

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VITÓRIA DE CASSIA MAURINO FREITAS

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE CAMBÚ ROXO (*Eugenia
candolleana*) POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

BURI - SP

2021

VITÓRIA DE CASSIA MAURINO FREITAS

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE CAMBÚ ROXO (*Eugenia candolleana*) POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beatriz Mello
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Martin do Prado

BURI - SP

2021

VITÓRIA DE CASSIA MAURINO FREITAS

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE CAMBÚ ROXO (*Eugenia candolleana*) POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos pela
Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Beatriz Mello
(Orientadora)

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Juliana Martin do Prado.
(Co-orientadora)

Universidade Federal do ABC (UFABC)

Prof^a. Dr^a. Priscilla Siqueira Melo

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho a minha família, amigos e todos os docentes que já fizeram parte da minha vida acadêmica e que me ensinaram tanto até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por ter me dado todo o aporte necessário pra chegar até aqui, principalmente aos meus pais, Carmen e Timotheo e ao meu irmão José Augusto.

Sou eternamente grata à toda a comunidade da Campina do Monte Alegre, uma cidade que me acolheu imensamente e fez parte da minha história. Aos meus amigos, Luis Henrique, Gabriela Almeida e Jaine Gomes que fizeram dos dias na Campina os mais inesquecíveis e mais alegres e ao meu namorado Rafael que fez tudo se tornar mais especial.

Agradeço também aos meus professores da Universidade Federal de São Carlos, em especial, a Juliana Martin do Prado e a Beatriz Mello, que me auxiliaram no trabalho de conclusão de curso e que sempre foram profissionais inspiradoras.

Resumo

Devido à vasta riqueza de fauna e flora do País, o Brasil detém inúmeras variedades de produtos naturais. Contudo, esse acervo é pouco estudado, fazendo com que os benefícios de diversas espécies sejam ignorados. Com base nessa preocupação, estudos de compostos bioativos de vegetais são de grande importância e mostram-se uma vertente promissora para a elaboração de novos produtos. Dentre as variadas espécies vegetais nativas brasileiras pouco estudadas, encontra-se o cambuí roxo (*Eugenia candolleana*). O fruto possui grande potencial para compostos de interesse, além de possuir um elevado teor de vitamina C, sendo notável seu interesse industrial. As metodologias de extração por hidrodestilação, extração assistida por ultrassom, Soxhlet, percolação e agitação foram aplicadas no decorrer de 120 min, utilizando-se etanol como solvente. Os métodos foram avaliados com relação ao rendimento bruto, polifenóis totais e atividade antioxidante. No método de hidrodestilação não obteve-se resultados satisfatórios, enquanto que a extração via Soxhlet apresentou maior rendimento (66%). Devido às diferenças observadas em cada análise, o melhor método de extração dependerá de seu objetivo final: maior rendimento (extração a quente); ou maior concentração de compostos fenólicos (Soxhlet e agitação).

Palavras-chave: Extração, Compostos bioativos, Cambuí roxo (*Eugenia candolleana*).

ABSTRACT

Due to the vast wealth of fauna and flora in the country, Brazil has a wide variety of natural products. However, this collection is poorly studied, ignoring the benefits of several species. Based on this concern, studies of bioactive compounds in vegetables are of great importance and show a promising trend in the development of new products. Among the varied Brazilian native plant species that have been little studied, there is the rainforest plum (*Eugenia candolleana*). The fruit has great potential for compounds of interest, in addition to having a high vitamin C content, and its industrial interest is notable. The methodologies of extraction by hydrodistillation, ultrasound assisted extraction, Soxhlet, percolation and agitation were applied in the course of 120 min, using ethanol as solvent.. In the hydrodistillation method, satisfactory results were not obtained, while extraction via Soxhlet resulted in a higher yield (66%). Due to the differences observed in each analysis, the best extraction method will depend on your final objective: higher yield (hot extraction); or higher concentration of phenolic compounds (Soxhlet and consolidated).

Keywords: Extraction, Bioactive compounds, Rainforest plum (*Eugenia candolleana*).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rendimento dos extratos	21
Figura 2 - Placa de CCD utilizando fase móvel 1, revelada com NP e observada sob luz visível (a), UV-254 (b) e UV-365 (c).....	22
Figura 3 - Placa de cromatografia em camada delgada utilizando fase móvel 2, revelada com anisaldeído.	23
FONTE: Elaborada pelo próprio autor.....	23
Figura 4 - Placa de CCD utilizando fase móvel 3, revelada com anisaldeído e observada sob luz visível (a), UV-254 (b) e UV 365 (c).	24
FONTE: Elaborado pelo próprio autor.....	24
Figura 5 – Compostos fenolicos totais do extrato de cambuí roxo obtido por diferentes métodos de extração (mg EAG/g extrato)	25
Figura 6 - Compostos fenolicos totais do extrato de cambuí roxo obtido por diferentes métodos de extração (mg EAG/g MP).....	25
Figura 7 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes metodologias de extração	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes de compostos a serem avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD).....	18
Tabela 2 - Umidade do cambuí roxo.	20

SUMÁRIO

1. Introdução e Justificativa	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Metodologia	14
3.1. Origem das amostras	14
3.2. Preparo e armazenagem.....	15
3.3. Caracterização da matéria-prima	15
3.4. Métodos de extração.....	15
3.4.1. Agitação.....	15
3.4.2. Soxhlet.....	15
3.4.3. Hidrodestilação.....	16
3.4.4. Extração assistida por ultrassom	16
3.4.5. Percolação.....	16
3.5. Remoção de solventes dos extratos	16
3.6. Análise dos extratos	17
3.6.1. Rendimento dos extratos	17
3.6.2. Cromatografia em camada delgada.....	17
3.6.3. Determinação de polifenóis totais.....	18
3.6.4. Determinação da atividade antioxidante	19
4. Resultados e Discussão	20
4.1. Umidade da matéria-prima.....	20
4.2. Rendimento dos extratos obtidos.....	20
4.3. Cromatografia em camada delgada	21
4.3.1. Flavonoides	21
4.3.2. Antocianinas, princípios amargos e saponinas.....	22
4.4. Polifenóis totais nos extratos.....	24
4.5. Atividade antioxidante dos extratos.....	26
5. Conclusão.....	27
Referências	28

1. Introdução e Justificativa

Bioativos naturais, extraídos de plantas, têm sido comumente utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. O Brasil detém a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, sendo irrefutável, portanto, sua riqueza de fauna e flora (PINTO et al., 2002). Munido deste acervo de produtos naturais, é considerável a vantagem de se estudar novas matérias-primas e os usos que estas podem proporcionar.

