

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS
QUÍMICOS

MAYENE FÁTIMA TOLFO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO VARIADOS SOLVENTES**

TOLEDO, PR

MAYENE FÁTIMA TOLFO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO VARIADOS SOLVENTES**

Trabalho
de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso Superior de
Tecnologia em Processos Químicos
(COPEQ) da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo,
como requisito parcial para obtenção do
título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Ricardo Fiori Zara

TOLEDO, PR
2019

MAYENE FÁTIMA TOLFO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO VARIADOS SOLVENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em ____, de _____ de 20__.

Banca examinadora

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Orientador

Prof^a Dr^a Jacqueline Ferandin Honório
UTFPR, câmpus Toledo
Banca

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
UTFPR, câmpus Toledo
Banca

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar, e me dar a oportunidade de viver.

Gostaria de agradecer a minha família que sempre me incentivou e me apoiou, que esteve ao meu lado, nos momentos bons e ruins, me dando forças pra superar todos os obstáculos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Ricardo Fiori Zara por ter aceitado me orientar, pelos conselhos e conhecimentos repassados.

Agradeço meu namorado por estar ao meu lado, por me incentivar, por me ouvir nos momentos de dificuldade, por toda compreensão e carinho.

Agradeço pôr fim aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, me aconselhando e incentivando.

Resumo

As plantas e frutas presentes na natureza são importantes fontes de vitaminas, minerais e compostos bioativos. Com o aumento no número de doenças causadas por radicais livres a busca por alimentos e plantas que contenham antioxidantes vem se tornando crescente. O Camu Camu é um fruto nativo da floresta amazônica pertencente à família *Myrtaceae* com grande potencial antioxidante, possuindo vitaminas, compostos fenólicos, antocianinas e outros antioxidantes. A avaliação da capacidade antioxidante do fruto, determinação de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas foi avaliada por meio de um planejamento experimental de misturas com três diferentes solventes, totalizando ao final 7 extratos diferentes avaliados, com ponto central realizado em triplicata, ao final das análises os dados foram avaliados através do software Statistica versão 10.0. A avaliação do potencial antioxidante foi realizada pelo método de DPPH e FRAP que se baseiam na redução oxidativa e pelo sequestro de radicais livres. O teor de compostos fenólicos foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu por espectroscopia de UV-vis, além disso também foi avaliado o teor de flavonoides e antocianinas por espectroscopia de UV-vis. O etanol foi o melhor solvente extrator para antocianinas e o 2º melhor para flavonóides, enquanto para compostos fenólicos a melhor extração ocorre com a mistura dos três solventes. Para FRAP e DPPH a água é solvente que mais se destaca, observando que sempre que a mesma está presente, seja sozinha ou em mistura ocorrem maiores interações, além da água, a mistura dos três solventes também obteve valores significativos e elevados. Ao final do trabalho foi possível comprovar os elevados índices de antioxidantes em Camu Camu e também pode-se otimizar a extração para grande parte das respostas, principalmente em relação à literatura, entretanto a otimização conforme planejamento não foi possível para antocianinas e FRAP, isso se deve ao fato de que cada resposta obteve uma equação da desejabilidade diferente, logo não seria possível otimizar todas as respostas.

Palavras-chave: Antioxidantes. DPPH. FRAP. Radicais livres. Superfície de resposta. Planejamento experimental.

Abstract

Plants and fruits present in nature are important sources of vitamins, minerals and bioactive compounds. With the increase in the number of free radical diseases, the search for antioxidants contained in foods and plants is growing. Camu Camu is a native fruit of the Amazon rainforest belonging to the Myrtaceae family with great antioxidant potential, having vitamins, phenolic compounds, anthocyanins and other antioxidants. The evaluation of the antioxidant capacity of the fruit, determination of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins was evaluated through an experimental design 2^3 aiming to optimize the extraction process, reducing errors, number of trials and ensuring quality. The antioxidant potential was evaluated by the DPPH and FRAP method based on oxidative reduction and free radical sequestration. In the other hand, the content of phenolic compounds will be evaluated by the Folin-Ciocalteu method by UV-vis spectroscopy, and also the content of flavonoids and anthocyanins by UV-vis spectrometry. All analyzes were performed from an experimental design of mixtures with three solvents, totaling at the end seven different extracts to be evaluated, with the central point performed in triplicate, at the end of the analysis the data were evaluated using the Statistica software and was performed. response surface modeling, obtaining contour diagrams and extract optimization. Ethanol was the best extraction solvent for anthocyanins and the second best for flavonoids, while for phenolic compounds the best extraction occurs with the mixture of the three solvents. For FRAP and DPPH water is the most outstanding solvent, noting that whenever it is present alone or in mixture there are more interactions, besides water, the mixture of the three solvents also obtained significant and high values. At the end of the work it was possible to prove the high levels of antioxidants in Camu-Camu and it is also possible to optimize most of the responses, especially in relation to the literature. Because each answer obtained a different desirability equation, it would'nt be possible to optimize all of them.

Keywords: Antioxidants. DPPH. FRAP Free radicals. Response surface. Experimental planning.

Lista de ilustrações

Figura 1:Fruto Camu-Camu.	15
Figura 2:Reação do radical DPPH com um doador de hidrogênio.	18
Figura 3:Reação do complexo TPTZ de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} .	18
Figura 4: Estrutura base das antocianinas que compõem o grupo dos flavonoides.	20
Figura 5:Gráfico de curvas de nível para flavonoides.	34
Figura 6: Diagrama de Pareto para flavonoides.	35
Figura 7:Gráfico de curvas de nível para compostos fenólicos.	37
Figura 8:Diagrama de Pareto para compostos fenólicos.	38
Figura 9: Gráfico de curvas de nível para antocianinas.	41
Figura 10: Diagrama de Pareto para antocianinas.	41
Figura 11: Gráfico de valores estimados.	42
Figura 12: Gráfico de curvas de nível para DPPH.	44
Figura 13: Diagrama de Pareto para DPPH.	45
Figura 14: Gráfico de curvas de nível para FRAP.	47
Figura 15: Diagrama de Pareto para FRAP.	48

Lista de tabelas

Tabela 1 – Planejamento experimental de misturas para extração de compostos bioativos em Camu Camu.....	25
Tabela 2 – Diluição para as amostras de FRAP.....	27
Tabela 3 – Resultados para determinação de atividade antioxidante dos 9 extratos obtidos no planejamento variando de 0 a 100% a fração de solventes.....	31
Tabela 4 – Resultado para Flavonoides.....	33
Tabela 5 – Resultado para Compostos fenólicos.....	36
Tabela 6 – Resultado para Antocianinas.....	39
Tabela 7 – Resultados para DPPH.....	43
Tabela 8 – Resultados para FRAP.....	46

Lista de abreviaturas e siglas

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
FRAP	Poder redutor do Ferro
TPTZ	2,4,6 Tripiridil-s-Triazina
UV-vis	Ultravioleta- Visível
L	Litro
M	Mol
μM	Micromol
mM	Milimol
EAG	Equivalente em ácido gálico
EQ	Equivalente em quercetina
ET	Equivalente em Trolox
RMS	Modelagem de superfície de resposta
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ANOVA	Análise de variância.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 O FRUTO CAMU CAMU	14
4.2 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES	16
4.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	17
4.3.1 <i>METODOLOGIA DPPH</i>	17
4.3.2 <i>MÉTODO FRAP</i>	18
4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	19
4.5 FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS	19
4.6 LIOFILIZAÇÃO	21
4.7 EXTRAÇÃO E SOLVENTES	21
4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 MATÉRIA PRIMA	24
5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	24
5.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
5.3.1 <i>MÉTODO DPPH</i>	25
5.3.2 <i>MÉTODO FRAP</i>	26
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	27
5.5 FLAVONOIDES	28
5.6 ANTOCIANINAS	28
5.7 OTIMIZAÇÃO E ESCOLHA DO MODELO	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	30
6.2 FLAVONOIDES	32
6.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	36

6.4 ANTOCIANINAS.....	39
6.5 DPPH.....	43
6.6 FRAP.....	46
7. CONCLUSÃO.....	49
REFERENCIAS.....	50
APÊNDICE.....	56

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande diversidade de frutas, por ser um país de grande extensão geográfica, muitas delas são pouco exploradas, porém podem ter um grande potencial nutricional e econômico. Além disso as frutas fazem parte da vida das pessoas, sendo grande fonte de nutrientes, fibras, vitaminas e antioxidantes.

Os antioxidantes presentes nessas frutas são muito importantes pois ajudam a controlar e diminuir o dano oxidativo em células que ocorre pela presença de radicais livres, agindo assim de forma a melhorar a saúde da vida das pessoas. Devido a seu caráter terapêutico se torna cada vez mais imprescindível realizar pesquisas envolvendo antioxidantes (FEITOSA, 2017).

As frutas podem possuir diversos antioxidantes, porém algumas tem seu potencial e atividade pouco estudado, é o caso do Camu-Camu. O Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*) é um fruto produzido por um arbusto de pequeno porte, sendo de origem amazônica, abrangendo países como Brasil, Peru, Venezuela e Colômbia. Conhecido pela população da região e sendo mais utilizados no Peru, o fruto possui grandes quantidades de vitamina C e antocianinas, demonstrando grande potencial e atividade antioxidante, como flavonoides e compostos fenólicos, dentre outros (PETERS, C. M., VASQUEZ, A., 1987).

Dentre os antioxidantes existem diversas classes, sendo algumas divididas em diversas outras subclasses. Os compostos fenólicos por exemplo abrangem classes como, flavonoides, antocianinas, flavonas dentre outras. Além disso, vitaminas como o ácido ascórbico também fazem parte da classe dos antioxidantes (FEITOSA, 2017).

Os processos de extração influenciam muito na determinação de antioxidantes, pois diferentes solventes, em diferentes condições podem ter maior ou menor eficácia, garantindo melhores ou piores resultados (FEITOSA, 2017).

Desta forma estudar a atividade antioxidante e os efeitos dos processos de extração, avaliando solventes e como eles influenciam na determinação destes compostos bioativos, é muito importante.

O estudo então pode vir a dar suporte fornecendo informações sobre a concentração de substâncias e compostos que apresentam potencial para a produção de produtos nutracêuticos e alimentícios, tendo em vista que a medicina tem buscado melhorias para novos fármacos, principalmente derivado de espécies vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos solventes e suas misturas no processo de extração sobre atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas em Camu-Camu.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos do fruto Camu-Camu com base em planejamento estatístico, com três diferentes solventes, sendo eles água destilada, etanol absoluto, acetato de etila e suas misturas.
- Determinar atividade antioxidante dos extratos por meio dos métodos de DPPH e FRAP.
- Determinar compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas.
- Avaliar os fatores de desejabilidade obtendo a equação de otimização, e testar a extração nestas condições.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O FRUTO CAMU CAMU

O fruto Camu-Camu pertencente à família Myrtaceae cresce em um arbusto de pequeno porte conhecido como Camu camuzeiro, próximo a rios e regiões alagadas, sobrevivendo a diversas condições. O Camu camuzeiro consegue se desenvolver e produzir em diversos tipos de solo, desde solos férteis, úmidos até solos arenosos (YUYAMA, 2011). Conhecido também como caçari, araçá-d'água entre outros, se encontra disperso na região amazônica, se distribuindo entre países como Peru, Venezuela, Colômbia e Brasil (PETERS, C.M., VASQUEZ, A. 1987). No Brasil o fruto está distribuído entre os estados do Pará, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (MAUES, COUTURIER, 2002).

O Camu camuzeiro pode crescer de 1 a 4 metros de altura, o arbusto se adapta conforme seu habitat. Possui caule estreito e muitas ramificações, em solos mais férteis possui raízes mais curtas e próximas ao caule já em solos mais arenosos suas raízes podem crescer até três vezes mais (YUYAMA, 2011). No Brasil estudos feitos em Camu camuzeiros nativos na Amazônia e Pará, mostraram que os arbustos tinham em torno de 1,5 metros de altura, possuindo floração durante quase todo o ano com variações nas quantidades, as flores são brancas e hermafroditas com tamanho em torno de 1,4 cm (MAUES, COUTURIER, 2002).

Após o período de floração vem o período de frutificação que pode variar de novembro a março ou dezembro a abril no Brasil, cerca de 5 meses, com variações conforme o terreno (YUYAMA, 2002). Maues e Couturier, 2002, em seus resultados observaram que o período de frutificação no Brasil nos anos de 1997 e 1998 foram mais intensos nos meses de maio a julho, com amadurecimento até agosto.

O fruto é esférico e globular, pode ter de 1 a 3 cm de diâmetro, com casca lisa e esverdeada quando verde e coloração vermelha-arroxeadada em seu estágio final de maturação, além disso possui de 1 a 4 sementes (YUYAMA, 2011). O fruto é apresentado na figura 1.

Figura 1:Fruto Camu-Camu.



Fonte: Silva, 2017.

O fruto que tem característica ácida, pode ser consumido ao natural, ou em sucos, sorvetes, chás, dentre outros alimentos, uma característica importante é que mesmo após o processamento o pó ainda possui teores de ácido ascórbico e antocianinas (YUYAMA, 2011).

Conhecido por seus compostos bioativos, possui uma grande diversidade, minerais e antioxidantes, alguns autores como Villanueva-Tiburcio et al, (2010), encontraram resultados de antocianinas na casca do fruto de $46,12 \text{ mg g}^{-1}$ para frutos maduros e $3,83 \text{ mg g}^{-1}$ para frutos começando a madurar e criar cor, para teores de ácido ascórbico, $0,22 \pm 0,01 \text{ mg Ac. Ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$ para frutos maduros, $0,20 \pm 0,01 \text{ mg Ac. Ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$ para frutos começando a madurar e $0,14 \pm 0,01 \text{ mg Ac. Ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$ para frutos verdes. O conteúdo de polifenóis totais encontra $6,02 \text{ mg ácido gálico g}^{-1}$ para frutos maduros e $5,95 \text{ mg ácido gálico g}^{-1}$ para frutos verdes.

Solis et al, 2009 encontraram valores de ácido ascórbico de $0,14 \pm 0,02 \text{ mg de ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$ para polpa da fruta e $0,1051 \text{ mg} \pm 0,0504 \text{ mg de ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$ para casca da fruta, para antocianinas encontraram $74,04 \pm 4,7 \text{ mg de antocianinas } 100 \text{ g}^{-1}$ para polpa da fruta e $109,50 \pm 33,8 \text{ mg de antocianinas } 100 \text{ g}^{-1}$ para casca da fruta, e para polifenóis totais $23168,00 \pm 932,7 \text{ mg de polifenóis } 100 \text{ g}^{-1}$ para polpa da fruta e $17905,50 \pm 1302,5 \text{ mg de polifenóis } 100 \text{ g}^{-1}$ para casca da fruta.

Chirinos, et. al 2010, ao realizar as análises em diferentes estágios de maturação observou que conteúdo de ácido ascórbico diminuiu conforme o fruto amadureceu, e as antocianinas, compostos fenólicos bem como DPPH aumentavam nos estágios mais

avançados de maturação, assim foi comprovado pelos autores seu alto teor fitoquímico, mostrando também a presença de outros antioxidantes como flavonoides e carotenoides.

4.2 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

As substâncias químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados são chamadas de radicais livres, essas substâncias possuem grande facilidade de doação desses elétrons, sendo elas espécies muito reativas (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1988).

Os radicais livres podem ser classificados como espécies derivadas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). A maioria das moléculas de radicais livres são produzidas pelo próprio metabolismo e sistema fisiológico ou biológico (FEITOSA, 2017; HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1988).

Segundo Bianchi e Antunes, 1999, a formação de radicais livres em seres vivos ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular. Ocorre principalmente quando há deficiência de antioxidantes. Um desequilíbrio entre radicais e antioxidantes, pode causar um grande dano oxidativo, também chamado de estresse oxidativo. Esses danos causados são associados a diversas doenças degenerativas, e quando ocorre no DNA a mutagênese e carcinogênese (BIANCHI et al., 1999).

