



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

KARINE SAYURI LIMA MIKI

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE MURICI (*Byrsonima crassifolia*)

LARANJEIRAS DO SUL

2023

KARINE SAYURI LIMA MIKI

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE MURICI (*Byrsonima crassifolia*)**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Bender
Coorientação: Prof^a. Dr^a Margarete Dulce Bagattini

LARANJEIRAS DO SUL

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Miki, Karine Sayuri Lima
OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE MURICI (Byrsonima
crassifolia) / Karine Sayuri Lima Miki. -- 2023.
100 f.:il.

Orientador: Doutor João Paulo Bender
Co-orientadora: Doutora Margarete Dulce Bagattini
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Compostos Bioativos. 2. Atividade antioxidante. 3.
Avaliação de Citotoxicidade. 4. Murici (Byrsonima
crassifolia). I. Bender, João Paulo, orient. II.
Bagattini, Margarete Dulce, co-orient. III. Universidade
Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KARINE SAYURI LIMA MIKI

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE MURICI (*Byrsonima crassifolia*)**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em: 05/05/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



JOAO PAULO BENDER
Data: 14/05/2023 22:39:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Paulo Bender - UFFS
Presidente/Orientador

Documento assinado digitalmente



GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI
Data: 15/05/2023 15:31:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli - UFFS
1º Membro

Documento assinado digitalmente



FILOMENA MARAFON
Data: 17/05/2023 08:29:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a Filomena Marafon - UFFS
2º Membro

Documento assinado digitalmente



MARGARETE DULCE BAGATINI
Data: 17/05/2023 16:46:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a Margarete Dulce Bagattini - UFFS
Coorientadora

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo amor, paciência e incentivo constantes, mesmo nos momentos mais difíceis agradeço pelo apoio incondicional sempre me levando a ir mais longe e sonhar mais alto, podendo sair da minha cidade e conhecer novos horizontes.

Ao meu Amor Miguel por tudo em todos esses anos, por ser sempre a pessoa que está ao meu lado e me apoia em todas as minhas loucuras, sem você esse sonho também não teria sido possível.

Aos meus amigos, tanto os que ficaram e principalmente pelos novos que fiz em Chapecó. A todas as meninas da república (Roberta, Rayssa, Tayna, Mayana, Nathila e Luana) só tenho a agradecer pela amizade sincera e pelos momentos de descontração que me ajudaram a recarregar as energias.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, o Prof. Dr. João Paulo Bender, por seu constante apoio e paciência durante nossos excelentes meses de trabalho conjunto em Chapecó. Também gostaria de agradecer à minha coorientadora, a Prof. Dra. Margarete Dulce Bagattini, por sua prontidão em participar e contribuir com esta pesquisa desde o início. Além disso, minha sincera gratidão ao Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli pela sua disponibilidade e contribuição fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço também as pessoas incríveis que pude conhecer no laboratório, principalmente a Aline Dresh, Aline Ruth, Bruna Caline que foram amigas indispensáveis e sempre excelentes parceiras de laboratório. A Larissa Welang e Alana Patrícia agradeço por todo o apoio e auxílio na realização das análises.

Gostaria de expressar, mais uma vez, minha profunda gratidão a todos aqueles que me apoiaram durante o período de realização do meu mestrado. Não teria sido possível alcançar este resultado sem o incondicional suporte de vocês.

RESUMO

A Floresta Amazônica é reconhecida por sua rica biodiversidade, incluindo uma variedade de plantas terapêuticas e alimentares com características distintas. Uma espécie com alto potencial regional é o murici, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, uma fruta nativa do Brasil, especialmente das regiões norte e nordeste, com uma polpa rica em compostos antioxidantes, tais como carotenoides, vitamina C, compostos fenólicos e ácidos graxos insaturados. Com o objetivo de investigar o processo de extração de compostos fenólicos do fruto do murici, utilizou-se a técnica de extração assistida por ultrassom. Essa técnica permite uma extração mais eficiente e rápida dos compostos desejados, por meio da aplicação de ultrassom para facilitar a transferência de massa entre o solvente e a matriz sólida do fruto. Os frutos foram adquiridos em uma feira em Manaus-AM, higienizados e armazenados a -18°C até o transporte para a Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *Campus* Chapecó-SC. Para avaliar a influência do método de secagem os frutos foram divididos em duas partes, sendo uma parte seca em estufa com circulação de ar e a outra seca em liofilizador. O tempo de extração foi avaliado por meio de estudo cinético, enquanto as variáveis de processo (temperatura, razão sólido/líquido e concentração de solvente) foram avaliadas com o auxílio da técnica de Planejamento de Experimentos – empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os extratos obtidos ao longo dos ensaios foram avaliados quanto aos compostos fenólicos totais (CFT), quantificados pelo método de *Folin-Ciocalteu*, e quanto à atividade antioxidante total (AAT), avaliada pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro). Para as melhores condições experimentais realizou-se o perfil cromatográfico dos extratos, por meio de cromatografia líquida acoplada ao detector de massa (HPLC-MS). Os resultados mostraram que a biomassa seca no liofilizador, com temperatura de 80°C , razão sólido/líquido de 25 mg/mL e concentração de etanol de 60%, resultou em uma quantificação de compostos fenólicos totais de $39,84 \pm 0,31$ mg AGE/g amostra seca e atividade antioxidante total de $229,31 \pm 2,58$ ($\mu\text{mol TE/g}$ amostra seca). O extrato obtido na melhor condição experimental foi liofilizado e caracterizado quanto ao seu perfil fenólico, identificando o ácido siríngico como o composto presente em maior concentração. Posteriormente estudo analisou a viabilidade celular das células saudáveis CCD 1059 Sk e das células cancerígenas SK-Mel-28 expostas ao extrato de murici. Os resultados mostraram que o extrato de murici não teve efeitos prejudiciais nas células saudáveis, com um aumento proporcional na viabilidade celular observado com o aumento da concentração do extrato. No entanto, nas células cancerígenas, o extrato de murici também aumentou a viabilidade celular, indicando que o extrato não é viável para o tratamento dessas células cancerígenas. É importante considerar que o murici contém um alto teor de açúcar, o que pode influenciar a viabilidade celular das células cancerígenas. Além disso, testes com compostos concentrados (quercetina e ácido p-cumárico) do murici não apresentaram aumento significativo na viabilidade celular. Em resumo, o extrato de murici não afetou negativamente as células saudáveis, mas não demonstrou eficácia no tratamento das células cancerígenas SK-Mel-28, indicando a necessidade de buscar outras abordagens para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Compostos bioativos, Amazonia, *Byrsonima crassifolia*, antioxidantes.

ABSTRACT

The Amazon Rainforest is recognized for its rich biodiversity, including a variety of therapeutic and edible plants with distinct characteristics. One species with high regional potential is murici, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, a native fruit of Brazil, especially from the northern and northeastern regions, with a pulp rich in antioxidant compounds such as carotenoids, vitamin C, phenolic compounds, and unsaturated fatty acids. In order to investigate the process of phenolic compound extraction from murici fruit, the technique of ultrasound-assisted extraction was used. This technique allows for a more efficient and rapid extraction of the desired compounds by applying ultrasound to facilitate mass transfer between the solvent and the solid matrix of the fruit. The fruits were acquired from a market in Manaus-AM, cleaned, and stored at -18°C until transported to the Federal University of Fronteira Sul - UFFS, Campus Chapecó-SC. To evaluate the influence of the drying method, the fruits were divided into two parts, with one part dried in an oven with air circulation and the other part dried in a freeze dryer. The extraction time was evaluated through a kinetic study, while process variables (temperature, solid/liquid ratio, and solvent concentration) were assessed using the experimental design technique of Central Composite Rotatable Design (CCRD). The extracts obtained during the experiments were evaluated for total phenolic compounds (TPC) quantified by the Folin-Ciocalteu method, and for total antioxidant activity (TAA) assessed by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) methods. For the best experimental conditions, the chromatographic profile of the extracts was obtained using high-performance liquid chromatography coupled with mass detector (HPLC-MS). The results showed that the biomass dried in the freeze dryer at a temperature of 80°C , a solid/liquid ratio of 25 mg/mL, and an ethanol concentration of 60% resulted in a quantification of total phenolic compounds of 39.84 ± 0.31 mg GAE/g dry sample and a total antioxidant activity of 229.31 ± 2.58 $\mu\text{mol TE/g}$ dry sample. The extract obtained under the best experimental condition was freeze-dried and characterized for its phenolic profile, identifying syringic acid as the compound present in the highest concentration. Subsequently, the study analyzed the cell viability of healthy CCD 1059 Sk cells and cancerous SK-Mel-28 cells exposed to the murici extract. The results showed that the murici extract had no detrimental effects on healthy cells, with a proportional increase in cell viability observed with increasing extract concentration. However, in cancerous cells, the murici extract also increased cell viability, indicating that the extract is not viable for the treatment of these cancer cells. It is important to consider that murici contains a high sugar content, which may influence the cell viability of cancer cells. Additionally, tests with concentrated compounds (quercetin and p-coumaric acid) from murici did not show a significant increase in cell viability. In summary, the murici extract did not negatively affect healthy cells but did not demonstrate efficacy in treating SK-Mel-28 cancer cells, indicating the need to explore other approaches for cancer treatment.

Keywords: Bioactive compounds, Amazonia, *Byrsonima crassifolia*, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– O murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>).	20
Figura 2– Representação de ruptura da parede celular devido à cavitação (a). Difusão do solvente dentro da estrutura celular (b).	24
Figura 3 – Estrutura compostos fenólicos: (a) Estrutura básica; (b) forma simples; (c) forma de polímero.....	26
Figura 4 – Estrutura básica dos flavonoides.....	27
Figura 5 – Estrutura de seis subclasses de flavonoides	27
Figura 6 – Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol	28
Figura 7– Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b)	29
Figura 8 – Estrutura básica do ácido gálico.....	30
Figura 9 – Estrutura básica da Quercetina.....	31
Figura 10 – Estrutura básica do Ácido Siríngico.....	32
Figura 11 – O radical DPPH.....	34
Figura 12 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺	35
Figura 13 – Como surge o câncer.....	36
Figura 14 – Três etapas principais da formação do câncer: iniciação, promoção e propagação.	37
Figura 15 – Fluxograma de atividades	39
Figura 16 – Frutos do Murici armazenados em garrafas, vendido nas feiras de Manaus-AM.	40
Figura 17 – Murici após secagem em estufa.	43
Figura 18 – Secagem do murici no liofilizador.	44
Figura 19 – Peneirador eletromagnético.....	45
Figura 20 – Extração de compostos fenólicos com o método de Soxhlet.....	48
Figura 21 – Porcentagem de partículas retidas em função da abertura da peneira pela série Tyler.	59
Figura 22 – Biomassa do Murici seco após passar nas peneiras pela série Tyler	60
Figura 23 – Cinética de extração com base no índice do Potencial Ativo	63
Figura 24 – Gráfico de Pareto referente ao DCCR 23 para a variável resposta: A) Compostos fenólicos totais; B) Atividade antioxidante e; C) Índice PA – murici seco em estufa	65

