

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DIONES JOEL KNIECIK

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DO JAMBOLÃO - *Syzygium cumini*
(L.) Skeels**

FRANCISCO BELTRÃO
2019

DIONES JOEL KNIECIK

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DO JAMBOLÃO - *Syzygium Cumini*
(L.) Skeels**

Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Departamento Acadêmico de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Novello
Coorientador: Prof. Dr. Gabriel Casemiro Mariano.

FRANCISCO BELTRÃO
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

DIONES JOEL KNIECIK

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DOS FRUTOS DO JAMBOLÃO - *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia
Química, UTFPR.

Data de aprovação:

Claudio Roberto Novello, Doutor

UTFPR

Gabriel Cassemiro Mariano, Doutor

UTFPR

Ivane Benedetti Tonial, Doutora

UTFPR

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso

Dedico a minha Família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que chegasse até aqui, pela saúde, capacidade de estudar, força para superar as dificuldades e pelas realizações diárias.

Aos meus pais, pela educação e oportunidades que recebi, pelo exemplo, pelo apoio em todos esses anos e por permitir que eu me dedicasse aos estudos.

Agradeço aos meus amigos Léon Silva Erhard, Douglas Gabriel Pertile, Bruce Paiva Duarte, Fábio Soares Fabian, entre outros amigos e colegas pela ajuda, convivência, troca de experiências, reflexões, disponibilidade, companhia ao longo desses semestres de faculdade. A amizade de vocês para mim será eterna.

A UTFPR por fornecer o espaço, estrutura de laboratórios, ter me proporcionando as ferramentas necessárias para o estudo e por ser a minha segunda casa durante o curso. A todos os professores pelo conhecimento e experiências transmitidas.

Ao professor Dr. Claudio Roberto Novello pela ajuda na produção dos experimentos, correções e sugestões na elaboração deste trabalho.

Nós somos a maneira pela qual o Universo conhece a si mesmo.

Carl Sagan

RESUMO

Syzygium cumini (L.) Skeels, popularmente conhecida como jambolão, é uma planta de grande porte cujos frutos são conhecidos pela sua expressiva atividade antioxidante e pela presença de pigmentos naturais conhecidos como antocianinas. Antioxidantes são substâncias muito utilizadas na indústria por apresentarem aplicações na conservação de alimentos, produção de fármacos, cosméticos entre outras. Neste trabalho, a partir de frutos maduros, realizou-se a análise dos teores de antocianinas, atividade antioxidantes e caracterização dos frutos. Partindo de um planejamento experimental centroide simplex obteve-se extratos dos quais realizou-se um estudo para a maximização da atividade antioxidante e do teor de antocianinas. A influência da resposta foi estudada para combinações de três solventes: (x_1) etanol, (x_2) acetona e (x_3) água. A partir do Software *Statistica 7.0*, foi ajustado um modelo matemático para a previsão do comportamento das variáveis de resposta obtendo-se o ponto ótimo de extração e a composição dos solventes. Nos extratos obteve-se atividade antioxidante (AAT) entre 579mg equivalente de DPPH por g de fruto liofilizado e 21,9mg g⁻¹. Foram obtidos teores de antocianinas monoméricas totais (AMT) com valor máximo de 488mg 100g⁻¹ e mínimo de 20,8mg 100g⁻¹ de fruto liofilizado.

Palavra Chaves: Jambolão; Antioxidante; Antocianinas; Simplex Centroides.

ABSTRACT

Syzygium cumini (L.) Skeels, popularly known as jambolão is a large plant. It produces fruits that are known for their expressive antioxidant activity and the presence of natural pigments known as anthocyanins. Antioxidants are substances widely used in the industry, presenting applications in food preservation, production of pharmaceuticals and cosmetics, among others. In this work, from mature fruits, the anthocyanin content, antioxidant activity and fruit characterization were analyzed. Starting from a centroide simplex experimental design, we obtained extracts from which a study was carried out to maximize the antioxidant activity and anthocyanin content. The influence of the response was studied for combinations of three solvents: (x1) ethanol, (x2) acetone and (x3) water. From Statistica Software 7.0, a mathematical model was adjusted to predict the behavior of the response variables, so the optimum extraction point and solvent composition were found. In the extracts, antioxidant activity (AAT) was obtained between 579mg of DPPH per g of lyophilized fruit and 21.9mg g⁻¹. Total monometrical anthocyanins (AMT) were obtained with a maximum value of 488mg 100g⁻¹ and a minimum of 20.8mg 100g⁻¹ of lyophilized fruit.

Keywords: Jambolan; Antioxidant Activity; Anthocyanins; Simplex Centroid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROBLEMA	13
3 JUSTIFICATIVA	14
4 OBJETIVOS	15
4.1 OBJETIVO GERAL	15
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
5.1 MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO E HISTÓRICO DO JAMBOLÃO	16
5.2 PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS	17
5.3 ANTIOXIDANTES	18
5.4 PLANEJAMENTO DE MISTURA	19
5.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM	22
6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	23
6.1 EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS	23
6.2 MATERIAL DE CONSUMO E USO	23
6.3 MATERIAL VEGETAL	23
6.4 PREPARAÇÃO DOS FRUTOS	24
6.5 AVALIAÇÃO DA PERDA DE MASSA POR LIOFILIZAÇÃO.	24
6.6 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	24
6.6.1 Extrato para a Avaliação Preliminar da Capacidade Antioxidante	24
6.6.2 Extrato para a Otimização da Capacidade de Extração	25
6.7 DELINEAMENTO DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS	25
6.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH	27
6.8.1 Preparo da Solução de DPPH	27
6.8.2 Curva de Calibração do DPPH	27
6.8.3 Preparo das Amostras para Determinação da Capacidade Antioxidante	28
6.8.4 Determinação da Atividade Antioxidante	28
6.9 TEOR DE ANTOCIANINAS	29
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
7.1 PERDA DE MASSA POR LIOFILIZAÇÃO	31
7.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH	32

7.2.1 Curva de Calibração do DPPH	32
7.2.2 Obtenção da Capacidade Antioxidante Total Preliminar	33
7.2.3 Curva Calibração Trolox	35
7.2.4 Capacidade Antioxidante Total Preliminar	35
7.2.5 Otimização de extração	36
7.2.6 Maximização da Atividade Antioxidante	37
7.2.7 Atividade Antioxidante no Centróide Simplex	39
7.3 ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS NO CENTROIDE SIMPLEX	40
7.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR MEIO DO CENTROIDE SIMPLEX	41
7.4.1 Representação do Modelo da Superfície de Resposta	42
7.4.2 Análise do Modelo	44
7.4.3 Análise do Ponto Ótimo	46
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
9 REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – Curvas de Calibração para Obtenção de EC₅₀	54

1 INTRODUÇÃO

Na procura por uma vida mais saudável é cada vez mais comum a substituição de ingredientes e aditivos sintéticos por equivalentes, mas de origem natural. Esse movimento atualmente é forte na indústria alimentícia e cosmética. A utilização de produtos naturais por parte das indústrias pode ocorrer tanto na forma de ingredientes como aditivos. Como exemplo tem-se a utilização de extratos obtidos a partir de plantas onde pode-se aproveitar as propriedades antioxidantes, corantes, flavorizantes, nutricionais, entre outras na manufatura de produtos (PRADO e ROSTAGNO, 2013).

Os antioxidantes são substâncias de elevada importância na indústria alimentícia por promover o retardo do surgimento de alterações oxidativas em alimentos. Esses agentes possuem a capacidade de se oxidar em detrimento dos constituintes dos alimentos, evitando assim a deterioração e permitindo preservar os alimentos por períodos de tempo maiores (ANVISA, 1961). Antioxidantes podem ser um conjunto de substâncias naturais como vitaminas, minerais, pigmentos, enzimas entre outros compostos vegetais ou ainda substâncias sintéticas como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (FOOD INGREDIENTS, 2009).

Na busca por alternativas naturais aos antioxidantes sintéticos, insere-se a espécie vegetal *Syzygium cumini*. É conhecida popularmente como jambolão, entre outros nomes como jamelão, jalão, jambú, jambuí, cereja, kambol, azeitona-do-nordeste, azeitona-da-terra, ameixa roxa, murta, baga de freira, guapê. É uma árvore frutífera de grande porte (Figura 1-A), pertencente à família das Mirtáceas, originária do sudeste asiático, comumente encontrada na Índia, cultivada em vários países, introduzida e bem adaptada no Brasil onde a frutificação ocorre no período de janeiro a maio dependendo da região (AGOSTINI-COSTA e SILVA, 2008).

Os frutos são pequenos, ovoides, de coloração verde no período de desenvolvimento, ficando roxo quando maduros (Figura 1-C, 1-D). São constituídos por uma polpa de sabor doce, agradável ao paladar e adstringente dependendo do estado de maturação. A polpa envolve um caroço único, a semente, que é grande em relação ao tamanho do fruto. O fruto é tanto comumente consumido em estado natural quanto processado em geleias, sucos, licores, doces entre outros (MORTON, 1987).

A coloração característica na polpa dos frutos se deve pela presença de substâncias conhecidas como antocianinas. Esses pigmentos fazem com que os

frutos provoquem manchas nas mãos, tecidos e até mesmo na pintura de veículos (CORRÊA, 1984). Essas propriedades possibilitam as essas substâncias serem aplicadas como corantes naturais, principalmente alimentícios, por serem comestíveis. As antocianinas também são reconhecidas por suas propriedades antioxidantes (NARAYAN, AKHILENDER e RAVISHANKAR, 1999). Além dessas, outras classes de substâncias antioxidantes estão presentes nos frutos do jambolão como carotenóides, compostos fenólicos e vitamina C (MORTON, 1987).

A obtenção de compostos de interesse com propriedades antioxidantes, passa pela elaboração de processos de extração. Comumente é empregado a extração por solvente, sendo muitas vezes conveniente a utilização de misturas de dois ou mais solventes. O planejamento de misturas é uma das formas de obtenção de respostas para a elaboração de um processo de extração e para a sua otimização (SCHEFFÉ, 1958). As abordagens por simplex centroide e simplex lattice são as ferramentas científicas utilizadas para a avaliação da capacidade de extração de determinadas substâncias em uma mistura de solventes.

Neste contexto, este trabalho visa por meio de técnicas de otimização maximizar a obtenção de substâncias com propriedade antioxidantes e antocianinas presentes na polpa e sementes dos frutos da *S. cumini*.

2 PROBLEMA

O problema inicialmente identificado foi a carência de estudos e dados científicos que abordassem as condições ideais de obtenção de extratos da *S. cumini*, visando a maximização da atividade antioxidante e antocianinas.

O jambolão é uma planta que apresenta grande potencial em seus constituintes que podem ser extraídos e utilizados na indústria. Para isso faz-se necessário a realização de estudos sobre a quantidade de antioxidantes e quanto a maximização da sua extração, a fim de embasar análises da viabilidade de obtenção dessas substâncias.

3 JUSTIFICATIVA

Os antioxidantes são substâncias que tem ampla utilização na indústria, o estudo de alternativas a sua obtenção tem grande importância. Vários fatores devem ser levados em conta na escolha de um antioxidante, portanto ter uma gama de opções a disposição é um fator essencial.

A obtenção e estudo de antioxidantes naturais tem bastante apelo quanto a fins de bem-estar social. A crescente utilização de produtos naturais como meio para levar uma vida mais saudável é cada vez mais comum na sociedade, carecendo de estudos para o seu endossamento.