Os antioxidantes por sua vez são moléculas que inibem e ou reparam o dano oxidativo provocado por espécies reativas. Atuam no organismo, e podem ter mais de um mecanismo. Podem inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres do ferro e cobre, ou reparando lesões causadas pelos radicais (BIANCHI, ANTUNES, 1999; FEITOSA, 2017).

Além de serem encontrados e produzidos pelo próprio organismos eles podem ser encontrados naturalmente ou ainda podem ser sintetizados. São basicamente um conjunto de substâncias, vitaminas, minerais, pigmentos naturais, enzimas além outros compostos vegetais (FEITOSA, 2017).

Os antioxidantes desempenham então um papel de proteção ao organismo, barrando o ataque promovido pelos radicais livres a tecidos, células, aminoácidos, lipídeos e proteínas ou reparando os danos já causados (BIANCHI et al., 1999; DUARTE-ALMEIDA, et. al., 2006).

4.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existem diversos métodos para a determinação e avaliação de atividade antioxidante envolvendo diversos ensaios e técnicas. Eles são importantes devido a sua utilização comercial de farmacológica.

Devido ao fato de existir uma grande diversidade de radicais livres e antioxidantes a busca por métodos práticos e rápidos vem se tornando constante, já que justamente por toda essa diversidade é impossível encontrar métodos universais (ALVES et al., 2010).

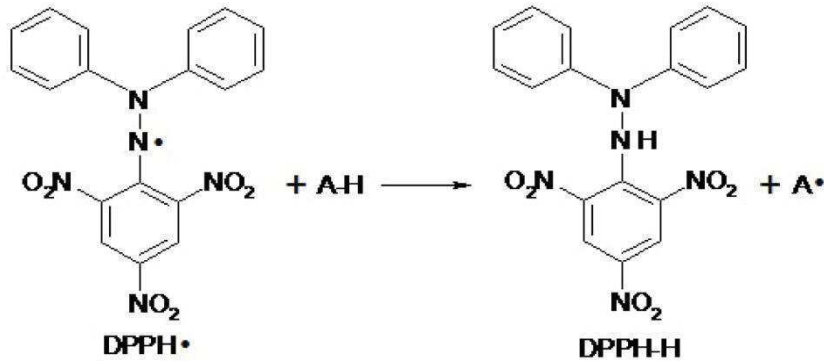
Alguns métodos são mais conhecidos como DPPH e FRAP que possuem potencial antioxidante redutor, o ensaio do DPPH é baseado no sequestro do próprio radical reduzindo-o a hidrazina, é um método preciso, rápido, muito utilizado para determinações em sucos, frutos, extratos e compostos fenólicos. O ensaio FRAP é relativamente simples e baseado da redução do Fe (III) (FEITOSA, 2017; BOXIN, et. al., 2002).

4.3.1 METODOLOGIA DPPH

O método de DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila é um dos métodos *in vitro* mais antigos utilizados para determinação de atividade antioxidante, muito utilizado para determinação de extratos de plantas, frações, compostos fenólicos, flavonoides, cúrcumas e diversas amostras, por ser um método prático, rápido e com boa estabilidade (BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2012). O DPPH é um radical orgânico e estável, apresenta a coloração violeta e possui faixa de absorção máxima na faixa de 515-520 nm (SUCUPIRA et al., 2012). A avaliação a atividade antioxidante em DPPH pode ser avaliada em espectrofotômetro em um determinado comprimento de onda (FEITOSA, 2017).

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes (BRAND, 1995). Quando um elétron desemparelhado do radical DPPH recebe um átomo de hidrogênio de um composto antioxidante, a solução púrpura perde a coloração se tornando amarela (BORGES et al., 2011). A Figura 2 mostra a reação do radical DPPH com um doador de hidrogênio.

Figura 2: Reação do radical DPPH com um doador de hidrogênio.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

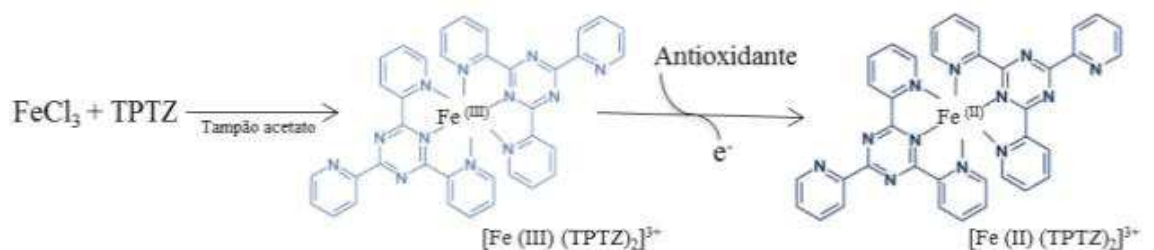
4.3.2 MÉTODO FRAP

O método FRAP é um ensaio *in vitro* muito utilizado, baseado na redução de Fe (III), ele possibilita avaliar a atividade antioxidante de diversos compostos (BOXIN, et. al., 2002).

Aplicado para determinação de atividade antioxidante em vegetais e fluidos líquidos o ensaio também é muito utilizado para determinação em plasma sanguíneo (BENZIE, STRAINT, 1996). Com um custo de reagentes baixo, o método é simples e rápido e com grande reprodutibilidade se torna muito útil para determinação de potencial antioxidante (BENZIE, STRAINT, 1996).

O ensaio ocorre com uma reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} , a mesma envolve o complexo TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazina) e o composto de interesse contendo o antioxidante, quando o ferro reduz produz uma coloração azul escura que absorve no espectro de UV-vis em 595 nm (BENZIE, STRAINT, 1996). Abaixo é possível ver a reação que acontece conforme figura 3:

Figura 3: Reação do complexo TPTZ de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} .



Fonte: URREA-VICTORIA, et. al, 2016.

4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos fazem parte das substâncias antioxidantes, encontrados em plantas, muitas vezes sua quantificação em extratos significa um resultado satisfatório para capacidade antioxidante (FEITOSA, 2017). Muito distribuídos no reino vegetal são substâncias que apresentam anéis aromáticos com um ou mais substituintes (SOARES, 2008; MALACRIDA, 2005).

Em estudos *in vitro* tem se mostrado muito eficazes para inibição da peroxidação lipídica e lipooxigenase, o que traz muita atenção para estes compostos. São divididos em diversas classes, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarias, flavonoides, taninos, lignanas e muitas mais (SOUSA et al., 2007).

Com fortes propriedades redutoras, os compostos fenólicos são muito importantes pois conseguem neutralizar ou sequestrar radicais livres, além disso fazem o processo que quelação de metais em transição, agem em todo o processo de oxidação (SOUSA et al., 2007).

4.5 FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS

Constituindo uma das classes de compostos fenólicos mais importantes, os flavonóides de origem vegetal são encontrados em plantas, flores, alimentos, frutas, e demais espécies vegetais (COUTINHO, et. al. 2009).

Metabólitos secundários, fazem parte de uma ampla classe de compostos poli fenólicos. Possuem estrutura química descrita como C6-C3-C6, que se baseia no núcleo flavono, que consiste em dois anéis aromáticos fenil ligados a um anel pirano. As variações e diversidade nas estruturas dos anéis se dão aos níveis de oxidação e alterações na estrutura de base carbônica dos flavonoides (DEGASPARI, 2004; FEITOSA, 2007).

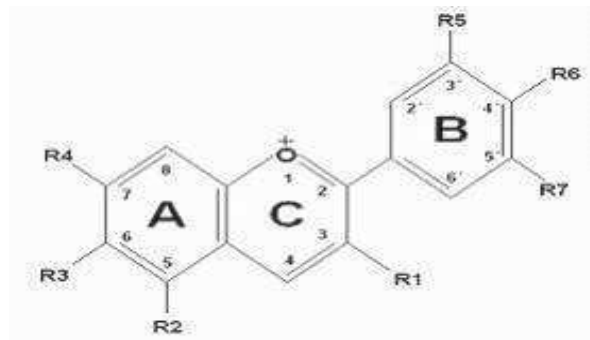
Podem ser divididos em diversas subclasses como flavanonas, flavonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas, antocianinas entre outras (COUTINHO, 2009).

Para a saúde humana sua importância se deve as características de antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer além de outras. Possui capacidade de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, além disso vem sendo associados a diminuição dos

efeitos do envelhecimento, doenças trombóticas (COUTINHO, et. al. 2009; DEGASPARI, 2004).

As antocianinas fazem parte da classe dos flavonoides, são pigmentos vegetais, que constituem cor a diversas plantas, frutas e flores. Amplamente distribuído, com colorações que variam do vermelho ao azul e as vezes em misturas de ambas em tons de roxo, são influenciadas por fatores como pH. São compostos hidrossolúveis e tem sensibilidade a temperatura. Sua estrutura base é policíclica assim como outros flavonoides (LOPES, et al., 2007; TEIXEIRA, STRINGUETA, OLIVEIRA, 2008). Segue Figura 4 com a estrutura base de antocianina.

Figura 4: Estrutura base das antocianinas que compõem o grupo dos flavonoides.



Fonte: LOPES, et al., 2005.

Sua importância se deve ao seu potencial antioxidante, estando presente em uma grande variedade de espécies, prevenindo a auto oxidação e peroxidação de lipídeos em sistema biológicos (LOPES, et al, 2007).

Além disso estudos mostram que extratos que possuem antocianinas, melhoram a visão, e possuem alta atividade antioxidante, e quimioterápicas (AGUILERA-OTÍZ, et al., 2011).

Para manter as características funcionais dos frutos utilizam-se métodos de secagem como a liofilização que conseguem manter na maioria dos frutos essas propriedades, sem terem grandes impactos.

4.6 LIOFILIZAÇÃO

As frutas e vegetais são ricas fontes de nutrientes, antioxidantes, proteínas e minerais. Apresentam como boa parte da sua composição a água, o que prejudica um pouco sua armazenagem e diminui seu tempo de vida útil. Os processos de secagem ajudam e facilitam o trabalho, armazenagem e estocagem das frutas. Porém poucos processos conseguem manter suas características. A liofilização é um processo que preserva os nutrientes, vitaminas, antioxidantes que estão presentes nos alimentos na maioria das frutas (PUHL, NITZKE, 2010).

A liofilização é um processo de secagem, onde ocorre a desidratação da fruta, o processo é feito sob aumento de pressão e temperatura controlada. A primeira etapa é o congelamento, após ocorre um aumento de pressão e ocorre a sublimação da água, passando do estado sólido direto pro gasoso. Em seguida ocorre a segunda desidratação por dessorção mantendo o alimento no liofilizador por mais um período, garantindo assim a retirada de toda a água (MARQUES, 2008; VALIM, 2009; PUHL, NITZKE, 2010).

A grande vantagem da liofilização é que o processo danifica menos se comparado a outros métodos o tecido vegetal. Além disso melhora as condições de armazenamento e garante qualidade, porém como desvantagem tem-se o alto custo o que dificulta o acesso e utilização (PUHL, NITZKE 2010).

4.7 EXTRAÇÃO E SOLVENTES

A extração de princípios ativos é um processo importante, feita a partir de um solvente e um metabolito primário e ou secundário, ela deve ser realizada de uma forma que possibilite a extração do maior número de substâncias, sendo assim os solventes utilizados devem ser apropriados para finalidade que se deseja.

Os extração dos compostos bioativos deve ser realizada com atenção, onde deve se observar, temperatura, tempo e a polaridade dos solventes, para que não ocorra nenhum dano a esses compostos (ANDREO, JORGE, 2006). Jardini, Mancini (2007) ao avaliarem atividade antioxidante observou que havia diferenças nos resultados, onde os valores aumentavam conforme a polaridade do solvente.

Sabe-se que nos processos de extração a escolha do solvente deve levar em conta quais os compostos de interesse, onde diversos estudos mostram que etanol e solventes mais polares são eficazes para extração de compostos fenólicos (SOUSA, 2007).

Zhao, (2009) observou que os resultados de fenólicos totais aumentavam com o aumento da proporção de etanol na mistura, bem como a ocorrência da influência que temperatura e tempo nos resultados.

Frações mais apolares de solvente conseguem extrair compostos mais apolares como ácidos graxos e terpenóides, enquanto frações mais polares conseguem a extração de flavonoides, polifenóis, tanino etc., logo para determinação de compostos mais polares deve se dar preferência a solventes mais polares (MONÇÃO, et. al., 2015).

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental é um método estatístico que otimiza processos, minimiza erros, diminuindo o número de ensaios e experimentos. Muito aplicado para otimizar processos de composição e mistura, vem cada vez mais sendo aplicado em diversas áreas e na indústria, onde é possível minimizar erros, aumentar produtividade de processos e gerar produtos e resultados de melhor qualidade. Em planejamento de misturas o método se baseia mais nas proporções das misturas, de modo a verificar variáveis presentes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; NUNES, 1998). Existem diversas técnicas de planejamento experimental, sendo o simplex centroide é uma delas.

O método é relativamente simples são selecionados para o experimento além dos vértices os centroides do simplex dimensional q^{-1} e todos os demais simplex contidos. O número de pontos estudados depende somente dos componentes avaliados, ficando 2^{q-1} , ou seja, o número de pontos depende dos termos e vice-versa (NUNES, 1998).

O modelo de superfície de resposta utilizado para modelagem e análises de interferências, é um modelo que otimiza as respostas obtidas dentro do espaço fatorial onde se desejam as especificações (NUNES, 1998). Composta por dois fatores a RMS contém a modelagem que é o ajuste do modelo escolhido em função das respostas de interesse, e o deslocamento que é como a resposta se comporta dentro nos limites do planejamento (NUNES, 1998). O planejamento pode ser representado por diferentes métodos, levando em consideração, o número de componentes e variáveis, podendo avaliar o melhor ajuste entre eles. Pode ser representado por um triângulo, onde os vértices representam os pontos e coeficientes do planejamento (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

De um modo geral os métodos de planejamento experimentais além de otimizarem o processo, garantem qualidade, diminuição de custos e tempo (NUNES, 1998).

Verificou-se que na revisão bibliográfica uma demanda por maiores estudos de caracterização do Camu-Camu ressaltando seu potencial antioxidante. Verificando que um planejamento experimental aplicado para avaliar a extração com diferentes solventes pode possibilitar a determinação de melhores resultados por meio das melhores concentrações de solvente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATÉRIA PRIMA

As frutas de Camu-Camu que foram utilizadas para os experimentos são da cidade de Tabatinga no estado do Amazonas, colhidas em 2017. As frutas vieram congeladas e passaram por um processo de descongelamento e lavagem com água corrente. Após a etapa de higienização foram trituradas e processadas inteiras em um multiprocessador, Philips Walita, modelo RI7632.

As frutas passaram por um processo de secagem por liofilização, onde as amostras foram primeiramente congeladas em um ultra freezer a -50 °C, e em seguida foram colocadas em uma bandeja de inox no equipamento liofilizador Liotop, modelo L101, até a retirada total de água. Após o processo a amostra foi armazenada em frascos de vidro âmbar em geladeira.

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar a diferença no processo de extração com diferentes solventes, um planejamento experimental de misturas foi realizado. O planejamento utilizado foi o planejamento experimental de misturas do tipo Simplex central design, no software Statistica versão 10. Os solventes utilizados foram água destilada, etanol absoluto e acetato de etila. O planejamento foi delimitado nas concentrações de 0 a 100% de solventes. Com base no planejamento experimental as proporções de solventes definidas para as extrações são:

Tabela 1: Planejamento experimental de misturas para extração de compostos antioxidantes de Camu-Camu, variáveis codificadas e não codificadas

Extratos	Água destilada	Etanol absoluto	Acetato de etila
A	1	0	0
B	0	1	0
C	0	0	1
D	0,33	0,33	0,33
E	0,33	0,33	0,33
F	0,33	0,33	0,33
G	0,5	0,5	0
H	0,5	0	0,5
I	0	0,5	0,5

Proporção em volume: 1-100% v/v; 0,5-50% v/v; 0,33-33% v/v. Fonte: Aatoria própria, Software Statistica versão 10.