Figura 25 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais – murici seco em estufa.	68
Figura 26 – Superfícies de resposta para atividade antioxidante total – murici seco em estufa.	69
Figura 27 – Gráfico de Pareto referente ao DCCR 23 para a variável resposta: A) Compostos fenólicos totais; B) Atividade antioxidante e; C) Índice P.A – murici seco em liofilizador.	73
Figura 28 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais – murici seco em liofilizador.	76
Figura 29 – Superfícies de resposta para atividade antioxidante total – murici seco em Liofilizador.....	78
Figura 30 – A correlação de Pearson (r) calculada entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total para as amostras secas em estufa.	81
Figura 31 – A correlação de Pearson (r) calculada entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total para as amostras secas em liofilizador.	81
Figura 32 – Extração em larga escala: A) Aparelho experimental utilizado para a extração de grandes volumes de amostra e; B) Etapa de evaporação do solvente após a extração em Erlenmeyer.....	84
Figura 33 – Viabilidade celular de células CCD 1059 Sk expostas a crescente concentração de extrato do murici em 24 h.....	87
Figura 34 – Viabilidade celular de células SK-Mel-28 expostas a concentrações do extrato do murici pelo período de 24 horas.	89
Figura 35 – Viabilidade celular de células SK-Mel-28 expostas a concentrações de (A) Ácido p-Cumárico e (B) Quercetina pelo período de 24 horas.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal do murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>).....	21
Tabela 2 - Principais compostos antioxidantes no murici [<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth]	22
Tabela 3 – Cinética de extração.....	46
Tabela 4 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR	47
Tabela 5 – Concentrações das soluções de ácido gálico para curva padrão.....	49
Tabela 6 – Concentrações das soluções de Trolox para curva padrão	50
Tabela 7 – Concentrações das soluções de sulfato ferroso para curva padrão.	52
Tabela 8 – Condições utilizadas na extração para a liofilização do extrato	54
Tabela 9 – Utilização de gradiente de concentração da fase móvel B ao longo do tempo na determinação de compostos bioativos	56
Tabela 10 – Cinética compostos fenólicos (Murici seco em estufa) ¹	61
Tabela 11– Cinética compostos fenólicos (Murici seco em liofilizador) ¹	62
Tabela 12 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 23 contendo as variáveis independentes - Temperatura; Razão sólido/líquido e; Concentração ([]) de Etanol - e dependentes - Compostos fenólicos totais (CFT); Atividade antioxidante total (AAT) e Índice PA - murici seco em estufa.....	64
Tabela 13 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 23 contendo as variáveis independentes - Temperatura; Razão sólido/líquido e; Concentração ([]) de Etanol - e dependentes - Compostos fenólicos totais (CFT); Atividade antioxidante total (AAT) e Índice PA - murici seco em liofilizador.....	71
Tabela 14 – Resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total para ambas as amostras de murici. Obtidos tanto estatisticamente quanto experimentalmente.....	80
Tabela 15 – Extração por Soxhlet em comparação à ultrassom	83
Tabela 16 – Diferentes condições experimentais avaliadas e os resultados obtidos para CFT, AAT e compostos fenólicos individuais por HPLC-MS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATT. – Atividade antioxidante total

AGE. – ácido gálico equivalente

CFT. – Compostos fenólicos totais

DCCR. – Delineamento central composto rotacional

DMEN. – Meio Dulbecco

DPPH. – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

HPLC. – *High performance liquid chromatography* do inglês: cromatografia líquida de alta eficiência

INCA. – Instituto Nacional de Câncer

kHz. – Quilo-hertz

LCMS. – *Liquid chromatography mass spectrometry* do inglês: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MC. – Melanoma cutâneo

mL. – Mililitro

mg. – Miligrama

mm. – milímetro

NaClO – hipoclorito de sódio

nm. – Nanômetro

PB – *Plackett-Burmann*

ppm. – Parte por milhão

Sup. Resp. – Superfície de resposta

TE. – Trolox equivalente

µg. – micrograma

µL. – microlitro

µmol. – Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	MURICI.....	20
2.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	23
2.2.1	Extração assistida por ultrassom.....	23
2.3	COMPOSTOS BIOATIVOS	24
2.3.1	Flavonoides.....	26
2.3.2	Taninos.....	27
2.3.3	Ácidos fenólicos	28
2.3.4	Compostos Bioativos presentes no Murici	29
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
2.4.1	Método DPPH.....	33
2.4.2	Método FRAP	34
2.5	CÂNCER	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	MATERIAL.....	40
3.1.1	Matéria-prima	40
3.1.2	Reagentes	41
3.1.3	Equipamentos.....	41
3.1.4	Padrões cromatográficos	42
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
3.2.1	Secagem dos frutos	43

3.2.2	Determinação de umidade	44
3.2.3	Análise granulométrica para determinação do tamanho das partículas	45
3.2.4	Cinética dos ensaios para determinação de tempo de extração	46
3.2.5	Planejamento experimental para otimização da obtenção do extrato	46
3.2.6	Métodos de extração	47
3.2.7	Métodos analíticos	48
3.2.8	Liofilização do extrato	53
3.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS	54
3.3.1	Cultivo celular.....	54
3.3.2	Tratamento das células.....	55
3.3.3	Análise da viabilidade Celular (MTT).....	55
3.4	PERFIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS POR HPLC-MS	55
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3.5.1	Análise estatística da cinética e da viabilidade celular	56
3.5.2	Análise estatística do planejamento experimental	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	58
4.1.1	Secagem dos frutos	58
4.1.2	Granulometria	58
4.2	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	60
4.2.1	Cinética de extração.....	60
4.2.2	Planejamento experimental para otimização da extração dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total dos extratos obtidos	63
4.2.3	Validação do método estatístico	79
4.2.4	Teste complementar para extração de compostos fenólicos.....	82
4.2.5	Extração em larga escala.....	83
4.3	PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DO MURICI HPLC-MS	84

4.4	VIABILIDADES DOS EXTRATOS	87
4.4.1	Viabilidade celular Fibroblastos normais de humanos da linhagem celular CCD 1059 Sk.....	87
4.4.2	Viabilidade celular (SK-Mel-28)	88
5	CONCLUSÃO.....	91
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Apresentando uma das maiores biodiversidades do mundo, a floresta amazônica abrange uma grande variedade de plantas terapêuticas e alimentares, contendo uma vegetação com características distintas das quais em sua grande maioria seus princípios ativos são desconhecidos (ANUNCIACÃO et al., 2019). A floresta amazônica consiste no maior bioma brasileiro (representando 49,29% do território brasileiro e aproximadamente 40% do continente sul-americano) e o maior ecossistema tropical intacto do mundo, compreende mais de 10.000 espécies de árvores sendo 2.956 espécies endêmicas (FARIA et al., 2021; PEIXOTO ARAUJO et al., 2021; TER STEEGE et al., 2019).

Nos últimos anos, tem havido uma maior conscientização sobre a importância da saúde e uma crescente demanda por alimentos nutritivos de alta qualidade. Como resultado disso, muitos estudos têm se concentrado nas atividades biológicas significativas dos alimentos, em especial, na sua capacidade antioxidante, devido à sua associação com a prevenção de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo (NEVES et al., 2015a). Devido a isso, as frutas amazônicas têm despertado interesse científico, uma vez que são consideradas uma rica fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante, evidenciando a sua importância para a promoção da saúde humana (DE FREITAS et al., 2018; DE SOUZA et al., 2019). Estudos anteriores mostraram atividades biológicas interessantes de frutas amazônicas conhecidas, bem como de não convencionais (DE SOUZA et al., 2019; PAZ et al., 2018). Portanto, dietas com consumo regular dessas frutas amazônicas podem proporcionar mais do que apenas nutrição (FARIA et al., 2021).

Em virtude disso, podemos destacar como espécie com alto potencial regional, o murici, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. Esta frutífera pertence à família das *Malpighiaceae* (ARAUJO et al., 2018), espécie nativa das regiões norte e nordeste do Brasil, possui uma polpa rica em carotenoides, vitamina C, compostos fenólicos, ácidos graxos insaturados, constituindo uma excelente fonte de compostos antioxidantes (DE SOUZA et al., 2012; FARIA et al., 2021; MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013; NEVES et al., 2015a). Geralmente sua polpa é consumida na forma de néctares, doces e sorvetes devido ao seu sabor exótico e odor característico de queijo. (PIRES et al., 2019). Esses compostos são frequentemente associados a efeitos benéficos para a saúde, o que justifica o uso do murici no tratamento e/ou prevenção de doenças (DE SOUZA et al., 2019; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1999; PIRES et al., 2019). Os hábitos alimentares são um dos principais fatores que determinam a saúde ou a doença de um indivíduo. Nesse contexto, a investigação do papel antioxidante do murici pode gerar

resultados importantes, contribuindo para incentivar o consumo de alimentos que promovam a saúde humana e reduzam os danos oxidativos. Portanto, compreender o potencial terapêutico do murici pode ter implicações significativas para a prevenção e tratamento de diversas doenças, além de estimular a adoção de hábitos alimentares mais saudáveis (SOUSA; DE SOUZA BUARQUE, 2020).

A fim de se obter compostos bioativos de matérias-primas vegetais para fins de isolamento/identificação/caracterização, são necessárias técnicas de extração adequadas e padronizadas (DÍAZ REINOSO; GONZÁLEZ MUÑOZ; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, 2017). A seleção de uma metodologia adequada é crucial para obter os compostos desejados de maneira eficiente e com alta pureza. Existem diversas técnicas de extração amplamente utilizadas, que variam de acordo com as características dos compostos a serem extraídos e as necessidades específicas do processo. Entre essas técnicas, algumas das mais comumente empregadas incluem a maceração, a extração por solvente e o Soxhlet, entre outros (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA, 2005; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012b).

Dentre as diversas tecnologias emergentes, a aplicação de ultrassom vem ganhando cada vez mais espaço, especialmente para a extração de compostos naturais, os quais, em métodos convencionais, normalmente requerem dias ou horas para serem extraídos. A técnica de ultrassom emprega a energia de ondas ultrassônicas, emitidas em uma frequência acima da capacidade auditiva humana (superior a 20 kHz), que eleva as taxas de transferência de massa e permite a ruptura da parede celular por meio da formação de microcavidades. Isso resulta em maior eficiência na extração, com menor tempo de processo e consumo reduzido de solventes (BARRALES et al., 2018; IRAKLI; CHATZOPOULOU; EKATERINIADOU, 2018; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012b). Isso ocorre devido à eficiência do método de extração, que reduz drasticamente o tempo necessário para a obtenção do extrato, aumentando o rendimento e, frequentemente, melhorando a qualidade do produto final. Além disso, a técnica de extração por ultrassom apresenta alta estabilidade e um baixo custo energético, o que a torna ainda mais atrativa (PICÓ, 2013; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012a).

Para justificar os esforços investidos na fase de obtenção dos extratos, é crucial avaliar o potencial dessas substâncias em relação ao objetivo específico do estudo. Conforme mencionado anteriormente, esses extratos possuem uma ampla gama de aplicações, que incluem o tratamento de doenças relevantes para a saúde pública, bem como o seu uso como suplementos alimentares (PALOS-HERNÁNDEZ et al., 2022). Uma dessas doenças é o câncer, uma condição grave e potencialmente letal que ocorre quando as células do corpo começam a crescer de forma descontrolada, invadindo tecidos e órgãos vizinhos. O câncer é considerado um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo, sendo a principal causa de morte por doença em muitos países (INCA, 2023).