Existe grandes potenciais na utilização industrial de substâncias presentes em plantas, a viabilização desse uso ocorre pela realização de etapas de otimização dos meios produtivos. Os processos industriais fundamentam na busca pela eficiência e minimização de custos, a otimização do solvente na obtenção de extratos visa contribuir nesse processo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Maximizar a extração de substâncias com atividade antioxidante e de antocianinas dos frutos do jabolão. Realizar a quantificação de substâncias antioxidantes e antocianinas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

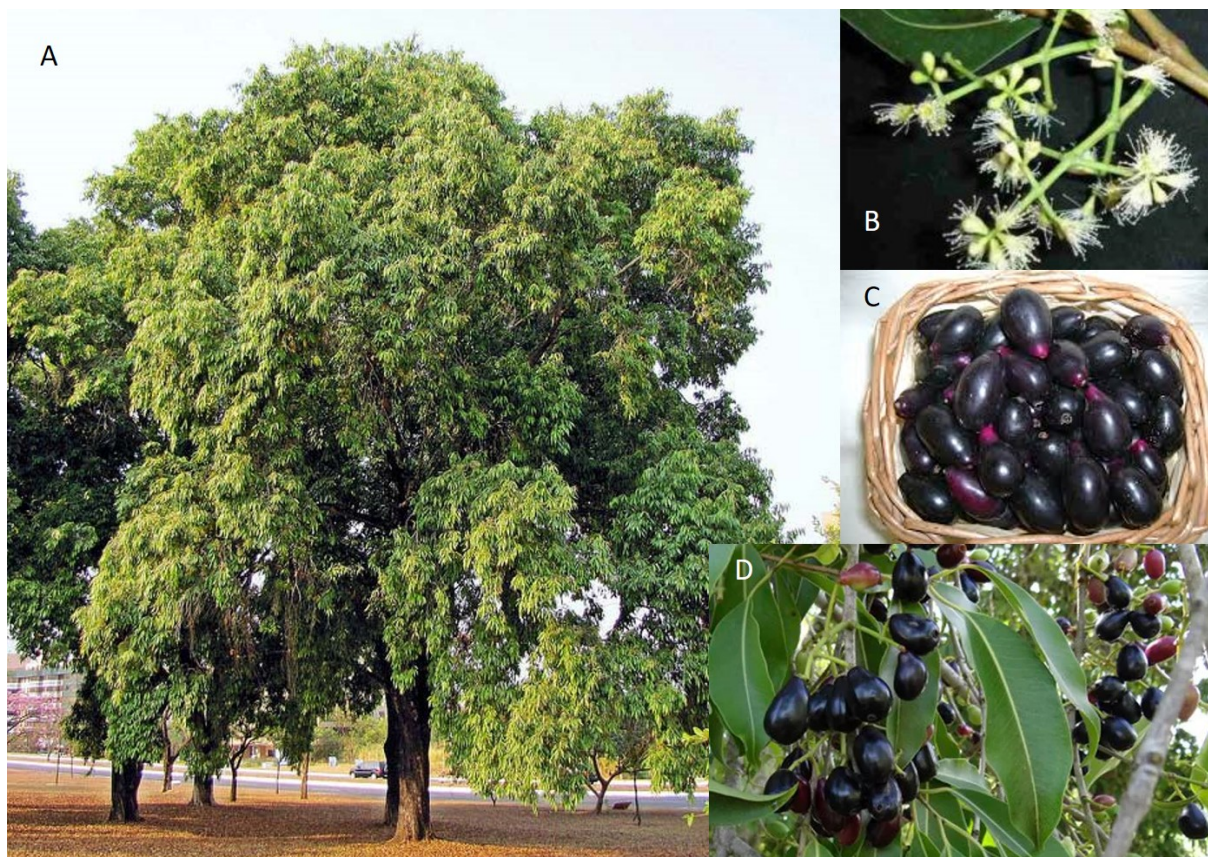
- Testar a capacidade de extração dos solventes: água, etanol e acetona;
- Preparar extratos através do planejamento de misturas;
- Identificar qual parte do fruto apresenta a maior atividade antioxidante;
- Avaliação do perfil e rendimento dos frutos coletados;
- Obter a atividade antioxidante total e dos extratos;
- Determinar o teor de antocianinas dos extratos;
- Definir a proporção de cada solvente que maximize a extração de: substâncias com atividade antioxidante e antocianinas;
- Construir superfícies de resposta com o auxílio do Software *Statistica 7.0*, para a atividade antioxidante e antocianinas;

5 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1 MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO E HISTÓRICO DO JAMBOLÃO

A espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, mais conhecida como jambolão é uma planta de tamanho médio a grande. De clima tropical apresenta rápido crescimento com flores e folhagens densa. Conhecida por seus usos como planta ornamental, medicinal, pelos seus frutos e madeira. Exibe uma considerável variação genética, sofrendo grande influência das condições climáticas e solo. Apresentando crescimento, tamanho de folhas, frutos e portes diferentes (LI *et al.*, 2010).

Figura 1 – Planta de Jambolão (A), Flores (B), Frutos (C e D)



Fonte: Adaptado de FRUTIFERAS (2011); VIZZOTO (2013); AGOSTINI-COSTA e SILVA (2008).

Podem atingir quando adultas de 15 até 40 m de altura, com o tronco variando de 0,5 até 2,5 m de diâmetro. Atinge crescimento completo por volta dos 30 anos. As flores são brancas levemente amareladas, surgindo na forma de aglomerados em

cachos (Figura 1-B). Na Índia a florada tem início no mês de março e vai até maio, quando então os frutos começam a se desenvolver, no Brasil esse período varia de novembro a dezembro (NAIR, 2017).

Os frutos são do tipo baga, com grande variação no tamanho, cor, espessura e paladar da polpa. Apresentam um formato ovoide, muito parecido com olivas, tem tamanho entre 1,5 a 3,5 cm. Possuem gosto adstringente, acentuado quando verde que vai se perdendo durante o amadurecimento, combinando com o doce e a presença de sabores característicos. Inicialmente de coloração verde os frutos passam para vermelho violeta gradualmente durante a maturação até ficarem roxo preto quando completamente maduros. São comumente consumidos crus, porém, também podem ser utilizados em tortas, molhos, sucos, vinhos, vinagres, sorvetes e geleias. A adstringência característica dos frutos é suprimida ao paladar se deixados em repouso na água salgada durante 1 hora (MORTON, 1987).

Historicamente é sabido que esta espécie era encontrada no subcontinente indiano e em várias outras regiões do sul da Ásia, como Bangladesh, Myanmar, Nepal, Paquistão, Sri Lanka e Indonésia. A planta é venerada na cultura budista e comumente plantada ao redor de templo hinduístas, sendo considerada sagrada. Posteriormente foi introduzida e disseminada para o resto do mundo, como planta ornamental, pela sua madeira e principalmente por seus frutos. Hoje se encontra naturalizada pelo continente asiático, leste do continente africano, Madagascar, América do Sul, Florida e Havaí (LI *et al.*, 2010).

O jambolão ainda não apresenta um cultivo expressivo no Brasil, embora existam estudos que abordam o plantio de mudas em larga escala, utilizando das técnicas de estaquia. O cultivo é na maior parte voltado como planta ornamental. As plantas cultivadas no Brasil são geralmente propagadas de forma popular e por viveiros sem a utilização das técnicas de cultivo para pomares, acarretando em plantas com grande variabilidade genética, considerado um problema para o cultivo comercial (LIMA *et al.*, 2007).

5.2 PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

A *S. cumini*, vem sendo bastante estudada pelas suas propriedades químicas e fisiológicas. Nos últimos anos estudos realizaram inúmeras descobertas quanto as

suas propriedades antibacteriana, antiulcerogênica, antialérgica, antiviral, antifúngica, cardioprotetora e hepatoprotetora (SAGRAWAT, MANN e KHARYA, 2006).

Estudos constataram atividade antibacteriana de extratos das folhas de jambolão. A atividade foi avaliada em bactérias Gram positivas e Gram negativas, através da inoculação de placas de ágar Mueller Hinton em mais de 17 isolados bacterianos. O extrato foi obtido a partir de uma extração hidro alcoólica a 10% (m/v), mostrando uma inibição de crescimento de 100% nos testes realizados. Demonstrando uma atividade antibacteriana expressiva nas folhas do jambolão (LOGUERCIO *et al.*, 2005).

O jambolão também é conhecido por sua atividade sobre os níveis glicêmicos, sendo utilizado no tratamento da diabetes pela medicina popular. A utilização da infusão das folhas de *S. cumini* já foi avaliada tendo mostrado eficiência no controle do efeito diabetogênico de substâncias como a aloxana, usada para a indução de diabetes *mellitus* tipo I em camundongos. Nos grupos de camundongos que receberam o tratamento foi possível constatar a diminuição do efeito hiperglicemiante da aloxana, apesar de não suprimir totalmente. Essa capacidade foi atribuída pela *S. cumini* ter característica de aumentar a atividade de enzimas removedoras de radicais livres nas células dos ratos diabéticos (ZANELLA *et al.*, 2010).

São conhecidos inúmeros componentes químicos no jambolão, tais como antocianinas, glicosídeos, ácido elágico, isoquercetina, kaemferol, quercitina e miretina. Nas sementes ocorre a presença de alcaloides, jambosinas, antimelinas, flavonoides, proteínas e cálcio. Na polpa apresenta na sua constituição uma grande quantidade de açúcares diversos, sais minerais, antocianinas, flavonoides, vitamina C e vitamina B3 (AYYANAR e BABU, 2012).

5.3 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são um conjunto de substâncias que tem a capacidade de atrasar o surgimento de alterações oxidativas em alimentos, como deterioração, rancidez e descoloração (ANVISA, 1961). Agem pelo retardamento dos efeitos danosos dos radicais livres. São geralmente compostos aromáticos com a presença do grupo hidroxila na molécula. Podem ser sintéticos, como o Hidroxianisol Butilado (BHA) e o Hidroxitolueno Butilado (BHT) ou naturais, como compostos

organosulfurados, fenólicos terpenos, vitaminas, minerais, pigmentos naturais, enzimas entre outros compostos vegetais (FOOD INGREDIENTS, 2009).

As carnes e seus subprodutos são muito susceptíveis a oxidação lipídica e proteica principalmente por passarem períodos de armazenagem até serem consumidos. A fim de retardar esses processos de oxidação é comum a adição de antioxidantes como Hidroxianisol Butilado (BHA), Hidroxitolueno Butilado (BHT), Propil Galato (PG) e *Terc* Butil Hidroquinona (TBHQ). Porém grande parte desses antioxidantes utilizados são de origem sintética, sendo que muitos deles possuem efeitos tóxicos a saúde humana. O uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos é bastante conhecido, podendo ser utilizados como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. Ervas, especiarias e extratos são habitualmente utilizadas no preparo de derivados cárneos sendo grande fonte de antioxidantes naturais (LEÃO *et al.*, 2017).

As antocianinas compreendem um conjunto de pigmentos naturais solúveis em água que estão presentes em vegetais. São substâncias responsáveis pela coloração de frutos, legumes e hortaliças, sendo encontradas em maior quantidade nas angiospermas (LOPES *et al.*, 2007). Em estudos realizados foram encontradas altas concentrações de antocianinas na polpa de frutos de jambolão. A presença de antocianinas avaliada por meio do método da diferença de pH em extratos de polpa *in natura*, obteve o valor de 111,2 mg a cada 100 g (KUSKOSKI *et al.*, 2006). Estudos demonstram que os altos teores de antocianinas presentes no jambolão têm potencial na utilização como antioxidante bem como um corante natural, podendo ser incorporado e empregado em alimentos e formulações farmacêuticas (SARI *et al.*, 2011).

5.4 PLANEJAMENTO DE MISTURA

Os resultados obtidos em um sistema de extração por solvente podem sofrer a influência de variáveis classificadas em dois tipos, de mistura e de processo. As alterações provocadas pelas condições de pressão, temperatura, pH, tempo de extração, área de contato, homogeneidade da amostra são consideradas variáveis de processo classificadas como independentes. Já fatores como os solventes utilizados e as concentrações que cada solvente terá na mistura são considerados variáveis de mistura sendo dependentes uma das outras. A proporção de um componente (i) da

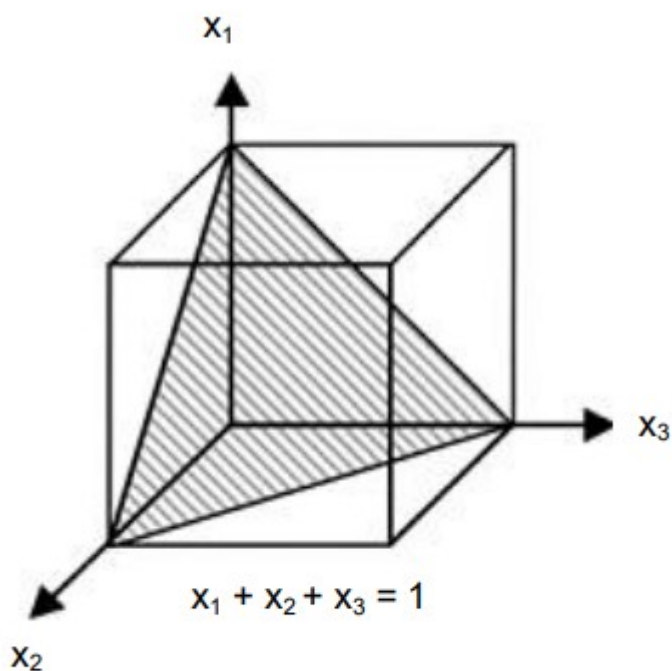
mistura acaba por afetar a dos outros já que a soma das frações (x) dos componentes é igual a 1. Exemplificado na equação (5.1) (SCHEFFÉ, 1958).

$$x_1 + x_2 + \dots + x_i = 1 \quad (5.1)$$

Como já descrito na literatura para uma mistura de vários componentes a resposta desse sistema dependera apenas da proporção dos componentes e não do montante total. Cada solvente apresenta uma interação característica com as substâncias de interesse. As diversas combinações de composição dos solventes em uma mistura apresentaram diferentes resultados. Essas combinações e restrições são representadas espacialmente por modelos conhecidos como simplex. Na Figura 2 é apresentado um simplex para três componentes em uma mistura (MUNHOZ, 2013).

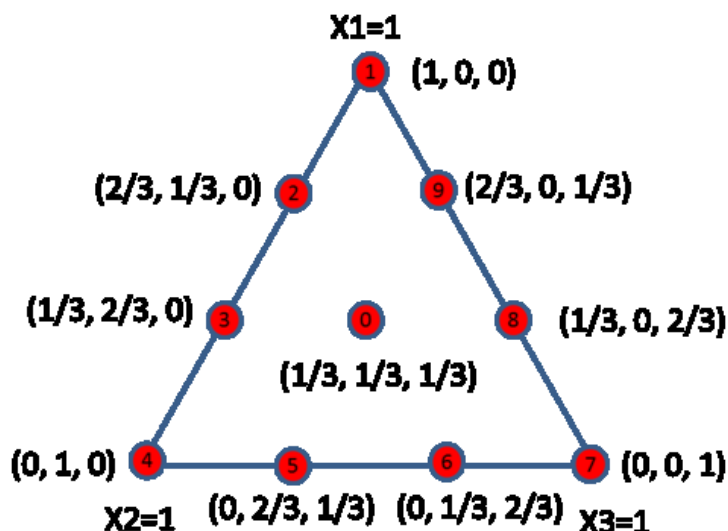
O resultado é um plano triangular equilátero limitado pelos pontos $x_1 = x_2 = x_3 = 1$. A partir da delimitação da estrutura simplex é montado o planejamento experimental, a fim de obter modelos matemático que representem o comportamento do sistema de mistura. Duas abordagens são comumente utilizadas. O simplex centroide e o simplex lattice (MUNHOZ, 2013).