Os extratos foram preparados em Erlenmeyer de boca esmerilhada de 125 mL, pesando 1 grama de amostra liofilizada para 50 mL proporção de solvente, em seguida o erlenmeyer foi tampado e levado a agitadora orbital, Thoth modelo 6430, por cerca de 2 horas, a 150 rpm e temperatura ambiente de 25 °C a 28 °C. Os extratos obtidos foram guardados em frascos de vidros âmbar e armazenados em geladeira (VIZZOTTO, PEREIRA 2009).

5.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 MÉTODO DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método do DPPH, segundo Brand Willians et al. (1995) e Choi et al, (2002). Os extratos foram avaliados em diferentes concentrações e cada concentração realizada em triplicata.

Primeiramente realizou-se o preparo da curva de calibração a partir de três soluções estoques do padrão de Trolox. Foi realizada a pesagem de 25 mg para balão volumétrico de 50 mL ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após o preparo das soluções estoques foram feitas diluições nas concentrações de 25, 125, 250, 375 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida foram pipetados 30 μ L de cada concentração de padrão para tubos de ensaio, adicionando 2,0 mL de solução de DPPH (0,06 mili mol) mantendo as soluções em ao abrigo da luz em repouso por 60 minutos.

A partir de cada extrato anteriormente preparado, pipetou-se 0,5 mL para tubo de ensaio e 2,0 mL da solução de DPPH, deixando as amostras em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz. Um branco foi realizado com ausência do extrato.

As leituras foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+ e o resultado foi expresso em equivalente de Trolox conforme curva de calibração.

5.3.2 MÉTODO FRAP

A atividade total antioxidante foi determinada por FRAP conforme metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) e Rufino, et. al (2006), com adaptações, primeiramente foi feito o preparo do reagente FRAP que consiste em mix de 100 mL de tampão acetato 0,3 M, 10 mL de uma solução de TPTZ 10 mili mol e 10 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

Em seguida foi realizada uma curva padrão com sulfato ferroso 2000 micro mol, realizando diluições que variam entre 100 a 2000 micro mol.

A partir das diluições foi transferido uma alíquota de 100 μ L das diluições para tubos de ensaio, adicionando 300 μ L de água destilada e 3,0 mL do reagente FRAP, os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e mantidos em banho maria a 37 °C por 40 minutos, após esse período foram realizadas leituras em 593nm em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+.

As amostras foram diluídas nas seguintes concentrações (Tabela 2).

Tabela 2: Diluições das amostras para FRAP.

Amostra (mg mL ⁻¹)	Volume pipetado	Balão volumétrico	Concentração (mg mL ⁻¹)
0,5	1,0	5	0,1
0,5	2,0	5	0,2
0,5	3,0	5	0,3
0,5	4,0	5	0,4
0,5	5,0	5	0,5

Fonte: Autoria própria.

A partir das diluições realizadas, foram transferidas alíquotas de 100 µL das diluições para tubos de ensaio, adicionado 300 µL de água destilada e 3,0 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e mantidos em banho maria a 37 °C por 40 minutos. Após esse período foram realizadas leituras em 593 nm em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+, utilizando o reagente FRAP como branco.

A atividade total antioxidante foi determinada pela equação da reta obtida dos extratos, onde o valor de x foi substituído pela concentração de 1000 micro mol do padrão de sulfato ferroso e por fim o valor encontrado foi transformado em gramas e dividido por 1000 para obter o resultado em mg de sulfato ferroso/g de fruta.

5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu utilizado por (BOROSKI, 2015).

Uma curva de calibração foi realizada a partir de três soluções estoque. Para cada estoque foi pesado 20 mg de padrão de ácido gálico e diluído em balão volumétrico de 100 mL com água destilada ficando com concentração de 200 µg mL⁻¹.

Após homogeneizar cada estoque realizaram-se as diluições nas concentrações de 5,00/7,50/10,00/14,00/17,00/20,00 µg mL⁻¹.

Foram coletadas alíquotas de extrato de 2,0 mL e transferiu para tubos de ensaio protegido da luz. Em seguida foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteu diluído (1:10). A mistura permaneceu em repouso de por cerca de 5 minutos. Em seguida foi

adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 1 hora, ao abrigo da luz (Figura 14).

Um preparo de amostra foi realizado igualmente, mas com a ausência de extrato que serviu de branco no momento da leitura em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+.

Os resultados foram expressos por meio da interpolação dos resultados das amostras frente a curva de calibração em miligrama por equivalente de ácido gálico por grama (mg EAG g⁻¹).

5.5 FLAVONOIDES

Para a determinação de flavonoides será empregada metodologia descrita por Woiski, Salantino 1998 e Boroski, 2015 com adaptações. A metodologia aplicada será realizada em triplicata e por espectroscopia de UV-vis.

O preparo da curva de calibração foi realizado a partir de três soluções estoques de Quercetina. Para cada estoque pesou-se 10 mg de padrão de quercetina e diluído em balão volumétrico de 5 mL com metanol ([quercetina] = 2000 mg L⁻¹).

Após a homogeneização de cada estoque realizaram-se as diluições nas concentrações de 10,0/30,0/50,0/80,0/100,0 mg mL⁻¹. A partir dos extratos previamente preparados foi transferida uma alíquota de 1,00 mL para tubos de ensaio protegido da luz. Em seguida adicionou-se 0,25 mL do cloreto de alumínio 5% e 3,70 mL de metanol. A mistura permaneceu em repouso por meia hora, ao abrigo da luz. As amostras foram lidas em 425 nm em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+, utilizando metanol como branco.

A partir da equação da reta obtida foi determinado o teor de flavonoides em mg de quercetina mL⁻¹ de extrato.

5.6 ANTOCIANINAS

A determinação do teor de antocianinas foi feita conforme metodologia Giusti, Wrolstad, (2001) com adaptações. As antocianinas são pigmentos influenciados diretamente pelo pH podendo ocorrer variações reversíveis em sua estrutura.

A análise foi realizada em triplicata e o método utilizado será o de pH diferencial. A partir de cada extrato foram transferidos 1 mL para balão volumétrico de 25 mL e

completado com tampão cloreto de potássio pH 1,0 e tampão acetato de sódio pH 4,5 cada amostra com um tampão, as amostras então ficaram incubadas por um período de 15 minutos e posteriormente foram determinadas as absorvâncias das amostras em 510 e 700 nm em espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+, como branco foram utilizados os tampões pH 1,0 e 4,5.

A quantificação será feita através da equação 1 descrita abaixo e o resultado será expresso em equivalente da antocianina cianidina-3-glucosídeo.

$$AT = (A_{510} - A_{700} \times MM \times 100 \times FD) / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

Onde (AT) são as antocianinas totais, (A) é a absorvância no determinado comprimento de onda, (MM) é a massa molecular da cianidina-3-glucosídeo, (FD) é o fator de diluição e (ϵ) é a absorvidade molar do comprimento de onda de 510nm conforme literatura.

5.7 OTIMIZAÇÃO E ESCOLHA DO MODELO

Com base nos resultados encontrados a partir do planejamento experimental para as cinco respostas que foram compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas, DPPH e FRAP, foi possível determinar as equações da otimização por meio do software Statistica versão 10. Assim com as equações determinadas, os ensaios foram repetidos nas novas condições otimizadas.

A escolha do modelo utilizado foi realizada a partir do planejamento experimental onde se avaliou qual modelo se ajustava melhor entre os modelos linear, quadrático e cúbico, com base no R^2 e a quantidade de resíduos gerados pelo modelo, ou seja, o modelo que apresenta a menor diferença entre os valores preditos e observados, sendo modelo escolhido o especial cúbico por apresentar os resíduos mais próximos da linha identidade com o melhor ajuste. O Apêndice 1 mostra todos os diagramas de resíduos dos modelos lineares, quadráticos e especial cúbico para todas as respostas, confirmando assim o melhor modelo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antioxidante do fruto camu-camu se deu por meio das análises de potencial antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, com base em um planejamento experimental e otimização da extração.

6.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental tem por objetivo avaliar as proporções de solvente, com base nas respostas de interesse, para assim determinar as equações das condições otimizadas.

Nos extratos preparados com base no planejamento experimental foram avaliados os seguintes parâmetros: compostos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH e antocianinas. A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados.

Tabela 3: Resultados para determinação de atividade antioxidante dos 9 extratos obtidos no planejamento variando de 0 a 100% a fração de solventes.

	EXTRATOS								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Fenólicos totais mg EAG 100 g ⁻¹ AS ²	7222,99	4488,90	1785,03	12237,99	12600,52	12766,68	11769,70	11885,46	4232,11
Flavonoides mg EQ4 g ⁻¹ AS ²	11,25	21,63	11,17	23,78	23,94	24,09	19,78	16,86	22,25
FRAP PRE ⁵ [] mg de sulfato ferroso g ⁻¹ AS ²	1029,46	746,49	273,82	1930,21	1935,09	1972,29	1951,07	2488,62	842,64
DPPH mg EQ. Trolox g ⁻¹ AS ²	14031,09	13693,19	12721,74	16269,64	16692,01	16593,85	15424,9	15011,88	15087,01
Antocianinas mg EQ cianidinas-3-glicosídeo 100 g ⁻¹ AS ²	31,31	198,3	13,92	27,83	27,83	38,27	125,24	6,96	6,96

1. EAG = equivalente em ácido gálico; 2. AS = Amostra seca; 3. EQ = equivalente em quercetina; 4. PRE = Poder redutor equivalente; 5. A = 100 % Água v/v; 6. B = 100% Etanol v/v; 7. C = 100% Acetato de Etila v/v; 8. D = 33,3% Água v/v, 33,3% Etanol v/v e 33,3% Acetato de Etila v/v; 9. E = 33,3% Água v/v, 33,3% Etanol v/v e 33,3% Acetato de Etila v/v; 10. F = 33,3% Água v/v, 33,3% Etanol v/v e 33,3% Acetato de Etila v/v; 11. G = 50% Água v/v e 50% Etanol v/v; 12. H = 50% Água v/v e 50% Acetato de Etila v/v; 13. I = 50% Etanol v/v e 50% Acetato de Etila v/v.

Na segunda etapa do planejamento experimental, primeiramente foram estabelecidas as variáveis dependentes que são flavonoides, compostos fenólicos, antocianinas, DPPH e FRAP e em seguida os independentes que foram água, etanol e acetato de etila.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios com base no planejamento, foi possível a determinação da equação da desejabilidade para todos os parâmetros, conforme Equação 2, além da obtenção de uma equação com foco nas respostas de interesse que são compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, conforme Equação 3.

Assim foi possível obter o diagrama de contorno, a equação da otimização para cada resposta e determinação da atividade antioxidante, bem como fatores estatísticos ANOVA e o diagrama de Pareto para avaliar a linearidade, resíduos e qualidade dos resultados.

$$D=0,25*x + 0,75*y \quad (2)$$

$$D = 0,5*x +0,4*y+0,1*z \quad (3)$$

Onde (x) é água, (y) é etanol e (z) é acetato de etila.

Com as equações conhecidas foram realizadas novas extrações utilizando os valores otimizados, realizando as análises de atividade antioxidante para os extratos otimizados.

6.2 FLAVONOIDES

Para o ensaio de flavonoides foi possível a determinação da presença dos mesmos e a otimização da extração tanto no extrato otimizado dos compostos de interesse (1) e o extrato otimizado geral (2).

Tabela 4: Resultados flavonoides.

	FLAVONOIDES				
	Otimizado 1 25/75/0	Predito	Otimizado 2 50/40/10	Predito	Melhor resultado
Flavonoides mg EQ g ⁻¹ AS ²	30,14	21,54	29,89	21,57	24,09

1.EQ – Equivalente de quecitina; 2.AS² - Amostra seca; 3. Otimizado 1 = 25% Água v/v 75% Etanol v/v; 4. Otimizado 2 = 50% Água v/v, 40% Etanol v/v e 10% Acetato de etila v/v;

Na Tabela 4 é possível visualizar bem os valores otimizados, o melhor resultado obtido na primeira parte do planejamento foi a mistura igual de água, etanol e acetato de etila, com um resultado de 24,09 mg EQ g⁻¹ AS², já os valores preditos para os extratos otimizados foram de 21,54 e 21,57 mg EQg⁻¹ AS². Desta forma, os valores obtidos tanto para o extrato otimizado 1 com o otimizado 2 ficaram acima dos valores preditos e tiveram sua extração realmente otimizada, ficando cerca de 28% acima do valor predito, isso se deve ao fato da maior solubilidade do extrato em moléculas polares, como água e etanol ambos com forte influência na extração desses compostos.

Solis, et. al. (2009), avaliou teor de flavonoides para polpa, casca e sementes do fruto de Camu-Camu, e obteve o maior resultado para flavonoides na casca de 20,12 mg EQ g⁻¹, para polpa de 9,95 mg EQ g⁻¹, e para as sementes 2,19 mg EQ g⁻¹, se compararmos os resultados obtidos pelos extratos otimizados 1 e 2 pode-se observar que ficaram acima do valor dos autores. Essa diferença acontece, pois, como o presente trabalho utilizou o fruto por inteiro, logo o valor encontrado deveria ser maior e demonstra a otimização frente aos autores.

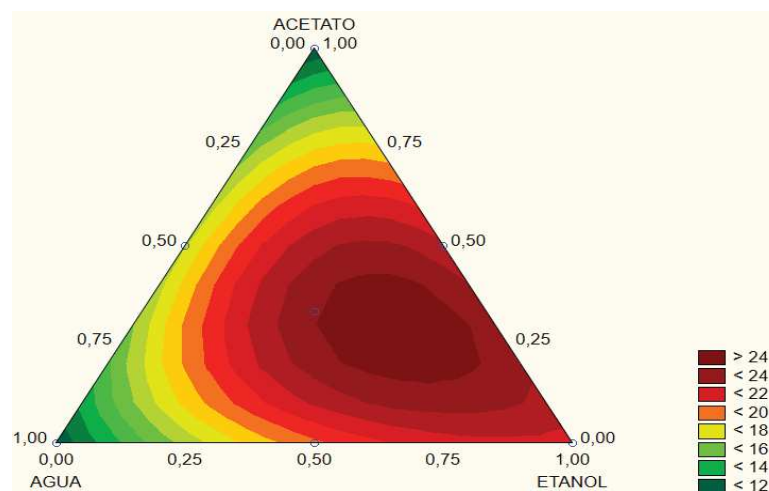
SOUZA, et. al, (2018) ao analisar genótipos diferentes obteve valores para o fruto verde, sendo o maior de 3,44 mg EQ g⁻¹ e para frutos começando a madurar sendo o menor valor de 1,38 mg EQ g⁻¹. Os resultados encontrados no presente estudo ficaram cerca de 9 vezes acima do maior resultado encontrado de 3,44 mg EQ g⁻¹, é 22 vezes maior que o menor resultado encontrado de 1,38 mg EQ g⁻¹ pelos autores.

Gonçalves, (2012) encontrou valores de 1,0 mg g⁻¹ para derivados de quercetina no fruto, e 5,0 mg g⁻¹ para polpa comercial, valores também menores do que o que foi encontrado no presente trabalho. Porém utilizou metodologia por CLAE para quantificar e outro solvente extrator, isso pode ter acarretado a baixa extração desses compostos e a diferença observada.