No Brasil, o câncer de pele é uma das formas mais frequentes de câncer diagnosticadas, e o melanoma cutâneo (MC) é uma forma especialmente agressiva desta doença. Em 2021, o Instituto Nacional de Câncer relatou que o melanoma cutâneo foi responsável por cerca de 8% de todos os tipos de câncer de pele no Brasil, sendo que a estimativa para esse ano é de 8.840 novos casos em homens e 7.330 novos casos em mulheres. É fundamental destacar a importância da prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado do melanoma cutâneo para minimizar os efeitos negativos na saúde pública. O câncer de pele é uma doença comum no Brasil e o melanoma cutâneo é uma forma particularmente perigosa dessa doença. Embora existam diversos tratamentos disponíveis para o melanoma cutâneo, a resistência aos medicamentos utilizados tem aumentado, evidenciando a necessidade de novas abordagens no combate a essa doença, incluindo o uso de compostos derivados de plantas (CHINEMBIRI et al., 2014). Diferentes mecanismos de ação têm sido identificados para os compostos bioativos, que têm sido associados a vários benefícios para a saúde, incluindo a prevenção do câncer (DE SOUZA et al., 2019).

Este estudo teve como objetivo explorar o potencial da matéria-prima por meio da extração de compostos fenólicos utilizando ultrassom. Os extratos resultantes foram caracterizados quanto à atividade antioxidante e compostos fenólicos totais. O extrato obtido sob as melhores condições de extração foi selecionado para avaliação da citotoxicidade em fibroblastos normais de humanos da linhagem celular CCD 1059 Sk e sua atividade contra a linhagem celular de melanoma cutâneo SK-Mel-28.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar o processo de extração e o extrato do fruto Murici (*Byrsonima crassifolia*) obtido por meio da técnica de extração assistida por ultrassom, além de avaliar a citotoxicidade em fibroblastos normais humanos e a viabilidade celular em células de melanoma cutâneo SK-Mel-28.

1.1.2 Objetivos específicos

Para atender o objetivo geral, pretende-se cumprir as seguintes etapas:

- a) Averiguar a influência das técnicas de secagem em estufa com circulação de ar e liofilização na qualidade do extrato obtido;
- b) Inferir sobre o de tempo de processo por meio de uma cinética de extração;
- c) Avaliar a influência das variáveis : Temperatura (°C); Razão sólido/líquido (g/mL) e; Concentração de etanol, na obtenção do extrato do murici utilizando a técnica de extração por ultrassom;
- d) Estimar os compostos fenólicos totais nas diferentes condições experimentais avaliadas;
- e) Realizar a avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos em diferentes métodos e condições experimentais.
- f) Caracterizar os extratos em relação aos compostos bioativos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência;
- g) Analisar o extrato quanto à citotoxicidade celular em Fibroblastos normais de humanos da linhagem celular CCD 1059 Sk.
- h) Selecionar a melhor condição experimental com base na atividade antioxidante total e investigar o potencial do extrato frente à linhagem celular de melanoma cutâneo SK-Mel-28;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MURICI

Popularmente conhecidos como murici (Figura 1), as espécies de *Byrsonima* são um dos gêneros mais importantes da família *Malpighiaceae*, com mais de 100 espécies descritas no continente americano, possuem ampla distribuição no Brasil, com maior frequência e abundância nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (NEVES et al., 2015b; RIBEIRO et al., 2017). A espécie *Byrsonima crassifolia* (L.) H.S.K., sinônimos *Byrsonima coriacea* (Sw.) DC.; *B. crassifolia* var. *cinerea* (Poir.) Nied.; *B. crassifolia* var. *spruceana* (Nied.) Nied.; *B. fagifolia* Nied, que também conhecida popularmente como: Douradinha-falsa, murici, murici-assú, murici-cascudo, entre outros. Em espanhol e inglês é conhecido como *nanche*. É uma fruta esférica, que possui centro de origem e dispersão na Amazônia, cresce em árvores pequenas e pode ser encontrado de dezembro a maio. Quando maduro, possui a cor amarelada, com o diâmetro de 1,5 a 2 cm e um sabor único e característico devido à presença de ésteres voláteis (REZENDE; FRAGA, 2003). Podendo ser consumido in natura ou em forma de suco, sorvete, geleias, entre outros produtos alimentícios, tornando-se um importante recurso alimentar, principalmente para populações rurais de baixa renda (ALVES; FRANCO, 2003; GRZYBOWSKI et al., 2017).

Figura 1– O murici (*Byrsonima crassifolia*).



Fonte: DoDesign-s

Devido a maioria de suas plantas derivarem de árvores de quintal, é considerado um fruto selvagem nativo, por não ser totalmente domesticado (AGREDANO-DE LA GARZA et al., 2021). Parâmetros físico-químicos, sabor, tamanho e cor da fruta são as principais variáveis de qualidade para selecionar os genótipos do murici. Embora seu fruto possua excelentes propriedades (Tabela 1), o seu uso ainda é limitado e muitas vezes artesanal, com pouca produção. A comercialização normalmente tende a ser restrita aos mercados locais de sua produção (AGREDANO-DE LA GARZA et al., 2021; DE SOUZA et al., 2012).

Tabela 1 – Composição centesimal do murici (*Byrsonima crassifolia*)

Nutriente	Unidade	Valor (100 g)
Energia	kcal	91
Proteína	g	0,88
Lipídios	g	2,47
Carboidratos	g	19,37
Fibra total	g	6,8
Açúcares	g	1,83
Cálcio	mg	40
Ferro	mg	0,29
Magnésio	mg	22
Fósforo	mg	21
β-caroteno	mcg	106
Vitamina C	mg	38,54

Fonte: Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (2018).

Diversos estudos têm evidenciado a ampla gama de atividades biológicas dos extratos que contêm compostos bioativos, incluindo atividade antimicrobiana (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1999), anti-inflamatória (MALDINI et al., 2009), antidepressiva (HERRERA-RUIZ et al., 2011), bom potencial como agente antidiabetes (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010), foram encontrados nas folhas e cascas; os frutos também apresentaram capacidade antioxidante (Tabela 2), com a presença de compostos fenólicos e carotenoides (ALMEIDA et al., 2011; IRÍAS-MATA et al., 2018; MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013). Identificada como uma boa fonte de luteína, a qual está associada a uma redução do risco do desenvolvimento de degeneração muscular (MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013) e também zeaxantina, podendo ser atribuída na

eficácia do tratamento de diabetes mellitus (PIRES et al., 2019). Também foram analisados a presença de compostos fenólicos derivados de quercetina e ácido gálico, além de compostos como catequina, epicatequina, rutina e kaempferol no extrato hidrofílico de murici (MARIUTTI et al., 2014; SOUSA; DE SOUZA BUARQUE, 2020). Estudos recentes evidenciam que os extratos celulares presentes no murici, apresentaram forte bioatividade, inibindo a viabilidade celular contra linhagens celulares carcinoma do ovário humano (DE SOUZA et al., 2019).

Tabela 2 - Principais compostos antioxidantes no murici [*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth]

Compostos Antioxidantes	Concentração	Autor
Vitamina C	58,88mg 100 g ⁻¹ Fruta	DE SOUZA et al., 2020
Fenólicos Totais	2,54mgGAE* g ⁻¹ Extrato	GORDON et al., 2011
Ácido Gálico	0,22mg g ⁻¹ Extrato	SOUSA et al., 2018
Quercetina	2,72µgmL ⁻¹ Extrato	MARIUTTI et al., 2014
Carotenoides Totais	0,57mg g ⁻¹ Extrato	SOUSA et al., 2018
Luteína	17,3µg g ⁻¹ Extrato	MARIUTTI et al., 2013
Zeaxantina	3,5µg g ⁻¹ Extrato	MARIUTTI et al., 2013

*GAE, equivalente de ácido gálico.

Em um estudo realizado por Pires *et al.* (2019), foi analisado o potencial antioxidante dos extratos da polpa de murici obtidos por meio de CO² supercrítico. Os resultados obtidos por esse meio de extração demonstraram uma alta concentração de compostos fenólicos e antioxidantes nos extratos, sugerindo seu potencial como alternativa no tratamento e/ou prevenção de condições como hipercolesterolemia, aterosclerose e trombogênese. No entanto, poucos estudos têm investigado os efeitos *in vivo* dos frutos de *B. crassifolia* aplicados a saúde (SOUSA; DE SOUZA BUARQUE, 2020).

Mariutti *et al.* (2014) demonstraram que os extratos hidrofílicos de murici atuam efetivamente contra o ácido hipocloroso, radical hidroxila, ânion de peroxinitrito e superóxido e inibe a oxidação da hemoglobina, peroxidação lipídica e depleção de glutatona em eritrócitos humanos. Além disso os extratos dos carotenoides do murici também demonstraram, *in vitro*, serem um potente eliminador do radical peroxil, sendo quase 13 vezes mais potente do que o α -tocoferol (MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013).

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos de extração utilizando solventes são amplamente utilizados na indústria e em centros de pesquisa devido à sua simplicidade e baixo custo (JIANG; GHOSH; CHARCOSSET, 2021). Entretanto, a utilização desses métodos podem acarretar em algumas desvantagens, tais como a demanda por grandes volumes de solvente e a necessidade de empregar altas temperaturas, o que pode resultar na degradação de compostos termolábeis presentes na amostra (PLAZZOTTA et al., 2021).

Com o intuito de minimizar os impactos negativos dos métodos convencionais, novas técnicas de extração estão sendo desenvolvidas. Entre elas, destacam-se a extração assistida por ultrassom, a extração assistida por micro-ondas, a extração assistida por líquidos pressurizados e a extração assistida por CO² supercrítico.

Essas técnicas utilizam mecanismos diferentes para extrair compostos da amostra, mas todas têm em comum a redução do uso de solventes e temperaturas mais baixas de extração, o que pode levar a um maior rendimento de compostos de interesse e preservação das propriedades químicas e biológicas da amostra. Além disso, essas técnicas têm um impacto ambiental reduzido, uma vez que geram menos resíduos e utilizam menos energia (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

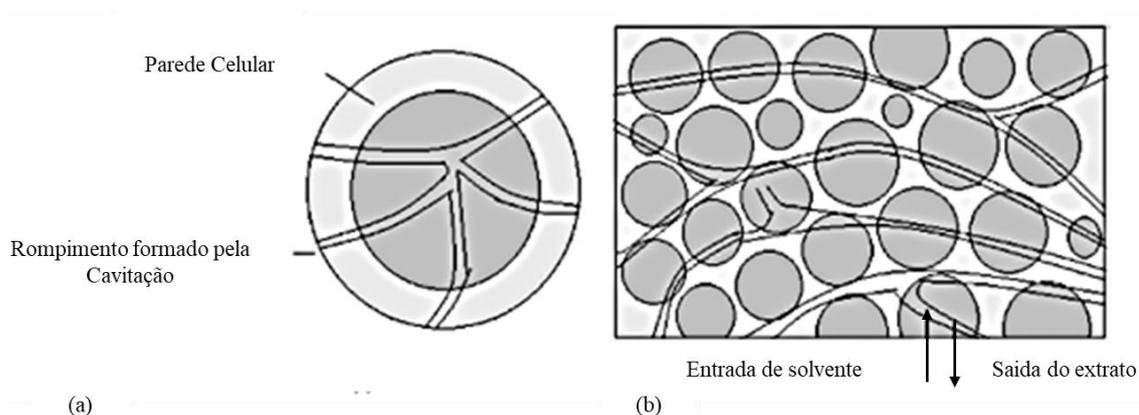
2.2.1 Extração assistida por ultrassom

Uma alternativa de extração com impacto ambiental reduzido tem sido a técnica de ultrassom. Essa técnica pode ser empregada como pré-tratamento de amostras ou acoplada a outros métodos de extração, com o intuito de aumentar a eficiência e reduzir o tempo dos processos extrativos. Ao utilizar o ultrassom, é possível diminuir a quantidade de solvente utilizada na extração e mitigar a degradação de compostos termolábeis presentes na amostra (HEDAYATI et al., 2021).