Figura 2 – Representação de um Simplex



Fonte: Adaptado de MUNHOZ (2013).

Figura 3 – Representação de um Simplex Lattice



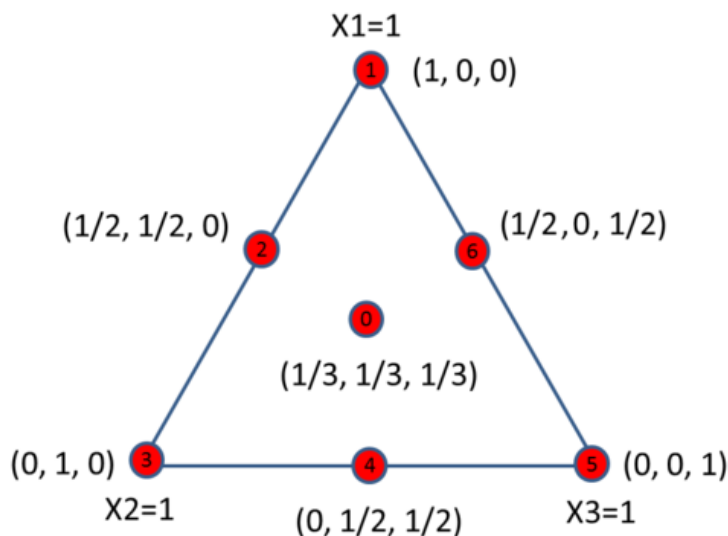
Fonte: Adaptado de RELIA (2017).

No simplex lattice os pontos representados pelos experimentos são distribuídos em um arranjo simétrica ao longo do simplex. Tendo a finalidade de abranger todas as possíveis combinações envolvendo os componentes da mistura. Para três componentes são necessários dez experimentos como representado na Figura 3. Para um simplex lattice de terceiro grau, os resultados do experimento podem ser usados para ajustar uma equação polinomial. Um projeto de estrutura simplex (Figura 3) resulta no modelo conhecido como cubico completo, representado na equação (5.2) (CORNELL, 2002).

$$\begin{aligned}
 y = & \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \delta_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2) \quad (5.2) \\
 & + \delta_{13} x_1 x_3 (x_1 - x_3) + \delta_{23} x_2 x_3 (x_2 - x_3) \\
 & + \beta_{123} x_1 x_2 x_3
 \end{aligned}$$

No simplex centroide os pontos correspondentes aos experimentos são concebidos para somente incluir lugares centrais, resultando em misturas com ao menos dois componentes em iguais proporções, a vantagem desse método em relação ao simplex lattice é a necessidade de menos ensaios experimentais. Para a mesma mistura de três componentes citada anteriormente são necessários sete experimentos como pode ser visto na Figura 4, (CORNELL, 2002).

Figura 4 – Representação de um simplex centroide



Fonte: Adaptado de RELIA (2017).

Para o simplex centroide da Figura 4, o polinômio comumente utilizado para descrever os dados experimentais é o modelo cubico especial, da equação (5.3).

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (5.3)$$

5.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM

A extração ultrassônica é uma técnica alternativa aos processos de extração convencionais, tem sido aplicada para extração de compostos orgânicos de material particulado (VEGGI, 2013). A eficiência de recuperação encontrada usando esta técnica, tem sido igual, ou melhor, que a obtida na extração por solvente convencional (OLIVEIRA *et al.*, 2016)

O ultrassom, baseia-se na ação de ondas ultrassônicas que causam mudanças físicas e químicas devido à variação de pressão no líquido, gerando cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento, ruptura e instabilidade na superfície e interface do sistema sólido-líquido intensificando a transferência de massa. O método apresenta como vantagens a simplicidade do equipamento, economia do custo e diminuição do tempo necessário para realização dos procedimentos (BRUNI *et al.*, 2014).

6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Foram utilizados os laboratórios da COEXP e laboratório de pescados ambos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão.

6.1 EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Liquidificador industrial, processador de alimentos, estufa de secagem, evaporador rotativo, liofilizador, banho de ultrassom, espectrofotômetro UV-Vis, centrífuga de bancada, balança semi-analítica, balança analítica, refrigerador e freezer.

6.2 MATERIAL DE CONSUMO E USO

Foram utilizados os seguintes materiais de consumo: Etanol, acetona, acetato de sódio, cloreto de potássio, metanol, água destilada, 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), ácido clorídrico. Os reagentes empregados apresentam grau de pureza pró-análise (PA). Além disso, utilizou-se os seguintes utensílios: Béquer, erlenmeyer, proveta, tubo de ensaio, tubo Falcon, balão volumétrico, micropipeta volumétrica, recipiente com tampa, frasco com tampa hermética, sacos plásticos, pipeta graduada, pipeta pasteur, ponteira, cubeta de quartzo e grade de tubos.

6.3 MATERIAL VEGETAL

Frutos maduros de *S. Cumini* foram coletados na rua do Aeroporto, 96, bairro Cristo Rei, da cidade de Francisco Beltrão – PR, coordenadas geográficas 26°04'06.5"S 53°03'31.4"W. As coletas foram realizadas na terceira semana do mês de março, em duas ocasiões, totalizando aproximadamente 5 kg de frutos. Após a coleta os frutos foram higienizados em água corrente, dispostos em sacos plásticos e armazenadas em freezer a temperatura de -12 °C.

6.4 PREPARAÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos obtidos foram triados visualmente visando a separação dos maduros e intactos. Em seguida a polpa e sementes foram separadas manualmente com auxílio de uma peneira. Os frutos foram processados em três grupos distintos: polpa, semente e polpa com semente. Os três conjuntos de amostras foram trituradas separadamente em um liquidificador industrial por 15 min. As amostras foram congeladas e liofilizadas até que a massa permaneceu constante, após isso foram homogeneizadas separadamente em um liquidificador doméstico, posteriormente alocadas em frascos fechados hermeticamente e armazenadas em freezer.

6.5 AVALIAÇÃO DA PERDA DE MASSA POR LIOFILIZAÇÃO.

Foram tomadas 3 amostras contendo 100 unidades de frutos maduros e intactos, a partir do material coletado. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos tarados e posteriormente pesados. Após, realizou-se a pesagem individual dos frutos de cada amostra. Em cada amostra, polpa e semente foram separadas manualmente e dispostas em novos recipientes tarados. Mais uma vez as massas foram determinadas separadamente. Na sequência polpa e semente foram reunidas novamente em seus respectivos recipientes. No liquidificador industrial cada amostra foi triturada e homogeneizada. Em seguida foram congeladas e encaminhadas para o processo de liofilização. Após liofilizadas realizou-se a pesagem para obtenção da massa de fruto seco.

6.6 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

6.6.1 Extrato para a Avaliação Preliminar da Capacidade Antioxidante

Para verificar qual parte dos frutos forneceria a maior capacidade antioxidante, foram preparados os extratos com amostras de: polpa, semente e polpa com semente a partir do material liofilizado. Cada extração foi realizada em triplicata.

Utilizou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007), com algumas adaptações. As amostras foram preparadas em tubos Falcon, pesando-se 0,5000 g de cada parte do fruto liofilizado (polpa, semente e polpa com semente), que haviam

sido obtidas no processo de preparação dos frutos, item 6.4. Para o procedimento de extração, adicionou-se 10 mL de uma solução metanol e água 50% (v/v) e então realizou-se o procedimento de extração assistida em ultrassom a 45 KHz, por 15 minutos. Em seguida as amostras de extrato foram centrifugadas por 10 min a 3600 rpm. Após a centrifugação transferiu-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta Pasteur para um balão volumétrico de 25 mL. Realizou-se uma nova extração com os mesmos procedimentos anteriores, porém com solução extratora composta de 70% acetona e 30% água (v/v). Completou-os com água destilada o balão volumétrico contendo os extratos combinados, perfazendo 9 amostras de 25 mL cada.

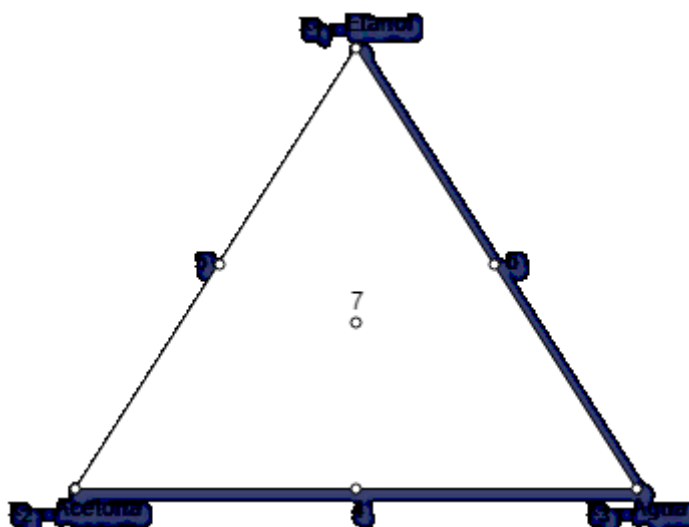
6.6.2 Extrato para a Otimização da Capacidade de Extração

Para esta etapa foi utilizado o fruto inteiro. A partir da porção de polpa com semente liofilizada obtida no item 6.4, pesou-se 0,5000g para cada amostra em relação a 25 mL de solução extrativas em um tubo Falcon. As amostras foram submetidas a extração assistida em ultrassom a 45 KHz, por 15 minutos. As amostras de extrato então foram centrifugadas por 10 minutos a 3600 rpm, o sobrenadante foi retirado e completado com a respectiva solução de solvente para 25 mL em balão volumétrico. Desses procedimentos obteve-se outros 9 extratos.

6.7 DELINEAMENTO DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Para o procedimento de otimização da atividade antioxidante foi realizado o planejamento de misturas, onde, optou-se por realizar os experimentos de forma aleatória utilizando o modelo simplex centroide, como o representado na Figura 5.

Figura 5 – Diagrama Ternário com o Planejamento Simplex Centroide



Fonte: Autoria Própria (2019).

Utilizou-se como solvente uma mistura de três componentes na obtenção dos extratos: (x_1) etanol, (x_2) acetona e (x_3) água, as proporções de cada um dos solventes então são determinadas de acordo com o modelo, sendo especificadas na Tabela 1. O modelo simplex centroide foi escolhido por necessitar um número reduzido de experimentos requeridos, contabilizando 7 extratos para obtenção do modelo matemático. A fim de obter maior confiabilidade estatística os extratos foram preparados em triplicata para o ponto central do simplex, totalizando 9 experimentos, os detalhes do processo de extração são descritos no item 6.6.2.

Tabela 1 – Fração dos Solventes para Extração de Antocianinas e Avaliar a Atividade Antioxidante

Experimento de Extração	Solventes		
	x_1 - Etanol	x_2 - Acetona	x_3 - Água
1	1,00	0	0
2	0	1,00	0
3	0	0	1,00
4	0	0,500	0,500
5	0,500	0,500	0
6	0,500	0	0,500
7	0,333	0,333	0,333
8	0,333	0,333	0,333
9	0,333	0,333	0,333

Fonte: Autoria Própria (2019).

6.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH

A atividade antioxidante foi analisada em dois procedimentos diferentes, em um primeiro momento de forma comparativa entre as partes do fruto: polpa, semente e polpa com semente. Em um segundo momento, visando a maximização da extração dessas substâncias a partir dos solventes estudados.

6.8.1 Preparo da Solução de DPPH

Pesou-se 3,94 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) na balança analítica de precisão. Em um balão volumétrico de 100 mL dissolveu-se o DPPH pesado com etanol absoluto, obtendo uma solução na concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. A solução foi homogeneizada em banho de ultrassom a 45 KHz, por 3 min.

6.8.2 Curva de Calibração do DPPH

A partir da solução de DPPH $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ produzida anteriormente, realizou-se diluições para construir os pontos da curva de calibração. As concentrações obtidas são apresentadas na Tabela 2. Utilizou-se balões volumétricos de 10 mL no preparo das soluções.

Tabela 2 – Concentrações e Volumes das Soluções Utilizadas no Preparo da Curva Calibração

Solução	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volume Etanol (mL)	Volume Solução DPPH (mL)
1	100	0	10
2	83	1,7	8,3
3	67	3,3	6,7
4	50	5,0	5,0
5	33	6,7	3,3
6	17	8,3	1,7
7	0	10	0

Fonte: Aatoria Própria (2019).

Após a produção das soluções, encaminhou-se para a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Vis. Em uma cubeta de quartzo, realizou-se a varredura da solução 1. A partir da varredura foi constatado que o pico de absorbância se

encontrava no comprimento de onda de 515 nm, como descrito por (RUFINO *et al.*, 2007). Zerou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro com etanol, solução 7. A absorbância então foi lida para o comprimento de 515 nm para todas as amostras. Repetiu-se novamente todos os procedimentos de obtenção da curva de calibração para produção de uma duplicata dos dados. Posteriormente no software Excel® foram construídas linhas de tendência com ajuste linear, onde encontrou-se uma curva de calibração para cada ensaio.