Observa-se que ocorrem variações quanto ao estágio de maturação, método utilizado, solventes e partes do fruto. Além disso, frutos em estágios de maturação mais avançados tendem a diminuir seus teores de compostos antioxidantes, tendo os maiores resultados durante o estágio de início até a maturação. Outro fator importante é que a maior quantidade desses compostos é encontrada na casca da fruta, seguida pela polpa e sementes. Desta forma, como o fruto estava no estágio de início da maturação seus valores foram elevados de flavonoides, ao utilizar o fruto quase maduro poderíamos obter maiores quantidades. O planejamento obteve um bom resultado para flavonoides, uma vez que se obtiveram resultados maiores do que os existentes na literatura. Sendo assim, o método foi eficiente e conseguiu a otimização da extração com os solventes propostos.

A Figura 5 apresenta o diagrama de contorno e as concentrações ótimas de extração com base nas respostas obtidas na primeira etapa do planejamento experimental, conforme tabela 3.

Figura 5: Diagrama de contorno para flavonoides.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

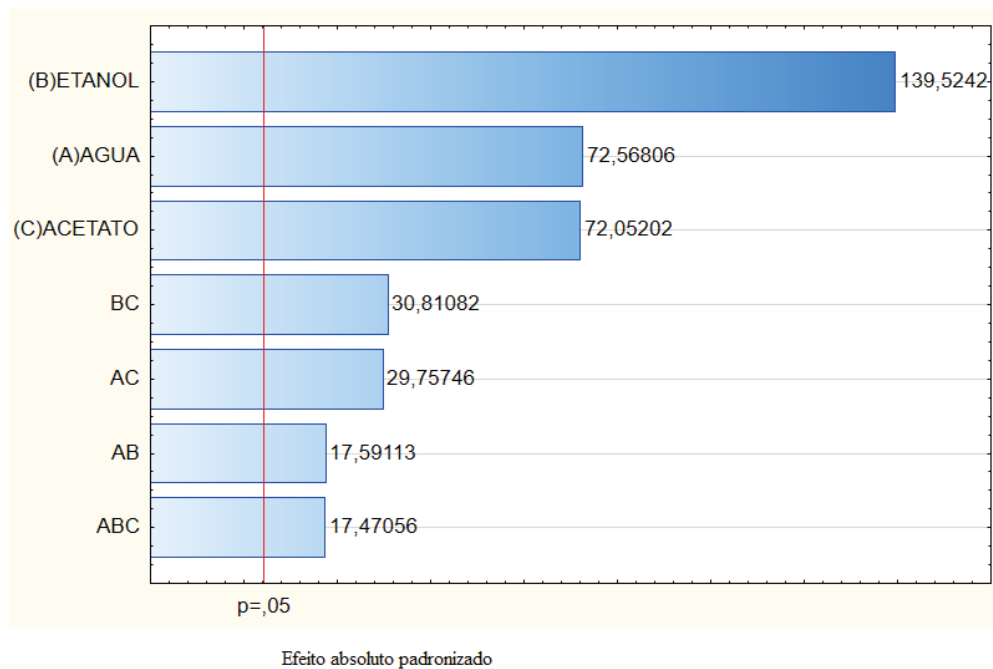
Por meio do diagrama de gráfico de curvas de nível é possível visualizar o ponto ótimo para determinação de flavonoides. Avaliando o diagrama de contorno visualizou-se que a melhor extração ficaria com uma concentração de em torno de 50% de etanol e 34% de acetato de etila, mas além disso uma porção menor de água de 16%. O coeficiente de correlação R^2 obtido foi de 0,9998 ficando muito próximo de 1, isso demonstra a qualidade dos resultados. A equação 4 mostra a equação específica para o modelo com base nas interações dos solventes.

$$v=+11,25*x+21,63*y+11,17*z+13,36*x*y+22,6*x*z+23,4*y*z+71,76*x*y*z+0, \quad (4)$$

Onde (x) é água, (y) é etanol e (z) é acetato de etila.

O diagrama de Pareto consegue demonstrar o grau de significância de cada solvente ou mistura de solventes. A linha vermelha indica o valor do t_{critico} , as variáveis que estão acima da linha são as que apresentam valores significativos para resposta de interesse, observando que o etanol apresentou um elevado grau de significância, seguido pela água e acetato de etila. Observa-se que as misturas dos três solventes são significativas, com valores acima da linha de t_{critico} contribuindo de forma positiva para a resposta. Os resíduos obtidos foram de 0,024, ou seja, baixa quantidade de resíduos, boas interações, demonstrando que o método está bem ajustado.

Figura 6: Diagrama de Pareto para flavonoides.



Autoria própria, software Statistica versão 10.

A análise de variância gerada para Flavonoides traz então uma comparação do ajuste da amostra com o coeficiente de determinação, o R^2 foi de 0,9998 o que mostra um bom ajuste, e o valor de $p < 0,05$ mostrando que as interações e os resultados foram significativos.

6.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos também se mostraram presentes nos extratos, demonstrando a otimização dos extratos 1 e 2. A Tabela 6 é apresenta os resultados otimizados

Tabela 5: Resultados dos extratos otimizados para compostos fenólicos.

COMPOSTOS FENÓLICOS					
	Otimizado 1 25/75/0	Predito	Otimizado 2 50/40/10	Predito	Melhor resultado
Fenólicos totais mg EAG 100 g ⁻¹ AS ²	9625,00	9607,00	13432,00	12853,00	12776,68

1.EAG = Equivalente de ácido galico; 2.AS² = Amostra seca; Fonte: Autoria Própria, software Statistica.

Na Tabela 5 pode-se verificar que o melhor resultado obtido na primeira etapa do planejamento que foi de 12766,68 mg EAG 100g⁻¹ AS² para a mistura igual de água, etanol e acetato de etila. Os resultados obtidos para os extratos otimizados ficaram acima dos valores preditos, sendo que o extrato otimizado A ficou quase igual ao valor predito, porém ficou abaixo do melhor resultado encontrado. O valor do extrato otimizado B ficou acima do valor predito e do melhor resultado obtido na primeira etapa do planejamento, ou seja, para esse extrato houve a otimização dos resultados para determinação de compostos fenólicos obtendo resultados acima dos valores preditos.

Jáugueri, (2007) ao analisar conteúdo de polifenóis totais encontrou para o Camu-Camu resultado de 2393,72 mg EAG 100g⁻¹ AS², sendo o fruto com maior conteúdo acima dos 8 outros frutos analisados, além disso o autor traz que o fruto é promissor e tem elevados teores de fenólicos. Souza, (2018) já encontrou valores de 3298,98 mg EAG 100g⁻¹ para Compostos Fenólicos e observou-se que ocorreu um aumento no conteúdo na maturação para todos os frutos.

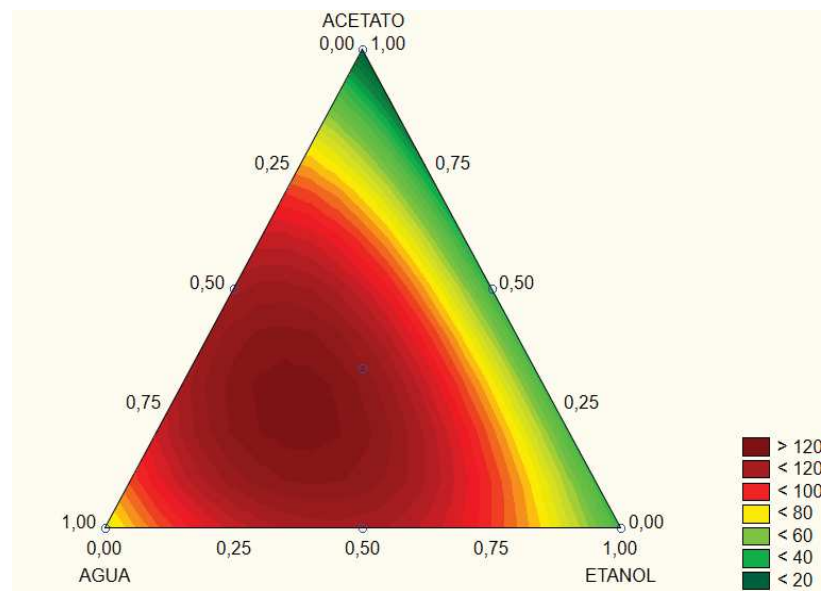
Villanueva-Tiburcio, (2010) encontrou valores de 770,0 mg EAG 100g⁻¹ para o fruto semi-maduro, 602,0 mg EAG 100g⁻¹ para o fruto maduro e 595,0 mg EAG 100g⁻¹ para frutos verdes, observando que o conteúdo aumentava no estágio semi-maduro em relação ao verde, mais havia uma diminuição no fruto maduro.

Os valores verificados no presente estudo ficam bem acima dos valores encontrados pelos autores Jáuregui, (2007), Souza (2018), Villanueva-Tiburcio, (2010). Logo as condições foram otimizadas maximizando os resultados, ficando acima da maioria dos autores presentes na literatura.

Os compostos fenólicos possuem estruturas aromáticas com hidrogênios e hidroxilas ligadas, essas ligações têm facilidade de doar hidrogênios e elétrons para radicais, e ainda assim conseguem se estabilizar por terem o anel aromático, o que facilita reações com solventes polares como água e etanol, conseguindo uma boa solubilização e extração da maior quantidade de compostos. O etanol além de ser polar por ter hidroxilas em sua molécula, também tem uma parte apolar, o que facilita a extração. Como os três solventes utilizados são polares a melhor extração com ponto ótimo se dá na mistura dos três solventes, sendo a maior porção de água pois a mesma é a molécula mais polar dos solventes utilizados (FREIRE, 2013).

Por meio da Figura 8 do gráfico de curvas de nível, é possível visualizar as quantidades ótimas de solventes para determinação desses compostos.

Figura 7: Gráfico de curvas de nível para compostos fenólicos.



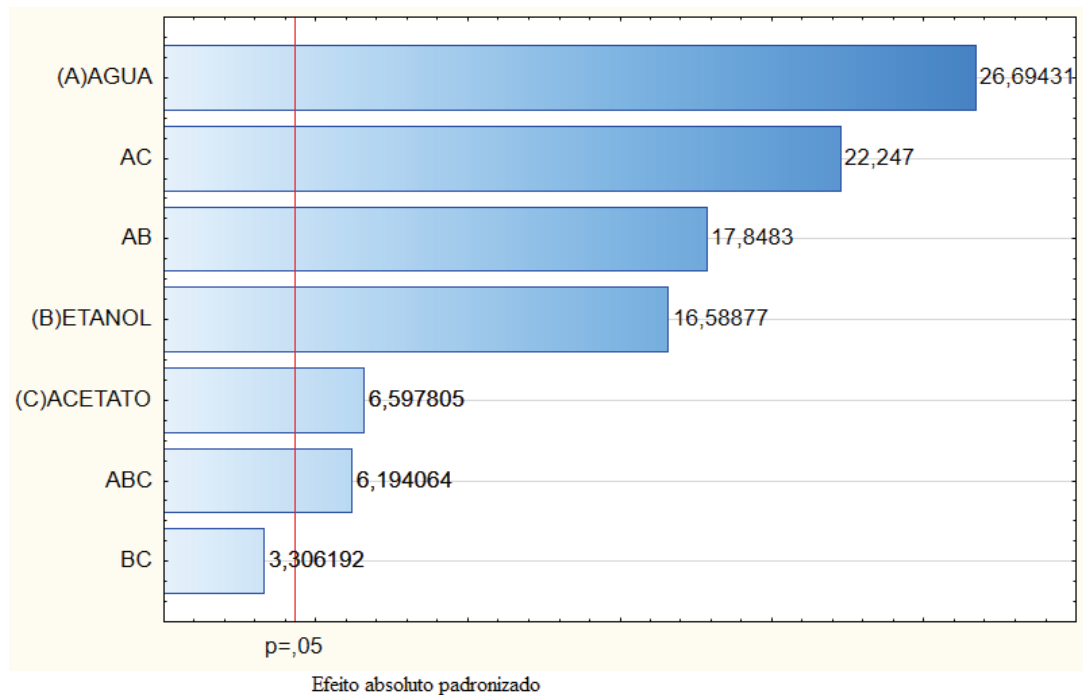
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Observa-se então que para essa resposta o melhor solvente extrator foi a água, e sua quantidade ótima de extração é de 50,00% da região ótima, seguida de etanol com 25,00% e 25,00% de acetato de etila. O coeficiente de determinação R^2 obtido para o modelo especial cúbico foi de 0,9990 ficando muito próximo de 1 que representa um bom ajuste do modelo.

A equação 5 mostra a equação específica para o modelo com base nas interações dos solventes.

$$v = +72,22 * x + 44,88 * y + 17,85 * z + 236,56 * x * y + 294,86 * x * z + 43,82 * y * z + 444 * x * y * z + 0, \quad (5)$$

Figura 8: Diagrama de Pareto para compostos fenólicos.



Fonte: Autoria própria, software Statistica.

O diagrama de Pareto demonstra as variáveis solventes, onde é possível visualizar que a água é a que melhor se ajusta e com maior grau de significância, seguida pelas misturas de água e acetato de etila e água e etanol, o gráfico também demonstra que a mistura entre etanol e acetato de Etila não é significativa para o método, e os demais solventes tiveram um bom ajuste e significância, porém pelo fato de uma das misturas ficar com valor menor que t_{critico} nota-se um aumento nos resíduos gerados pelo método especial cúbico, com valor de 7,31.

Pareto diz que 80 % dos efeitos, ou no caso atual dos erros, são gerados por 20 % das causas, o que é bem visível já que o aumento na quantidade de resíduos se dá por apenas uma das interações estar abaixo do valor de t_{critico} . Se compararmos o diagrama de Pareto de compostos fenólicos com o de flavonoides é possível ver a diferença, como em flavonoides não houveram valores abaixo da linha de t_{critico} , os erros foram baixíssimos, e no caso em

questão como uma das variáveis ficou abaixo, houve um aumento significativo da quantidade de resíduos gerados pelo método, porém, mesmo que o método deixe resíduos mais altos, em relação aos modelos lineares e quadrático, o modelo especial cúbico ainda foi o que melhor se ajusta, logo, ainda é o modelo mais vantajoso. O coeficiente de determinação R^2 para o modelo especial cúbico foi de 0,9990, confirmando assim um bom ajuste e melhor qualidade dos resultados.

A análise de variância para Compostos fenólicos traz o coeficiente de correlação como já foi observado em Pareto de 0,9990 o que é considerado um valor com bom ajuste ficando muito próximo de 1. O valor de p ficou abaixo de 0,05, logo os resultados foram significativos.

6.4 ANTOCIANINAS

As antocianinas foram determinadas nos extratos, porém não tiveram seus resultados otimizados como flavonoides e compostos fenólicos conforme Tabela 6. Ao observar os resultados obtidos na primeira parte do planejamento nota-se que o extrato que conseguiu o melhor resultado foi com etanol.

Esses compostos derivados de fenólicos, apresentam uma estrutura de anéis aromáticos e hidroxilas, o que facilita reações envolvendo hidrogênios, o etanol por sua vez possui um grupamento OH em sua estrutura que facilidade em se ligar e solubilizar esses compostos, por esse motivo sua facilidade em extrair diversos compostos como já foi observado.

Tabela 6: Resultados dos extratos otimizados para Antocianinas.

	ANTOCIANINAS				
	Otimizado 1 25/75/0	Predito	Otimizado 2 50/40/10	Predito	Melhor extrato (Etanol)
Antocianinas mg EQ cianidina-3- glicosídeo 100g ⁻¹ AS ²	121,07	163,63	68,19	83,28	198,3

EQ = Equivalente; AS = Amostra seca;

Os resultados obtidos com o planejamento para o extrato otimizado 1 tiveram uma proporção maior de etanol e uma menor de água o que aumentou o potencial extrativo uma

vez que o etanol foi o melhor solvente para extrair Antocianinas, porém não conseguindo alcançar os resultados da primeira etapa e o valor predito, porém ao comparar o resultado obtido com o resultado da segunda melhor extração que foi de 125,24 mg EQ cianidina-3-glicosido 100g^{-1} AS² nota-se uma proximidade e ambos os solventes extratores foram uma mistura de etanol e água, desta forma o resultado obtido foi significativo.

