fenólicos, identificou esses compostos e avaliou a capacidade antioxidante e o teor de fitoquímicos em frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia*) em diferentes estádios de maturação.

Uma vez que a eficiência da quantificação de substâncias bioativas nos tecidos vegetais depende muito das condições de extração utilizadas, a otimização da extração é fundamental para obter teores de compostos fenólicos mais condizentes com a realidade. Os resultados mostraram que 20% de acetona e 80% de metanol foi a melhor combinação de solventes para a extração de TMA e TPC de murici vermelho. Além disso, estudando o volume de solventes em função da quantidade de amostra, conclui-se que a proporção de 30 mL de solvente para uma grama de amostra foi adequada para ambas as respostas, não havendo diferença estatística ($p < 0,05$) quando utilizados volumes maiores de solventes em função da mesma quantidade de amostra.

As antocianinas identificadas por HPLC-MS/MS foram cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo. Os principais ácidos fenólicos e antoxantinas presentes nos extratos de murici vermelho foram: ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, quercetina e catequina.

Com a quantificação de compostos fenólicos nos frutos em diferentes estádios de maturação, conclui-se que os frutos imaturos são melhores fontes de ácidos fenólicos do que os maduros. No entanto, mesmo no estádio de maturação mais avançado (RS5), o teor de ácido gálico (1419 mg/100 g DW) foi muito expressivo. Como esperado, o teor de antocianinas aumentou durante o amadurecimento e o teor de cianidina-3-glicosídeo passou de 17 mg/100 g DW em RS1 chegando a 1679 mg/100 g DW em RS5, tornando-se cem vezes mais concentrado.

A maior capacidade antioxidante foi encontrada no primeiro estádio de maturação (RS1) em todos os ensaios empregados (Folin-Ciocalteu, ABTS, e DPPH). Esta foi correlacionada com os níveis de flavonóides totais e ácidos fenólicos individuais. O ácido ascórbico não mostrou correlação com a atividade

antioxidante, e antocianinas (TMA e cianidina-3-glicosídeo) apresentaram correlação negativa.

Apesar de ainda ser um fruto subutilizado, murici vermelho tem potencial como fonte de antioxidantes naturais, devido ao seu alto teor de cianidina-3-glicosídeo e ácidos fenólicos, especialmente ácido gálico. Desta forma, esse fruto revela-se como uma fonte promissora de compostos fenólicos com propriedades nutracêuticas e de pigmentos que poderiam ser utilizados como corantes alimentares naturais, após estudos sobre estabilidade.

REFERÊNCIAS

AABY, K.; REMBERG, S. F. Strawberry phenolics and impact of ripening. In: PREEDY, V. (Ed.). **Processing and impact on active components in food**. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2014, p. 157–164.

ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.

ALVAREZ-JUBETE, L. *et al.* Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat, and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v.119, n.2, p.770–778, 2010.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 16^a edição, Washington, DC, 1997.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 18^a edição, Washington, DC, 2005.

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

BAKAR, M. F. A. *et al.* Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). **Food Chemistry**, v. 113, p. 479–483, 2009.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 142–147, 2014.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. **LWT – Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609–615, 1997.

BORGES, G. S. C. *et al.* Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44, p. 708–715, 2011.

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

BRASIL. **Alimentos regionais brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 484 p.

BYSTROM, L. M. *et al.* Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017–1024, 2008.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, p. 2442–2451, 2011.

CHEN, L. *et al.* Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 152, p. 386–390, 2014.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

COCETTA, G. *et al.* Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development). **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1059–1065, 2012.

COFFANI-NUNES, J. V.; AZZOLINI, A. P.; MORGANTE, P. G. Morphological characterization of fruits and in vitro germination of *Byrsonima ligustrifolia* A.Juss. (Malpighiaceae). **Communications in Plant Sciences**, v.2, p.121–123, 2012.

CONTESSA, C. *et al.* Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 351–357, 2013.

CRUZ-RUS, E. *et al.* Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4191–4201, 2011.

CRUZ-RUS, E.; BOTELLA, M. A.; GOMEZ-JIMENEZ, M. C. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 9, p. 739–748, 2010.

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 2031–2048, 2010.

DE ROSSO, V. V. *et al.* Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291–299, 2008.

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

DE-BRITO, E. S. *et al.* Anthocyanins present in select tropical fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

DONNO, D. *et al.* Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, 2014, doi: 10.1016/j.jff.2014.05.020

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 1956.

EICHHOLZ, I.; HUYSKENS-KEIL, S.; ROHN, S. Blueberry phenolic compounds: fruit maturation, ripening and post-harvest effects. In: PREEDY, V. (Ed.). **Processing and impact on active components in food**. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2014, p. 173–180.

ES-SAFI, N. E.; GUYOT, S.; DUCROT, P. H. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6969–6977, 2006.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 4. ed. New York: Marcel Dekkan, 2010.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 2309–2314, 2004.

FRANKE, A. A. *et al.* Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 1–35, 2004.

GIADA, M. L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZALEZ, J. A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants**. Rijeka: InTech, 2013. p. 87–112.

GONÇALVES, B. *et al.* Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). **Food Chemistry**, v. 103, p. 976–984, 2007.

GONZALEZ-AGUILAR, G. A. *et al.* Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, s197–s202, 2007.

GORDON, A. *et al.* Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7688–7699, 2011.

GRUZ, J. *et al.* Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, v. 124, p. 271–277, 2011.

GUIMARÃES, R. *et al.* Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: a comparative study. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 37–42, 2014.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 280–286, 2005.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 10–21, 2011.

HELENO, S. A. *et al.* Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009. p. 772–807.

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

HUTCHINGS, J. B. **Food colour and appearance**. London: Blackie, 1994.

IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

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

JAYASENA, V.; CAMERON, I. °Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson Seedless table grapes. **Journal of Food Quality**, v. 31, p. 736–750, 2008.

JUSTESEN, U. Negative atmospheric pressure chemical ionization low-energy collision activation mass spectrometry for the characterization of flavonoids in extracts of fresh herbs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 369–379, 2000.

KAMMERER, D. *et al.* Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360–4367, 2004.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 4, n. 24, p. 691–693, out./dez. 2004.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LI, W. *et al.* Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 4, p. 499–506, 2009.

LIMA, V. L. A. G. *et al.* Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 101–103, 2003.

LIMA, V. L. A. G. *et al.* Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 565–568, 2005.

LOPES-DA-SILVA, F. *et al.* Identification of anthocyanins pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 248–253, 2002.

MAIEVES, H. A. *et al.* Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. **Journal of Functional Foods**, 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.01.044.

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

MAMEDE, M. C. H.; FRANCENER, A. Byrsonima. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8838>>. Acesso em: 10 Jun. 2014

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MANICA, I. *et al.* **Acerola: tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 397 p.

MARAIS, J. P. J. *et al.* The stereochemistry of flavonoids. In: GROTEWOLD E. (Ed.). **The Science of Flavonoids**. Ohio: Springer, 2006. p. 1–46.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARIUTTI, L. R. B. *et al.* The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, v. 64, p. 618–625, 2014.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 6, n. 17, p. 271–278, 2002.

MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J.; TÖRRÖNEN, R. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7193–7199. 2006.

MAZUREK, A.; JAMROZ, J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. **Food Chemistry**, v. 173, p. 543–550, 2015.

McGUIRE, R. G. Reporting of objective colour measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254–1255, 1992.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and super-fruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 79–87, 2011.

MESKIN, M. S.; BIDLACK, W. R.; RANDOLPH, R. K. **Phytochemicals: Aging and Health**. 7. ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

MEZADRI, T. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 282–290, 2008.

MILLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.

MOLINA-QUIJADA, D. M. A. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest México. **CyTA Journal of Food**, v. 8, p. 57–63, 2010.

MONTGOMERY, D. C. Response surface methods and designs. In: MONTGOMERY, D. C. (Ed.). **Design and Analysis of Experiments**. 7. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 417–485.

MOO-HUCHIN, V. M. *et al.* Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, p. 17–22, 2015.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–25, 2001.

OU, B. *et al.* Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122–3128, 2002.

PANTELIDIS, G. E. *et al.* Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777–783, 2007.

PAREDES-LÓPEZ, O. *et al.* Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life – A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 299–308, 2010.

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

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. **Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos**. 272p. Tesis (Doctorado em Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Alimentos), Universidade Autonoma de Madrid, Madrid, 2007.

PINHEIRO, J. M. S. **Tecnologia pós-colheita para conservação de bananas da cultivar tropical**. 59p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido), Universidade Estadual de Montes Claros, Unimontes, 2009.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6076–6082, 2009.

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

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396–3402, 2000.

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

REYNERTSON, K. A. *et al.* Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883–890, 2008.

RIBEIRO, A. B. *et al.* Antioxidant capacity, total phenolic content, fatty acids and correlation by principal component analysis of exotic and native fruits from Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 797–804, 2013.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. **Analyst**, v. 122, p. 11R–34R, 1997.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657–691, 2003.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2003. p. F1.1.1–F.1.1.11.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LAURRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270–276, 1998.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F. *et al.* Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 553–563, 2004.

SANTIAGO, M. C. P. de A. *et al.* Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 51–57, 2014.

SCHEFFÉ, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 25, n. 2, p. 235–263, 1963.

SEERAM, N. P. Berries. In: BLACKBURN, G.; GO, V.; MILNER, J. (Ed.). **Nutritional Oncology**. 2. ed. London: Academic Press, 2006. p. 615–625.

SEERAM, N. P. Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 627–629, 2008.

SERRANO, M. *et al.* Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Sweet Cherry at Different Ripening Stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2741–2745, 2005.

SILVA, L. M. R. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Method Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

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

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

SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 164p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPEIRS, J.; BRADY, C. J. Modification of Gene Expression in Ripening Fruit. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 5, p. 519–532, 1991.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 743–749, 2005.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 147–156, 2008.

TSANOVA-SAVOVA, S.; RIBAROVA, F.; GEROVA, M. (+)-Catechin and (–)-epicatechin in Bulgarian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 691–698, 2005.

VALENTE, A. *et al.* Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International**, v. 44, p. 2237–2242, 2011.

Van BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 1998. 38 p.

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

VEBERIC, R. *et al.* Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 509–517, 2015.

VILLANO, D. *et al.* The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, p. 501–509, 2004.

VOLP, A. C. P. *et al.* Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 2, n. 23, p. 141–9, 2008.

VOSS, D. H. Relating colourimeter measurement of plant colour to the royal horticultural society colour chart. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1256–1260, 1992.

WANG, P. S.; FANG, J. J. The Optimization of Medicine Formulation Using Mixture Experiments. **International MultiConference of Engineers and Computer Scientists**, v. 3, p. 1–6, 2010.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; WANG, C. Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 676–684, 2009.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140–146, 2000.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2589–2599, 2005.

YUAN, B. *et al.* Cytocidal effects of polyphenolic compounds, alone or in combination with, anticancer drugs against cancer cells: potential future application of the combinatory therapy. In: NTULI, T. (Ed.). **Apoptosis and Medicine**. Rijeka: InTech, 2012. p. 155–174.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2118–2124, 2005.

ZERAIK, M. L. *et al.* Passion fruit: A functional food? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 459–471, 2010.