6.8.3 Preparo das Amostras para Determinação da Capacidade Antioxidante

A partir dos extratos obtidos no item 6.6.1 realizou-se testes com diferentes concentrações de extrato, foram preparadas em tubos de ensaio diluições de 1:10, 1:20, 1:50 1:70 1:100 e 1:200. Em tubos separados, adicionou-se 1600 µL da solução 100 µmol L⁻¹ de DPPH e 150 µL das soluções diluídas dos extratos e em seguida os tubos foram agitados. Após 30 min observou-se as amostras, verificando visualmente a cor apresentada a fim de selecionar as diluições ideais para a leitura da absorbância. Esse procedimento foi necessário para encontrar a região onde ocorre uma relação proporcional entre a absorbância e concentração, somente trabalhando nela é possível determinar a atividade antioxidante.

Partindo-se dos extratos obtidos no item 6.6.2, com o auxílio da micropipeta volumétrica efetuou-se 8 diluições: 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100 e 1:200. As diluições foram realizadas em tubos de ensaio, utilizado etanol absoluto para completar volume final de 5 mL. A partir dos 9 extratos iniciais produziu-se um total de 72 amostras de extratos diluído.

6.8.4 Determinação da Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001), com algumas adaptações.

Em uma grade com tubos de ensaio adicionou-se uma alíquota de 150 µL de cada extrato diluído. Os tubos então receberam um volume de 1600 µL da solução 100 µmol L⁻¹ de DPPH e foram homogeneizados. Esses procedimentos foram realizados de maneira a deixar cada amostra com um intervalo de 30 min. entre a mistura e a leitura no espectrofotômetro, reagindo em temperatura ambiente. Em

cubeta de quartzo, realizou-se a leitura da absorvância no comprimento de onda de 515 nm para todas as amostras. Como controle negativo foi utilizando a mistura de uma alíquota de 1600 μL da solução de DPPH 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com 150 μL de etanol. Como controle positivo o espectrofotômetro teve a absorvância zerada com etanol.

6.9 TEOR DE ANTOCIANINAS

Os teores de antocianinas totais foram mensurados utilizando o método do pH diferencial com ajustes (TEIXEIRA, STRINGHETA e OLIVEIRA, 2008). O doseamento de antocianinas totais foi realizado a partir da utilização de duas soluções tampão, das quais a primeira tratava-se de uma solução de cloreto de potássio (0,025 M) em pH 1, e a segunda, uma solução de acetato de sódio (0,4 M) com pH 4,5. Partindo dos 9 extratos, obtidos no item 6.6.2, foram preparadas para cada solução de tampão e de extrato uma triplicata, totalizando 54 amostras, 27 para cada solução tampão. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 4,5 mL da respectiva solução tampão e 0,5mL de extrato. Após 30 minutos da mistura das soluções, realizou-se a leitura dos valores de absorvância em dois comprimentos de onda (520 e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas monoméricas totais por 100 gramas de fruto liofilizado (AMT), utilizando as equações (6.8.1) e (6.8.2) (COHEN *et al.*, 2006).

$$A = (A_{520} - A_{700})pH_1 - (A_{520} - A_{700})pH_{4,5} \quad (6.8.1)$$

$$AMT(\text{em mg}/100 \text{ g de fruto}) = \frac{A * MM * f_D * 100}{\epsilon * L} \quad (6.8.2)$$

Nessas equações, MM é massa molecular do padrão utilizado para expressar os resultados, comumente se utiliza o padrão de pelargonidina-3-O-glicosídeo ($MM = 433,2 \text{ mg mmol}^{-1}$).

f_D Refere-se ao fator de diluição dos procedimentos de análise, foram realizadas duas diluições, uma na obtenção do extrato utilizando 0,5 g de fruta para 25mL de solvente relativo à concentração do extrato. A outra diluição refere-se à solução tampão na obtenção da amostra 1:10, 0,5mL de extrato para 5mL. ($f_D = 500$).

ϵ Representa o coeficiente de absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), é calculado a partir da equação de Lambert-Beer, para o padrão de pelargonidina-3-O-glicosídeo

o qual já foi determinado em outros estudos como $\varepsilon = 25660 (L\text{ mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1})$ (CHAVES, 2014).

L Corresponde ao caminho ótico (cm), referente a largura da cubeta (1 cm);
EP significa equivalentes de pelargonidina-3-O-glicosídeo, padrão utilizado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 PERDA DE MASSA POR LIOFILIZAÇÃO

A *S. cumini* é uma planta bastante estudada cientificamente, porém é necessário o conhecimento de características próprias de cada exemplar. As partes e componentes constituintes dos frutos podem sofrer variações de sazonalidade, clima, solo, variabilidade genética, grau de maturação entre outros fatores. Neste estudo optou-se por identificar a proporção de polpa e semente, massa seca após liofilização e o peso médio de cada unidade de fruto.

Os resultados obtidos no processo de caracterização descrito são apresentados a seguir:

Tabela 3 – Resultados da Avaliação do Perfil e Rendimento dos Frutos Coletados

Especificação	Massa Média (g) em 100 unidades	Massa Média (g) em cada fruto
Frutos inteiros	409,40 ± 5,40	4,09 ± 0,05
Polpa	301,60 ± 4,30	3,02 ± 0,04
Sementes	101,90 ± 1,50	1,02 ± 0,02
Polpa e sementes liofilizadas	132,50 ± 0,30	1,33 ± 0,003

Fonte: Autoria Própria (2019).

De acordo com a Tabela 3, cada fruto em média apresentou uma massa de 4,09 g. Sendo dessa massa aproximadamente 3,02 g correspondente a polpa e 1,02g referente a semente do fruto, ou seja cerca de 24,9% da constituição mássica do fruto refere-se a semente e 75,1% a polpa, uma proporção expressiva de semente no fruto. A principal observação é que as massas da polpa e semente deveriam ser complementares a massa inicial dos frutos *in natura*, porém devido a perdas da polpa no processo de separação elas não foram.

Após liofilizados polpa e semente apresentaram uma massa seca média por fruto de 1,33 g, logo o teor de massa úmida do fruto corresponde a 74,82% da massa do fruto *in natura*. Como os extratos nos procedimentos foram obtidos a partir do fruto

lioofilizado, utilizando o teor de humidade e voláteis pode ser encontrado o equivalente dos resultados para o fruto *in natura*.

Os resultados obtidos na caracterização estão bem próximo aos encontrados por outros autores. Os frutos apresentaram rendimento médio em polpa de 75,69%, 24,31% de semente, umidade de 84,57g de água em 100g de fruto (AUGUSTA *et al.*, 2010).

7.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH

7.2.1 Curva de Calibração do DPPH

A obtenção da curva de calibração foi necessária para correlacionar a absorbância das amostras com as concentrações conhecidas de DPPH, utilizada no procedimento de determinação da atividade antioxidante. Os resultados obtidos na construção da curva, descritos no item 6.8.2, são apresentados na Tabela 4.

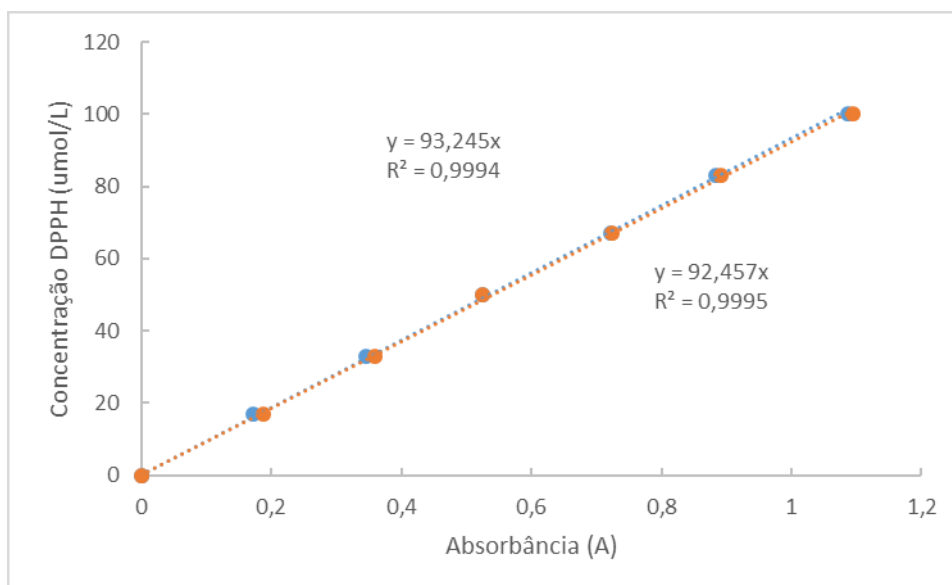
Tabela 4 – Leituras de Absorbância e Concentração de DPPH para a Curva Calibração

Concentração DPPH ($\mu\text{mol/L}$)	Absorbância (A)	
	Primeiro Ensaio	Segundo Ensaio
100	1,086	1,094
83	0,883	0,891
67	0,722	0,723
50	0,524	0,525
33	0,346	0,360
17	0,172	0,188
0	0	0

Fonte: Autoria Própria (2019).

No Excel[®] foram construídas linhas de tendência com ajuste linear, onde encontrou-se uma curva de calibração para cada ensaio, apresentadas no gráfico (Figura 6).

Figura 6 – Curva de Calibração para o DPPH



Fonte: Autoria Própria (2019).

As curvas apresentaram um ajuste ótimo com R^2 bem próximo de 1, apesar de terem uma pequena diferença no coeficiente linear. Isso demonstra uma pequena variação na repetitividade dos procedimentos, podendo ser atribuída a imprecisão da balança na pesagem do DPPH. Diante disso, utilizou-se nos cálculos a curva de calibração que foi construída com a mesma solução de DPPH empregada nos experimentos.

7.2.2 Obtenção da Capacidade Antioxidante Total Preliminar

Esse experimento teve a finalidade de determinar a capacidade antioxidante total dos frutos e identificar em qual parte ela é mais expressiva. A partir dos procedimentos realizados no item 6.7.6 obteve-se os resultados da Tabela 5.

Para cada parte do fruto os extratos foram produzidos em triplicata e depois na determinação da atividade antioxidante em duplicata, totalizando 6 dados de absorbância. Desses valores obteve-se as médias, desvios e coeficiente de variação. Nos procedimentos do item 6.8.3 encontrou-se as seguintes diluições de trabalho, para a polpa 1:20, polpa e semente 1:100 e semente 1:200.

Tabela 5 – Leituras de Absorbância Referente a Atividade Antioxidante Total

Parte do fruto	Replicatas	Absorbância (A)	Média	Coefficiente de Variação
Polpa	1	0,721	0,714 ± 0,009	0,013
	2	0,704		
	3	0,727		
	4	0,711		
	5	0,701		
	6	0,719		
Polpa e Semente	1	0,677	0,703 ± 0,017	0,025
	2	0,692		
	3	0,722		
	4	0,692		
	5	0,707		
	6	0,728		
Semente	1	0,675	0,682 ± 0,010	0,015
	2	0,684		
	3	0,674		
	4	0,698		
	5	0,693		
	6	0,669		
Branco	1	0,961	0,967 ± 0,005	0,005
	2	0,968		
	3	0,973		

Fonte: Autoria Própria (2019).

A partir das diluições, médias das absorbâncias e valores de concentração calculou-se a atividade antioxidante total (AAT) em massa de DPPH consumido por grama de fruto, utilizando a equação a seguir.

$$AAT = \frac{C_{DPPH \text{ consumida}}}{C_{\text{extrato na amostra}}} = \frac{(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) * a * MM_{DPPH} * f_c}{C_{\text{extrato}} * f_d} \quad (7.1)$$

Onde os termos da equação são:

A_{branco} é a média da absorbância do controle, ou branco.

A_{amostra} é a média da absorbância dos extratos do fruto após a resposta.

a é o coeficiente angular da curva de calibração do DPPH, dentre as duplicatas realizadas utilizou-se a que apresentou o melhor ajuste, R^2 mais próximo de 1.

MM_{DPPH} é a massa molar do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, igual a 394,32 g/mol.

f_c é o fator de conversão das unidades, nesse caso resultou em $1.0e - 6$.

