EFEITO DO TEMPO E RAZÃO MASSA:SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE EXTRATO DE CASCA DE SEMENTE DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)

Jessyca Ribeiro Willemann (PIBIC/CNPq), Graziela Bragueto Escher, Daniel Granato (Orientador), e-mail: granatod@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área do conhecimento em Ciências Agrárias (5.00.00.00-4) e Subárea em Ciência de Alimentos (5.07.01.00-2)

Palavras-chave: atividade antioxidante, compostos bioativos, delineamento experimental, fruta amazônica.

Resumo

O objetivo do estudo foi maximizar a extração de compostos fenólicos da casca de semente de camu-camu e determinar as propriedades funcionais *in vitro*. Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 para avaliar os efeitos do tempo e razão massa:solvente na extração de compostos bioativos. A composição química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e as propriedades funcionais do extrato otimizado foram analisadas. Os resultados demostraram que o extrato obtido com a razão massa:solvente de 1:34,1 (g/mL) e tempo de 30 min apresentou o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH). A otimização simultânea sugeriu que a razão massa:solvente de 1:34,1 e o tempo de 51,15 min foram as condições ideais para extrair maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante por DPPH. Foram identificados, no extrato otimizado, os compostos químicos: ácidos fenólicos, flavonoides, elagitaninos e estilbeno. O extrato otimizado liofilizado (EOL) demonstrou as propriedades funcionais *in vitro*: atividades antioxidante, antimicrobiana, antidiabética e anti-hipertensiva.

Introdução

O camu-camu (*Myrciaria dubia Kunth McVaugh*), pertencente à família Myrtaceae, é uma planta nativa da floresta Amazônica que cresce de forma selvagem nas margens de rios, lagos ou pântanos da região amazônica. Os frutos são uma importante fonte de vitamina C, β-caroteno e compostos fenólicos (YODA et al, 2010). Durante o processamento dos frutos, as sementes e cascas são descartadas. Estes subprodutos podem apresentar compostos bioativos com alto potencial antioxidante (MYODA et al., 2010). Podendo ocorrer valorização econômica através da exploração desses compostos pelas indústrias alimentícia e cosmética (LIMA et al., 2008).

Estudos prévios (DO CARMO et al., 2019; FIDELIS et al., 2018) acerca da composição química da casca (exocarpo) da semente e semente de camu-camu demonstraram um elevado teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, anti-hipertensiva e potencial antimutagênico. O estudo do efeito do tempo e razão massa:solvente na extração de compostos fenólicos e propriedades funcionais *in vitro* é necessário afim de otimizar as condições experimentais para extração desses compostos bioativos.

Material e Métodos

Amostras de um lote de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) provenientes de Iguape – São Paulo foram analisadas. Onze extratos foram elaborados com a farinha da casca de semente de camu-camu conforme o DCCR 2^2, Tabela 1. As extrações foram realizadas a 45 °C. O extrato otimizado foi liofilizado sob vácuo de 830 µmL Hg. Nos extratos aquosos foram determinados: compostos fenólicos totais (CFT), taninos condensados (TC), capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (CRFC), capacidade sequestradora do radical DPPH, e capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP). No EOL foram quantificados os compostos fenólicos e elagitaninos por CLAE. As análises seguiram as condições experimentais descritas por Fidelis et al., 2018. As propriedades funcionais *in vitro* do EOL analisadas foram as atividades antimicrobiana (CLEELAND & SQUIRES, 1991); antidiabética por meio da inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase, e anti-hipertensiva pela inibição da enzima conversora da angiotensina-I, ECA-I (FERREIRA et al., 2019).

O teste de Brown-Forsythe analisou a homocedasticidade dos dados e análise de variância (ANOVA) unifatorial, seguida do teste de Fisher LSD ($p \leq 0,05$), avaliou as diferenças entre os valores médios. Os efeitos do tempo e razão massa:solvente na extração de compostos bioativos foi realizada por meio da regressão linear múltipla utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR). A metodologia de otimização por meio da função de desejabilidade foi empregada para maximizar a extração de compostos bioativos. O software TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Statistica™ Ltd, USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

Resultados e Discussão

Os resultados da composição química e atividade antioxidante (AA) dos extratos aquosos de casca de semente de camu-camu estão apresentados na Tabela 1. O extrato obtido com a razão massa:solvente de 1:34,1 (g/mL) e tempo de 30 min apresentou o maior teor de CFT e AA (DPPH). Na análise de regressão múltipla, somente os modelos propostos para CFT, TC, e DPPH foram significativos ($p<0.001$), e explicaram acima de 81% ($R^2adj>0.81$) a variabilidade dos dados.

