"EXTRAIR OS COMPONENTES ATIVOS DA SEMENTE DE JABUTICABA *(MYRCIARIA CAULIFLORA)* E ANALISAR AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E CITOTOXICAS"

Taynee Moyse Semkiw (PIBIC), Aline Alves Migliorini (PG), Mariza Boscacci Marques (PQ), Neiva Deliberali Rosso (Orientador), e-mail: ndrosso@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra e Química.

Palavras-chave: Estudos espectroscópicos, conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante.

Resumo

A jabuticaba pertence à família *Myrtaceae* e é um fruto rico em compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. O consumo deste fruto está relacionado à redução do risco de algumas doenças, como o câncer. Neste trabalho foram extraídos os compostos fenólicos das sementes de jabuticaba Sabará e analisou-se estatisticamente os teores obtidos de acordo com as variáveis tempo e temperatura, e também a atividade hemolítica do extrato liofilizado. A partir de um planejamento composto central rotacional 2^2, e uma solução 2:3 acetona/água obteve-se um elevado rendimento para compostos fenólicos e flavonoides, $27{,}82 \pm 1{,}49 \times 10^{-2}$ g equivalentes de ácido gálico (EAG) e $1{,}33 \pm 2{,}06 \times 10^{-3}$ g equivalentes de Quercetina (EQ) por 100 g de semente seca, respectivamente. A atividade antioxidante para estes compostos também foi elevada, $32{,}56 \pm 1 \times 10^{-3}$ g equivalente de ácido ascórbico (EAA) por 100 g de semente. No planejamento, a temperatura e o tempo foram estatisticamente significativos para a extração dos compostos fenólicos, e para atividade antioxidante somente a temperatura. Nas concentrações analisadas o extrato não apresentou propriedades citotóxicas.

Introdução

A jabuticaba do tupi "iapoti kaba", que significa frutas em botão, é um fruto original da região centro-sul do Brasil, pertencente à família *Myrtaceae* (BRUNINI et al., 2004). Cultivada em pequena escala em diversos Estados do país, a espécie de maior abundancia é a jabuticaba Sabará, *Myrciaria jabuticaba,* encontrada nas regiões de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Paraná (COSTA et al., 2013).
De acordo com Lima et al. (2008) juntos a casca e a semente compõem uma fração de 50% da jabuticaba e com exceção de uma pequena parte das sementes, oriundas das frutas processadas, que é utilizada para o preparo de novas mudas, as demais são descartadas como resíduo. As sementes são ricas em compostos fenólicos, como os elagitaninos e apresentam elevada capacidade antioxidante e inúmeros benefícios para a saúde. O aproveitamento da semente para obter novos produtos agregaria valor econômico à fruta (HACKE et al., 2016). Estudos mostram que a extração de compostos fenólicos depende dos constituintes, temperatura e do solvente (REZENDE, 2010). Dentre os solventes, metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetil formaldeído e suas combinações foram eficientes para a extração, enquanto a temperaturas pode variar de 20 a 80 ºC. Os compostos

fenolicos isolados das sementes apresentaram atividade antibiótica, anti-HIV e antiproliferativa (REYNERTSON et al., 2006).

Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore) e os reagentes utilizados foram ácido gálico, reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH (Sigma), carbonato de sódio, cloreto de alumínio hexahidratado e ácido clorídrico (Merck).

2.2. Métodos

2.2.1 Preparação das amostras e extração dos compostos fenólicos totais

Os frutos maduros da jabuticaba Sabará coletados no município de Rebouças/PR foram higienizados e as sementes separadas da polpa. As mesmas foram secas em ausência de luz, a temperatura ambiente durante 15 dias e trituradas em um moinho analítico (Quimis-628A21). As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, a 4 ºC. Os compostos fenólicos foram extraídos por um planejamento composto central rotacional 2^2 nas temperaturas de 15.9, 20, 30, 40 e 44.1 ºC, e tempos de 5.86, 10, 20, 30 e 34.14 min. Amostras de 0,5 g das sementes foram misturadas com 15 mL da solução extratora, 2:3 acetona:água, em uma cela termostatizada, sob agitação constante.