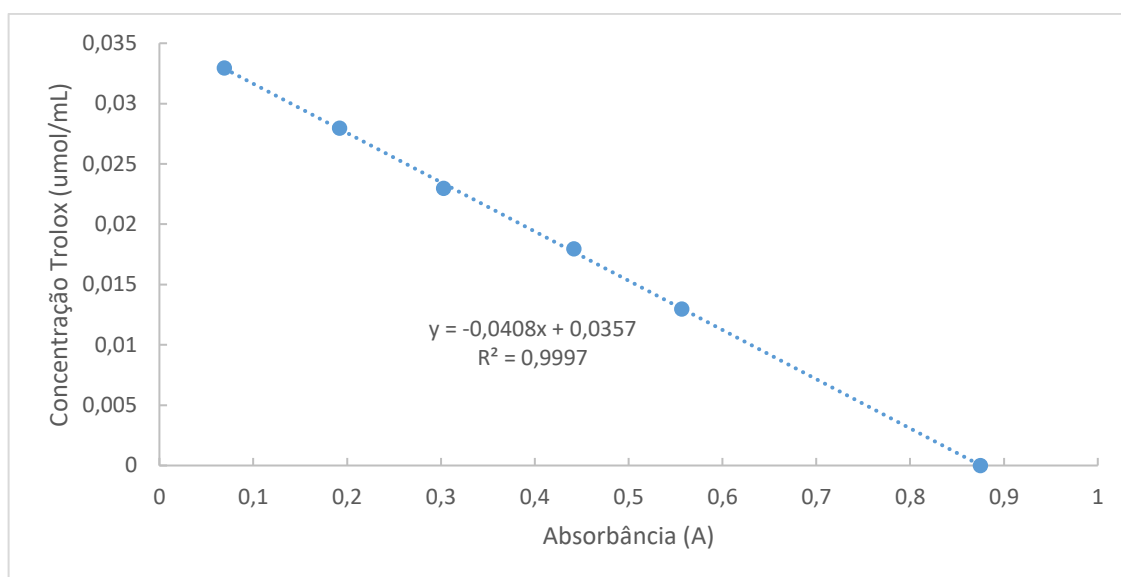
C_{extrato} é a concentração mássica do extrato inicial produzido, igual 20 g/L.

f_d é o fator de diluição envolvido na confecção da amostra até a leitura da absorbância. Uma diluição do extrato e outra diluição na mistura com o DPPH.

7.2.3 Curva Calibração Trolox

Para fazer a comparação entre a atividade antioxidante obtida nos experimentos com resultados de outras fontes em literatura realizou-se a conversão dos valores de (AAT) expressos em mg de DPPH por grama de fruto atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra.

Figura 7 – Curva de Calibração Utilizada para o Trolox



Fonte: Adaptado de NOVELLO (2011).

7.2.4 Capacidade Antioxidante Total Preliminar

A atividade antioxidante (AAT) expressa em consumo de DPPH, e a atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra, encontradas nas partes do fruto são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade Antioxidante Extratos

Parte do Fruto	AAT (mg DPPH/g de fruto)	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g de fruto}$)
Polpa	108 \pm 6	120 \pm 7
Polpa com Semente	563 \pm 48	629 \pm 54
Semente	1213 \pm 66	1357 \pm 73

Fonte: Aatoria Própria (2019).

Quanto maior o consumo de DPPH por g de fruto, maior é a atividade antioxidante apresentada pela parte analisada. Como pode ser observado na Tabela 6 a semente foi a parte do fruto que obteve a maior atividade antioxidante. Sendo 11 vezes maior que a encontrada na polpa e 2 vezes maior que o encontrado no fruto inteiro, isso mostra uma elevada concentração de antioxidantes na semente. Comparando a resposta da polpa com semente com a resposta para a polpa, percebe-se que apesar da pequena proporção mássica na constituição dos frutos, cerca de 20%, a semente desempenha a maior parte da atividade antioxidante dos frutos, mais de 80%.

Estudos encontraram que a atividade antioxidante foi 58,14% superior nas sementes quando comparadas aos frutos de jambolão (VIZZOTTO e PEREIRA, 2008). Em análises expressas em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) encontraram 103 ($\mu\text{mol Trolox/g fruto in natura}$) (ARAÚJO, 2014), 30,51 \pm 0,20 ($\mu\text{mol Trolox/g de amostra liofilizada}$) pelo método DPPH (FERNANDES *et al.*, 2013). Também em (TEAC) outros trabalhos conseguiram 262,13 \pm 8,2 ($\mu\text{mol Trolox/g de amostra}$) para o jambolão, 4,3 \pm 0,2 para a Amora e 6,9 \pm 0,3 para o Açaí (SÁ, 2008), ainda, 517,2 \pm 11,35, 215,15 \pm 15,9 e 309,8 \pm 4,6 ($\mu\text{mol Trolox/g de amostra}$) para diferentes árvores de Jambolão (BARCIA, 2009).

Pode ser vista uma variação significativa nos resultados para a atividade antioxidante descritos em literatura, essa variação pode ser atribuída a variabilidade entre os exemplares da planta.

7.2.5 Otimização de extração

Os procedimentos utilizados para o calcular e processar os resultados são detalhados e explicados na sequência.

7.2.6 Maximização da Atividade Antioxidante

A partir dos extratos obtidos no planejamento de mistura, no item 6.7, realizou-se oito pontos de diluições para a construção da curva de resposta, onde foi avaliada a inibição de 50% dos radicais do DPPH (EC_{50}). O EC_{50} garante um ponto de equalização na comparação entre as capacidades antioxidantes das diferentes amostras de extratos, dos procedimentos do item 6.7.6 obteve-se os resultados:

Tabela 7 – Absorbâncias das Amostras

Amostra	Diluição dos Extratos							
	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:75	1:100	1:200
1	0,073	0,073	0,233	0,628	0,789	0,870	*0,966	0,922
2	0,482	0,756	0,856	0,924	0,93	0,938	0,950	0,964
3	0,088	0,081	0,170	0,501	0,739	0,814	0,855	0,914
4	0,084	0,079	0,075	0,115	0,429	0,605	0,688	0,815
5	0,070	0,072	0,078	0,470	0,664	0,787	0,831	0,882
6	0,090	0,078	0,075	0,177	0,510	0,636	0,721	0,850
7	0,078	0,075	0,076	0,117	0,424	0,573	0,679	0,813
8	0,078	0,074	0,075	0,124	0,449	0,615	0,692	0,818
9	0,078	0,075	0,074	0,143	0,443	0,596	0,691	0,818

Fonte: Autoria Própria (2019).

Tabela 8 – Absorbâncias do Controle

Amostra	Absorbância	Média	Absorbância EC_{50}
A	0,963		
B	0,971	0,969 ± 0,004	0,4845
C	0,972		

Fonte: Autoria Própria (2019).

Para cada amostra a partir das diluições da Tabela 7, realizou-se um ajuste com a linha de tendência no Excel, obtendo uma equação linear relacionando a concentração de cada extrato nas diluições com a respectiva absorbância na resposta. Os gráficos são apresentados no Anexo A. Na Tabela 9 são apresentados os valores dos coeficientes obtido.

Tabela 9 – Coeficientes de Ajuste para Curvas de EC₅₀ nas Amostras de Extrato

Amostra de Extrato	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R ²)
1	-4,2835	0,9534	0,9947
2	-0,5616	0,9582	0,9973
3	-6,8387	0,9712	0,9999
4	-13,591	0,9624	0,9956
5	-7,2563	0,9502	0,9866
6	-13,591	0,9624	0,9956
7	-15,430	0,9568	0,9973
8	-14,997	0,9570	0,9978
9	-15,324	0,9573	0,9972

Fonte: Autoria Própria (2019).

A curva de resposta da absorvância em relação a concentração de extrato não é linear para todos os pontos de diluição da Tabela 7, para a obtenção dos gráficos selecionou-se apenas região onde a resposta para a inibição dos extratos é linear, nela se encontra o ponto onde ocorre 50% da inibição da absorvância, ou seja, a concentração de extrato onde metade dos radicais de DPPH foram inibidos pela presença de substâncias antioxidantes no extrato.

Os ajustes apresentaram coeficientes de determinação ótimos, R² entre 0,9999 e 0,9866, muito próximos de 1 (Tabela 9). O que indica que no pior dos modelos, o extrato 5, pelo menos 98,66% dos valores tem sua relação com a variável dependente determinada pela equação.

Para o cálculo do EC₅₀ utilizou-se os coeficientes lineares (b) e angulares (a) das retas obtidas anteriormente nos ajustes, equação 7.2. Os valores de EC₅₀ variam de acordo com as alíquotas e concentrações utilizados nos procedimentos. Então, para a comparação com outros experimentos calculou-se também a partir do EC₅₀ o consumo de DPPH por grama de extrato com a equação 7.3.

$$IC_{50} = \frac{(A_{IC_{50}} - b)}{a} \quad (7.2)$$

a é o coeficiente angular da reta de ajuste;

b é o coeficiente linear da reta de ajuste;

$A_{IC_{50}}$ é a absorção correspondente a 50% de inibição da concentração de DPPH, considerada como metade da absorbância do controle.

$$AAT = \frac{C_{DPPH \text{ consumida}}}{C_{\text{extrato na amostra}}} = \frac{A_{\text{controle}} * a * MM_{DPPH} * f_c}{2 * IC_{50}} \quad (7.3)$$

A_{branco} é a média da absorbância do controle, ou branco.

a é o coeficiente angular da curva de calibração do DPPH.

MM_{DPPH} é a massa molar do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, igual a 394,32 g/mol.

f_c é o fator de conversão das unidades, nesse caso resultou em $1.0e - 6$.

7.2.7 Atividade Antioxidante no Centróide Simplex

No planejamento de mistura realizado obteve-se os seguintes resultados para a atividade antioxidante total (AAT):

Tabela 10 – Atividade Antioxidante dos Extratos Obtidos no Centróide Simplex

Amostra de Extrato	Solventes			EC ₅₀ extrato (g/L)	AAT (mg DPPH/g fruto)
	x ₁ - Etanol	x ₂ - Acetona	x ₃ - Água		
1	1,00	0	0	0,110	161,2
2	0	1,00	0	0,844	21,9
3	0	0	1,00	0,071	248,0
4	0	0,500	0,500	0,030	579,0
5	0,500	0,500	0	0,064	275,0
6	0,500	0	0,500	0,035	501,9
7	0,333	0,333	0,333	0,031	576,7
8	0,333	0,333	0,333	0,032	560,2
9	0,333	0,333	0,333	0,031	572,1

Fonte: Autoria Própria (2019).

A resposta para a atividade antioxidante obtida para o simplex centróide (Tabela 10), ficou muito próxima a atividade antioxidante total para a mesma amostra, polpa com semente (Tabela 6). Os extratos que apresentaram maior atividade foram as amostras 7, 8, 9, (etanol, acetona e água na mesma composição), e 4 (combinação de água e acetona). Isso mostra que ambos os procedimentos convergiram para a

mesmo resultado de substância antioxidantes. Já o extrato 2 (acetona pura) foi o que apresentou a menor atividade. Apesar disso, a acetona quando combinada com água apresentou um dos melhores resultados.

7.3 ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS NO CENTROIDE SIMPLEX

O teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) presentes nos extratos foi expressa em miligramas de antocianinas monoméricas (mg/ 100g de frutos), baseado no padrão pelargonidina-3-O-glicosídeo (CHAVES, 2014). Cabe ressaltar que os resultados obtidos estão em base de fruto liofilizado.

Tabela 11 – Teor de Antocianinas dos Extratos Obtidos no Centroides Simplex

Amostra de Extrato	Solventes			AMT (mg/100g fruto)
	x ₁ - Etanol	x ₂ - Acetona	x ₃ - Água	
1	1,00	0	0	364,1
2	0	1,00	0	20,8
3	0	0	1,00	383,8
4	0	0,500	0,500	446,5
5	0,500	0,500	0	347,8
6	0,500	0	0,500	479,5
7	0,333	0,333	0,333	472,4
8	0,333	0,333	0,333	488,7
9	0,333	0,333	0,333	476,4

Fonte: Autoria Própria (2019).

As antocianinas apresentaram valores de resposta bem próximos entre as combinações de solvente, os melhores resultados foram para os extratos 7, 8, 9 (mistura ternária de mesma composição) e 6 (Etanol e água). O menor valor foi obtido no extrato 2, acetona pura. Esse comportamento foi semelhante ao exibido pela atividade antioxidante.

O teor de antocianinas encontrado nos melhores extratos (488 à 472 mg/100g de fruto) foi superior ao encontrado por Kuskoski *et al.* (2006) de 111 mg/100g de fruto de Jambolão. Os teores encontrados também foram superiores aos valores de 276,70 (mg/100g peso fresco) (LAGO e GOMES, 2006) e (300,54 mg/100g) para o Jambolão (AUGUSTA *et al.*, 2010). Também foram superiores comparando com outros tipos de

frutos como framboesas (197,2 mg/100g), amora-preta (171,6 mg/100g) e mirtilo (113,55 mg/100g) (SELLAPPAN *et al.*, 2002).

7.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR MEIO DO CENTROIDE SIMPLEX

A fim de avaliar a dependência das combinações dos solventes, variáveis independentes, com a atividade antioxidante apresentada pelos extratos, a variável dependente, realizou-se a análise das respostas para a atividade antioxidante e antocianinas dos extratos com o auxílio do Software *Statistica 7.0*.

Tabela 12 – Anova dos Modelos De Regressão para o Centroides Simplex

Atividade Antioxidante total (AAT)					
Modelo	SQ	GL	Valor F	Valor p	R ²
Linear	48897,9	2	0,4609	0,651304	0,133182
Quadrático	317882,3	3	857,0482	0,000068	0,998990
Cúbico Especial	227,3	1	3,1639	0,217251	0,999609
Antocianinas monoméricas total (AMT)					
Modelo	SQ	GL	Valor F	Valor p	R ²
Linear	84815,6	2	2,8567	0,134403	0,487764
Quadrático	88923,5	3	602,9669	0,000114	0,999152
Cúbico Especial	2,4	1	0,0336	0,871451	0,999166

Fonte: Autoria Própria (2019).