Já o resultado do extrato otimizado 2 que também ficou abaixo do valor predito, isso se deve ao fato do método otimizar todas as respostas em uma única vez. Como cada resposta teve solventes diferentes que foram os melhores extratores, a equação não consegue otimizar 100% para todas as respostas a extração.

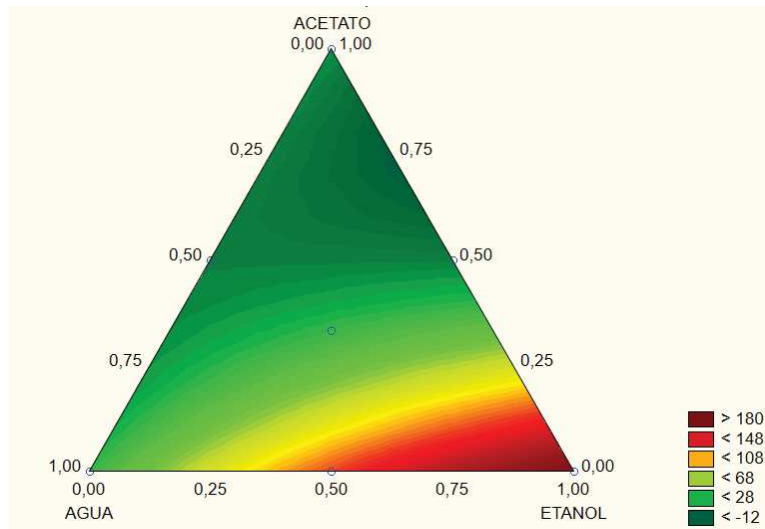
Ao compararmos com outros autores Souza, (2018) encontrou diferentes valores para diferentes estágios de maturação, sendo para estágio semi-maduro de 35,34 mg 100g^{-1} e para estágio maduro de 165,91 mg 100g^{-1} . Villanueva-Tiburcio, (2010) por sua vez encontrou valores de 46,42 mg 100g^{-1} para fruto maduro e 3,83 mg 100g^{-1} para o fruto semi-maduro fresco.

Favaro, (2008) ao avaliar a extração de antocianinas por um processo de otimização, concluiu que os melhores extratos eram com etanol, demonstrando a eficiência do solvente para extrair esses compostos.

As variações no conteúdo de antocianinas podem ocorrer por fatores genéticos, assim como por estágios de maturação, nota-se que no estágio maduro seu conteúdo aumenta muito, o que se justifica por serem pigmentos e estarem mais presentes nesses estágios.

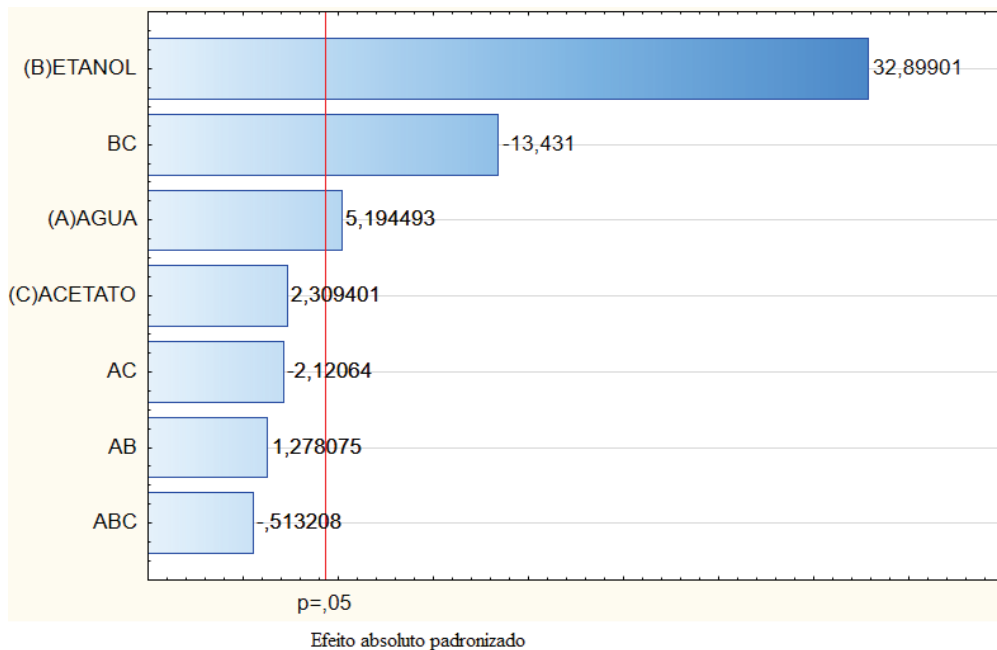
Ao comparar os resultados obtidos pelos autores nota-se uma diferença entre os valores, isso pode ocorrer principalmente pelas variações já citadas, mas também porque um dos autores utilizou amostra fresca. Já em comparação com o presente trabalho nota-se que os resultados ficaram dentro dos valores encontrados na literatura, sendo o extrato otimizado 1 e 2 ficaram mais elevados que o valor encontrado por SOUZA (2018) para o estágio semi-maduro, o que mostra um bom resultado, mesmo não estando otimizado em relação ao planejamento, os resultados ficaram acima em relação à literatura.

Figura 9: Gráfico de curvas de nível para antocianinas.



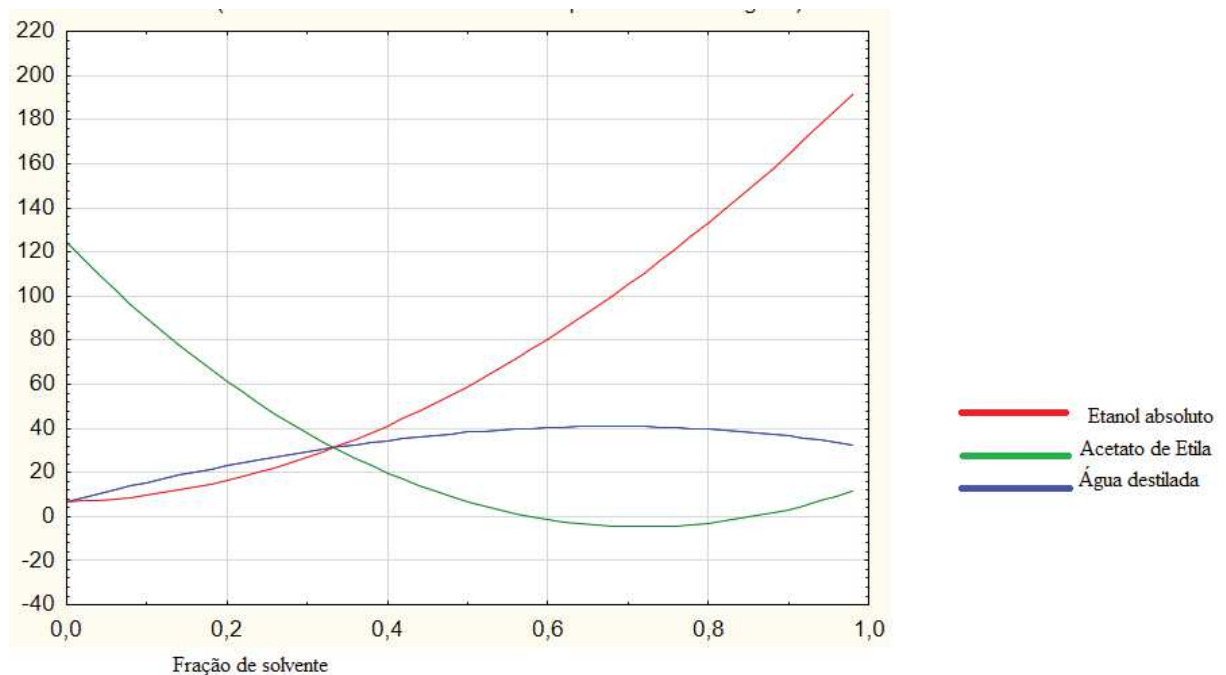
A Figura 9 mostra o gráfico de curvas de nível para o resultado ótimo de antocianinas, onde é possível visualizar que a maior proporção de solvente foi o Etanol, ou seja, sua equação da otimização para Antocianinas ficou com 100 % da extração com etanol. A equação 6 mostra a equação específica para o modelo com base nas interações dos solventes.

Figura 10: Diagrama de Pareto para antocianinas.



O diagrama de Pareto para antocianinas Figura 10 mostra os efeitos observados dos solventes, onde é possível observar que o maior efeito sobre a resposta foi do etanol. A mistura BC de etanol e acetato de etila apresenta valores negativos, assim como todos os solventes que apresentem acetato de etila, isso se deve ao fato de que o modelo especial cúbico ao traçar um gráfico de respostas estimadas, o acetato de etila apresentou valores negativos, ou seja, a combinação de misturas contendo acetato de etila atuam no sentido de diminuir o teor de antocianinas. Desta forma apenas etanol e água obtiveram efeitos significativos e positivos sobre a resposta de interesse ficando acima da linha de t_{critico} .

Figura 11: Gráfico de valores estimados.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Onde o eixo y representa os valores do efeito da resposta, eixo x a fração de solvente, a linha vermelha etanol, linha azul água e linha verde acetato de etila.

A Figura 11 apresenta o gráfico de valores estimados, assim é possível visualizar como já foi apresentado que para o acetato de etila os valores estimados são negativos, principalmente por sua dificuldade em extrair esses compostos, já o etanol se observa que é o solvente que mais consegue extrair e tem o maior valor estimado, a água por sua vez apresenta valores menores, porém com um pequeno aumento, sendo mais significativa que o acetato de etila.

Seus resíduos foram de 36,33 para o modelo especial cúbico, isso se deve ao fato que grande parte dos solventes não interagiram bem, além do acetato de etila que teve uma dificuldade maior para extrair esses compostos, logo grande parte dos solventes extratores geraram uma quantidade maior de erros, aumentando assim seus resíduos. Apesar disso o coeficiente de determinação R^2 ficou em 0,9979, que é um valor muito próximo de 1, sendo um bom ajuste de dados.

A análise de variância para antocianinas foi positiva com valor de $p < 0,05$, ou seja, os resultados foram significativos. O coeficiente R^2 ficou com um valor de 0,9979 o que representa um bom ajuste e bons resultados.

6.5 DPPH

A determinação do potencial antioxidante foi realizada por dois métodos sendo um deles DPPH. Foi realizada a determinação da atividade antioxidante, observando bons resultados, onde o DPPH foi medido em equivalente a Trolox. Para esse teste quanto menor a absorbância melhor o resultado, pois o teste se baseia na inibição do radical DPPH.

Tabela 7: Resultados para DPPH.

	DPPH				
	Otimizado 1 25/75/0	Predito	Otimizado 2 50/40/10	Predito	Melhor resultado
DPPH mg EQ. Trolox g ⁻¹ AS ²	15054,91	14949,74	18297,01	16052,06	16692,01

EQ = Equivalente; AS = Amostra Seca; DP = Desvio padrão;

É possível observar por meio dos resultados que ambos os extratos foram otimizados em relação aos valores preditos. O extrato otimizado 1, ficou acima do valor predito, porém não ficou acima do melhor resultado encontrado, diferença essa pois o melhor resultado encontrado na etapa anterior tinham uma proporção de acetato de etila, como a equação da desejabilidade para esse parâmetro já mostrou, o extrato ótimo para DPPH leva proporções

dos três solventes, se formos comparar com o extrato de mistura igual de água e etanol o resultado fica um pouco abaixo mais muito próximo do obtido na etapa inicial.

Já o extrato otimizado 2 os valores dos resultados ficaram acima do valor predito e do maior valor obtido na primeira etapa, o que mostra a otimização do parâmetro, alcançando valores elevados de potencial antioxidante.

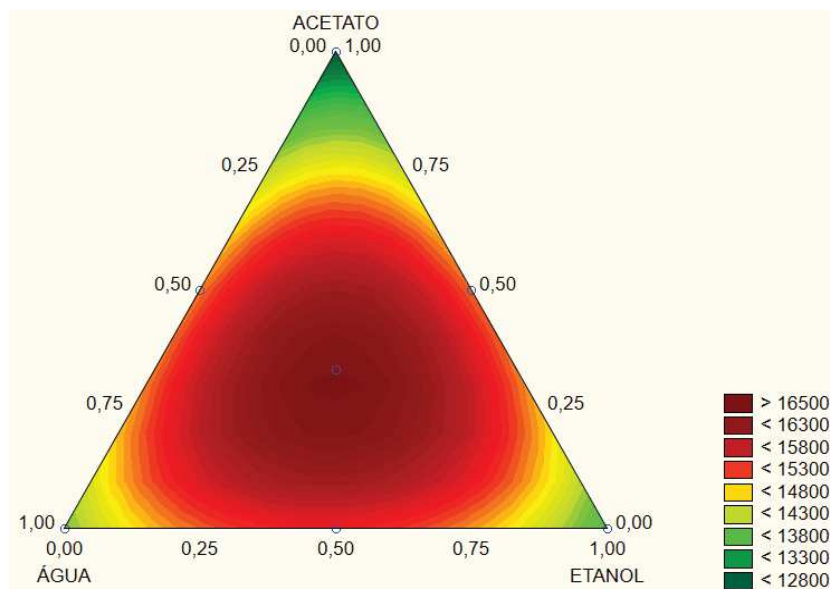
Gonçalves, (2008) considerou o Camu-Camu frente a diversas frutas como o fruto com maior capacidade antioxidante, obtendo valor de 3601,67 mg EQ Trolox g⁻¹, bem acima de frutas como maracujá doce, graviola, cupuaçu etc. Gonçalves, (2012) em uma nova pesquisa encontrou valor mais elevado de 4202,37 mg EQ Trolox g⁻¹.

Jáuregui, (2007) encontrou o resultado de 276,6 mg EQ Trolox g⁻¹ para Camu-Camu, sendo o maior valor frente a outros 8 frutos, trazendo o Camu-Camu como um fruto promissor para uma alimentação saudável.

Se compararmos os valores encontrados na literatura nota-se que os valores obtidos no presente trabalho foram bem elevados tanto para o extrato otimizado 1 quanto para o extrato otimizado 2, o que demonstra a otimização do processo de extração, possibilitando a maximização das respostas.

No diagrama de contorno, conforme figura 13, é possível visualizar o ponto ótimo da extração para determinação de DPPH.

Figura 12: Gráfico de curvas de nível para DPPH.