A otimização simultânea sugeriu que a razão massa:solvente de 1:34,1 (g:mL) e o tempo de 51,15 min foram as condições ideais para extrair maiores teores de CFT, TC e AA (DPPH). As amostras foram extraídas nessa nova condição e o extrato otimizado testado usando as metodologias já descritas. Os valores preditos pelos modelos de regressão (Tabela 2) e cálculo do erro absoluto, demonstraram que o extrato otimizado apresentou valores experimentais dentro do intervalo de predição ±95%, mostrando que os modelos gerados podem ser considerados preditivos.

Os compostos químicos identificados e quantificados por CLAE no extrato otimizado de casca de semente de camu-camu foram os ácidos fenólicos: 2,4 dihidroxibenzóico (15,5 mg/100 g), 3,4 dihidroxibenzóico (271,0 mg/100 g), gálico (16,1 mg/100 g), síringico (4,7 mg/100 g,), 2-hidroxicinâmico (0,2 mg/100 g), *para*-cumárico (0,4 mg/100 g), 5-cafeoilquínico (2,8 mg/100 g), cafeico (6,2 mg/100 g), ferúlico (1,3 mg/100 g), além do elágico (2,8 mg/100 g). Os flavonoides quantificados foram a (+)-catequina (30,1 mg/100 g), (-)-epicatequina (30,2 mg/100 g), procianidina A2 (2,7 mg/100 g), quercetina (1,1 mg/100 g), e a rutina (1,7 mg/100 g). Os elagitaninos quantificados foram a vescalagina (4109 mg/100 g) e castalagina (8830 mg/100 g). O estilbeno quantificado foi o *trans*-resveratrol (0,5 mg/100 g).

Tabela 1. Composição química e atividade antioxidante dos extratos aquosos de casca de semente de camu-camu de acordo com o DCCR 2^2

E	Massa: solvente (g/mL)	t (min)	CFT (mg AGE/100 g)	TC (mg CE/100 g)	CRFC (mg AGE/100 g)	DPPH (mg AAE/100 g)	FRAP (mg AAE/100 g)
1	1:10	15	4252±9^{f}	366±15^{g}	2565±127^{e}	4708±24^{f}	4626±94^{e}
2	1:30	15	5418±18^{e}	649±20^{b}	3333 ± 21^{a}	6479±101^{b}	6188±118^{a}
3	1:10	45	4307±98^{f}	382±6^{g}	2495±146^{e}	4755±45^{f}	4233±44^{f}
4	1:10	45	5723±21^{d}	723±5^{a}	3417±128^{a}	6315±101^{c}	5409±186^{bc}
5	1:5,9	30	3130±59^{g}	382±18^{g}	2027±71^{f}	3573±77^{g}	3834±23^{g}
6	1:34,1	30	6786±83^{a}	583±14^{d}	3132±124^{bc}	7806±117^{a}	5261±33^{bcd}
7	1:20	8,85	5781±76^{d}	544±27^{e}	2860±71^{d}	5335±114^{e}	5167±173^{d}
8	1:20	51,15	6072±80^{c}	483±14^{f}	2948±112^{cd}	6212±79^{c}	5432±96^{b}
9	1:20	30	5809±90^{d}	618±15^{bc}	2443±59^{e}	5856±55^{d}	5211±74^{cd}
10	1:20	30	6438±166^{b}	507±6^{f}	3238±96^{ab}	5782±90^{d}	5228±23^{bcd}
11	1:20	30	5750±12^{d}	609±39^{cd}	3363±162^{a}	5767±106^{d}	5323±196^{bcd}
p-Valor (homoscedasticidade)			0,552	0,885	0,964	0,952	0,811
p-Valor (ANOVA fator único)			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: E = ensaios. t = tempo. CFT = compostos fenólicos totais. TC = taninos condensados. CRFC = capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteau. DPPH = capacidade de sequestro do radical DPPH. FRAP = capacidade antioxidante de redução do ferro. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$). AGE = ácido gálico equivalente. CE = catequina equivalente. AAE = ácido ascórbico equivalente.