2.2.3 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos foi determinado em triplicata, de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Os flavonoides foram quantificados em triplicata em 425 nm com uma curva padrão de quercetina (y = 20967,90494 x - 0,0646 R^2 = 0,9929). A atividade antioxidante por DPPH foi determinada em triplicata de acordo com Brand-Williams et al. (1995) e os resultados expressos g EAA/100 g de semente, a partir de curva padrão de ácido ascórbico (y =13697,91667x + 0,80472 R = 0,99957). A análise das variáveis independentes para a extração dos compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante foram realizadas com o programa STATISTICA ® 12,6.

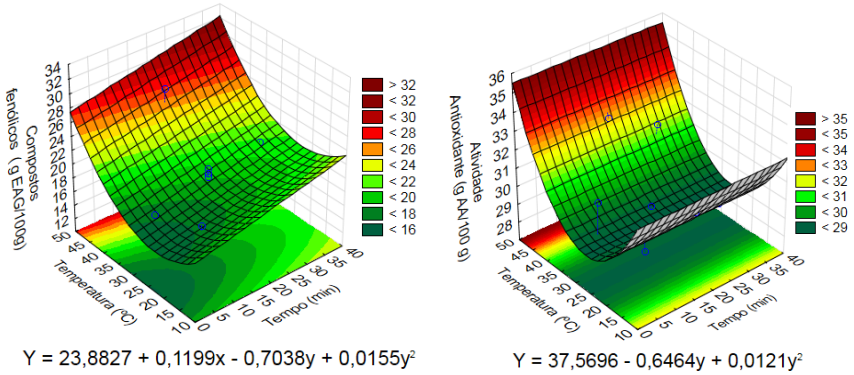
2.2.4 Determinação da hemólise

A partir do extrato liofilizado da semente de jabuticaba a atividade anti-hemolítica foi determinada segundo Freitas et al. (2008), com algumas modificações. Amostras de sangue do tipo O^+, de três indivíduos diferentes, foram cedidos pelo Hospital Universitário Regional Wallace Thadeu de Mello e Silva, Ponta Grossa, Brasil. A hemólise foi determinada em triplicata em 576 nm, pela dosagem de hemoglobina.

Resultados e Discussão

O conteúdo de compostos fenólicos variou estatisticamente ($p<0,0001$) de 17,36 ±1 x 10^{-3} a 27,82 ± 1,49 x10^{-2} g EAG/100 g de semente, observando-se o maior teor para a extração de 20 min à 44,1 °C e o menor em 34,14 min à 30 °C. O teor de flavonóides variou estatisticamente ($p<0,0001$) de 0,88 ± 2,07 x1 0^{-3} a 1,33 ± 2,06 x 10^{-3} g EQ/100 g de semente, obteve-se o maior conteúdo na extração em 5,86 min a 30 °C e o menor em 20 min à 44,1 °C. A atividade antioxidante variou

estatisticamente ($p<0,0001$) de 28,14 ± 3,84 x 10^{-2} a 32,56 ± 1 x 10^{-3} g EAA/100 g de semente. Onde a maior atividade foi observada na condição de 20 min à 44,1 °C.
A partir das variáveis de resposta, analisou-se o efeito do tempo e da temperatura para obter a melhor condição experimental. Os respectivos modelos matemáticos foram obtidos, Figura 1, e os mesmos foram avaliados segundo a ANOVA com nível de confiança de 95%. Verificou-se que não houve falta de ajuste ($p_{Lack\ of\ Fit}$ = 0,1144) para extração de compostos fenólicos, sendo a temperatura e o tempo linear, e a temperatura quadrática estaticamente significativos (R_{adj} = 0,7117). Enquanto que para os flavonoides ($p_{Lack\ of\ Fit}$ = 0,9575) nenhuma das variáveis, tanto no modelo linear como no quadrático foram significativas (R_{adj} = 0,6987). E para atividade antioxidante ($p_{Lack\ of\ Fit}$ = 0,1541), apenas a temperatura no modelo linear e quadrático foram estatisticamente significativas (R_{adj} = 0,6311).