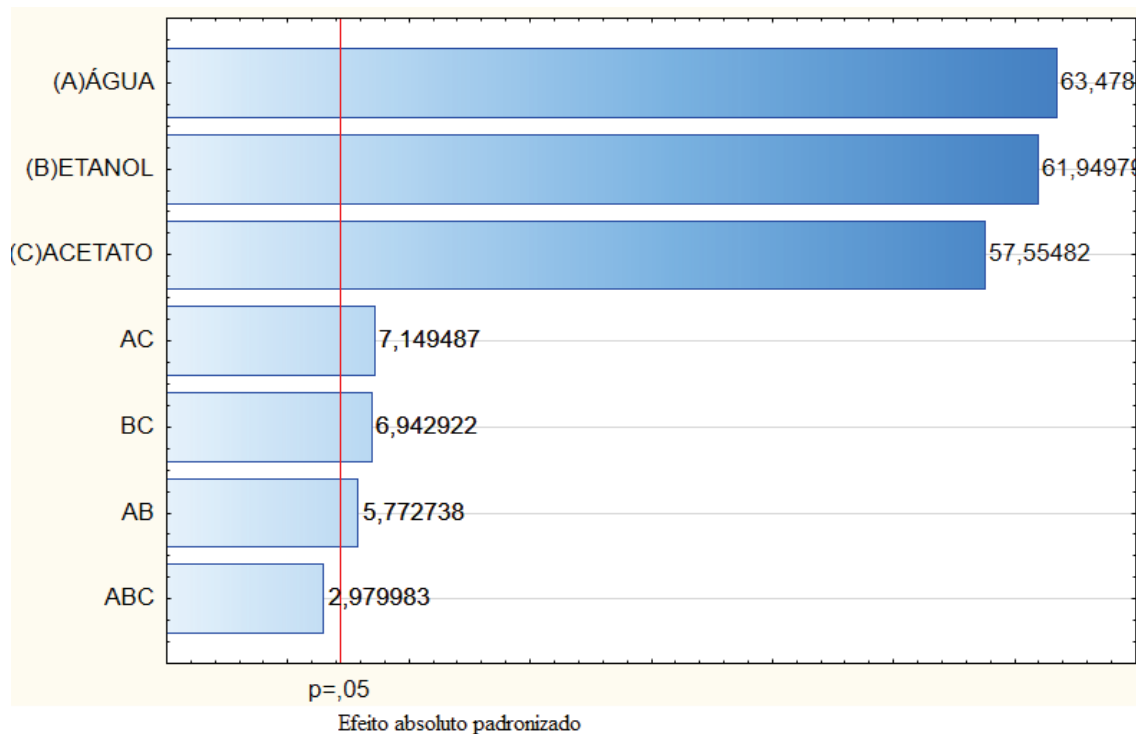
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

É possível visualizar que o resultado ótimo para DPPH foi na proporção de 25% de água seguida por etanol com 37,5% e acetato de etila com 37,5%. A equação 7 mostra a equação específica para o modelo com base nas interações dos solventes.

$$v = +31,31 * x + 198,3 * y + 13,92 * z + 37,74 * x * y - 62,62 * x * z - 396,6 * y * z - 81,96 * x * y * z + 0,$$

(7)

Figura 13: Diagrama de Pareto para DPPH.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Por meio do diagrama de Pareto Figura 13, é possível ver os efeitos dos três solventes, onde o maior efeito foi da água, seguida de etanol e acetato de etila, com exceção da mistura dos três solventes, todos os demais ficam acima da linha de $t_{\text{crítico}}$. Desta forma, os valores acima de $t_{\text{crítico}}$ foram significativos e obtiveram efeito positivo sobre essa resposta.

Os resíduos gerados para esse método foram de 48857,32 isso se deve principalmente ao valor abaixo da linha de $t_{\text{crítico}}$ para os três solventes, uma vez que a mistura é o que gera a maior quantidade de erros. Porém mesmo com uma quantidade altíssima de resíduos o coeficiente de correlação R^2 ficou em 0,9935, valor esse que é próximo de 1, logo o método apresenta um bom ajuste e qualidade dos resultados.

A análise de variância para DPPH ficou com valor de $p < 0,05$, além disso seu coeficiente de determinação R^2 ficou em 0,9935, o que demonstra qualidade dos resultados e que os mesmos foram significativos.

6.6 FRAP

O método FRAP também foi utilizado para determinação da atividade antioxidante, onde foi realizado uma curva para o padrão de Sulfato ferroso, determinada a absorbância para concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, e realizadas curvas para as amostras determinando sua concentração utilizando a absorbância obtida na curva do padrão.

Tabela 8: Resultados para FRAP.

	FRAP				
	Otimizado 1 25/75/0	Predito	Otimizado 2 50/40/10	Predito	Melhor extrato
FRAP PRE ⁵ [] mg de sulfato ferroso g^{-1} AS ²	1364,6	1614,55	1412,20	2017,77	2488,62

PRE⁵ = Poder redutor equivalente; AS = Amostra seca; DP = Desvio padrão;

É possível observar por meio da Tabela 8 os resultados dos extratos otimizados para FRAP. O extrato otimizado 1 ficou abaixo do valor predito para a mistura, ao compará-lo com o melhor resultado isso também acontece pois são misturas diferentes de solventes, nota-se uma facilidade maior de extração para a mistura de água e acetato de etila na resposta FRAP. Se comparado com o extrato de água e etanol da primeira etapa, o resultado também fica abaixo, isso também ocorre devido às proporções de solventes, uma vez que no extrato anterior a proporção de Água é maior em torno de 50%, já para o otimizado 1 foi 25%.

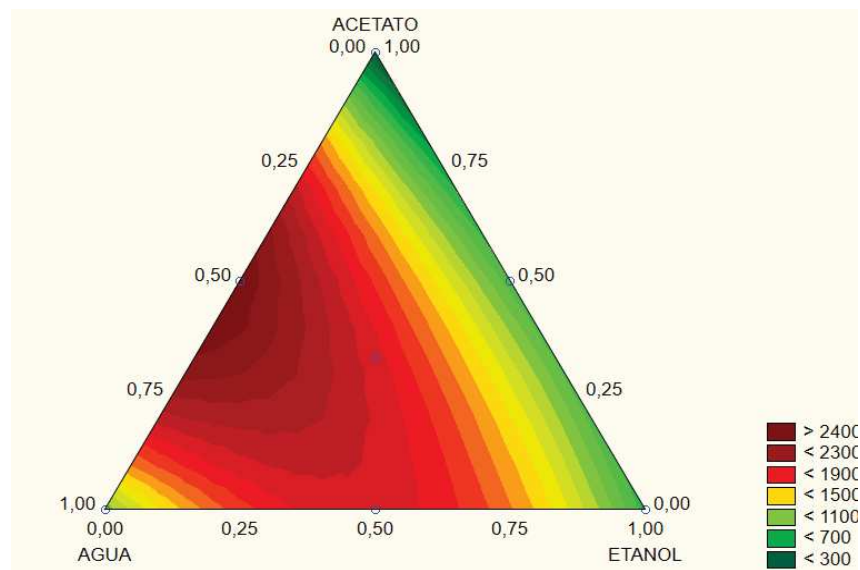
O extrato otimizado 2 não foi otimizado em relação ao predito, também em relação ao melhor extrato anterior, e nem as misturas com os três solventes da etapa anterior. O que pode ter acarretado é novamente a questão das proporções de solventes, em ambos os extratos a quantidade de etanol foi significativa. Para esse parâmetro é observado que a extração com acetato de etila puro na etapa inicial obteve um valor muito baixo, porém ao realizar a mistura

com a água obtemos o melhor resultado de extração, sabe-se que ambos os solventes são polares, o que pode ter ajudado a extrair uma quantidade maior de compostos bioativos para esse parâmetro.

Ao compararmos com a literatura, Grigio, (2016) encontro valor de 17,54 mg de sulfato ferroso g^{-1} para Camu-Camu. Este valor que está bem abaixo do encontrado para os extratos 1 e 2, a extração realizada pelo autor se deu com outros solventes o que pode ter influenciado, obtendo valores menores. Na Figura 16 que a maior interação foi com misturas contendo água, ou apenas a mesma como constituinte, enquanto na literatura usou-se metanol e acetona, além do tempo de extração e temperatura, que não foram avaliados, mas são fatores que podem influenciar na extração.

A Figura 14 do diagrama de contorno para FRAP mostras os valores ótimos para determinação do extrato para FRAP, sendo 50% água e 50% acetato de etila. A equação 8 mostra a equação específica para o modelo com base nas interações dos solventes.

Figura 14: Diagrama de contorno para FRAP.

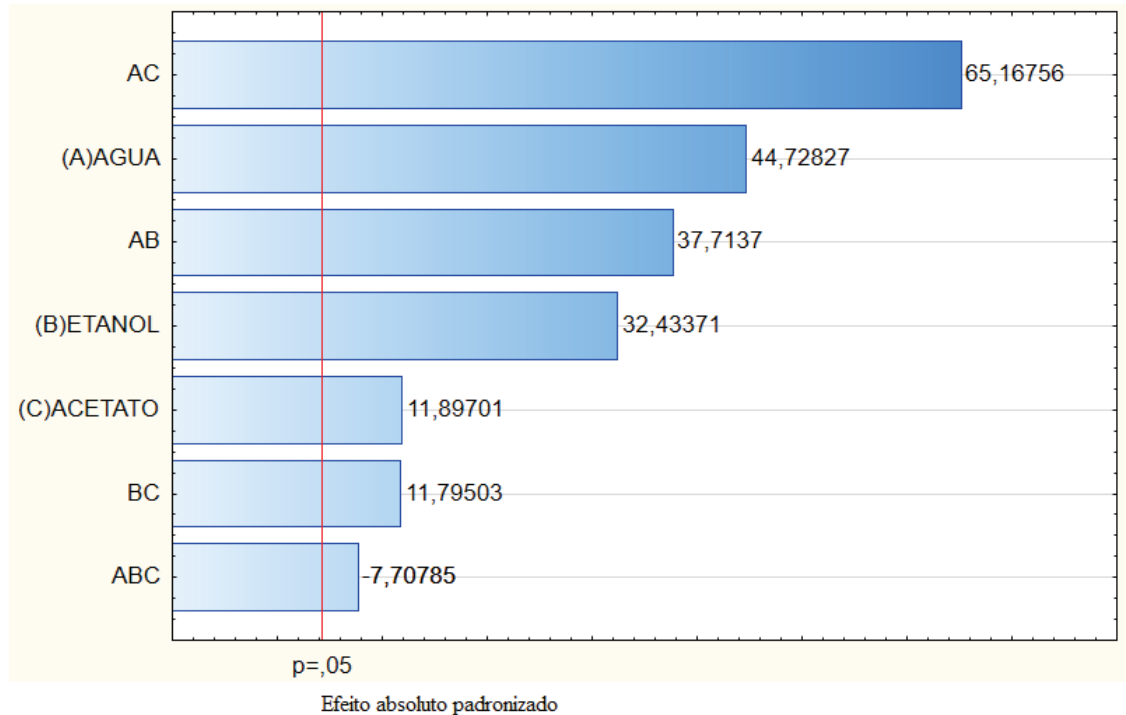


Fonte: Autoria própria, software Statistica.

$$v = +1029,46 * x + 746,49 * y + 273,82 * z + 4252,38 * x * y + 7347,92 * x * z + 1329,94 * y * z - 4700,34 * x * y * z + 0, \quad (8)$$

Onde (x) é água, (y) é etanol e (z) é acetato de etila.

Figura 15: Diagrama de Pareto para FRAP.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Com relação às interações, é observado pela Figura 15 que as interações foram positivas para esse parâmetro em quase todas as interações, onde a maior significância foi da água e acetato de etila, seguida pela água. A água então entra como um importante fator, uma vez que ela e suas misturas são as que tiveram melhores efeitos sobre a resposta e os resultados mais positivos, sendo muito significativa para esse parâmetro. Porém a interação dos três solventes combinados contribui para diminuição do teor de atividade antioxidante. Os resíduos foram de 529,73. O R^2 obtido foi de 0,9998 ficando com excelente ajuste do método.

A análise de variância para FRAP foi significativa, uma vez que o valor de $p < 0,05$, além disso o coeficiente de determinação R^2 ficou 0,9998, demonstrando além de significância a qualidade dos resultados e o bom ajuste do método.

7. CONCLUSÃO

Foi possível preparar os extratos a partir da amostra liofilizada do fruto, obtendo-se respostas para atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, o que permitiu encontrar a da equação da desejabilidade e obter o extrato otimizado, e também para o extrato otimizado compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas.

Observou-se durante o trabalho a influência dos solventes, suas interações e efeitos, observando que a interação dos três solventes obteve bons resultados em quase todas as respostas. Para o extrato otimizado geral a melhor proporção de solventes foi de 50% água, 40% de etanol e 10% de acetato de etila. Já para o extrato otimizado dos compostos de interesse foi de 25% de água e 75% de etanol. Observando os resultados, verificou-se que para compostos fenólicos o melhor resultado encontrado foi de 13432,00 mg EAG 100g⁻¹ referente ao extrato otimizado geral 2, já para flavonoides foi do extrato otimizado dos compostos de interesse 1 com valor de 30,14 mg EQ g⁻¹, antocianinas teve o melhor resultado na primeira etapa com 100% de etanol, obtendo o valor de 198,00 mg EQ cianidina-3-glicosídeo, DPPH e FRAP tiveram forte influência da água, onde o valor para DPPH foi de 18297,01 mg EQ Trolox g⁻¹ para o extrato otimizado geral 2 e FRAP foi de 2017,77 mg Sulfato ferroso g⁻¹ na primeira etapa do planejamento com o extrato H que contém 50% de água e 50 % de acetato de etila.

Conclui-se então, que apesar da otimização dos resultados em quase todas as respostas, e a influência dos fatores foi diferente, logo não seria possível otimizar todas as respostas ao mesmo tempo. Contudo, os valores encontrados possibilitaram a comprovação dos altos teores presentes na literatura. Além da determinação de Compostos fenólicos totais, Flavonoides e Antocianinas, que se mostraram presentes e em quantidades elevadas.

Portanto, o fruto Camu-Camu pode ser considerado como uma importante fonte de antioxidantes, que podem trazer diversos benefícios à saúde. Além disso, futuros trabalhos podem ser realizados testando outras condições de extração, avaliando o efeito do tempo e temperatura e diferentes estágios de maturação, podendo ser aplicado na indústria alimentícia e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-OTÍZ, M. et al. Propriedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. v. 13, n. 2, p. 16-22, 2011.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, Vol. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- BENZIE, I.; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* v. 239 p.70-76, 1996.
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*, Campinas, p. 123-130, 1999.
- BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.12, p. 1-20, 2011.
- BOXIN, O. 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 of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.
- BOROSKI M., VISENTANINER J., COTTICA S., MORAIS D., *Antioxidantes princípios e métodos analíticos*. 1 ed., Curitiba, Appris., 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CHIRINOS, Rosana et al. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019-1024, 2010.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agente terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual Química*, 2009, p. 241-256. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/51/98>. Acesso em 20/10/2018 as 16:00h.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -Caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, Campinas, 446-452, abr.-jun, 2006.

FAVARO, MMA. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes. 2008. 105 f. **Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, 2008.

FEITOSA, C. M. Antioxidantes aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos. Editora Átomo. Campinas-SP, p. 11-137, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*, vol.43 n.1 São Paulo, 1997.

FERRERA, T. S. et al. Phenolic Substances, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Herbs under Different Soil Covers and Shadings. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FREIRE, Juliana Mesquita et al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2291-2296, 2013.

FUJITA, Alice et al. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 495-500, 2013.

GIUSTI, M. Mónica; WROLSTAD, Ronald E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, New York, 2001.

GONÇALVES, A. E. de S. S.t. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GONÇALVES, A. E. de S. S.. **Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GRIGIO, M. L. et al. Avaliação e comparação da atividade antioxidante de camu-camu (*myrciaria dubia*) com outros sete frutos. In: **Embrapa Roraima-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 24., 2016, São Luis. Fruticultura: fruteiras nativas e sustentabilidade. São Luis, MA: SBF, 2016., 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. 1988.

JÁUREGUI, A. M. M. et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 73, n. 3, p. 142-149, 2007.

JARDINI, Fernanda Archilla; MANCINI FILHO, Jorge. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.

JOHN, B. I. J. U. et al. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 1, p. 406-408, 2014.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira Agrociência*, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

MALACRIDA, C. R., DA MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas presentes no suco de uva. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 659-664, 2005.

MARQUES, Luanda Gimeno. Liofilização de frutas tropicais. Universidade Federal de São carlos. São Carlos- SP, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/3870/2148.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Acesso em: 27/10/2018 as 15:00.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. *Revista brasileira Botânica*, vol.25 n ° 4 São Paulo, 2002.