Durante a extração assistida por ultrassom, as ondas mecânicas oscilantes ajudam a aumentar a taxa de difusão, gerando altas tensões por meio do colapso das bolhas de cavitação. Esse processo de cavitação (Figura 2) é capaz de romper as paredes celulares e aumentar as interações entre o solvente e o substrato, resultando em uma melhoria significativa do coeficiente de transferência de massa. Isso pode levar a um aumento da eficiência da extração, com tempos de processo reduzidos em comparação aos métodos convencionais. Além disso, a extração assistida por ultrassom é uma técnica ambientalmente amigável, pois não produz

resíduos químicos ou tóxicos (MAJZOABI; HEDAYATI; FARAHNAKY, 2015; WANG et al., 2015).

Figura 2– Representação de ruptura da parede celular devido à cavitação (a). Difusão do solvente dentro da estrutura celular (b).



Fonte: Adaptado de Shirsath et al. (2012a).

De acordo com a Figura 2, durante a propagação da onda ultrassônica, ocorrem alterações de pressão e compressões nas moléculas, gerando microbolhas que se expandem e, posteriormente, colapsam no meio líquido. Essas compressões intensas contribuem para a quebra das células e a liberação de compostos bioativos, o que torna o método de extração por ultrassom eficiente para a obtenção desses compostos. Além disso, essa técnica apresenta uma vantagem significativa por ser de baixo custo e não exigir a utilização de equipamentos complexos, podendo ser empregada tanto em pequena como em larga escala (DAI; MUMPER, 2010; TIWARI, 2015; CARNIEL et al., 2018; CONTE et al., 2016).

A etapa de extração é crucial para obter uma eficiente extração de compostos bioativos. No entanto, os mecanismos subjacentes a este processo ainda não são completamente compreendidos, uma vez que a estrutura e composição da matriz podem ser alteradas durante a extração. Vários fatores têm sido investigados como influenciadores da extração, como a cultivar utilizada, o tamanho das partículas da amostra, a temperatura, a proporção água/solvente, o tempo de extração e a razão sólido-líquido. É importante estudar e otimizar esses fatores a fim de melhorar a eficiência da extração e garantir a obtenção dos compostos bioativos desejados (TUNCEL; YILMAZ, 2015).

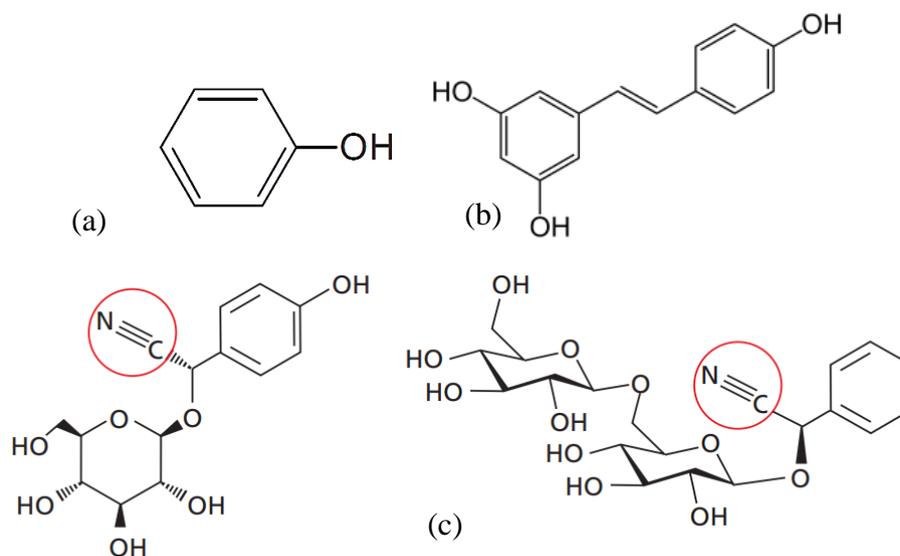
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos são uma classe de substâncias químicas encontradas em alimentos de origem vegetal, que possuem a capacidade de afetar positivamente a saúde humana. Esses compostos incluem não apenas os compostos fenólicos, mas também outras classes de compostos como carotenoides, vitaminas, minerais e fibras alimentares. Nos últimos anos, houve um crescente interesse na extração de compostos bioativos de materiais vegetais, devido às suas possíveis propriedades terapêuticas (DE LA ROSA et al., 2018).

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal que têm despertado grande interesse. Eles são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, que podem se desenvolver tanto como parte do desenvolvimento normal quanto em resposta a condições de estresse (MORALES-SOTO et al., 2013). Pesquisas têm mostrado que esses compostos podem ter ação antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena, além de ajudar a reduzir o risco de doenças crônicas. Por isso, há um interesse crescente em explorar o potencial terapêutico na prevenção e tratamento de diferentes condições de saúde (BORGES et al., 2013b; XIANG et al., 2022).

Os compostos fenólicos são compostos químicos que possuem uma estrutura formada por anel aromático e grupos hidroxila (Figura 3a), podendo ser encontrados na forma simples (Figura 3b), ou de polímero (Figura 3c), além de poderem estar livres ou complexados a açúcares e proteínas (GARCIA-SALAS et al., 2010). Os compostos fenólicos possuem propriedades que podem ser influenciadas pelo número e pela posição dos grupos hidroxila presentes no anel aromático, assim como pela conformação desses grupos. Essas características podem provocar modificações nas propriedades dos compostos fenólicos, o que pode afetar sua atividade biológica (ANGELO; JORGE, 2007a; BORGES et al., 2013a). Existem duas classes principais de compostos fenólicos: flavonoides ($C_6C_3C_6$) (flavonas, flavononas, flavonóis, antocianinas e isoflavonas) e não-flavonoides (C_6C_1) (álcoois fenólicos, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas) a partir de rotas metabólicas complexas, esses compostos podem originar outros grupos fenólicos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Figura 3 – Estrutura compostos fenólicos: (a) Estrutura básica; (b) forma simples; (c) forma de polímero.



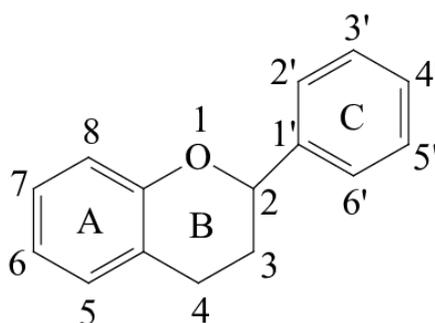
Fonte: Adaptado de Taiz et al. (2017)

Tais compostos têm atraído interesse científico pôr suas atividades biológicas significativas, particularmente como antioxidantes, que inibem os danos oxidativos nas células humanas, podemos assim, destacar a importância do murici, principalmente pelas suas características como: boa fonte de luteína e zeaxantina (MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013), e sua composição com os principais compostos fenólicos sendo o ácido gálico, ácido quinino, antocianinas e derivados de quercetina (MARIUTTI et al., 2014).

2.3.1 Flavonoides

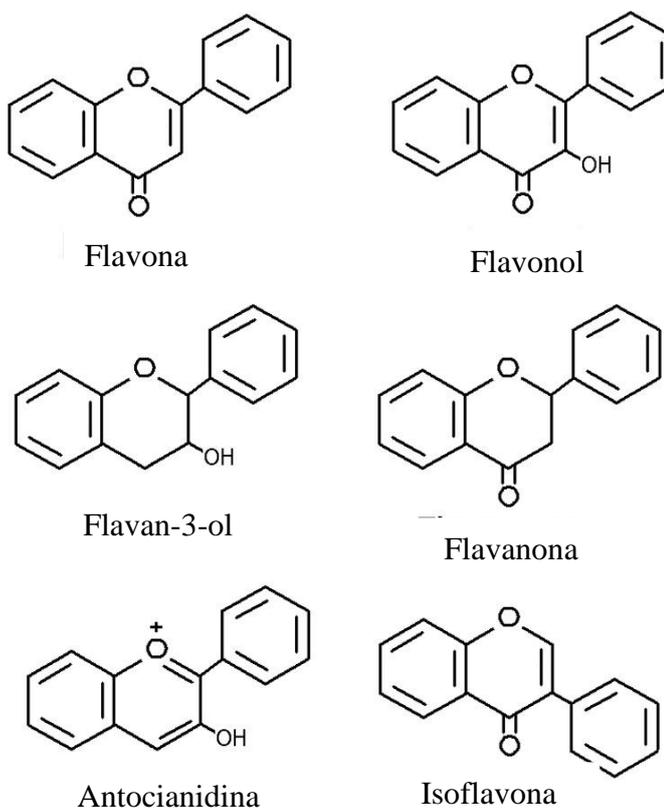
Os flavonoides são uma classe diversa de compostos bioativos, com mais de 6.000 diferentes tipos já identificados na natureza. Eles são encontrados em uma ampla variedade de plantas, incluindo frutas, verduras, legumes, ervas e chás, representando quase dois terços dos compostos fenólicos na dieta (DE LA ROSA et al., 2018). Os flavonoides possuem uma estrutura básica composta por um núcleo de 15 átomos de carbono, dispostos em dois anéis aromáticos (denominados A e B), conectados por uma ponte de três carbonos contendo um átomo de oxigênio (anel C), como ilustrado na Figura 4 (LIMA; BEZERRA, 2012). As diferenças estruturais nos flavonoides resultam em uma grande diversidade de classes conforme mostra a Figura 5, que incluem flavonas, flavonóis, flavonóis, diidroflavonóis, antocianidinas e isoflavonóides (HUI et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Lima et al. (2012)

Figura 5 – Estrutura de seis subclasses de flavonoides



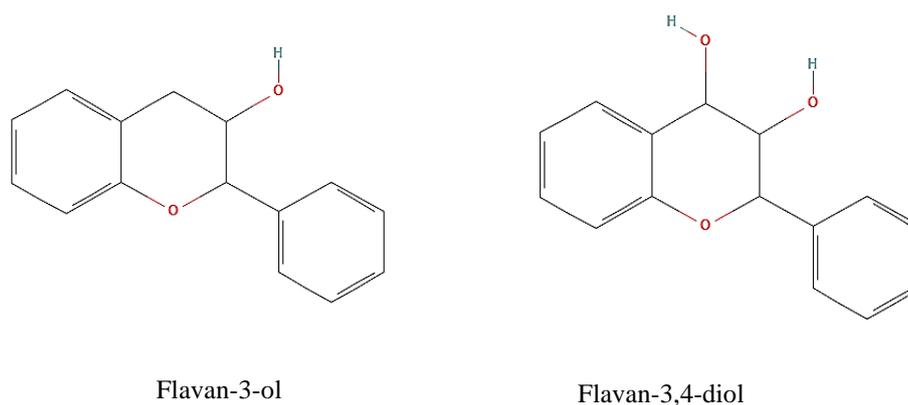
Fonte: Adaptado de Hui et al. (2013).