Estudos evidenciam que o uso de aditivos sintéticos pode provocar, a longo prazo, alterações clínicas, complicações no metabolismo e efeitos carcinogênicos, com isso, aditivos naturais vem sendo uma boa opção para substituição dos sintéticos (BOTREL et al., 2007; SOUZA et al., 2019). Em vista disso, a pesquisa de produtos naturais de origem vegetal aumenta gradativamente ao passar dos anos, resultado da preocupação dos consumidores com a dieta e ingestão de produtos percebidos como saudáveis (BOTREL et al., 2007).

Segundo Silva et al. (2010), o alto consumo de produtos vegetais está relacionado com diminuição no risco de uma série de doenças e a explicação para isto é a presença de compostos antioxidantes nestes alimentos. Dentre esses compostos, alguns dos que se destacam são as vitaminas, os carotenoides e os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (SILVA et al., 2010). Esses materiais bioativos são de interesse para aplicação tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica e cosmética. Na indústria de alimentos desempenham papel como corantes e conservantes naturais, além da possibilidade de conferir sabor e aroma (PRADO, 2016).

Segundo Angelo e Jorge (2007), os compostos fenólicos são estruturas químicas que possuem hidroxilas e anéis aromáticos, configurando assim seu poder antioxidante. Dentre os compostos fenólicos, ressaltam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis.

Para a produção desses extratos, dentre os métodos encontram-se: Soxhlet, hidrodestilação, agitação, extração assistida por ultrassom e percolação. Tais métodos são considerados limpos, dependendo da escolha do solvente, devido à sua preocupação ambiental. O melhor método de extração varia de acordo com a matéria-prima e com os compostos alvos (ROSTAGNO & PRADO, 2013). A utilização do etanol como solvente nas extrações apresenta

vantagens frente a outros solventes orgânicos, por sua toxicidade ser inferior e sua produção ser elevada no País. Dessa maneira, é justificável o uso deste em metodologias ambientalmente corretas (RODRIGUES, 2011).

O avanço dos métodos de extração possibilitou a utilização desses solventes menos agressivos, usando-os em menor quantidade. Essas novas técnicas são uma alternativa para o progresso da chamada “química verde” (CAVALHEIRO, 2013).

A extração via Soxhlet é considerada referência em escala laboratorial, podendo utilizar-se de um ou mais solventes, onde, majoritariamente, os componentes de interesse possuem maior ponto de ebulição do que o líquido extrator (SANTOS, 2011). Em contrapartida, no meio industrial, utiliza-se, em grande parte, o método de agitação, que se desenvolve a partir de agitação mecânica com possibilidade de aquecimento da solução.

A extração efetuada por meio de Soxhlet é considerada referência devido ao seu alto rendimento comparado com o uso de solvente, visto que há constante reciclo do mesmo e não é necessário grandes volumes para que a extração seja eficiente. Entretanto, pode ocorrer degradação nos extratos devido a utilização de meio de extração a quente, já que alguns compostos são termicamente sensíveis (FILHO, 2015; SOUZA; LEITE, 2019).

Quanto ao método de agitação citado anteriormente, o mesmo possui variações de rendimento de acordo com os tamanhos das partículas do soluto a ser extraído, visto que esse fator influencia a cinética da extração, ou seja, partículas pequenas podem induzir uma quantidade superior de extrato com a mesma quantidade de solvente (BORGES et al., 2017).

Outra alternativa é a extração via percolação, que permite a lavagem constante do material sólido pela mistura de solvente + extrato, a qual é constantemente enriquecida com extrato. No método de percolação, há economia do solvente e diminuição do tempo de extração, e é de extrema vantagem em processos com fármacos ativos, além disso, por ser um procedimento a frio, auxilia na menor perda por degradação térmica dos compostos de interesse (MIYAKE, 2018).

Apesar da notória eficiência desses métodos, viu-se a necessidade de se empregar métodos tecnológicos mais eficientes e não convencionais de extração, como extração assistida por ultrassom (CAVALHEIRO, 2013). O

ultrassom é uma onda mecânica que se propaga nos meios. A propagação desta facilita a difusão do solvente na amostra e a combinação do aumento da temperatura com a onda faz com que ocorra um aumento da eficiência da extração (CAVALHEIRO, 2013). Além disso, essas ondas de baixa frequência resultam no fenômeno chamado cavitação, que consiste no surgimento e colapso de bolhas em áreas com elevada pressão e temperatura, facilitando o processo de extração devido ao dano físico causado à parede celular da matéria-prima (FREITAS et al., 2014).

Outro método bastante utilizado em extrações, porém mais especificamente de óleos essenciais é a hidrodestilação, onde o material fica completamente submerso em água e seus compostos voláteis são arrastados pelo vapor e condensados sob forma de óleo (GOMES, 2003).

Para a extração de compostos bioativos, dentre as inúmeras espécies vegetais nativas brasileiras pouco estudadas, encontra-se o cambuí. Dentro desta espécie há inúmeras variações, que podem ser diferenciadas pela coloração de seus frutos (SILVA et al., 2009). O cambuí pertence à Família Myrtaceae e é uma espécie nativa do Brasil, ocorrendo do Maranhão ao Rio Grande do Sul, podendo se estender até a Argentina (SILVA et al., 2009). O cambuí roxo, destaca-se por sua coloração, seu teor de sólidos-solúveis e vitamina C (SILVA et al., 2009). Com nome científico *Eugenia candolleana*, o cambuí roxo pode ser conhecido popularmente como ameixa de Joinville ou cereja preta, é uma espécie arbustiva, pertencente aos angiospermae, já que apresenta flores, frutos e sementes (MUNIZ, 2008).

Estima-se que é frutífera nos meses de março a maio e pode alcançar até 4 metros de altura, possuindo copa arredondada, cônica e densa. Seus frutos são muito apreciados e suas sementes podem ser empregadas em receitas de bolos ou aplicadas na fabricação de sucos, sorvetes e geleias (MUNIZ, 2008). Tal diversificação de uso é o que chama a atenção para ampliar os estudos sobre o vegetal (MUNIZ, 2008).

Em estudos do fruto verificou-se que o mesmo é uma boa fonte de fibras e seus ácidos graxos são, em grande parte, insaturados. A polpa da fruta, contém elevado teor de ácido cítrico e riboflavina (vitamina B2), além de antocianinas, compostos fenólicos, flavonoides e taninos (SOARES, 2019; RADAELLI et al., 2018; SANTOS, 2015).

Com relação a atividade antioxidante do cambuí roxo, ela pode ser encontrada tanto na polpa quanto nas sementes, sendo mais presente nos extratos das sementes (SOARES, 2019; SANTOS, 2015).

A fim de aumentar o conhecimento sobre este fruto nativo brasileiro é necessário estudar diferentes aspectos de seu potencial. Isso contribuirá para o avanço de novos produtos à base do vegetal, agregando valor a esta matéria-prima pouco conhecida.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo aplicar diversos métodos de extração para a obtenção de possíveis componentes bioativos de interesse comercial, utilizando tecnologias ambientalmente corretas.