O coeficiente de determinação representa a proporção da variabilidade dependente, antioxidante ou antocianinas, explicada pelas variáveis regressoras. Assim, quanto mais próximo R² estiver de 1, maior é a explicação da variável resposta pelo modelo ajustado (PORTAL ACTION, 2015). O valor F é uma razão, que vai de 0 a infinito, e quanto maior ela é, maior é a diferença entre o modelo mais simples e o mais complexo (RIBAS, 2013).

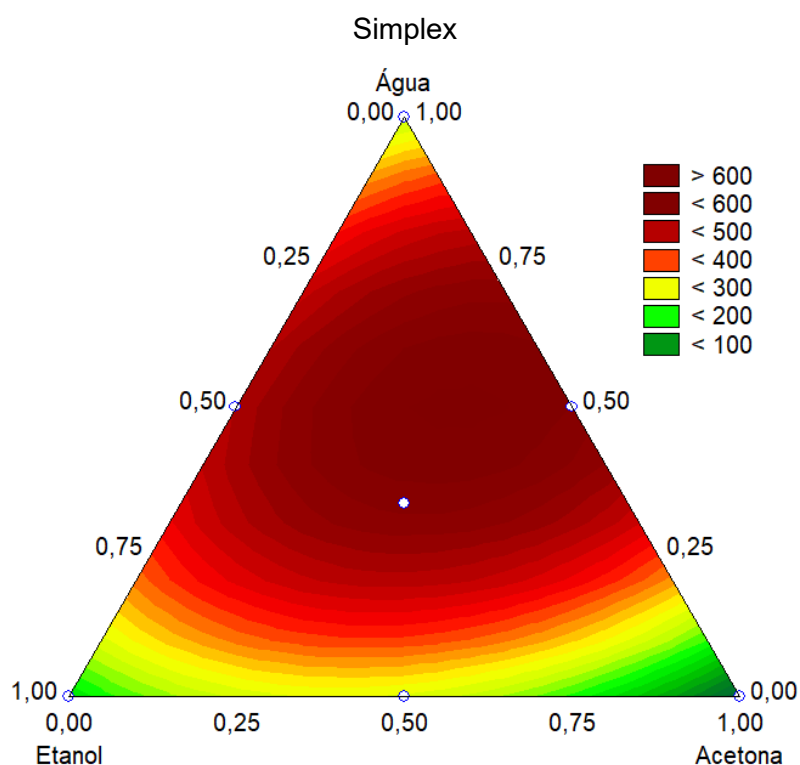
Para as variáveis AAT e AMT, o melhor valor de R² foi obtido com modelo Cúbico especial, R² = 0,9996 e 0,9991 respectivamente, com uma pequena diferença para o modelo quadrático. Porém de acordo com a interpretação do Valor F, ocorreu um incremento expressivo do resultado de F no modelo quadrático (F = 857 e 602), contra incremento pequeno de F para o modelo cúbico (F = 3,16 e 0,03), mostrando

ser irrisória a diferença entre os modelos para ambas as variáveis de resposta. O valor de p para o modelo quadrático foi o que apresentou a maior significância, ou seja, $p < 0,05$. Observando esses fatores, a melhor escolha é o modelo quadrático para ambas as variáveis AMT e AAT.

7.4.1 Representação do Modelo da Superfície de Resposta

A fim de ilustrar o comportamento das variáveis estudadas obteve-se os gráficos do comportamento previsto pelo modelo quadrático no diagrama ternário.

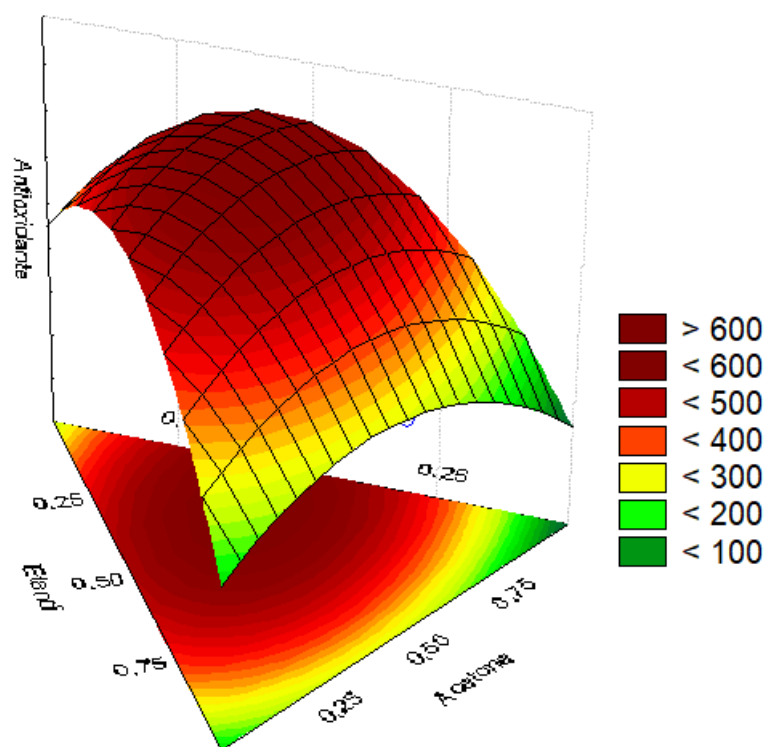
Figura 8 –Diagrama Ternário e Curvas de Nível para Atividade Antioxidante no Centróide



Fonte: Autoria Própria (2019).

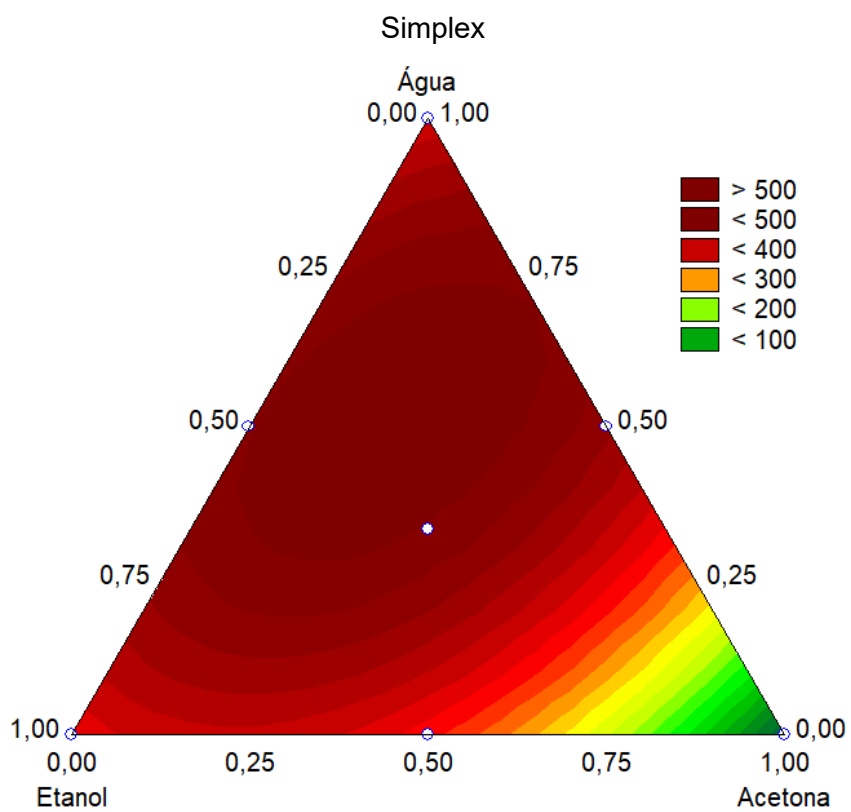
Nos diagrama ternários (Figuras 8 e 10) a cor verde nas curvas de nível representa a região de menor valor para as variáveis resposta (AAT) e (AMT), a medida que a cor vai mudando de verde para amarelo e depois vermelho, os valores de resposta aumentam.

Figura 9 – Superfície de Resposta para a Atividade Antioxidante



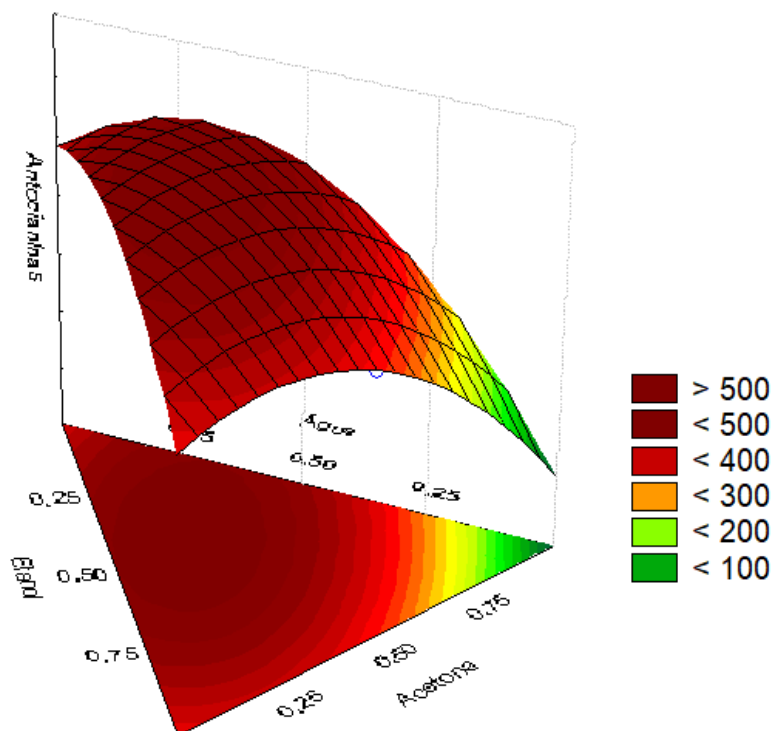
Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 10 – Diagrama Ternário e Curvas de Nível do teor de Antocianinas no Centroide



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 11 – Superfície de Resposta para o Teor de Antocianinas



Fonte: Autoria Própria (2019).

Nas Figuras 8 e 10 a resposta para as variáveis AAT e AMT, respectivamente, é representada por curvas de nível, cada cor representa o intervalo onde se localiza o valor da resposta, a região de maximização encontra-se na circunferência central vermelha. Já nas Figuras 9 e 11 a intensidade da resposta é representada pela altura da superfície no plano tridimensional, quanto maior a altura mais intensa ele é. A região ótima se encontra na parte mais alta da superfície.

7.4.2 Análise do Modelo

As Tabelas 12 e 13 mostram os parâmetros que representam o comportamento para as variáveis independentes, analisadas com nível de significância de 95%. O modelo matemático que representa a resposta para a atividade antioxidante é apresentado na equação 7.1.

Tabela 13 – Sumário Pseudo-componentes para Atividade Antioxidante

Fator	Coefficiente	Valor p	Limite -95%	Limite +95%
A - Etanol	161,249	0,002751	124,784	197,714
B - Acetona	20,927	0,132245	-15,538	57,392
C - Água	248,026	0,001166	211,560	284,491
AB	735,785	0,003169	557,143	914,426
BC	1189,415	0,001216	1010,773	1368,056
AC	1778,132	0,000545	1599,491	1956,774
ABC	399,413	0,217251	-566,740	1365,566

Fonte: Autoria Própria (2019).

$$y = 161,2x_1 + 20,92x_2 + 248,0x_3 + 735,8x_1x_2 + 1189x_1x_3 + 1778x_2x_3 + 399,4x_1x_2x_3 \quad (7.1)$$

Os pseudo-componentes AC (etanol e água) e BC (Acetona e água) foram os que apresentaram a maior contribuição na resposta da atividade antioxidante. Já a forma pura dos solventes são as que menos contribuem, com destaque para a Acetona que possui uma contribuição irrelevante. Para a resposta do teor de antocianinas o pseudo-componente ternário teve uma contribuição negativa e a Acetona novamente teve a menor contribuição. O melhor componente foi de novo a mistura AC, porém com uma resposta menos intensa que para a atividade antioxidante. O modelo matemático que representa a previsão para o teor de antocianinas é apresentado na equação 7.2.

Tabela 14 – Sumário Pseudo-Componentes para Teor de Antocianinas

Fator	Coefficiente	Valor p	Limite -95%	Limite +95%
A - Etanol	364,09	0,000547	327,45	400,73
B - Acetona	20,82	0,134370	-15,82	57,46
C - Água	383,79	0,000492	347,15	420,43
AB	621,26	0,004479	441,77	800,77
BC	422,05	0,009630	242,56	601,56
AC	976,92	0,001819	797,42	1156,42
ABC	-41,36	0,871451	-1012,17	929,44

Fonte: Autoria Própria (2019).