2.3.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos poliméricos encontrados em plantas, com propriedades de defesa contra predadores e patógenos, assim como as ligninas. Existem duas principais categorias de taninos: os condensados e os hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis representam uma classe de compostos fenólicos que apresentam em sua estrutura uma

combinação complexa e variada de ácidos fenólicos, sendo o ácido gálico um dos mais comuns, e açúcares simples. Ao contrário dos taninos condensados, que são formados pela polimerização de unidades de flavonoides, os taninos hidrolisáveis são menores e mais solúveis em água, o que lhes confere a capacidade de serem hidrolisados com maior facilidade. Os taninos condensados, também conhecidos como taninos catequicos ou proantocianidinas, são compostos oligoméricos e poliméricos formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 6). Diferentemente dos taninos hidrolisáveis, os taninos condensados não são hidrolisados e não são heterosídeos. Eles são compostos por oligômeros e polímeros que resultam da policondensação de duas ou mais unidades de flavanol e flavandioli. (ANGELO; JORGE, 2007b; MORI et al., 2001)

Figura 6 – Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol



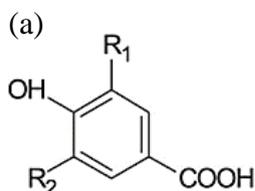
Fonte: National Center for Biotechnology Information – PubChem (2023)

2.3.3 Ácidos fenólicos

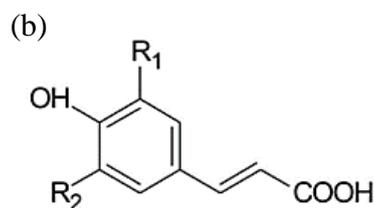
Os ácidos fenólicos são compostos caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila em sua estrutura molecular. Esses compostos podem ser classificados em dois grupos principais: derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 7). Os ácidos hidroxibenzóicos, como o ácido gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, possuem uma estrutura comum de seis carbonos interligados. Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, são compostos aromáticos com uma

cadeia lateral de três carbonos (C6-C3) e são os mais abundantes nessa classe (ANGELO; JORGE, 2007b).

Figura 7– Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b)



Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido protocatecuíco: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
 Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Fonte: Adaptado de Angelo et al. (2007) e De La Rosa et al. (2018)

É de suma importância compreender a composição e função dos compostos fenólicos devido à influência da natureza dos compostos, métodos de extração e tamanho da amostra na sua determinação. Esses compostos apresentam alta polaridade, reatividade e são suscetíveis à ação de enzimas, o que os torna de grande relevância em diversas aplicações, como alimentos, nutracêuticos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Portanto, é crucial possuir um conhecimento aprofundado sobre as propriedades e características dos compostos fenólicos para garantir sua utilização adequada e eficaz (ANGELO; JORGE, 2007b).

2.3.4 Compostos Bioativos presentes no Murici

O murici (*Byrsonima crassifolia*) é uma planta encontrada na América Latina, incluindo no Brasil, e apresenta compostos fenólicos em sua composição. A presença desses compostos pode variar de acordo com a espécie de murici, sua maturidade e condições de cultivo. Alguns dos compostos fenólicos presentes no murici incluem:

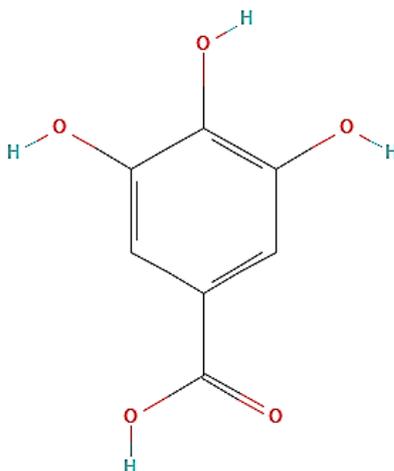
2.3.4.1 Ácido Gálico

O ácido gálico (Figura 8) é um composto fenólico natural, quimicamente, é o ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico que pode ser encontrado em uma ampla variedade de vegetais, frutas,

chá, café e vinho. Possui uma fórmula molecular de $C_6H_2(OH)_3CO_2H$ e um peso molecular de 170,12 g/mol. Sua presença em plantas ocorre em diferentes formas, incluindo ácidos livres, derivados de catequina, ésteres e taninos hidrolisáveis. Os derivados do ácido gálico são naturalmente produzidos em plantas e podem ser sintetizados a partir de plantas naturais. O ácido gálico é mais comumente encontrado em espécies da família *Myrtaceae*, como o murici, e é conhecido por sua forte ação antioxidante. Alimentos como chás, vinho tinto, café, frutas e vegetais podem ser fontes de ácido gálico (AL ZHRANI; EL-SHISHTAWY; ASIRI, 2020; OBOH et al., 2016; SHUKLA et al., 2022).

O ácido gálico tem sido estudado por suas propriedades farmacológicas e terapêuticas potenciais, incluindo atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e antidiabética. Também tem sido estudado em relação à sua capacidade de prevenir doenças cardíacas, pois pode ajudar a reduzir o nível de colesterol no sangue e a pressão arterial. Pode ajudar a proteger a pele contra os danos causados pelos radicais livres, retardar o envelhecimento da pele e reduzir a inflamação (KANG et al., 2018; OBOH et al., 2016; SUN et al., 2016).

Figura 8 – Estrutura básica do ácido gálico.



Fonte: National Center for Biotechnology Information – PubChem (2023)

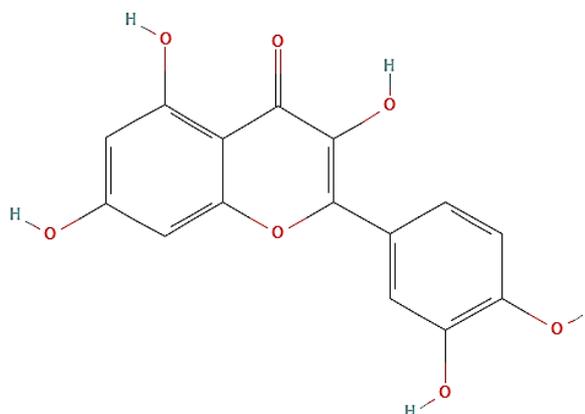
2.3.4.2 Quercetina

A quercetina é um flavonóide pertencente à classe dos flavonóis com nomenclatura 2-(3',4'-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidrocromo-4-ona (Figura 9), é encontrada em diversas plantas, como cebola, maçã, brócolis, chá verde, uvas e outros alimentos de origem vegetal (ALMEIDA et al., 2018). É um dos compostos fenólicos mais estudados e comprovadamente benéficos para

a saúde. Apresentando uma potente ação antioxidante, ajudando a neutralizar os radicais livres e prevenir danos oxidativos às células. Além disso, ela apresenta propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e anticancerígenas, podendo ser eficaz no tratamento de diversas doenças (SUGANTHY et al., 2016; UDAYA RAJESH; SANGEETHA, 2023; YANG et al., 2018).

A quercetina é geralmente bem tolerada e segura quando consumida em quantidades encontradas naturalmente em alimentos. No entanto, doses elevadas podem causar efeitos colaterais, como dor de cabeça e problemas gastrointestinais (UDAYA RAJESH; SANGEETHA, 2023).

Figura 9 – Estrutura básica da Quercetina.

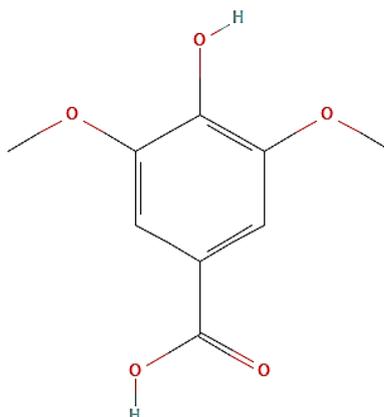


Fonte: National Center for Biotechnology Information – PubChem (2023)

2.3.4.3 Ácido Siríngico

O ácido siríngico (Figura 10) ($C_9H_{10}O_5$) é um composto fenólico pertencente ao grupo dos ácidos hidroxibenzoicos, assim como o ácido gálico, o ácido p-hidroxibenzoico e o ácido vanílico. É encontrado em diversas plantas, como trigo, arroz, centeio, milho, cevada, soja e outras leguminosas. Apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória, podendo ser benéfico na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação crônica, como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (ABD-ALLAH; RAGAIE; ELMOWAFY, 2023; SRINIVASULU et al., 2018).

Figura 10 – Estrutura básica do Ácido Siríngico.



Fonte: National Center for Biotechnology Information – PubChem (2023)

Diversos estudos apontaram que o ácido siríngico possui propriedades que podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Isso se deve ao fato de que o ácido siríngico possui a capacidade de proteger as células nervosas do dano oxidativo e reduzir a inflamação no cérebro (SOMADE et al., 2022). Além disso, esse composto também pode trazer benefícios para a saúde do sistema gastrointestinal, prevenindo inflamações e doenças no trato digestivo. Algumas pesquisas sugerem que o ácido siríngico pode até mesmo ter propriedades prebióticas, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas no intestino (ABD-ALLAH; RAGAIE; ELMOWAFY, 2023; MUTHUKUMARAN et al., 2013; SRINIVASULU et al., 2018).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Em baixas concentrações em relação ao substrato oxidado, os antioxidantes podem retardar ou inibir efetivamente o processo de oxidação. Na indústria de alimentos, a busca por antioxidantes naturais e seguros tem se tornado cada vez mais importante. Apesar dos antioxidantes sintéticos serem altamente eficazes e estáveis, seu uso é limitado em muitos países devido aos possíveis efeitos adversos na saúde humana (TIVERON et al., 2012).

O uso de compostos antioxidantes tem despertado grande interesse em diversas áreas devido aos seus potenciais benefícios à saúde. Na nutrição, por exemplo, esses compostos podem ajudar a prevenir ou controlar doenças crônicas, melhorar a função cardiovascular e fortalecer o sistema imunológico. Na medicina, os antioxidantes são estudados como uma

possível forma de prevenir ou tratar doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, bem como certos tipos de câncer (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Segundo estudo realizado por Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L, (2005) existem duas categorias principais de ensaios de capacidade antioxidante: (1) ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) e (2) ensaios baseados na reação de transferência de elétrons únicos (ET). Os ensaios baseados em ET envolvem uma reação redox na qual o oxidante (que também age como uma sonda para monitorar a reação) é um indicador do ponto final da reação. Por outro lado, a maioria dos ensaios baseados em HAT monitora a cinética da reação competitiva, e a quantificação é derivada das curvas cinéticas obtidas.