2.2. Objetivos específicos

- Aplicar diferentes métodos de extração à polpa de cambuí roxo, a saber, Soxhlet, extração assistida por banho de ultrassom, hidrodestilação, percolação e agitação;
- Fazer varredura das possíveis classes de compostos presentes nos extratos;
- Verificar a presença de compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante nos extratos obtidos.

3. Metodologia

3.1. Origem das amostras

As amostras (3Kg) do cambuí roxo foram adquiridas no Sítio Frutas Raras, localizado na cidade de Campina do Monte Alegre (SP). O Sítio detém mais de 1300 espécies, tendo como principal objetivo o consumo próprio e o auxílio nas pesquisas científicas (MUNIZ, 2008).

3.2. Preparo e armazenagem

O cambuí roxo foi despulpado manualmente e posteriormente seco. A secagem foi feita em estufa com circulação de ar forçado a 50°C no decorrer de 72 horas, até umidade inferior a 20%. A umidade foi medida a cada 12h com uma balança determinadora de umidade por infravermelho e (Marte, ID200, Belo Horizonte, Brazil). As polpas já secas foram trituradas em moinho de facas e mantidas em *freezer* (-18°C) até sua utilização nos experimentos de extração.

3.3. Caracterização da matéria-prima

Amostras seca e *in natura* foram caracterizadas quanto a sua umidade por uma balança determinadora de umidade por infravermelho (Marte, ID200, Belo Horizonte, Brazil). As análises foram realizadas em triplicata.

3.4. Métodos de extração

Para todos os métodos de extração utilizou-se o etanol como solvente, exceto na extração por hidrodestilação. A temperatura ambiente local foi de aproximadamente 30°C e a proporção entre solvente (v) e matéria-prima (m) foi mantida em 10:1 (v/m) em todos os métodos de extração.

3.4.1. Agitação

Em um béquer, foi introduzida a matéria-prima já seca juntamente com o etanol, em uma proporção de solvente para matéria-prima de 10:1 (v/m). Foi adicionada uma barra magnética à solução no béquer. Posteriormente, a mistura foi sujeita a agitação magnética a frio durante 120 min. Os extratos foram filtrados através de papel filtro sobre um funil de Büchner acoplado a bomba de vácuo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4.2. Soxhlet

A matéria-prima já pesada foi introduzida em um cartucho de papel filtro, e este inserido no aparelho Soxhlet que foi acoplado a um balão de fundo redondo contendo etanol. A proporção S/F foi de 10:1 (v/m). A extração foi executada durante 120 min, à temperatura de ebulição do etanol (~78 °C) a pressão ambiente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4.3. Hidrodestilação

A matéria-prima foi colocada juntamente com água em um aparelho de hidrodestilação do tipo Clevenger, em proporção de S/F de 10:1 (v/m). Neste tipo de extração, a amostra permanece imersa na água, a água evapora, arrasta os componentes voláteis da amostra e o vapor com o extrato passam por um condensador onde são condensados e posteriormente separados pela diferença de densidade. Essa técnica foi aplicada durante 120 min, em duplicata.

3.4.4. Extração assistida por ultrassom

Em um Erlenmeyer foram adicionados a amostra e o etanol em proporção de S/F de 10:1 (v/m). A técnica foi realizada em intervalos de tempo de 30 e 120 min, pela imersão da vidraria em um banho de limpeza de ultrassom operando a 40kHz. A temperatura da água foi monitorada com termômetro e mantida constante (30°C) através da inserção de água destilada fresca no banho.

A filtração do extrato foi realizada através de um papel filtro sobre um funil de Büchner conectado a bomba de vácuo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4.5. Percolação

A matéria-prima foi disposta em cartucho de papel filtro inserido em uma coluna de vidro, através da qual percolou o solvente. O solvente utilizado foi o etanol em proporção S/F de 10:1 (v/m). Neste método, a solução extrato foi continuamente recirculada e enriquecida em extrato utilizando uma bomba peristáltica (Tecnopon, LAP-101-3, Piracicaba, Brasil). Os experimentos foram realizados em duplicata durante 120 min.

3.5. Remoção de solventes dos extratos

A remoção do etanol foi realizada utilizando um evaporador rotativo operando a 0,1 bar e 40°C durante 3h. Quanto a extração por hidrodestilação, o próprio solvente (água) foi separado do extrato por destilação, fazendo com que se separem pela diferença de densidade.

3.6. Análise dos extratos

3.6.1. Rendimento dos extratos

Após a obtenção de todos os extratos, obteve-se os rendimentos dos mesmos, ou seja, será possível a determinação do melhor método de extração na recuperação de extrato bruto. Esse rendimento bruto será calculado com relação a quantidade de extrato após a evaporação do solvente.

Basicamente os extratos eram pesados após a evaporação do solvente, neste caso etanol, posteriormente seu valor em gramas era comparado com o peso do soluto anteriormente a extração, e então a conta de porcentagem de extração foi feita com 100% sendo o peso inicial da matéria-prima.

Como os ensaios serão feitos em duplicada, com a amplitude dos métodos será possível a determinação da melhor metodologia quanto ao rendimento bruto. Esse rendimento bruto não está relacionado com a bioatividade dos extratos, mas sim com a quantidade de extrato obtida.

3.6.2. Cromatografia em camada delgada

Para a detecção da presença de diferentes classes de compostos nos extratos foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD) como um método de análise qualitativa de varredura. Foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio recobertas com sílica-gel sensíveis a luz UV. Três gotas das soluções de amostras diluídas em etanol (20 mg/mL) foram aplicadas com auxílio de capilar. A placa foi inserida em cuba de vidro contendo diferentes fases móveis, de acordo com a Tabela 1. A solução reveladora de anisaldeído foi preparada com 0,5 mL de p-anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, adicionados nesta ordem. A solução reveladora de 2-aminoetil-difenilborinato (NP) foi preparada com 1 g de 2-aminoetil-difenilborinato em 100 mL de metanol (WAGNER e BLADT, 2001).

Tabela 1 - Classes de compostos a serem avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

Classe de compostos	Fase móvel	Revelação	Observação
Flavonoides	1) hexano: acetato de etila (70:30, v/v)	Reagente NP	Luz visível, luz 254 e luz 365
Antocianinas	2) n-butanol ácido acético glacial: água destilada (50:10:20, v/v/v)	Solução de anisaldeído e aquecimento a 100°C por 10 min	Luz visível, luz 254 e luz 365
Princípios amargos, pungentes e saponinas	3) clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8, v/v/v/v)	Solução de anisaldeído e aquecimento a 100°C por 10 min	Luz visível, luz 254 e luz 365

FONTES: WAGNER e BLADT, 2001.