Tabela 2. Valores preditos e experimentais para o extrato aquoso otimizado de casca de semente de camu-camu

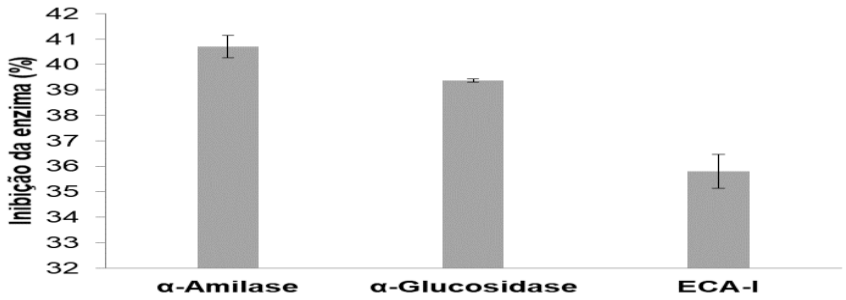
Variáveis de resposta	Valor médio predito	-95% Predição	+95% Predição	Valor experimental	Erro absoluto relativo (%)[1]
CFT	6322	5793	6850	6242 ± 208	1,26
TC	598	494	703	695 ± 24	16,18
DPPH	7321	7029	7614	7350 ± 487	0,39

Nota: [1] Erro absoluto relativo (EAR) foi calculado como EAR (%) = [(valor experimental médio – valor predito médio)/valor predito médio] x 100. CFT = compostos fenólicos totais. TC = taninos condensados. DPPH = capacidade de sequestro do radical DPPH.

O EOL, 2 mg/cavidade, inibiu o crescimento da *L. monocytogenes* (1,19 cm), *P. aeruginosa* (0,89 cm), *S. Typhimurium* (0,89 cm), *S. Enteritidis* (1,05 cm), *B. cereus* (0,88 cm), *E. coli* (1,05 cm), e *S. aureus* (1,15 cm). Somente o crescimento da *S. cerevisiae* não foi inibida pelo EOL, sugerindo que o EOL apresentou atividade antimicrobiana em relação a maioria das cepas de micro-organismos testadas.
A atividade enzimática da α-amilase foi inibida em 40,7 ± 0,44 % com 20 mg/mL do EOL. Para a enzima α-glucosidase, 20 mg/mL do extrato inibiu 39,37 ± 0,06 % da atividade enzimática. O EOL apresentou uma inibição de 35,80 ± 0,66 % na atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I), Figura 1. Fidelis et al. (2018) verificou uma inibição de 28-40 % da ECA-I com diferentes extratos (álcool etílico, água e propanona) de casca de semente de camu-camu.

Figura 1. Atividades inibitórias das enzimas α-amilase, α-glucosidase e ECA-I frente ao extrato otimizado liofilizado de casca de semente de camu-camu

ISSN 1676-0093



Conclusões

Os extratos aquosos de casca de semente de camu-camu apresentaram alto teor de compostos fenólicos e propriedades funcionais *in vitro*. As melhores condições de extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante definidas pela metodologia de otimização foram a razão massa:solvente de 1:34,1 (g:mL) e tempo de 51,15 min. O EOL apresentou alto teor de CFT, TC e AA frente ao radical DPPH. Foram identificados, por meio da CLAE, ácidos fenólicos, flavonoides, elagitaninos e estilbeno. O EOL apresentou as propriedades funcionais *in vitro*: atividades antioxidante, antimicrobiana, antidiabética e anti-hipertensiva.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica. Ao Departamento de química da UEPG e ao C-LABMU pela infraestrutura. À Faculdade de Ciência de Alimentos da UNICAMP por auxiliar nas análises de atividade antimicrobiana.

Referências

CLEELAND, R., SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in 742 experimental animal infections, in: Lorian, V. (Ed.), Antibiotics in Laboratory 743 Medicine. **Lippincott Williams & Wilkins**, third ed., Baltmore, p. 739-787, 1991.

DO CARMO, M. A. V., FIDELIS, M., PRESSETE, C. G., MARQUES, M. J., CASTRO-GAMERO, A. M., MYODA, T., GRANATO, D., & AZEVEDO, L. Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, *125*, 108551, 2019.

FERREIRA, M. V. S., CAPPATO, L. P., SILVA, R., ROCHA, R. S., GUIMARÃES, J. T., BALTHAZAR, C. F., ESMERINO, E. A., FREITAS, M. Q., RODRIGUES, F. N., GRANATO, D., NETO, R. P. C., TAVARES, M. I. B., SILVA, P. H. F., RAICES, R. S. L., SILVA, M. C., & CRUZ, A. G. Ohmic Heating for processing of whey-raspberry flavored beverage. **Food Chemistry**, 125018, 2019.

FIDELIS, M., SANTOS, J. S., ESCHER, G. B., DO CARMO, M. V., AZEVEDO, L., DA SILVA, M. C., PUTNIK, P. & GRANATO, D. *In vitro* antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, myrtaceae) seed coat: a multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 479-490, 2018.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVEZ, A. P. C.; ABREU, C. M. P. A. DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, n. 4, p. 416, 2008.

MYODA, T., FUJIMURA, S., PARK, B., NAGASHIMA, T., NAKAGAWA, J., NISHIZAWA, M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, p. 304-307, 2010.