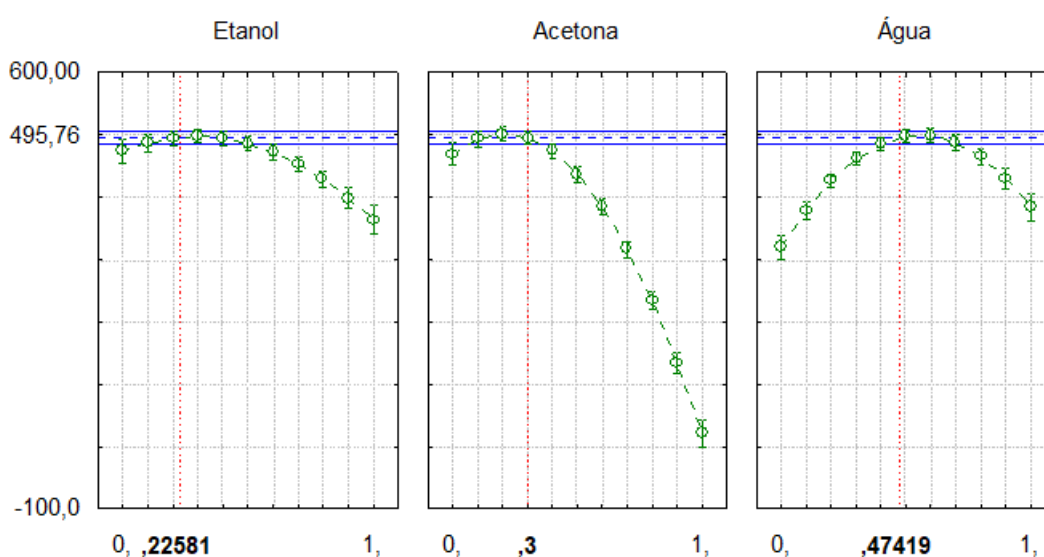
$$y = 364,1x_1 + 20,82x_2 + 383,8x_3 + 621,3x_1x_2 + 422,1x_1x_3 + 976,9x_2x_3 - 41,36x_1x_2x_3 \quad (7.2)$$

7.4.3 Análise do Ponto Ótimo

As Figuras 20 e 19 representam o perfil de desejabilidade da resposta para a atividade antioxidante (AAT) e teor de antocianinas (AMT) respectivamente, onde no topo encontra-se o ponto de maximização, especificado pela linha vermelha.

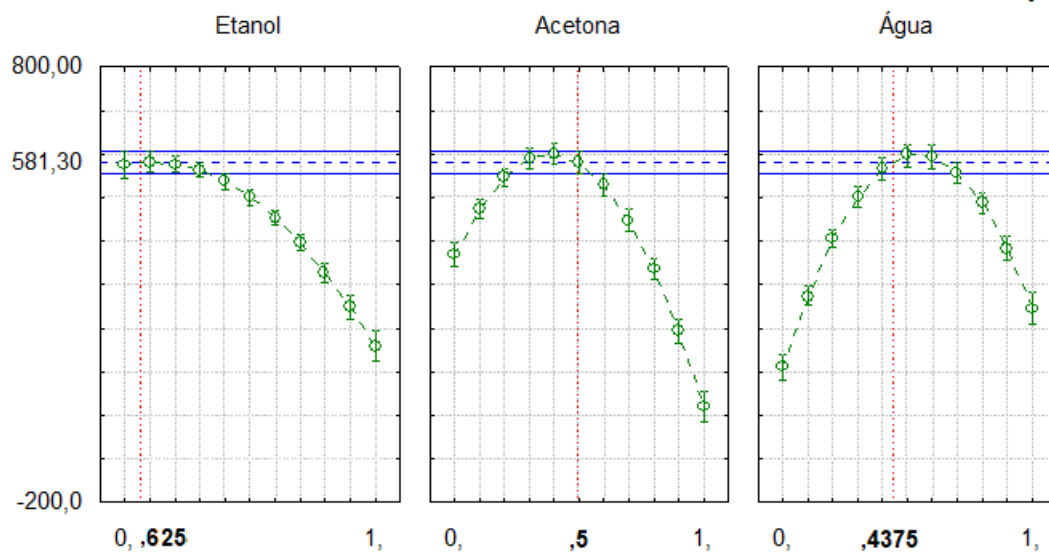
O valor ótimo previsto para AMT foi 495,76 mg/100g. A composição de maximização dos solventes foi etanol 22,58%, acetona 30,0% e água 47,42%. Já para a variável AAT obteve-se um valor ótimo de 581,3 mg/100g e composição dos solventes de etanol 6,25%, acetona 50,0% e água 43,75%. Apesar da otimização fornecer um ponto específico, é possível interpretar tanto nos gráficos das curvas de nível (Figuras 8 e 10), como no perfil de desejabilidade (Figuras 12 e 13), que existe uma região ótima onde se obtém a maximização da resposta com diferentes combinações de solvente. Extrapolando, para as antocianinas, poderia se trabalhar com composições de etanol de 20 a 40%, acetona de 10 a 30% e água entre 45 e 55%. Nesse sentido também para atividade antioxidante, poderia se utilizar composições de etanol entre 5 e 25%, para a acetona 30 a 50% e água de 43 a 60%.

Figura 12 – Perfil de Desejabilidade Previsto para o Teor de Antocianinas



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 13 – Perfil de Desejabilidade Previsto para atividade Antioxidante



Fonte: Autoria Própria (2019).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho realizou-se a otimização da extração de substâncias com atividade antioxidante e de antocianinas dos frutos do jambolão. Testou-se a capacidade de extração da água, etanol e acetona. Preparou-se extratos com o planejamento simplex centroide, determinou-se a atividade antioxidante, o teor de antocianinas totais, realizou-se a avaliação do perfil dos frutos e identificou-se a parte do fruto que apresentou a maior atividade antioxidante. No procedimento de otimização foi encontrado o ponto de maximização (ponto ótimo) para atividade antioxidante e antocianinas e a composição dos solventes nesse ponto.

Nos resultados obteve-se uma perda de massa em voláteis de 74,82% no processo de liofilização. A partir das partes do fruto liofilizada foi encontrado que a maior parte da atividade antioxidante é proveniente das sementes, está foi 11 vezes maior que na polpa e 2 vezes maior se comparada com fruto inteiro. Foram obtidos teores de antocianinas monoméricas totais (AMT) com valor máximo de 488mg 100 g⁻¹ e mínimo de 20,8 mg 100g⁻¹ de fruto liofilizado. Para a atividade antioxidante entre 579 mg equivalente de DPPH por g de fruto liofilizado e 21,9 mg g⁻¹.

O valor ótimo previsto para o teor de antocianinas foi 495,76 mg/100g. A composição de maximização dos solventes foi etanol 22,58%, acetona 30,0% e água 47,42%. Já para a atividade antioxidante obteve-se um valor ótimo de 581,3 mg/g e composição dos solventes de etanol 6,25%, acetona 50,0% e água 43,75%.

Pode-se afirmar que o jambolão tem um grande potencial na utilização como antioxidante, apresenta considerável teor de antocianinas. Bem como a obtenção de seus extratos pode ser melhor otimizada a partir da combinação dos solventes apropriados.

9 REFERÊNCIAS

AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; SILVA, B. D. Jambolão: A Cor Da Saúde. **Infobibos**, 2008. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Jambolao/index.htm>. Acesso em: 23 outubro 2018.

ANVISA. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. **Decretos Anvisa**, 1961. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040_61.htm>. Acesso em: 5 outubro 2018.

ARAÚJO, A. L. **Polpa de Jambolão(*Syzygium Cumini*) Desidratada por Liofilização e Secagem em Leito de Jorro: Caracterização Química e Funcional e Impacto da Secagem**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, 2014.

AUGUSTA, I. M.; RESENDE, J. M.; BORGES, S. V. ; MAIA, M. C. A. Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n4/v30n4a14.pdf>>. Acesso em: 18 Outubro 2018.

AYYANAR, M.; BABU, . *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **US National Library of Medicine**, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609276/>>. Acesso em: 6 Outubro 2018.

BARCIA, M. T. **Composição Centesimal E De Fitoquímicos Em Jambolão (*Syzygium Cumini*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas , 2009. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/123456789/1306/1/Dissertacao_Milene_Teixeira_Barcia.pdf>. Acesso em: 8 Outubro 2018.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Quarta Edição. ed. [S.I.]: Atheneu editora São Paulo LTDA, 1988.

BRUNI, G. P.; MACHADO, H. B.; MORAIS, M. M.; EHLERS, R. **Estudo Do Método De Ultrassom Para A Extração**. [S.I.]: [s.n.], 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0724-24287-181250.pdf>>. Acesso em: 7 novembro 2018.

CHAVES, V. C. **Teor de Antocianinas, Compostos Fenólicos e Capacidade de captação de Radicais Livres de Frutos de cultivares de Morangueiro (*Frangaria xananassa Duch*)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Florianópolis: [s.n.], 2014.

COHEN, K. D. O.; OLIVEIRA, M. S.; CHISTÉ, R. C.; PALLET, J. P. D. Quantificação do Teor de Antocianinas Totais da Polpa de Açaí de diferentes Populações de

Açaizeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 1^a. ed. Belém: Embrapa, 2006.

CORNELL, J. Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data. **Online library**, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118204221.fmatter>>. Acesso em: 15 Outubro 2018.

CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, v. 3, 1984.

FERNANDES, T. R. N.; ROCHA, M. P.; SILVA E. S. ; ARAÚJO, A. L. M. Teor De Compostos Fenólicos E Atividade Antioxidante Em Extratos Aquosos De Resíduo De Jambolão (*Syzygium Cumini*) Liofilizado. **Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, 2013. Disponível em: <<https://proceedings.science/slaca/slaca-2013/trabalhos/teor-de-compostos-fenolicos-e-atividade-antioxidante-em-extratos-aquosos-de-residuo-de-jambolao?lang=pt-br#>>. Acesso em: 15 maio 2019.

FOOD INGREDIENTS, B. Dossiê: Os Antioxidantes. **Revista FIB**, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acesso em: 4 outubro 2018.

FRUTIFERAS. **Jambolão ou Jamelão**, 2011. Disponível em: <<https://www.frutiferas.com.br/jambolao>>. Acesso em: 24 junho 2019.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000400037>. Acesso em: 15 maio 2019.

LAGO, E. S.; GOMES, E. Produção De Geléia De Jambolão (*Syzygium Cumini Lamarck*) Processamento, Parâmetros Físico – Químicos E Avaliação Sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n4/20.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2019.

LEÃO, L. L. *et al.* Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, 2017. Disponível em: <<https://seer.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/4249/3240>>. Acesso em: 6 Outubro 2018.

LI, L. *et al.* Eugenia jambolana Lam. Berry Extract Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Human Breast Cancer but not Non-Tumorigenic Breast Cells. **US National Library of Medicine**, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2680249/>>. Acesso em: 11 Outubro 2018.

LIMA, Y. D. O. U. *et al.* Tipos De Estacas E Substratos No Enraizamento De Jambolão. **Scientia Agraria**, 2007. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/9896/8070>>. Acesso em: 5 Outubro 2018.

LOGUERCIO, A. P. *et al.* Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, 2005. Disponível em: <www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000200019&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 5 Outubro 2018.

LOPES, T. *et al.* Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology (CAST)**, 2007. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/1375/1359>>. Acesso em: 10 Outubro 2018.

MENSOR, L. L. *et al.* **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method**. [S.l.]: Phytother, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2Fptr.687>>. Acesso em: 20 Outubro 2018.

MORTON, J. Fruits of warm climates: Jambolan. **Hortpordue**, 1987. Disponível em: <<https://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan.html>>. Acesso em: 23 Setembro 2018.

MUNHOZ, V. M. AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO. **Universidade Estadual de Maringá**, 2013. Disponível em: <<http://sites.uem.br/palafito/trabalhos/trabalhos/vanessa-marquito-munhoz>>. Acesso em: 5 Outubro 2018.

NAIR, K. N. **The Genus Syzygium: Syzygium cumini and Other Underutilized Species**. 1. ed. [S.l.]: CRC Press, 2017. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=HgagDgAAQBAJ>>. Acesso em: 15 Outubro 2018.

NARAYAN, M. S.; AKHILENDER, N. K.; RAVISHANKAR, G. A. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. 1. ed. [S.l.]: Prostaglandins, 1999. p. 1-4.

NASCIMENTO, J. C. *et al.* **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L.** Belo Horizonte: Revista Brasileira de Farmacia, 2011. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-4-14-327-332.pdf>>. Acesso em: 20 Outubro 2018.

NOVELLO, C. R. **Estudo Fitoquímico E Avaliação Da Atividade citotóxica, Antioxidante E Adaptógena Do Lenho De Croton Echioides Baill. - Euphorbiaceae**. Tese (Doutor em Ciências), Universidade Estadual de Maringá - UEM, 2011. Disponível em: <<http://sites.uem.br/palafito/trabalhos/trabalhos/claudio-roberto-novello>>. Acesso em: 24 de junho 2019.

OLIVEIRA, R. D. S. *et al.* **Aplicação de processo ultrassom na extração de catequinas dos resíduos de chá verde**. Campo Mourão: Brazilian Journal of Food Research, 2016. Disponível em:

<<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/viewFile/3724/pdf>>. Acesso em: 20 Outubro 2018.

PORTAL ACTION. Análise De Variância (Teste F) - Medidas De Associação. **Portal Action**, 2015. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/analise-de-regressao/24-analise-de-variancia-teste-f-medidas-de-associacao>>. Acesso em: 01 Junho 2019.

PRADO, J. M.; ROSTAGNO, M. A. Natural Product Extraction: Principles and Applications. 1. ed. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, 2013. p. 516.

RELIA. Mixture Design. **reliawiki**, 2017. Disponível em: <http://reliawiki.org/index.php/Mixture_Design>. Acesso em: 5 outubro 2018.