3.6.3. Determinação de polifenóis totais

Foi empregado o método do reagente de Folin-Ciocalteu para estabelecer a quantidade de fenóis totais nos extratos obtidos. Tal método é descrito por SINGLETON e ROSSI (1965), com algumas modificações para extratos vegetais (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

Uma solução estoque foi preparada de forma que 0,25 g de ácido gálico foram dissolvidos em 5 mL de etanol em um balão volumétrico de 50 mL, completando o restante com água. Subsequentemente foram preparadas as soluções de calibração para a construção da curva padrão em balões volumétricos de 10 mL, diluindo com água destilada, frações da solução estoque para a obtenção de concentrações de ácido gálico iguais a 0,05; 0,025; 0,015; 0,01 e 0,005 mg/mL. As amostras foram diluídas em etanol em concentração de 10 mg/mL. Subsequente a isto, foi feita uma diluição de 1:10 do reagente de Folin-Ciocalteu em água destilada. Para a solução de carbonato de sódio anidro a diluição foi feita com água destilada até a concentração final de 75 mg/mL. Etanol foi usado como controle (VEGGI, 2013).

Anteriormente às reações, novas diluições das soluções de calibração foram feitas (1:10). As reações foram realizadas combinando 2 mL dessas novas diluições das soluções de calibração com as soluções de amostras ou o controle com 10 mL da solução do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 min foram inseridos 8 mL da solução de carbonato de sódio. Posteriormente a estes procedimentos, as amostras foram colocadas em banho térmico a 50°C por 5 min e logo depois a absorbância foi lida em um espectrofotômetro UV-vis utilizando comprimento de onda de 760 nm. A concentração total de compostos fenólicos nos extratos foi calculada em equivalentes de ácido gálico (VEGGI, 2013).

3.6.4. Determinação da atividade antioxidante

A técnica utilizada para determinar a atividade antioxidante foi o método de Hammerschmidt e Pratt (1978) com adaptações.

O substrato foi elaborado utilizando 10 mg de β -caroteno, 10 mL de clorofórmio, 60 mg de ácido linolênico e 200 mg de Tween 80. A solução foi concentrada em um evaporador rotativo com controlador de vácuo a 50°C e 470 mba de vácuo. Posteriormente, a diluição se deu adicionando 50 mL de água destilada. A reação foi realizada utilizando 1 mL de substrato com a adição de 2 mL de água destilada e 0,05 mL de extrato diluído em etanol (0,02 g extrato/mL etanol). Na amostra controle foi usado etanol puro no lugar do extrato diluído. A mistura foi colocada em banho maria a 40°C e a evolução da reação foi controlada usando espectrofotômetro em 0, 1, 2, e 3 h de experimento (SILVA, 2018). A leitura foi realizada na absorbância de 470 nm. A atividade antioxidante foi calculada através da Equação 1 (SKERGET et al., 2005):

$$AA = 100 \times \left(1 - \left[\frac{abs_{extrato}^{t=0} - abs_{extrato}^t}{abs_{controle}^{t=0} - abs_{controle}^t} \right] \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

AA = atividade antioxidante (%);

$abs_{extrato}^{t=0}$ = absorbância do extrato no início da reação (t=0);

$abs_{extrato}^t$ = absorbância do extrato no tempo de reação t onde t = 1, 2 ou

3 horas;

$abs_{controle}^{t=0}$ = absorbância do controle no início da reação (t=0);

$abs_{controle}^t$ = absorvância do controle no tempo de reação t onde t = 1, 2 ou 3 horas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Umidade da matéria-prima

A umidade da matéria-prima está apresentada na Tabela 2. O teor de umidade mensurado da fruta *in natura* foi de 82%.

Tabela 2 - Umidade do cambuí roxo.

Componente	Umidade
Polpa <i>in natura</i>	82% ± 3,0
Polpa seca	3,1% ± 0,4

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

4.2. Rendimento dos extratos obtidos

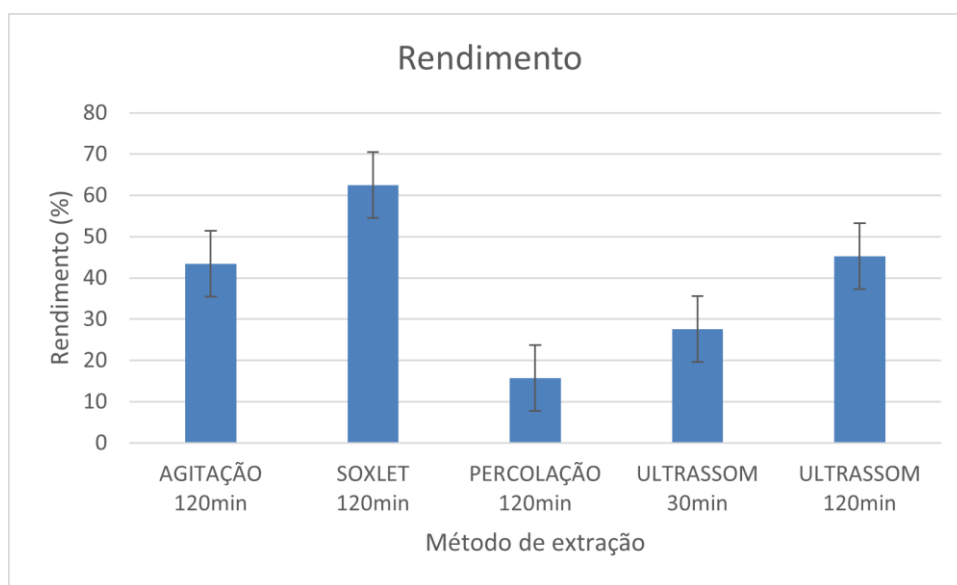
Quanto ao rendimento dos extratos, o mesmo não exprime a bioatividade da solução, mas apresenta a quantidade de extrato obtido em cada método de extração. Esse rendimento pode representar quais métodos foram mais efetivos na transferência de massa do soluto para o solvente e quando munido de análises qualitativas podem evidenciar as variáveis (temperatura, tempo de exposição, luz, ondas ultrassônicas) que alteram a bioatividade dos extratos.

Os respectivos rendimentos dos extratos encontram-se na Figura 1. Não foi obtido óleo essencial ao realizar a hidrodestilação no decorrer de 120 min, conseqüentemente, tal método não é ideal para a obtenção do extrato de polpa de *E. Candolleana*.

O maior rendimento encontrado foi alcançado a partir do Soxhlet durante 120 min, correspondendo a 66%. Isso pode ser explicado devido à utilização de temperatura mais alta (aprox. 78°C) neste método comparado aos demais. Temperaturas mais altas propiciam o aumento da solubilidade do soluto no solvente, fazendo com que a transferência de massa seja mais efetiva. Todos os outros métodos de extração foram realizados a temperatura ambiente, por volta de 30°C.