MONÇÃO, Nayana et al. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. *Molecules*, v. 20, n. 3, p. 4204-4224, 2015.

MUÑOZ JÁUREGUI, Ana María et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 73, n. 3, p. 142-149, 2007.

NETO, B. B.; SCRAMINIO, I. S. BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NUNES, Danielle Barcos. Rotinas para a otimização experimental de misturas. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

OLIVEIRA, GL S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. *Rev. bras. plantas med*, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

PEREIRA, Evelyn Diane et al. Composição química e potencial antioxidante do camu-camu (*Myrciaria dubia*) e sua influência em composições nutricionais utilizadas na piscicultura. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

PETERS, C. M.; VAZQUES, A. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) i produccíon de frutos em poblaciones naturales. *Acta Amazonas* vol. 17, p. 164-171, Manaus 1987.

PUHL, J.; NITZKE, J. A. Secagem de vegetais. 2010. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/veg_desidratados/secagem_liofiliza%C3%A7%C3%A3o.html . Acesso em 27/10/2018 as 15:20 h.

RUFINO, M, et. al. Metodologia científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Comunicação Técnica online* 125, Embrapa, 2006.

SILVA, C. Camu-Camu: A poderosa fruta repleta de antioxidantes pode fazer muito pela sua pele e organismo. 2017. Disponível em : https://www.dermaclub.com.br/noticia/camu-camu-a-poderosa-fruta-repleta-de-antioxidantes-pode-fazer-muito-pela-sua-pele-e-organismo_a4094/1 acesso em: 02/11/2018 as 21:30h.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura* v.30, n.1 Jaboticabal, 2008.

SOBRINHO, Tadeu J. da S. P. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, n. 4, p. 683-689, out./dez., 2008.

SOLIS, V. S.; DOZA, L. S.; SOTERO, D. G.; CORREA, S. I. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.). *Revista de la sociedad química del Perú*, v.75 n.3 Lima, 2009.

SOTERO SOLIS, Víctor et al. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* HBK). **Revista de la sociedad química del Perú**, v. 75, n. 3, p. 293-299, 2009.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Vol. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, CM de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, Aline et al. Bioactive compounds in the peel of camu camu genotypes from Embrapa's active germplasm bank. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 67-71, 2018.

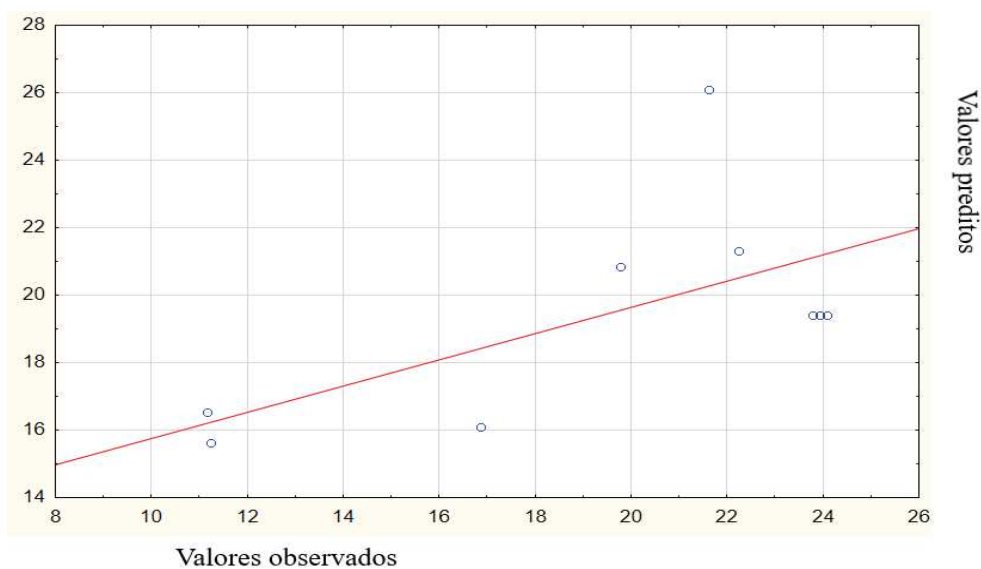
SOUZA, W. Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos em extratos vegetais. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.

- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante em frutos. UNOPAR científica. Ciências Biológicas Saúde, p. 236-269, 2012.
- TEIXEIRA, L. N.; STRINGUETA, P. C.; DE OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Revista Ceres, n. 4 v. 55, p. 297-304, 2008.
- URREA-VICTORIA, V. et. al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de biociências, Universidade de São Paulo.
- VALIM, D. D. Vegetais desidratados by Liotecnica. Aditivos Ingredientes, São Paulo, nº 61, março/abril 2009. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/edicoes/61/marcoabril-2009> . Acesso em 27/10/2018 as 14:30 h.
- VILLANUEVA-TIBURCIO, J. E.; CONDEZO-HOYOS, L. A.; ASQUIERI, E. R. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K) McVaugh). Ciência Tecnologia Alimentos vol.30, Campinas, 2010.
- VIZZOTTO, Márcia; PEREIRA, Marina Couto. Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). Embrapa Clima Temperado-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2009.
- WOISKY, R.; SALANTINO, A. Analysis of propols: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal Apiculture Research. v. 37 p. 99-05, 1998.
- YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, p. 1-2, 2011.
- YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. Acta Amazônica, v. 32, p. 169-174, 2002.
- ZHAO, Zhen-Gang et al. Optimization of extraction of phenolic compounds from scum using response surface methodology. **International Sugar Journal**, v. 111, n. 1321, p. 13, 2009.

APÊNDICES

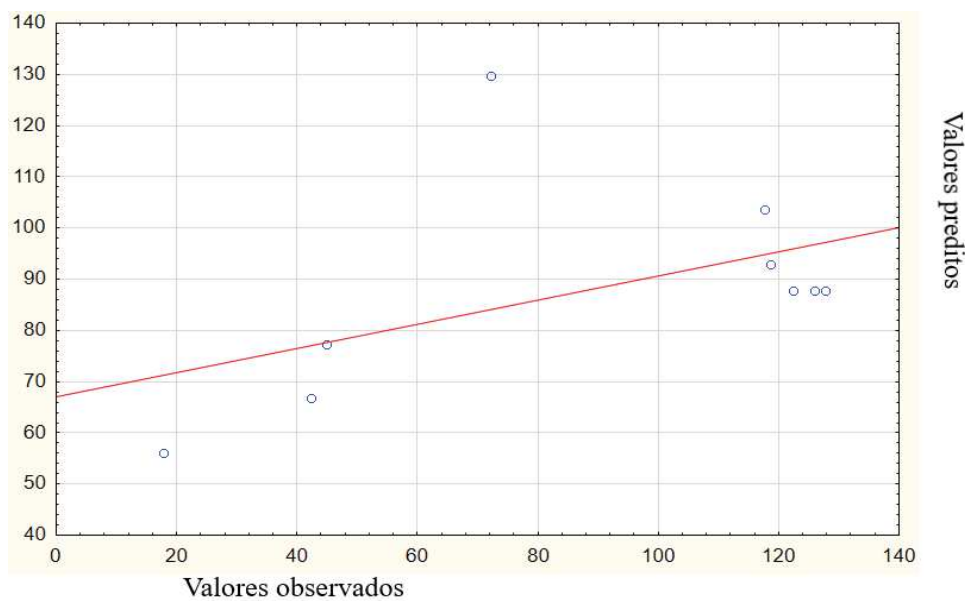
Apêndice 1: Diagramas de resíduos para flavonoides, compostos fenólicos, antocianinas, DPPH e FRAP dos modelos linear e quadrático respectivamente.

Figura A-1: Diagrama de resíduos para flavonoides modelo linear.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

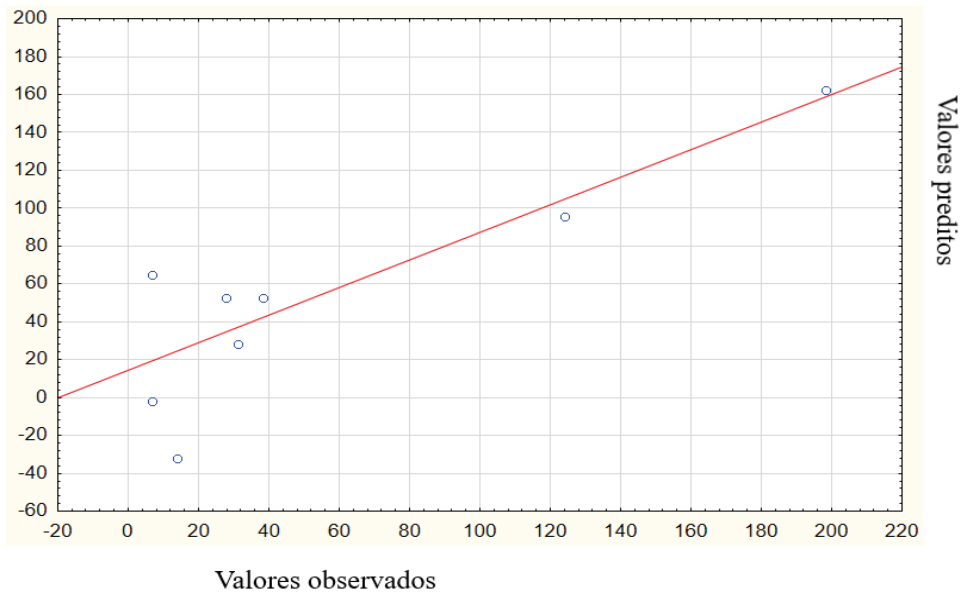
Figura A-2: Diagrama de resíduos para compostos fenólicos modelo linear.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

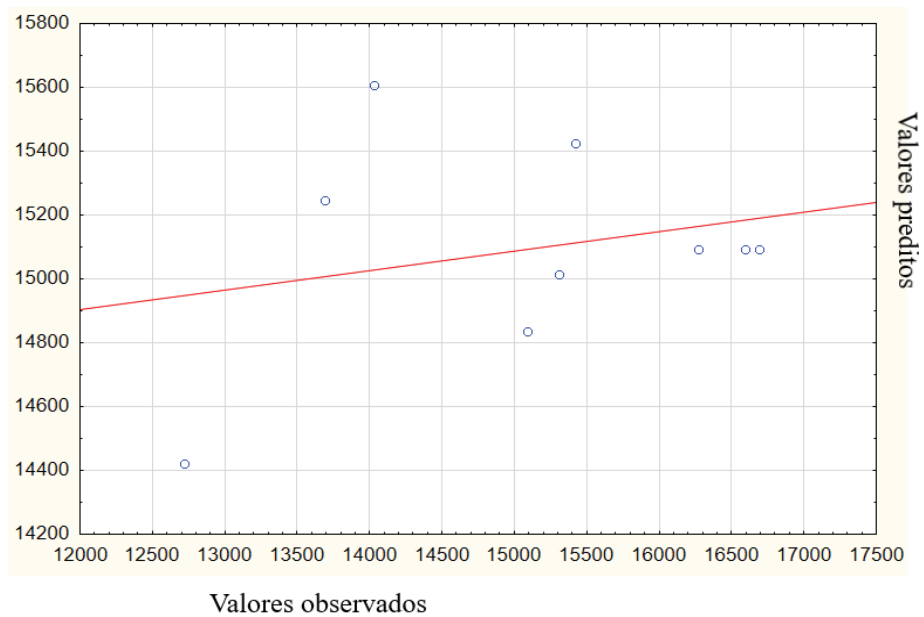
Figura A-3: Diagrama de resíduos para antocianinas modelo linear.

,



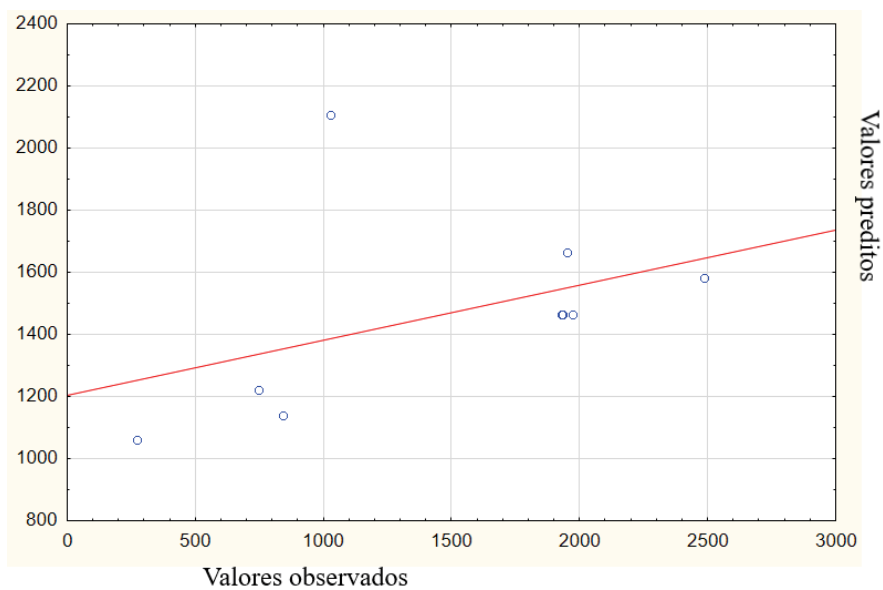
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-4: Diagrama de resíduos para DPPH modelo linear.



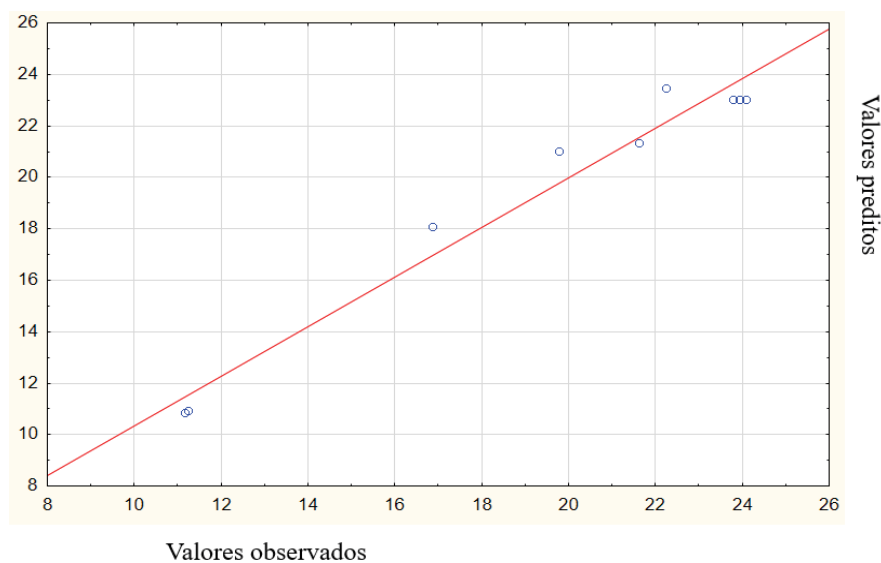
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-5: Diagrama de resíduos para FRAP modelo linear.