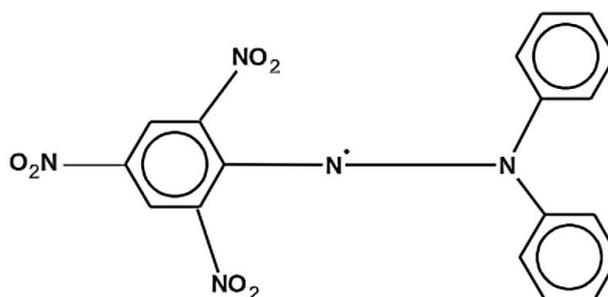
Os ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) incluem o ensaio do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), o ensaio do radical 2,2'-difênil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o ensaio do radical peroxila (ORAC). Já os ensaios baseados na reação de transferência de elétrons únicos (ET) incluem o ensaio do poder redutor férrico (FRAP), o ensaio do íon cúprico (CUPRAC) e o ensaio do poder antioxidante do ferro (FCA).

Tanto os ensaios baseados em transferência de átomos de hidrogênio (HAT) quanto em transferência de elétrons (ET) têm como objetivo mensurar a capacidade de remoção de radicais (ou oxidantes), em vez da capacidade antioxidante preventiva de uma amostra.

2.4.1 Método DPPH

O ensaio DPPH é amplamente adotado devido à sua popularidade, facilidade de uso, custo acessível e eficiência. Foi desenvolvido por Blois em 1958 (KEDARE; SINGH, 2011), utiliza o radical DPPH (2,2-difênil-1-picrilhidrazil), reconhecido como um radical livre estável e um dos poucos radicais de nitrogênio disponíveis (conforme ilustrado na Figura 11). Esse ensaio é amplamente empregado para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais. Os antioxidantes presentes na amostra interagem com o radical livre DPPH, realizando a transferência de um elétron e neutralizando o radical (KANDI; CHARLES, 2019).

Figura 11 – O radical DPPH



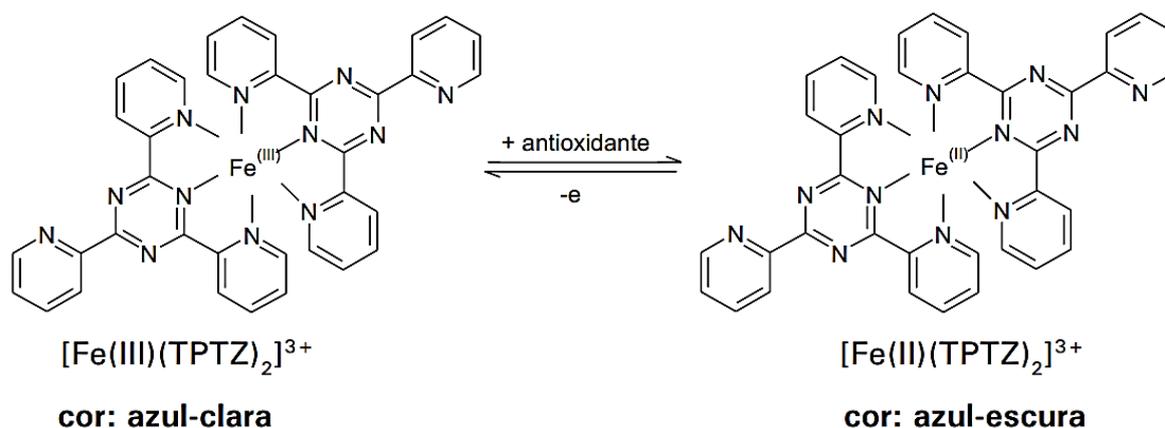
Fonte: Adaptado de Kedare et al. (2011)

Esse ensaio a medição da capacidade dos compostos em neutralizar radicais livres ou doar hidrogênio, e pode ser aplicado em amostras sólidas ou líquidas, incluindo sistemas biológicos complexos. Além disso, o DPPH pode ser usado para medir a capacidade antioxidante global de uma amostra, bem como a atividade de eliminação de radicais livres em sucos de frutas e vegetais. Em resumo, o ensaio DPPH é uma ferramenta importante na avaliação da atividade antioxidante de compostos e na determinação do potencial de prevenção de doenças associado a esses compostos (KEDARE; SINGH, 2011).

2.4.2 Método FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro (Figura 12) é uma técnica desenvolvida para avaliar a capacidade antioxidante de compostos puros em soluções aquosas e fluidos biológicos, medindo a redução do ferro. Além de ser aplicável para estudar a atividade antioxidante de extratos de alimentos e bebidas, esse método também é eficiente na avaliação da eficácia antioxidante de substâncias puras, fornecendo resultados comparáveis a outros métodos mais complexos. Durante o ensaio, o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido a complexo ferroso (FeII-TPZ) na presença de um antioxidante e em condições ácidas. Esse processo resulta em um complexo de coloração azul intensa, cuja absorção máxima ocorre em 593 Nm (RUFINO et al., 2006).

Figura 12 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺



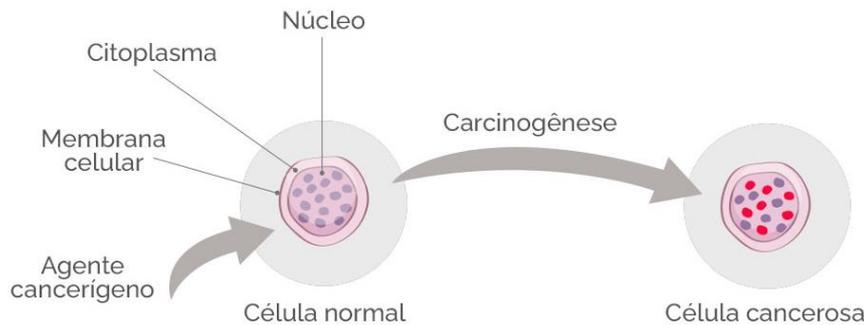
Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2006)

2.5 CÂNCER

O câncer é uma condição complexa que se refere a um conjunto de mais de 100 doenças malignas distintas. Todas elas são caracterizadas pelo crescimento desordenado e incontrolável de células anormais que podem invadir e danificar tecidos e órgãos saudáveis próximos ou mesmo em outras partes do corpo. Essas células cancerosas têm a capacidade de se dividir e se reproduzir rapidamente, muitas vezes de forma agressiva e invasiva, e são capazes de se adaptar e resistir a tratamentos convencionais.

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo que ocorre a partir de mutações genéticas em células normais (Figura 13). Essas mutações podem ser causadas por uma variedade de fatores externos, como o tabagismo, a exposição à radiação ionizante ou à produtos químicos cancerígenos, ou por fatores internos, como erros na replicação do DNA ou predisposição genética. As células com mutações genéticas começam a se dividir e crescer descontroladamente, formando um tumor que pode invadir tecidos próximos e se espalhar para outras partes do corpo, através do sistema linfático ou da corrente sanguínea, num processo conhecido como metástase. O câncer pode afetar qualquer órgão ou tecido do corpo e é classificado de acordo com o tipo de célula que o origina (TEIXEIRA, 2007).

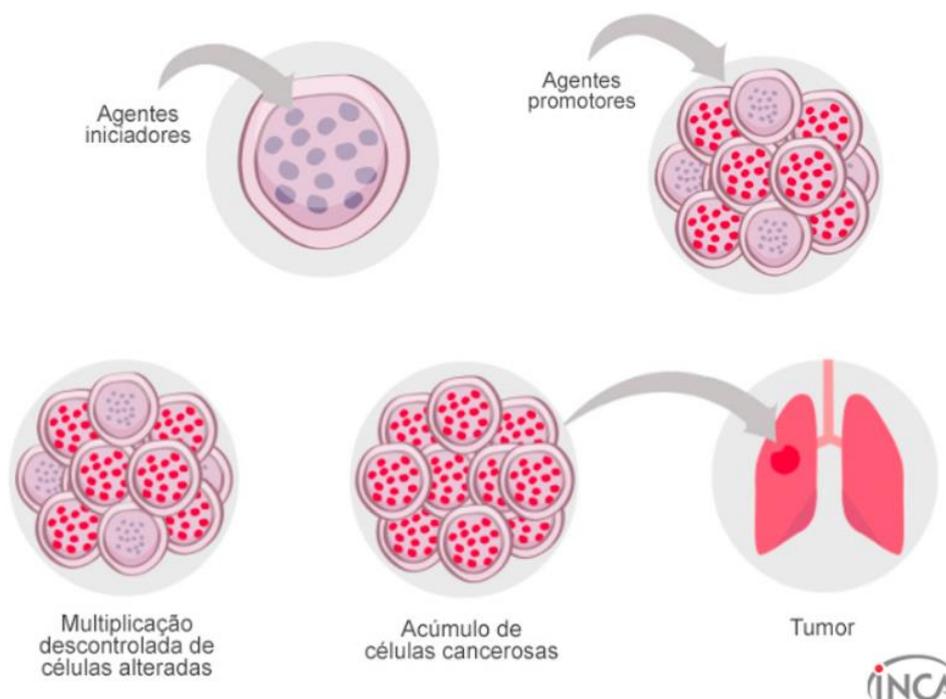
Figura 13 – Como surge o câncer.



Fonte: Adaptado de Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2023.

A formação de câncer envolve um processo complexo denominado de carcinogênese ou oncogênese, que ocorre em três estágios principais (Figura 14). O primeiro estágio é a iniciação, no qual agentes cancerígenos agem modificando o material genético das células normais, deixando-as suscetíveis a mutações adicionais no estágio seguinte, conhecido como promoção. Na etapa de promoção, as células "iniciadas" passam a ser transformadas em células cancerosas pela ação de agentes cancerígenos conhecidos como oncopromotores. É importante destacar que, para que isso aconteça, as células iniciadas precisam ser expostas a esses agentes por períodos prolongados. Uma vez que as células tenham ultrapassado as etapas iniciais, a carcinogênese inicia-se a fase progressão, na qual as células cancerosas se multiplicam de forma descontrolada, formando um tumor que pode se espalhar para outras partes do corpo. Esse estágio é acompanhado por manifestações clínicas da doença, que podem incluir dor, perda de peso, fadiga e outros sintomas, dependendo do tipo e da localização do tumor (INCA, 2023).

Figura 14 – Três etapas principais da formação do câncer: iniciação, promoção e propagação.



Fonte: Adaptado de Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2023.

No Brasil, o câncer de pele é o tipo mais comum e representa cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2022). Ele é dividido em câncer de pele do tipo melanoma e não melanoma. Embora o melanoma corresponda a apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, é considerado o tipo mais grave e preocupante de câncer cutâneo devido à sua natureza altamente invasiva e capacidade de formar metástases. De fato, o melanoma é responsável por mais de 79% das mortes relacionadas a câncer de pele, resultando em baixa sobrevida e alta mortalidade. (ANTONIO ACCIOLI DE VASCONCELLOS; BINS ELY, 2009; PELINSON et al., 2019).