A extração assistida por ultrassom é um método de interesse por ser mais moderno e rápido, por consequência, refez-se a extração em mais de um tempo, 30 min, além dos 120 min. Os rendimentos obtidos para 120 min e 30 min foram de 48% e 28%, respectivamente. Nota-se também que o rendimento nos métodos de ultrassom e agitação para 120 minutos foram próximos, sugerindo que a utilização da convecção, neste caso, foi eficaz.

Figura 1 - Rendimento dos extratos



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

4.3. Cromatografia em camada delgada

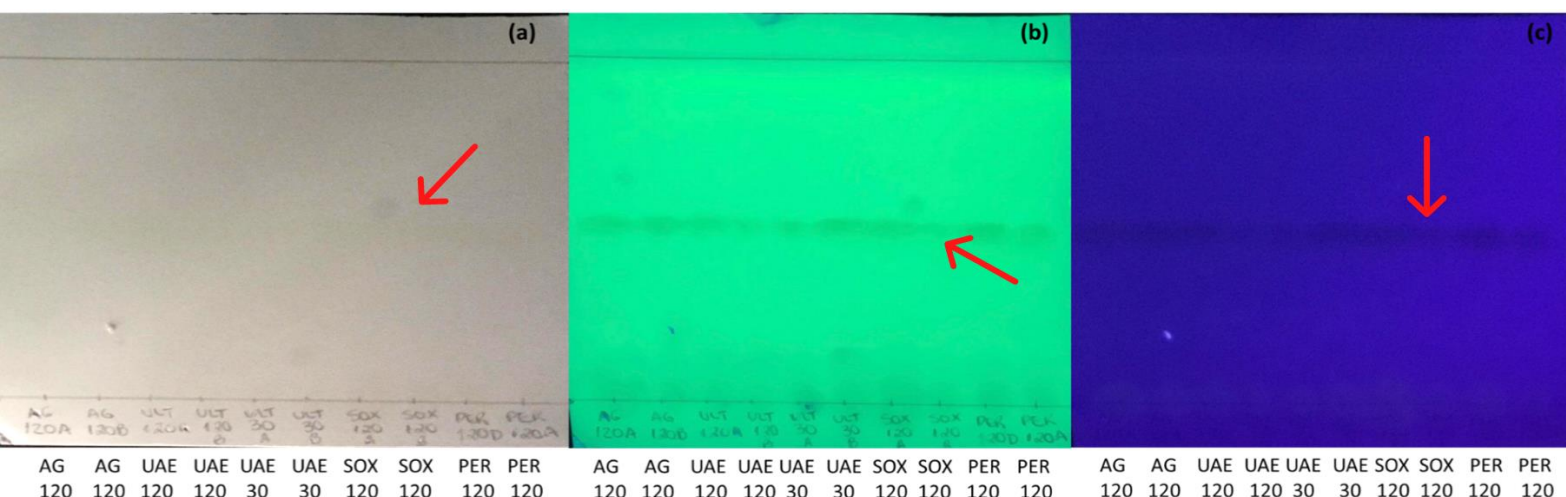
4.3.1. Flavonoides

Os flavonóides são compostos fenólicos de origem vegetal e detêm diversas atividades biológicas, como antiviral, ação anti-inflamatória, antibacteriana, antialérgica, vasodilatadora, além disso, são comumente relacionados à prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares (OLIVEIRA; ESPESCHIT; PELUZIO, 2006).

Na detecção de flavonoides, após a utilização da fase móvel 1 e aplicação do relevador de NP, notou-se a luz visível bandas amareladas, que em luz UV-254 foram ainda mais evidenciados, em contrapartida, sob luz UV-365 os mesmos pontos apresentaram coloração azul (Figura 2).

Essa alteração de fluorescência na cor azul pode indicar a presença de ácidos carboxílicos e cumarinas (WAGNER; BLADT, 1996). Além disso, outros estudos evidenciaram a presença de flavonóides em cambuí roxo (RADAELLI et al., 2018).

Figura 2 - Placa de CCD utilizando fase móvel 1, revelada com NP e observada sob luz visível (a), UV-254 (b) e UV-365 (c).



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Onde:

AG120: agitação durante 120 minutos;

UAE120: ultrassom durante 120 minutos;

UAE30: ultrassom durante 30 minuto;

SOX120: soxlet durante 120 minutos;

PER120: percolação durante 120 minutos.

4.3.2. Antocianinas, princípios amargos e saponinas

As antocianinas são flavonoides rotineiramente encontrados em frutas roxas e sua função vem sendo associada a capacidade antioxidante.

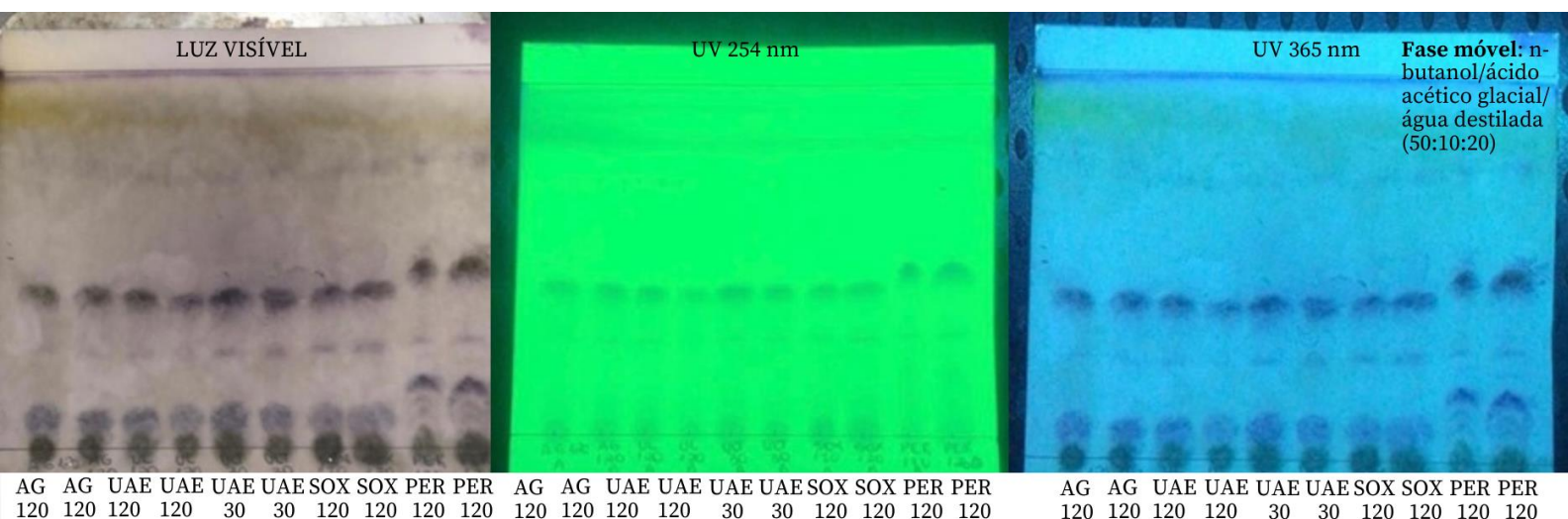
Em cromatografia por camada delgada, observa-se a presença de antocianinas após a eluição na fase móvel 2 sem qualquer tratamento químico, o que não aconteceu nesse estudo, visto que não foram observadas quaisquer manchas na placa antes da aplicação do revelador (WAGNER; BLADT, 1996). Entretanto, alguns estudos evidenciaram o declínio da presença de antocianinas