$Y = 23,8827 + 0,1199x - 0,7038y + 0,0155y^2$ $Y = 37,5696 - 0,6464y + 0,0121y^2$

Figura 1 – Curvas de superfície de resposta para compostos fenólicos e atividade antioxidante.

A partir da análise observou-se que os valores de resíduos para os compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante seguem a normalidade, segundo o teste de Shapiro-Wilk, com os respectivos valores de p = 0,9331, p = 0,1544 e p= 0,2102. Com a função de desejabilidade (100 iterações), obteve-se o tempo de 34,14 min, e temperatura de 44,1°C, condição ótima para a extração do maior conteúdo de compostos fenólicos.
Os resultados para a determinação das propriedades citotóxicas da semente de jabuticaba em sangue humano seguidos dos respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela 1. A partir das análises estatísticas observou-se que os extratos nas concentrações aplicadas não apresentaram toxicidade frente a eritrócitos, pois a porcentagem no meio isotônico, tampão 0,9%, não difere estatisticamente da hemólise mecânica. Em meio hipotônico, tampões 0,4% os eritrócitos foram protegidos da hemólise hipotônica, independente da concentração do extrato, pois a porcentagem de hemólise com 50 µg/mL e 100 µg/mL de extrato não diferiu estatisticamente da taxa de hemólise na ausência de extrato.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) para as variáveis de respostas analisadas.

Meio	Concentração	Média da hemólise
Tampão 0,4%	[HM] 0 µg/mL	74,53 ± 4,57 [a]
	[] 50 µg/mL	66,66 ± 7,66 [a]
ANOVA p<0.05	[] 100 µg/mL	62,52 ± 5,55 [a]
Tampão 0,9%	[HM] 0 µg/mL	0,45± 5,0 x 10^{-2} [a]
	[] 50 µg/mL	0,42± 1,4 x 10^{-1}[a]
ANOVA p<0.05	[] 100 µg/mL	0,37± 1,6 x 10^{-1}[a]

Conclusões

Conclui-se que o planejamento composto central rotacional 2^2, com as variáveis independentes tempo e temperatura, foi uma ferramenta eficaz, pois possibilitou a extração de um maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides presentes na semente da jabuticaba Sabará. Esses compostos apresentaram elevada atividade antioxidante, e também o extrato liofilizado não apresentou propriedades citotóxicas na análise da atividade hemolítica. Conclui-se que a semente de jabuticaba, considerada um resíduo agroindustrial, é uma fonte rica em compostos fenólicos e um potente antioxidante natural.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de estudos concedidas, a Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade para a realização deste trabalho.

Referências

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie,** v.28, p. 25-30, 1995.

BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Influência de embalagens e temperatura de armazenamento de jabuticabas (Myrciaria jabuticaba (Vell) Berg) cv 'Sabará'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378-383, 2004.

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of functional food**, v.5, p. 539-549, 2013.

FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M.; HUSS, J. C. C.; SOUZA, T. M. T.; COSTA, J. O.; FIRMINO, A. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

HACKE, A. C. M.; GRANATO, D., MACIEL, L. G.; WEINERT, P. L.; PRADO-SILVA, L. D.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANA, A.S.; BATAGLION, G. A.; EBERLIN, M. N.; ROSSO, N. D. Jabuticaba (Myrciaria cauliflora) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds. **Journal of food science**, v. 81, n. 9, p. C2206-C2217, 2016.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREU, C. M. P.; DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jabuticaba (Myrciaria cauliflora Berg) e de suas frações. **Archivos latino-americanos de nutricion**, v.58, n.4, p. 416-421, 2008.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (Myrciaria cauliflora). **Journal Natural Products**, n. 69, p. 1228-1230, 2006.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia.** 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

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