A viabilidade celular em células cancerígenas é crucial tanto para a pesquisa quanto para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer. Ela se refere à capacidade dessas células de se manterem íntegras e sobreviverem em ambientes *in vitro* ou *in vivo* (RISS; MORAVEC; NILES, 2013). Diversos fatores podem influenciar a viabilidade, como a presença de compostos tóxicos, alterações no microambiente celular, deficiências nutricionais e fatores intrínsecos à célula, incluindo alterações genéticas e mutações. Os ensaios de viabilidade celular são amplamente utilizados para avaliar a toxicidade de compostos em células cancerígenas, bem como identificar novos compostos com atividade anticancerígena. Além disso, a viabilidade celular é uma medida importante da resposta aos tratamentos, como quimioterapia e radioterapia, uma vez que a morte celular é um dos principais objetivos dessas terapias. A

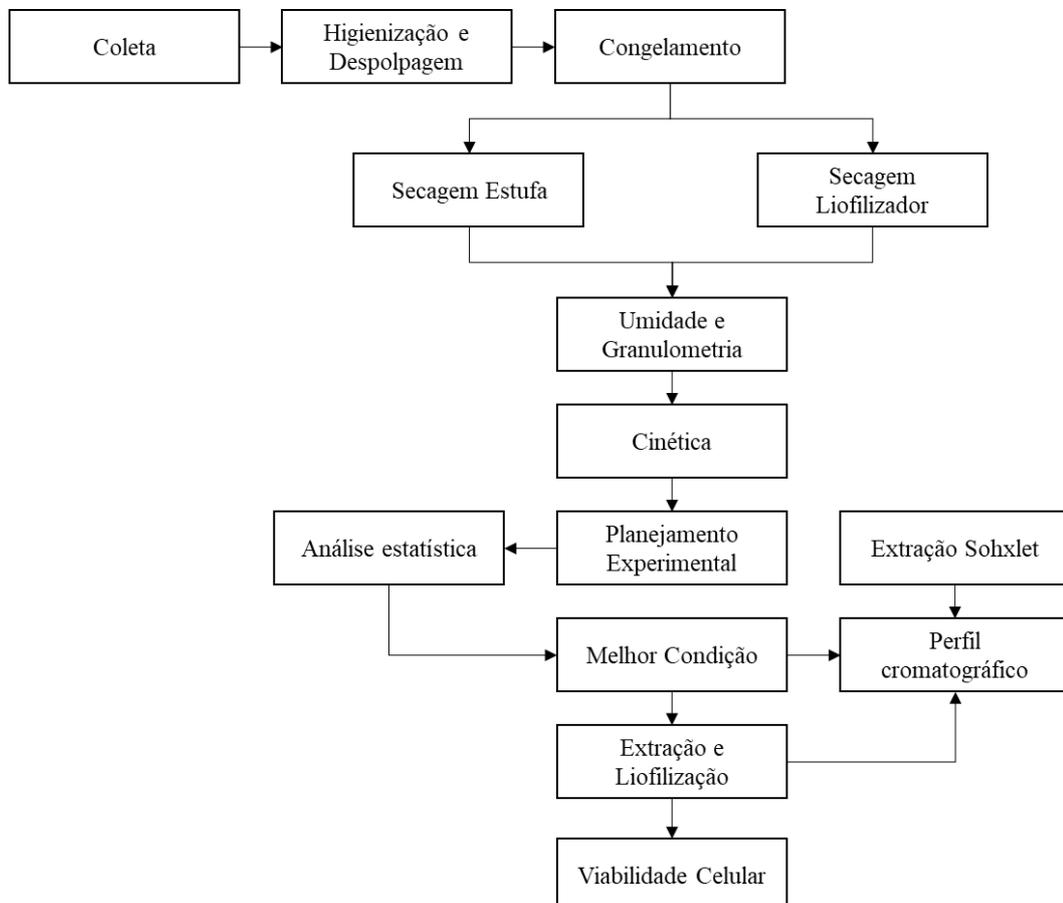
avaliação da viabilidade celular pode indicar a eficácia do tratamento e ajudar na escolha de abordagens terapêuticas mais efetivas. É crucial considerar as características distintas das células cancerígenas em relação às células normais, o que pode afetar a viabilidade celular e a resposta aos tratamentos, demandando estudos específicos nesse contexto (AHMAD et al., 2018; KAMILOGLU et al., 2020; RISS; MORAVEC; NILES, 2013).

Os compostos bioativos são poderosas ferramentas para estudar sistemas biológicos, uma vez que são capazes de modular de maneira rápida, condicional, muitas vezes reversível e dependente da dose, as funções biológicas das células vivas. Por esta razão, os inibidores da migração celular têm sido amplamente utilizados como ferramentas úteis para investigar os mecanismos fundamentais por trás da migração celular (TASHIRO; IMOTO, 2016). Uma das vantagens do uso de compostos bioativos obtidos de plantas é a alta eficiência que eles apresentam, com poucos efeitos colaterais e a um baixo custo. Por isso, tais compostos podem ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas doenças (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, serão descritas as técnicas utilizadas para desenvolver a pesquisa com o objetivo de extração de compostos bioativos do Murici. As principais etapas envolvidas no processo incluem: secagem, moagem, análise de umidade e granulometria, cinética de extração, além do planejamento experimental. Também serão apresentados os métodos analíticos empregados para determinar os compostos fenólicos totais (CFT), avaliar a atividade antioxidante total (AAT), perfilar os compostos bioativos quantificados por cromatografia líquida e verificar a citotoxicidade em fibroblastos normais de humanos e a viabilidade celular do extrato em células de melanoma cutâneo. O fluxograma das metodologias a serem desenvolvidas é mostrado na Figura 15. Todos os experimentos e procedimentos analíticos foram realizados nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus Chapecó*.

Figura 15 – Fluxograma de atividades



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria-prima

Os frutos do Murici (*Byrsonima crassifolia*) foram obtidos na feira da SEPROR localizada na Colônia Terra Nova, Manaus – AM (latitude -2.9953332072022874, longitude -0.02238795997073), foram obtidos no mês de março de 2022. Os frutos foram transportados em garrafas armazenados com água (Figura 16) da forma como são vendidos nas feiras, e ao chegar no local de destino, foram submetidos a higienização. Os frutos foram retirados das garrafas e lavados em água corrente, higienizados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 200 ppm, para que pudessem ser despulpados. A polpa foi congelada a uma temperatura de -18 °C até o transporte para o laboratório da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. As amostras foram transportadas por avião pela autora, mantendo-as armazenadas e congeladas em caixa de isopor. Ao chegarem à universidade foram armazenadas no freezer (-18 °C) até o momento da utilização.

Figura 16 – Frutos do Murici armazenados em garrafas, vendido nas feiras de Manaus-AM



Fonte: Acervo da autora, 2023.

3.1.2 Reagentes

- DPPH -2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Alfa Aesar, 95%);
- Trolox ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,6,7,9-tetrametilcromano-2-carboxílico (Sigma-Aldrich, 97%);
- Álcool etílico P.A (Neon, 95%);
- Reagente Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica, 99%);
- Carbonato de sódio (Dinâmica; 99%)
- Ácido gálico (Êxodo Científica, 99%);
- Metanol (Tedia[®], grau HPLC);
- Acetato de sódio trihidratado (PM = 136,08);
- Ácido acético glacial P.A.;
- Ácido clorídrico P.A. (PM = 36,5; d = 1,19);
- Cloreto férrico hexahidratado (PM = 270,3);
- Sulfato ferroso heptahidratado (PM = 278,02);
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34);
- Ácido fórmico;
- DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium);
- Soro fetal bovino;
- Tripsina/EDTA;
- MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio);
- DMSO (dimethyl sulfoxide).

3.1.3 Equipamentos

- Peneirador eletromagnético (Contenco);
- Balança (Shimadzu, AUX 320);
- Multiprocessador (Arno 420W)
- Centrífuga (Sigma, 3-15KL);
- Cromatógrafo (Shimadzu HPLC-MS 2020);
- Coluna Shim-pack GISS.
- Estufa de secagem e esterilização com circulação e renovação de ar (American Lab, AL-102/480);

- Liofilizador de bancada (Solab, SL-404);
- Ultrassom (Ultronique, Q5.9/404)
- Evaporador rotativo (Technal, TE 211);
- Microscópio Invertido de fluorescência (Nikon, Eclipse Ts2; câmera Nikon DS-Fi3 127 m);
- Estufa Incubadora (Thermo Scientific™);
- Centrífuga de placas (Thermo Scientific™);
- Leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan FC).

3.1.4 Padrões cromatográficos

- Quercetina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Mirecetina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Caempferol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido cafeíco (Sigma-Aldrich, 99%);
- Epicatequina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Flavona (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido P-cumarico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido siríngico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Pirocatecol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Epigallocatequina (Sigma-Aldrich, 99%)

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Secagem dos frutos

Para dar continuidade ao processo, a polpa e a casca dos frutos foram separadas para a realização da secagem, tendo sido retirada a semente para evitar interferências indesejáveis no resultado final. Foram conduzidos dois tipos de secagem: a primeira em estufa com circulação de ar e a segunda no liofilizador, com o objetivo de comparar qual método resultaria em menores perdas e maior eficiência na extração de compostos bioativos.

3.2.1.1 Secagem em Estufa com circulação de ar

Para realizar a secagem em estufa, a polpa foi colocada em bacias de alumínio e levadas a uma estufa com circulação de ar a 50°C por 120 horas, até que a massa (g) atingisse um valor constante conforme mostrado na Figura 17.

Figura 17 – Murici após secagem em estufa.

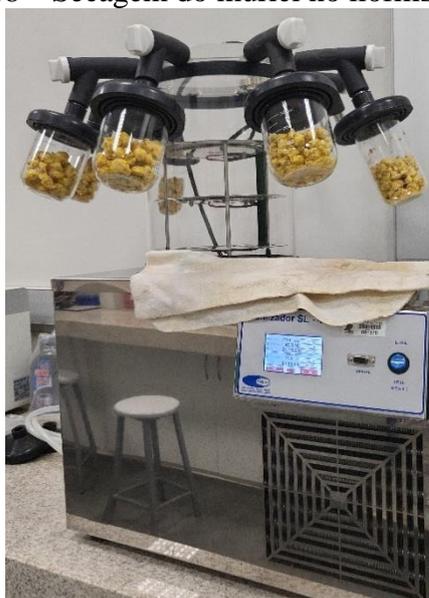


Fonte: Acervo da autora, 2023.

3.2.1.2 Secagem no Liofilizador

Para preparar as amostras do liofilizador, a polpa dos frutos foi separada em frascos de vidro adequados para o equipamento. As amostras foram então levadas ao liofilizador de bancada (Solab, SL-404) com temperatura de -22°C e pressão de -705mmHg , por um período de 48 horas, até que a massa (g) atingisse um valor constante (Figura 18).

Figura 18 – Secagem do murici no liofilizador.



Fonte: Acervo da autora, 2023.

3.2.2 Determinação de umidade

Para determinar a umidade, foi realizada uma análise em estufa com circulação de ar, conforme a metodologia 012/IV descrita por Adolfo Lutz (2008), até que a massa se tornasse constante. As análises foram feitas em triplicata, e o teor de umidade das amostras foi calculado de acordo com a Equação 1, expressando o resultado como percentual de umidade (%).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_a} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

M_i = massa inicial da placa (g);

M_f = massa final da amostra mais a placa (g);

M_a = massa inicial da amostra (g).