com amadurecimento em extratos de cambuí obtidos por etanol (SOARES, 2019; RADAELLI et al., 2018). Isso pode ser uma das causas do não aparecimento destes compostos no estudo, visto que o grau de amadurecimento da fruta era alto já no momento da colheita.

Outra explicação seria a degradação das antocianinas durante o armazenamento dos extratos no tempo decorrido entre a extração e análise (cerca de 20 dias).

Entretanto, observou-se diversos pontos na placa submetida a luz visível ou UV-254/UV-365 após a revelação com reagente anisaldeído. Tais bandas apresentaram coloração roxa, marrom, verde e amarela e quando submetidas a luz UV mostraram fluorescência, indicando possivelmente a presença de princípios amargos e/ou saponinas (WAGNER; BLADT, 1996).

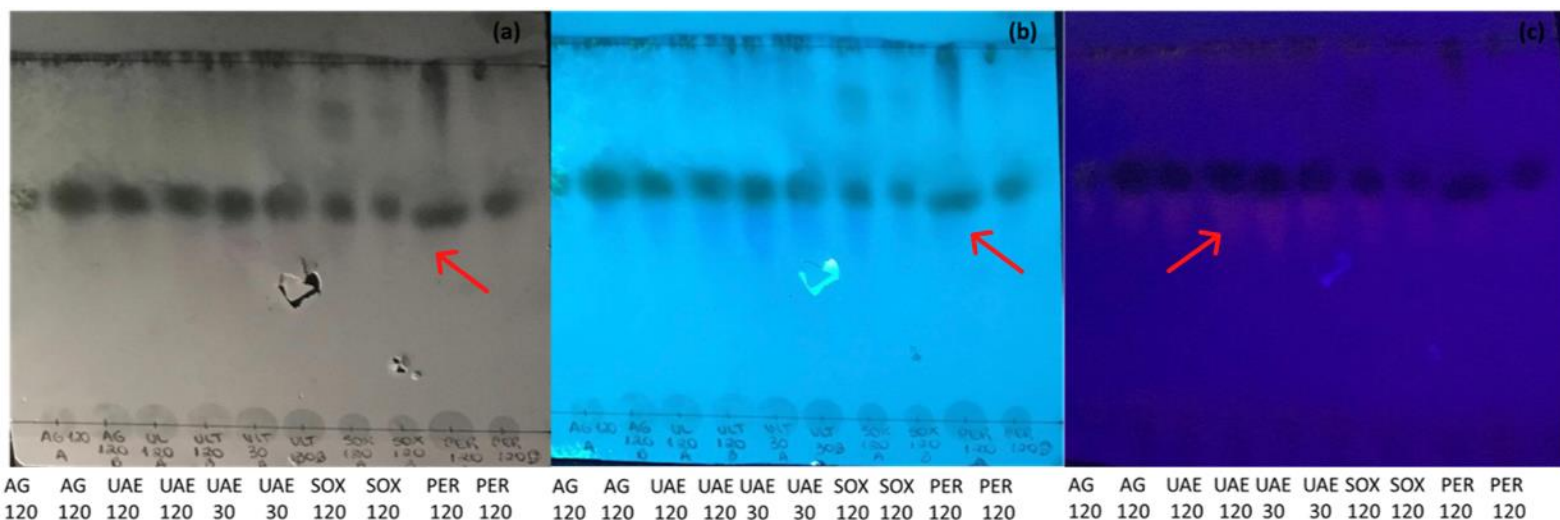
Figura 3 - Placa de cromatografia em camada delgada utilizando fase móvel 2, revelada com anisaldeído.



FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

A Figura 4 mostra a placa após eluição com a fase móvel 3 e revelação com anisaldeído. Nota-se que as manchas roxas sob luz visível mudaram para laranja quando submetidas a luz UV-356, o que também pode indicar a presença de princípios amargos e saponinas (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 4 - Placa de CCD utilizando fase móvel 3, revelada com anisaldeído e observada sob luz visível (a), UV-254 (b) e UV 365 (c).



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Onde:

AG120: agitação durante 120 minutos;

UAE120: ultrassom durante 120 minutos;

UAE30: ultrassom durante 30 minutos;

SOX120: soxlet durante 120 minutos;

PER120: percolação durante 120 minutos.

4.4. Polifenóis totais nos extratos

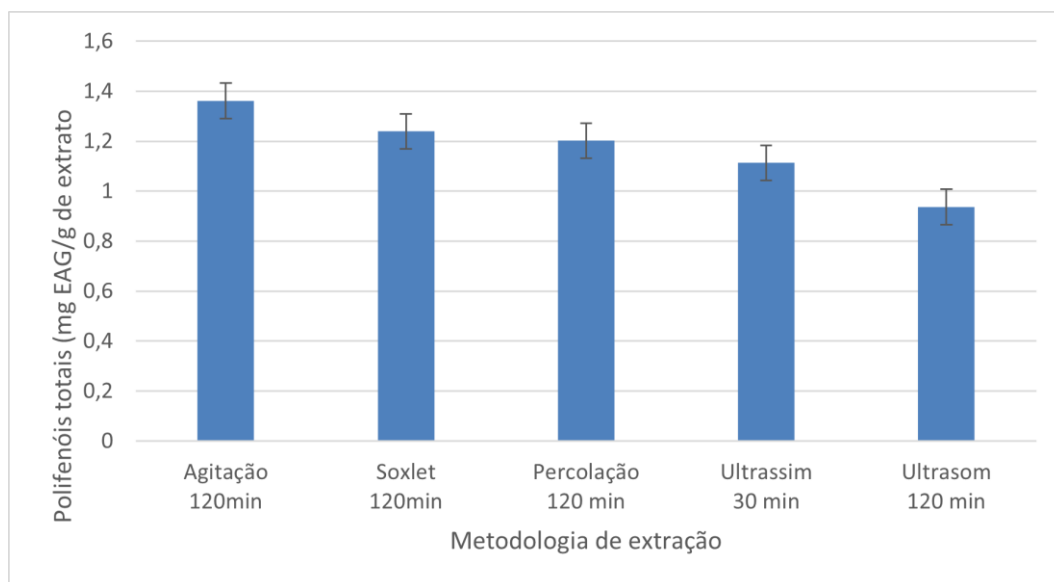
Os valores de polifenóis totais atingidos estão apresentados nas Figuras 7 e 8, por grama de extrato e de matéria-prima, respectivamente.