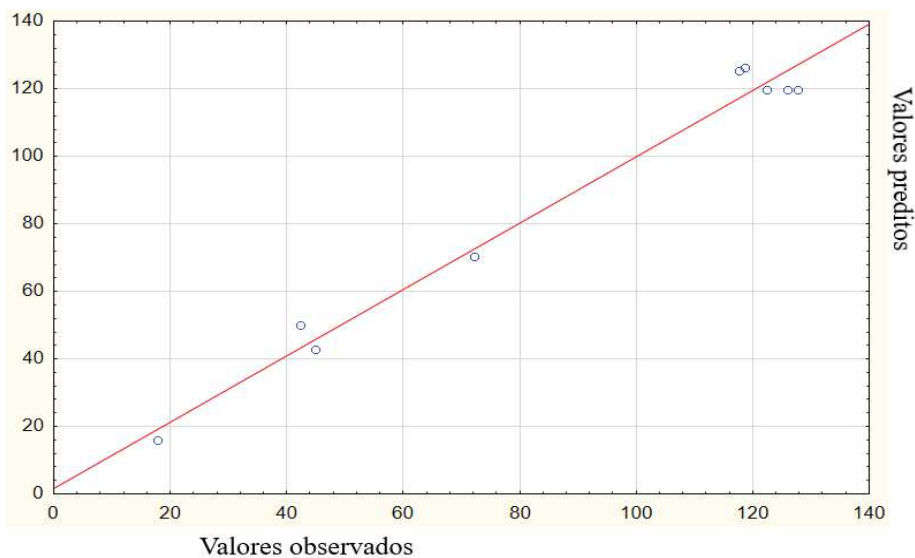
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-6: Diagrama de resíduos para flavonoides modelo quadrático



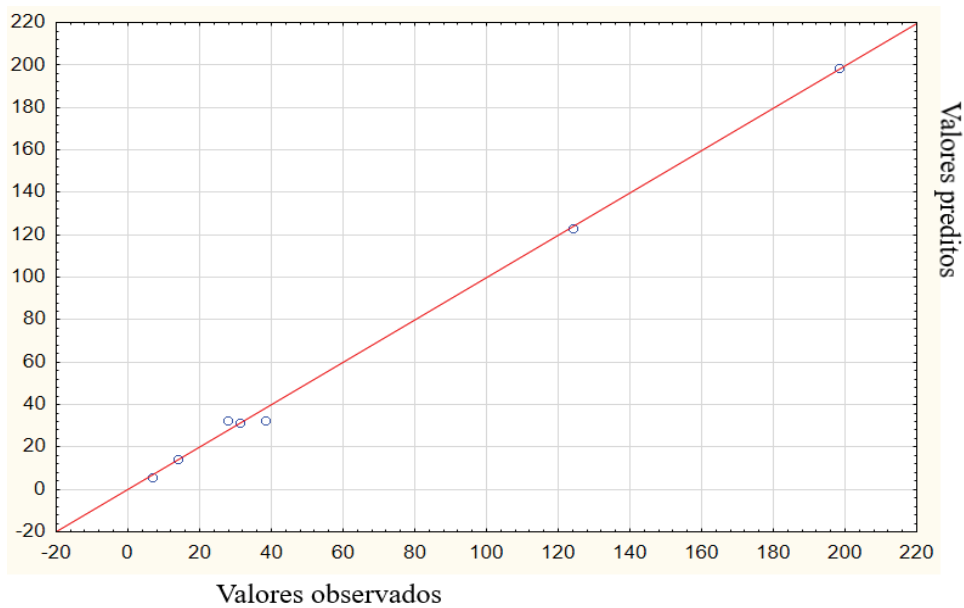
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-7: Diagrama de resíduos para compostos fenólicos modelo quadrático.



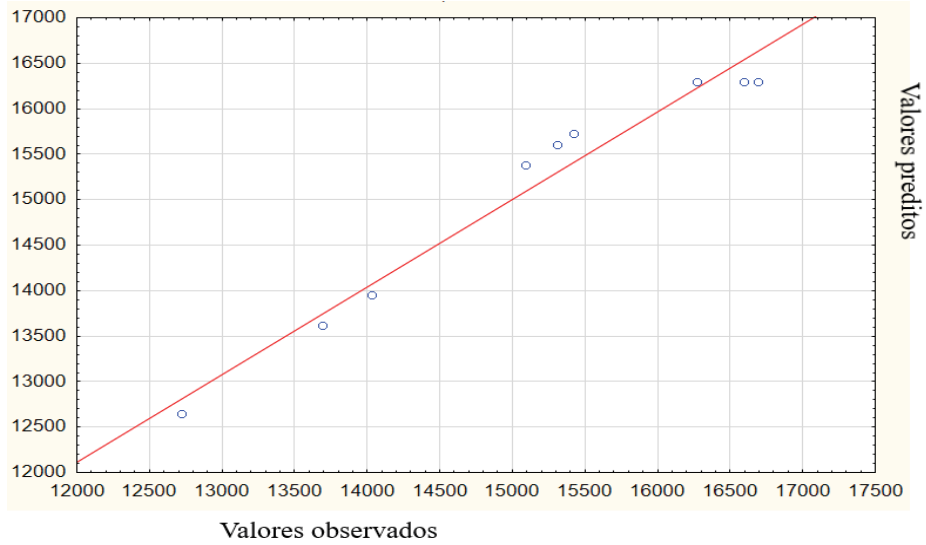
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-8: Diagrama de resíduos para antocianinas modelo quadrático.



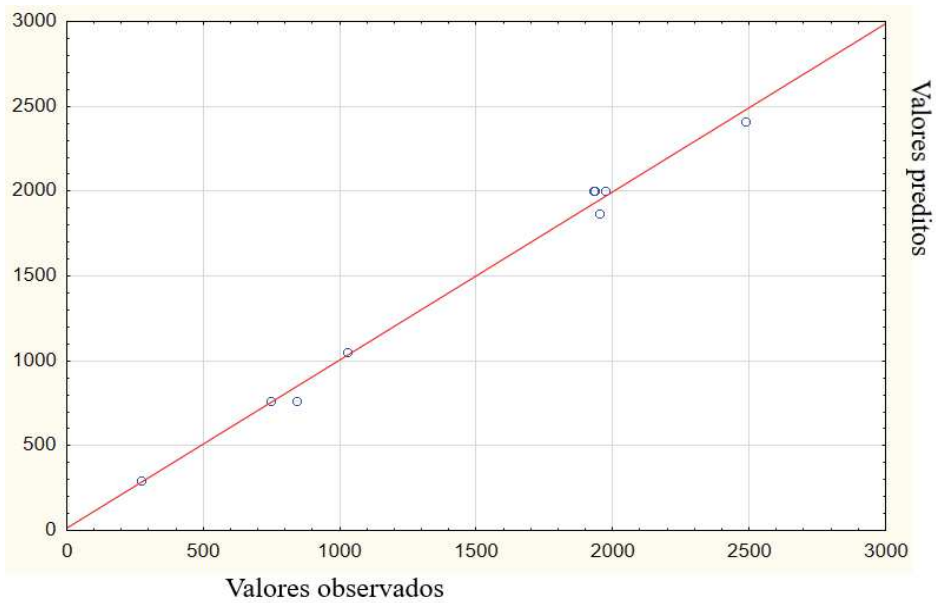
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-9: Diagrama de resíduos para DPPH modelo quadrático.



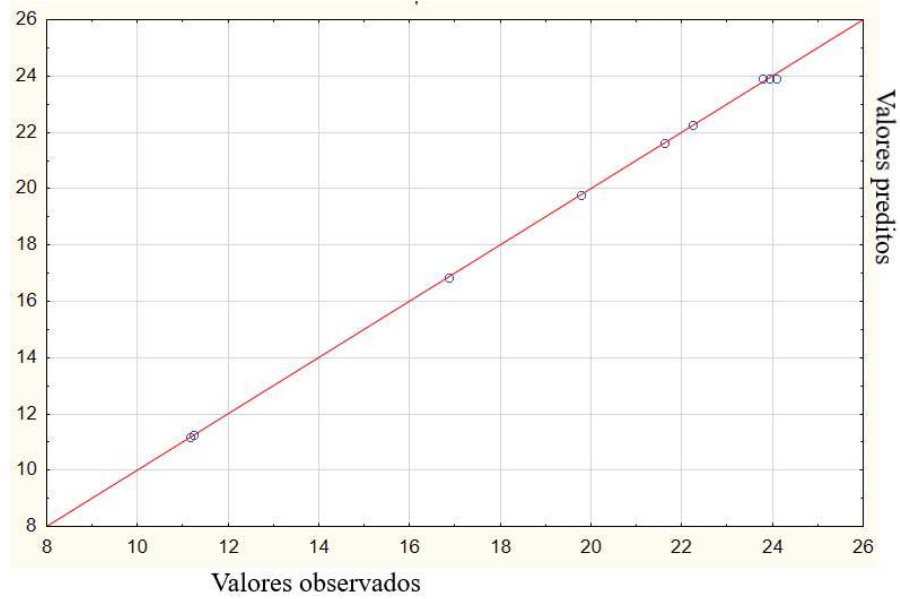
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-10: Diagrama de resíduos para FRAP modelo quadrático.



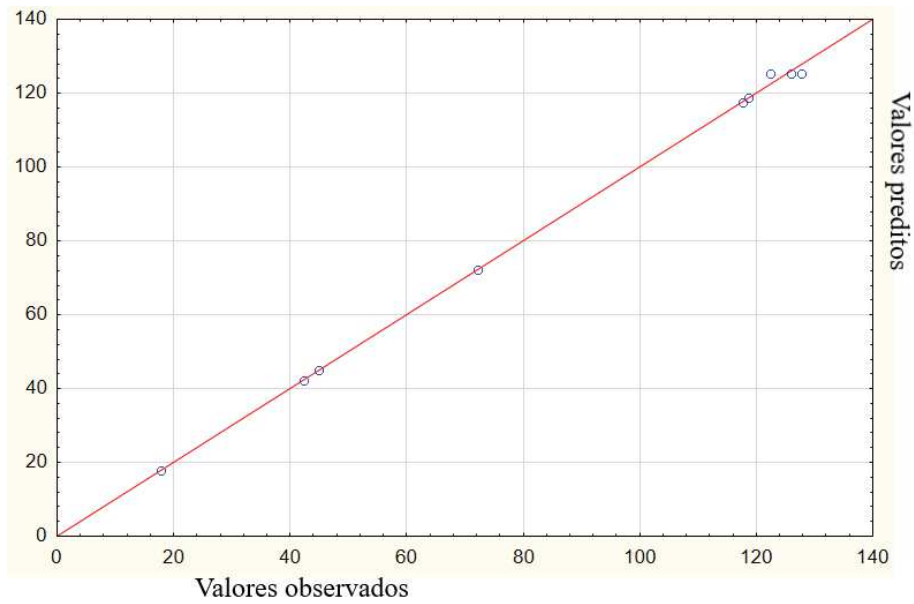
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-11: Diagrama de resíduos para flavonoides modelo especial cúbico.



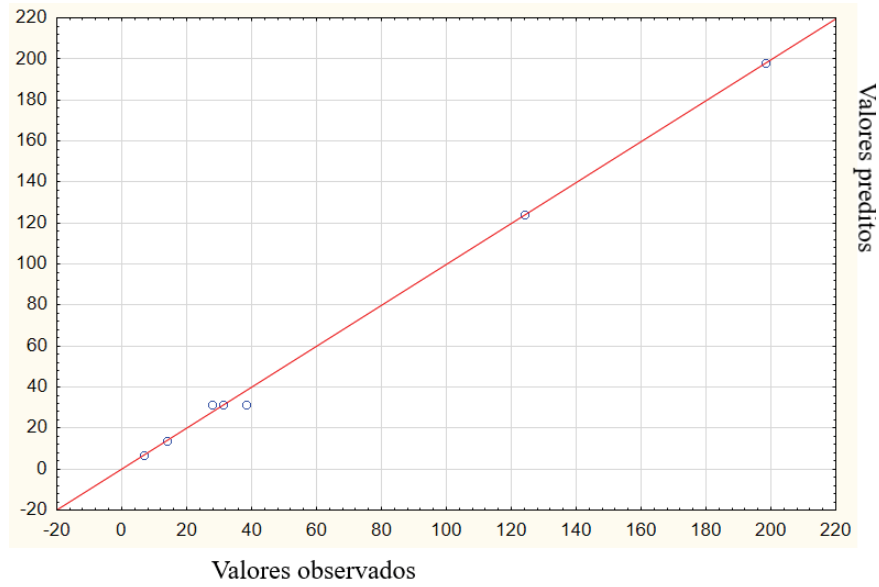
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-12: Diagrama de resíduos para compostos fenólicos modelo especial cúbico.



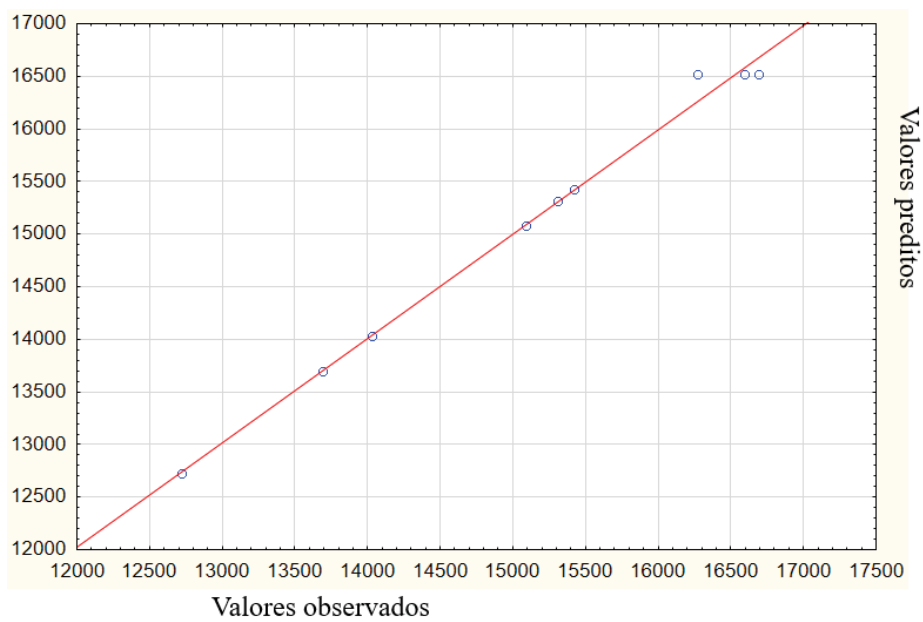
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-13: Diagrama de resíduos para antocianinas modelo especial cúbico.



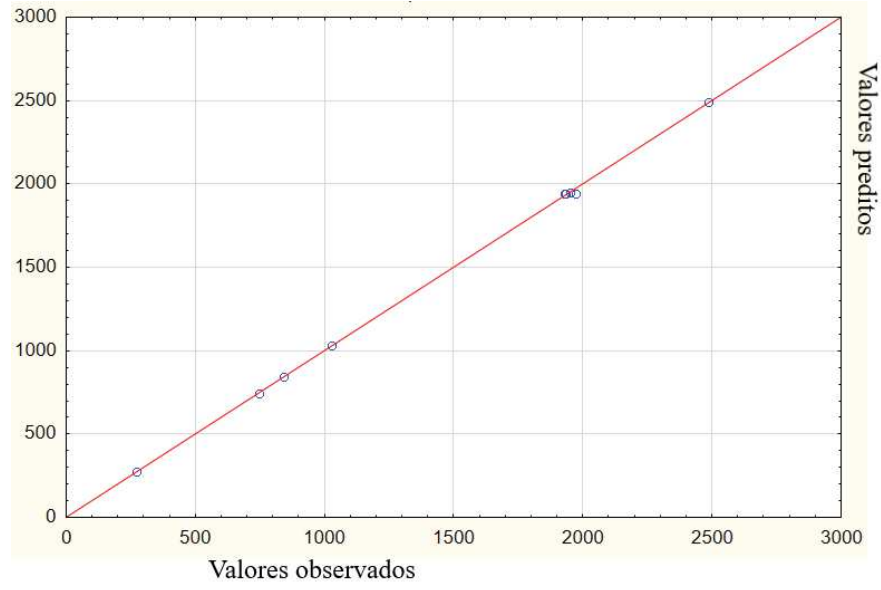
Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-14: Diagrama de resíduos para DPPH modelo especial cúbico.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.

Figura A-15: Diagrama de resíduos para FRAP modelo especial cúbico.



Fonte: Autoria própria, software Statistica versão 10.