RIBAS, A. Estatística F e a idéia da anova. **Recologia**, 2013. Disponível em: <<http://recologia.com.br/2013/01/estatistica-f-a-ideia-da-anova/>>. Acesso em: 01 Junho 2019.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Eadical Livre DPPH. **Embrapa**, julho 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf>. Acesso em: 01 Maio 2019.

SILVA & SÁ, A. P. C. Potencial Antioxidante e Aspectos Químicos e Físicos das frações comestíveis (polpa e Casca) e sementes do Jamelão (*Syzygium Cumini*, L Skells). , 2008. Disponível em: <<https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/tede/398/1/2008%20-%20Ana%20Patricia%20Correia%20da%20Silva%20e>>. Acesso em: 10 Maio 2019.

SAGRAWAT, H.; MANN, S.; KHARYA, M. D. Pharmacological potential of *Eugenia jambolana*: A review. **Pharmacognosy Magazine**, 2006. Disponível em: <<http://www.phcog.com/article.asp?issn=0973-1296;year=2006;volume=2;issue=6;spage=96;epage=105;aulast=Sagrawat;type=0>>. Acesso em: 15 outubro 2018.

SARI, P. *et al.* Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.025>>. Acesso em: 08 Outubro 2018.

SCHEFFÉ, H. Experiments With Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, 1958. 344-360.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. D. **Comparação de métodos para quantificação de antocianinas**. Viçosa: Ceres, 2008. Disponível em:

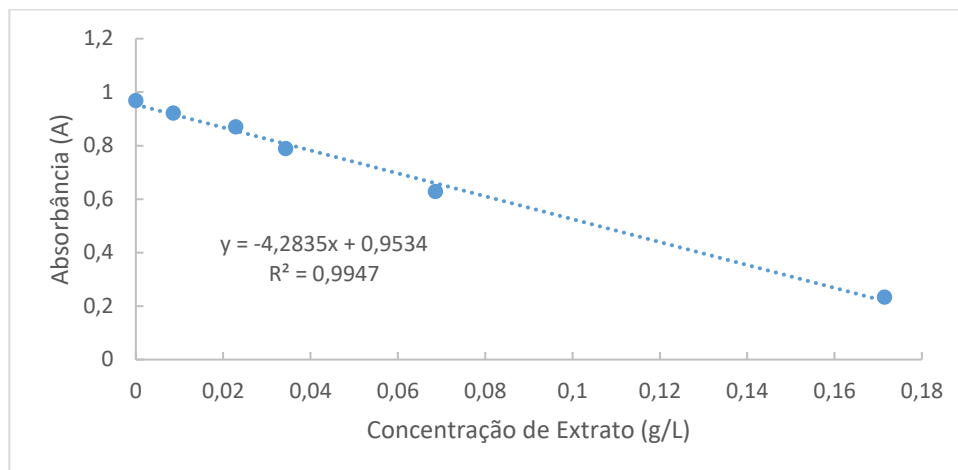
<<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/viewFile/3320/1217>>. Acesso em: 20 Outubro 2018.

VEGGI, P. **Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando**. Campinas: [s.n.], 2013. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/254865/1/Veggi_PriscillaCarvalho_D.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2018.

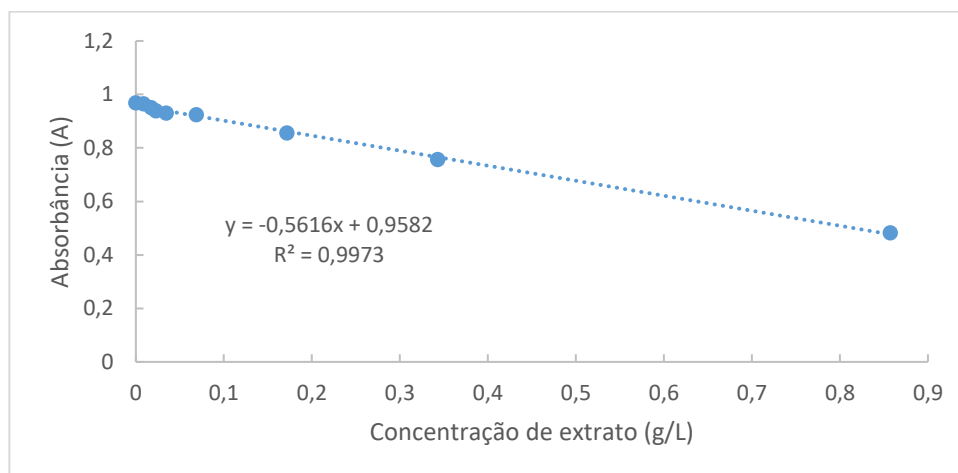
VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Caracterização das Propriedades Funcionais do Jambolão. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**, 2008. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/15431415.pdf>>. Acesso em: 10 abril 2019.

ZANELLA, R. *et al.* Uso de antioxidantes para melhorar a eficiência reprodutiva de rebanho bovino submetido a protocolo de sincronização com progesterona (p4). **Ciência Animal Brasileira**, 2010. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/3848/7904>>. Acesso em: 5 Outubro 2018.

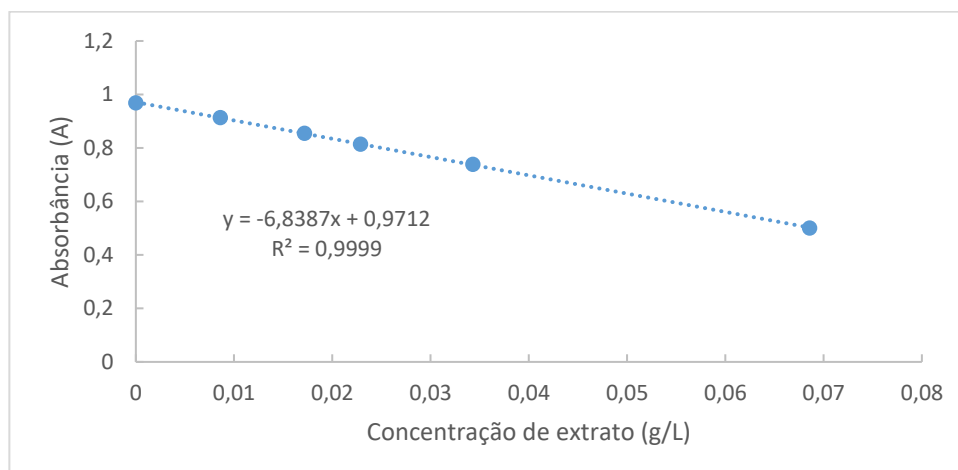
ZANOELLO, A. M. *et al.* Efeito protetor do syzygium cumini contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 2002. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/1/LAJOP_21_1_1_6_XMNEVGSPQ4.pdf>. Acesso em: 15 Outubro 2018.

ANEXO A – Curvas de Calibração para Obtenção de EC₅₀Figura 14 – Curva EC₅₀ para Extrato 1

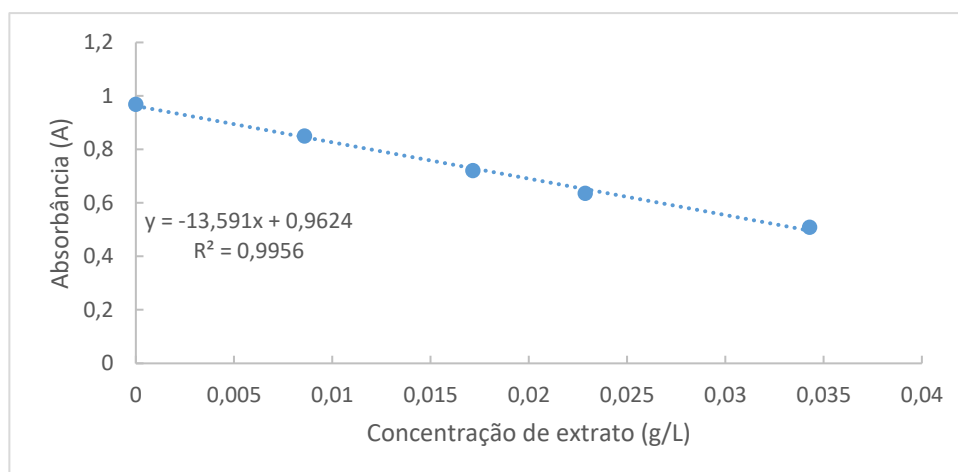
Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 15 – Curva EC₅₀ para Extrato 2

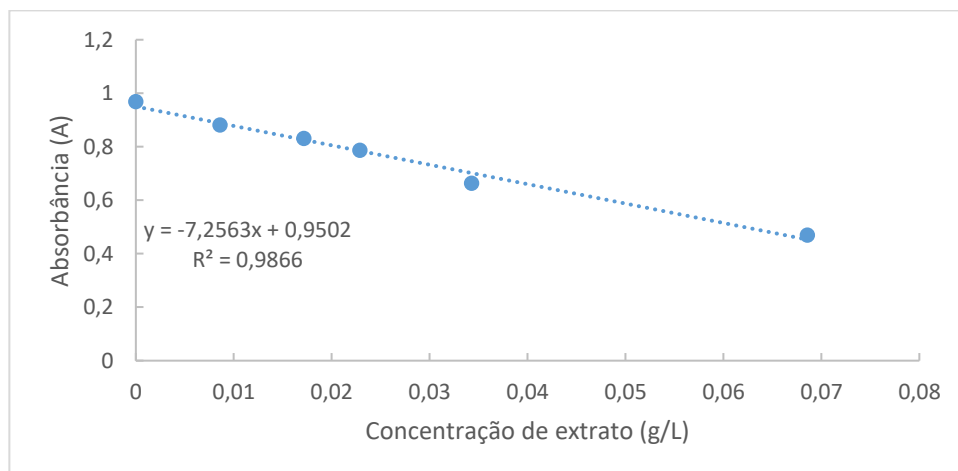
Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 16 – Curva EC₅₀ para Extrato 3

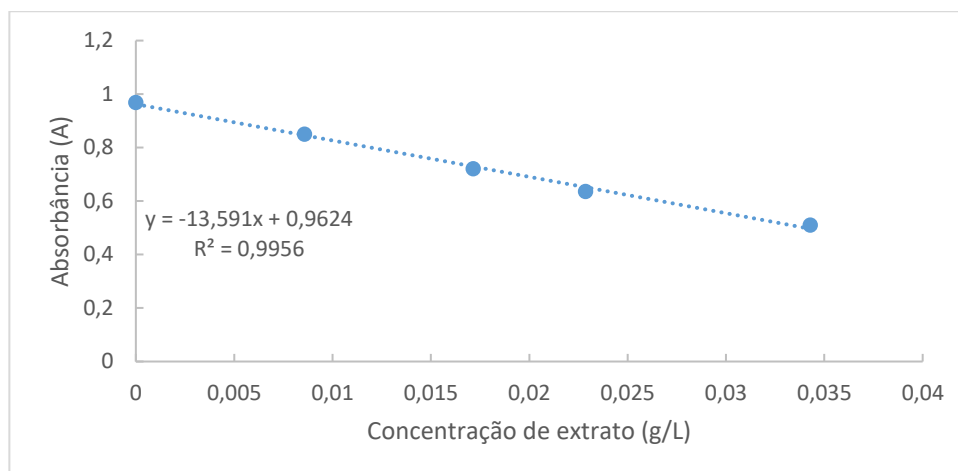
Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 17 – Curva EC₅₀ para Extrato 4

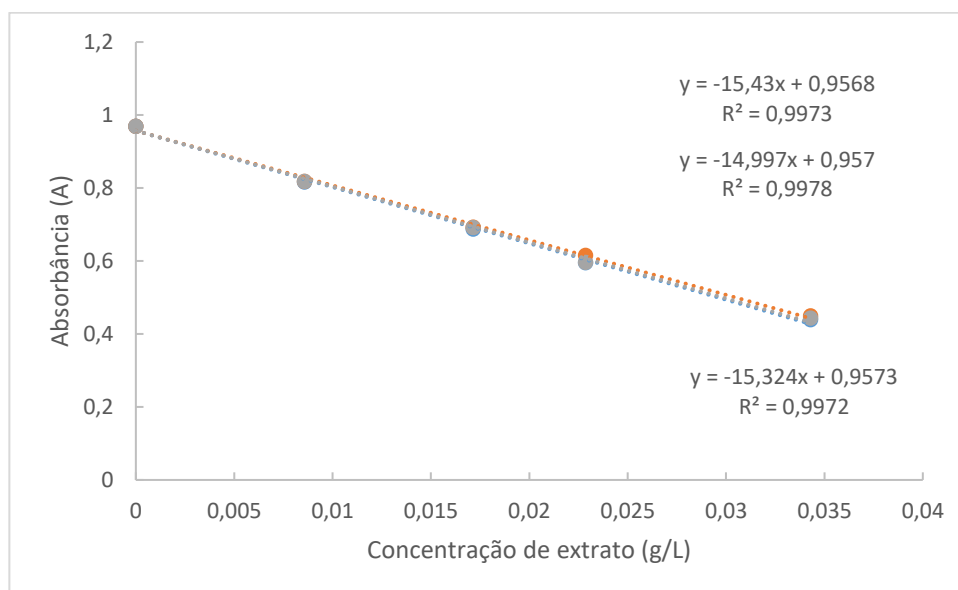
Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 18 – Curva EC₅₀ para Extrato 5

Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 19 – Curva EC₅₀ para Extrato 6

Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 20 – Curva EC₅₀ para Extrato 7, 8 e 9

Fonte: Autoria Própria (2019).