Quanto à obtenção de compostos fenólicos totais (FT) dos extratos, estes foram expressos em miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato ou de matéria prima.

Na Figura 5 observa-se que as metodologias mais eficientes para extração de compostos fenolicos foram agitação e Soxhlet, enquanto o método via ultrassom foi o menos favorável. Isso pode ter ocorrido pelo fato de alguns compostos serem sensíveis às ondas do método de ultrassom. Quando se observa o rendimento de FT em 30 min de extração, nota-se que é maior do que com 120 min, o que pode ter correlação com esta sensibilidade. Os demais métodos apresentaram resultados próximos. Contudo, ao compararmos a Figura

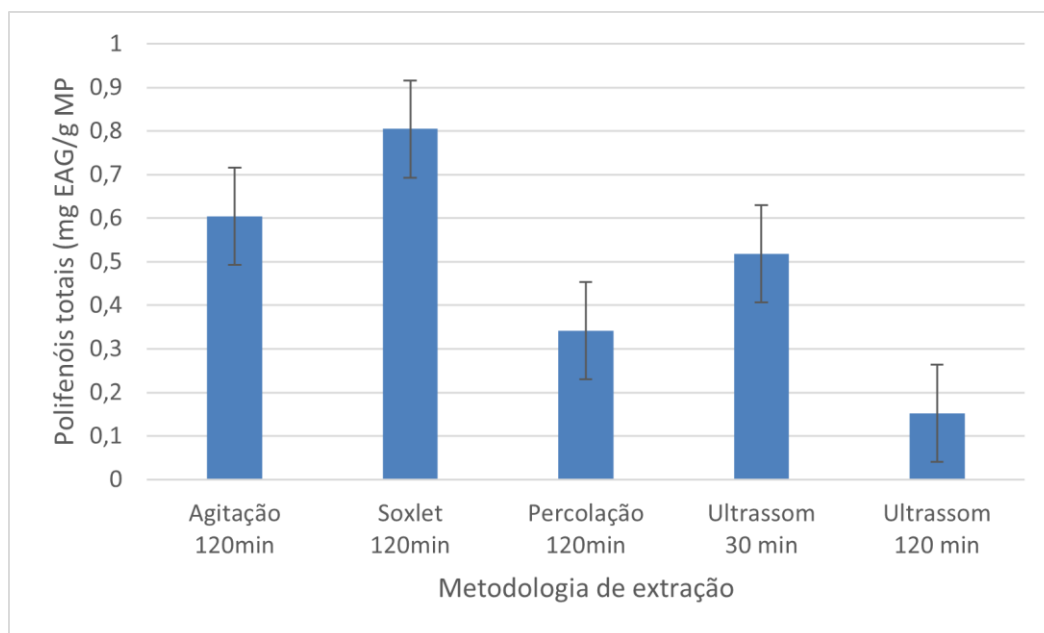
8 o rendimento se difere, visto que a metodologia mais eficiente neste caso foi Soxhlet, o que se deve ao maior rendimento de extrato total obtido por este método.

Figura 5 – Compostos fenolicos totais do extrato de cambuí roxo obtido por diferentes métodos de extração (mg EAG/g extrato)



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 6 - Compostos fenolicos totais do extrato de cambuí roxo obtido por diferentes métodos de extração (mg EAG/g MP).



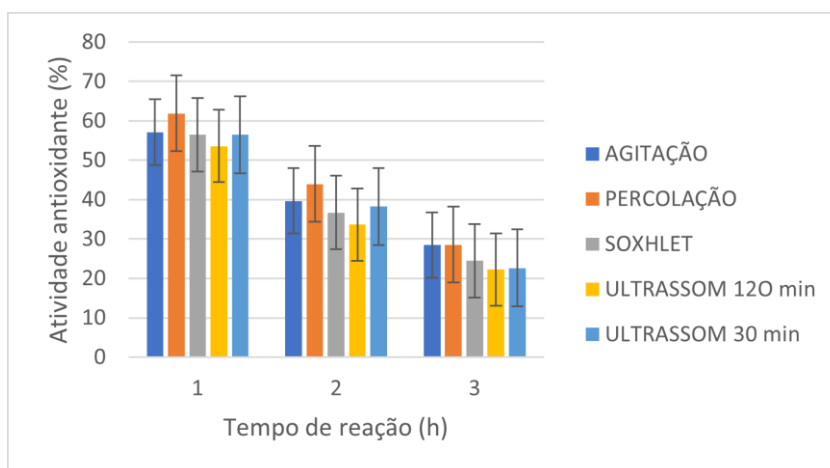
FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

4.5. Atividade antioxidante dos extratos

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante (AA) dos extratos recuperados pelas diferentes metodologias de extração estão expostos na Figuras 9. Cada análise foi realizada com as duplicatas dos extratos.

Nota-se que a AA dos extratos obtidos por todas as metodologias apresentaram a mesma tendência, oscilando entre 49 e 65% para 1 h de reação, entre 28 e 47% para 2 h de reação, e entre 18% e 37% para 3 h de reação. Isso sugere que os extratos obtidos tiveram atividade antioxidante e que a mesma foi diminuindo com o passar da reação, devido ao tempo de exposição ao agente oxidante. Outros estudos também confirmaram AA do extrato de cambuí roxo, mas por diferentes métodos de análise, que não são comparáveis a metodologia usada no presente estudo (SOARES, 2019; SANTOS, 2015).

Figura 7 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes metodologias de extração



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Não foram vistas diferenças entre os tratamentos aplicados em relação a AA. Em consequência, não é possível ver correlação entre o teor de polifenóis e AA, o que sugere que outros compostos além dos fenólicos podem estar agindo sobre o AA dos extratos.

5. Conclusão

Obtiveram-se extratos a partir da polpa de cambuí roxo seca utilizando diferentes métodos de extração, como agitação, extração assistida por ultrassom, Soxhlet e percolação, durante 120 min. O método de hidrodestilação não foi capaz de recuperar extratos. Soxhlet apresentou o maior rendimento de extrato total (66%). Observou-se pela análise por cromatografia em camada delgada que todos os extratos possivelmente apresentam flavonoides, princípios amargos e pungentes e saponinas. A metodologia mais eficiente para obter extratos ricos em polifenóis totais foi a agitação, enquanto o método via ultrassom foi o que apresentou menor eficiência. Em contrapartida, o rendimento total de polifenóis em relação à matéria-prima foi maior para o extrato obtido via Soxhlet. Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante e a mesma diminuiu com o tempo de reação. Para maior rendimento de extrato bruto e maior teor de compostos fenólicos a metodologia mais indicada é Soxhlet. No entanto, pensando em aplicação industrial, a metodologia mais indicada seria agitação, uma vez que Soxhlet não é viável nessa escala devido ao seu alto valor energético.

Referências

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão**. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.) vol.66 no.1 São Paulo, 2007.

BOTREL, D. A. et al. **Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano**. Food Science and Technology (Campinas), sciELO, v. 27, p. 32 – 38, 03 2007. ISSN 0101-2061. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php%3Flang%3Den%26pid%3DS0101-20612007000100006>>.

BORGER, C.E.F.; COSTA, M.G.; BUCEK, E.U.; FINZER, J.R.D. **Influência do tamanho da partícula e da agitação na extração de solúveis**. XXXVIII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados 22 a 25 de outubro de 2017 Departamento de Engenharia Química Universidade Estadual de Maringá Maringá – Paraná.

CARDOSO, L. M.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G. **Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico**. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 40 (1), 116-138, 2011.

CAVALHEIRO, C. V. **Extração de Compostos Fenólicos Assistidas por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Mineirais em Folhas de *Olea Europea* L.** 2013. 93 p. Dissertação (Ciência e Tecnologia do Alimentos) — Universidade Federal de Santa Maria.

COUTINHO, H. D. M. et al. **Análise físico-química e avaliação antimicrobiana do fruto cambuí**. Biofar, v. 9, n. 1, p. 96 – 103, Março 2013.

FILHO, A. C. A. C. **Extração sólido-líquido a quente de lipídeos de alimentos industrializados**. Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas – MG, 2019.

FREITAS, P. C.; CARVALHO, R. M.; SILVA, J. S. A.; PRADO, T.; DUARTE, E. R.; FRESCURA, V. L. A.; CHAVES, E. S. **Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**. Quim. Nova, Vol. 38, No. 4, 570-574, 2015.

GOMES, F. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido super crítico (SFE)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p. 556-559, 1978.
JORDÃO, A. M.; CORREIA, A. C. S. **Afr. J. Enol. Vitic.** 2012, 33(2), 214–224.

LEAL, P. F. et al. **Extraction Kinetics and Anethole Content of Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Anise Seed (*Pimpinella anisum*) Extracts Obtained by Soxhlet, Ultrasound, Percolation, Centrifugation, and Steam Distillation.** *Separation Science and Technology*, v. 46, n. 11, p. 1848 – 1856, 2011.

LEAL, P. F. et al. **Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction.** v. 51, p. 2520 – 2525, 2003.

LEITE, R.C.S.; SOUZA, M.A.F. **Análise e comparação de métodos de extração do óleo de inajá (*Maximiliana maripa*) com solvente orgânico.** 59º Congresso Brasileiro de Química, 2019.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: **UMA BREVE REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E DA ESTABILIDADE.** n. 3, p. 291 – 297, 2007.

MIYAKE, T. **Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais.** Universidade Estadual de Ponta Grossa. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>>. Acesso em: 25/04/2018.

MUNIZ, H. J. T. **Colecionando frutas: 100 espécies de frutas nativas e exóticas.** [S.l.]: Arte & Ciência, 2008.

OLIVEIRA, V. P.; ESPESCHIT, A. C. R.; PELUZIO, M. C. G. P. **Flavonóides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante.** *Rev Med Minas Gerais* 2006; 16(4): 234-8.

PINTO, A. C. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** *Química Nova*, v. 25, p. 45 – 61, 05 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php%3Flang%3Den%26pid%3DS0100-40422002000800009>>.

PRADO, J. M. **Obtenção de compostos bioativos de plantas exóticas e nativas brasileiras utilizando tecnologias ambientalmente corretas.** p. 1 – 24, Fevereiro 2016.

RADAELLI, J.C.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; JÚNIOR, W. A.; CITADIN, I.; LUCCHETTA, L. 2018. *Colloq. Agrariae*, 56-65. DOI: 10.5747/ca.2018.v14.n2.a206

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. **Food Chem.** 2008, 109(4), 883–890.

RODRIGUES, C. E. da C. **Utilização de solvente biorenovável nos processos de extração e desacidificação de óleos vegetais.** 2011. 172 p. Tese (Engenharia de Alimentos) — Universidade de São Paulo.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. **Natural Product Extraction: Principles and Applications.** [S.l.]: Green Chemistry Series, 2013.

SANTOS, A. S. O. dos. **Estudo comparativo entre extração sohxlet e ultrassom para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do estuário do rio Sergipe por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.** 2011. 97 p. Dissertação (Química) — Universidade Federal de Sergipe.

SANTOS, M. T. **Caracterização de compostos bioativos em frutas exóticas da mata atlântica.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2015.

Disponível em: <
http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256723/1/Santos_MichelleTeixeira_M.pdf>.

SILVA, A. V. C. et al. **Caracterização físico-química de frutos de três variedades de cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg).** Universidade Federal de Sergipe, 2018. Disponível em: <
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/662424/1/AnaVeruskaCambui.pdf>>.

SILVA, A. V. C.; SANTOS, J. S.; YAGUIU, P.; MATOS, I. A.; MUNIZ, E. N. **Caracterização físico-química de frutos de três variedades de cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg).** Universidade Federal de Sergipe, 2009. Disponível em:
<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/662424/1/AnaVeruskaCambui.pdf>>.

SILVA, M. L. C. et al. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais.** Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669 – 682, Jul/Set 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.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetria de fenólicos totais com reagentes de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico**. Am J Enol Vitic. Janeiro de 1965 16: 144-158; publicado antes da impressão em 01 de janeiro de 1965

SKERGET, M. et al. **Proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities**. Food Chemistry, v. 89, p. 191 – 198, 2005.

SOARES, K. L. **Composição e atividade antioxidante de frutos do cambuí roxo (*Eugenia candolleana* DC)**. Universidade Vila Velha (ES) – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Vila Velha (ES), 2019.

SOUZA, B. A.; PIAS, K. K. S.; BRAZ, N. G.; BEZERRA, A. S. **Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana**. 2019. Editora Unijuí – Revista Contexto & Saúde – vol. 19, n. 36, jan./jun. 2019 – ISSN 2176-7114.

VEGGI, P. C. **Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom**. 2013. 220 p. Tese (Engenharia de Alimentos) — Universidade Estadual de Campinas.

WAGNER, H.; BLADT, S. (1996) **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**; Springer Science & Business Media.