3.2.3 Análise granulométrica para determinação do tamanho das partículas

Após a etapa de secagem, as amostras foram trituradas em um multiprocessador da marca Arno®, a fim de reduzir e padronizar o tamanho das partículas da amostra. Em seguida, o pó resultante foi submetido à peneiração utilizando um peneirador eletromagnético da marca Conteco®, com peneiras da série Tyler 10, 16, 30, 40, 60, 100 e fundo, empilhadas em ordem decrescente de tamanho de *mesh* (Figura 19).

Aproximadamente 100 g da fruta seca triturada foram adicionadas à primeira peneira e, em seguida, as peneiras foram agitadas por 15 minutos. Ao final do tempo, as peneiras foram pesadas para determinar a massa retida em cada uma delas.

Figura 19 – Peneirador eletromagnético



Fonte: Acervo da autora, 2023.

Após a análise dos resultados, optou-se por selecionar as partículas retidas na peneira de 60 *mesh*, onde se obteve o maior volume de biomassa, juntamente com o material do fundo, para a realização dos ensaios. Em seguida, o pó do murici foi armazenado em potes de vidro envoltos em papel alumínio e acondicionados no freezer (-18 °C) até o momento da utilização.

3.2.4 Cinética dos ensaios para determinação de tempo de extração

Para a determinação do tempo ideal de extração foi realizada uma cinética de extração, conforme a Tabela 3, com variações de tempo entre 0 e 120 minutos. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 50°C, com razão sólido-líquido de 40 mg/mL e concentração de etanol de 70%, condição que apresentou bons resultados na obtenção de atividade antioxidante, conforme descrito por Gambin e Bender (2020). O tempo ideal de extração foi determinado com base nos resultados obtidos para os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, utilizando os testes de Tukey e de HSU (*Multiple Comparisons with the Best-MCB*)."

Tabela 3 – Cinética de extração

Ensaio	2	3	4	5	6	7	8
Tempo (min)	15	45	60	75	90	105	120

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.2.5 Planejamento experimental para otimização da obtenção do extrato

Conduzido por meio da aplicação da técnica de planejamento de experimentos foi realizado o estudo para obtenção do extrato do murici. A fim de avaliar a influência das variáveis estudadas e encontrar a melhor condição para a obtenção do extrato do murici, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) completo conforme a Tabela 4, utilizando pontos axiais para avaliar o efeito quadrático das variáveis investigadas. O delineamento foi composto por três variáveis, dois níveis, pontos axiais e centrais, em um fatorial completo 2³. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em ordem randômica, para os dois tipos de secagem (Estufa e Liofilizador), a fim de comparar qual o melhor método de secagem. Após a cinética de extração descrita no item anterior, um tempo de extração foi fixado com base nos resultados obtidos.

Tabela 4 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	30	40	55	70	80
Razão sólido/líquido (mg/mL)	15	25	40	55	65
Concentração de etanol (%)	6	20	40	60	74

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir da análise do comportamento das variáveis, foi selecionada a melhor condição de extração para obtenção de um extrato com alta atividade antioxidante.

3.2.6 Métodos de extração

3.2.6.1 Banho de ultrassom

Os experimentos foram conduzidos em banho de ultrassom por um período fixo de 105 minutos, seguindo a determinação do tempo de extração obtido na cinética experimental. O pó de murici foi pesado em tubos de ensaio com rosca, de acordo com as condições definidas no delineamento experimental, e em seguida, adicionou-se uma solução de extração contendo etanol nas concentrações também definidas no planejamento experimental. Os tubos de ensaio foram devidamente fechados e submetidos ao banho de ultrassom, sendo a temperatura ajustada conforme as condições de cada experimento.

Após o término do tempo determinado de extração, as amostras foram transferidas para tubos *Falcon* e centrifugadas a 5000 rpm, 5 °C por 5 minutos. O resíduo foi descartado e o extrato (sobrenadante) foi filtrado utilizando filtros nylon (0,45 μ m) e armazenado em tubos de *Falcon* previamente envoltos em papel alumínio e mantidos em freezer a -18 °C até o momento das análises.

3.2.6.2 Soxhlet

Para fins de comparações dos resultados obtidos pelo planejamento experimental, utilizou-se a melhor condição (Tabela 6) encontrada pelo método de ultrassom para comparar com o método de Soxhlet.

Foram utilizados cartuchos extrativos contendo três (3) gramas de biomassa para a realização da análise em triplicata por meio do método de Soxhlet. A solução de extração (150 mL), contendo 60% de etanol, juntamente com as pérolas de vidro, foi adicionada em cada balão e os mesmos foram colocados no extrator (Figura 20). Em seguida, o aquecimento foi ligado para que ocorresse o processo de sifonação, que se estendeu por mais de 6 horas até que o solvente em torno do cartucho se tornasse incolor. Ao término do processo, as alíquotas foram armazenadas para análises posteriores.

Figura 20 – Extração de compostos fenólicos com o método de Soxhlet



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.7 Métodos analíticos

Ao término de cada planejamento experimental, procedeu-se a análise dos compostos fenólicos totais e a avaliação da atividade antioxidante total, utilizando os ensaios DPPH e FRAP. A seguir, serão descritas as metodologias utilizadas para a realização dessas análises.

3.2.7.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada por meio de um método espectrofotométrico utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu*, seguindo a metodologia descrita por Pires *et al.* (2019) e Singleton *et al.* (1999). Para garantir a preservação

dos compostos reativos presentes nos extratos e reagentes, os ensaios foram realizados em um ambiente escuro.

Inicialmente elaborou-se uma curva padrão para a realização da leitura das amostras. Essa curva foi preparada a partir da solução mãe de ácido gálico (0,5 mg/mL – 500 µg/mL) em diluições de metanol (10, 25, 50, 75, 100, 125 µg/mL) todas preparadas em triplicata nos eppendorf, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações das soluções de ácido gálico para curva padrão.

Pontos	[] finais da solução (µg/mL)	Volume final (mL)	Volume solução mãe (mL)	Volume de metanol (mL)
1	0	1,5	0	1,5
2	10	1,5	0,03	1,47
3	25	1,5	0,075	1,425
4	50	1,5	0,15	1,35
5	75	1,5	0,225	1,275
6	100	1,5	0,3	1,2
7	125	1,5	0,375	1,125

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As amostras foram diluídas em metanol (proporção 1:20 v/v) e foram preparadas em triplicata para cada ponto da curva, branco e amostras, seguindo a ordem de adição dos reagentes. Aos tubos, foram adicionados uma alíquota de 100 µL das amostras, alíquotas de 500 µL do reagente de *Folin-Ciocalteau* (10%, v/v) e 400 µL de carbonato de sódio (7,5% v/v). Como controle foi utilizado metanol (100 µL de metanol, 500 µL de *Folin-Ciocalteau* e 400 µL de carbonato de sódio).

Os tubos de ensaio contendo as amostras foram submetidos a um banho-maria a 50°C por 5 minutos, seguido de um período no banho de gelo pelo mesmo tempo. Em seguida, foram pipetados 300 µL de amostra e transferidos para uma microplaca organizada para facilitar a leitura dos dados. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 760 Nm. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de biomassa seca (mg AGE/g fruta seca).

3.2.7.2 Atividade antioxidante total pelo método DPPH

Foi empregada a metodologia de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) para avaliar a atividade antioxidante dos extratos, seguindo o procedimento descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) e Roesler *et al.* (2007), com algumas modificações. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e em ambiente escuro para preservar os compostos reativos presentes nos extratos e reagentes.

Para a realização do procedimento experimental, primeiramente foram realizadas as preparações dos reagentes, o DPPH foi diluído em metanol a fim de obter uma solução 0,004% (m/v (g/mL)), após o preparo do reagente foi mantido em frasco âmbar a temperatura de 4 °C até o momento do ensaio. Em seguida, foi realizado o preparo da solução padrão de Trolox (1500µM) a partir desta solução as amostras foram diluídas conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações das soluções de Trolox para curva padrão

Pontos	Concentração (µmol/L)	Volume (µL) – Solução padrão (mãe)	Volume solvente Etanol (µL)
1	10	10	1490
2	25	25	1475
3	50	50	1450
4	75	75	1425
5	100	100	1400
6	125	125	1375
7	150	150	1350
8	175	175	1325
9	200	200	1300
10	225	225	1275

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As diluições realizadas para a curva padrão, foram acondicionadas em eppendorf e levadas a banho ultrassônico a 10°C durante 30 minutos. Passado o tempo, foram pipetados 40 µL das diluições para as microplacas, tanto da curva, quanto das amostras diluídas 1:40 (v/v). Em ambas as situações, adicionou-se 200 µL da solução de DPPH 0,004% para o preparo. Para controle negativo, usou-se 40 µL de metanol e 200 µL da solução de DPPH 0,004%, além disso

240 µL de metanol foram adicionados para corrigir a curva base. Decorrido o tempo de 30 minutos, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 517 Nm. Os resultados foram expressos com micromol de Trolox equivalente por grama de amostra seca (µmol TE/g seca).

3.2.7.3 Cálculo do potencial ativo (PA)

O objetivo deste estudo é obter um extrato que apresente não apenas elevada concentração de compostos fenólicos, mas também uma forte atividade antioxidante. Para avaliar os resultados alcançados, foi utilizado um índice que considera ambos os fatores. O índice de Potencial Ativo (PA) foi calculado conforme a Equação 2.

$$PA = \frac{CTF_x}{CTF_y} + \frac{DPPH_x}{DPPH_y} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

CTF_x= resultado para o ponto analisado;

CTF_y= maior resultado encontrado para CTF no ensaio analisado;

AAT_x= resultado para o ponto analisado;

AAT_y= maior resultado encontrado para AAT no ensaio analisado.

A fim de avaliar a relação entre o resultado analisado e o melhor resultado obtido no experimento em relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, é importante ter em mente que o valor do índice PA não pode exceder 2,00. Assim, o cálculo do índice PA fornece uma indicação do desempenho superior em termos de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3.2.7.4 Avaliação da atividade antioxidante total pelo método FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), utilizou-se o procedimento descrito por Rufino *et al.* (2006). Com o objetivo de explorar outras análises de atividade antioxidante do extrato obtido e permitir a comparação com resultados anteriores relatados na literatura, visando avaliar as melhores condições dos extratos em relação à atividade antioxidante. O método FRAP avalia a capacidade de redução do ferro como indicador de atividade antioxidante.

Para a realização do procedimento experimental, foram preparados os reagentes utilizados ao longo de todo o processo. Primeiramente uma solução padrão de sulfato ferroso 2.000 μM foi preparada. A partir dessa solução, as amostras foram diluídas de acordo com a Tabela 7. Além disso, preparou-se a solução do reagente FRAP (a qual deve ser usada imediatamente após sua preparação, não podendo ser armazenada) a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Também foi preparada uma solução padrão de sulfato ferroso 2.000 μM

Tabela 7 – Concentrações das soluções de sulfato ferroso para curva padrão.

Ponto	Concentração (μmol)	Volume (μL) – Solução padrão (mãe)	Volume solvente Água (μL)
1	500	250	750
2	1.000	500	500
3	1.500	750	250
4	2.000	1000	0

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para a determinação da curva padrão, foram adicionados uma alíquota de 30 μL de cada concentração de sulfato ferroso para cada eppendorf, juntamente com 90 μL de água destilada e 900 μL do reagente FRAP. Após homogeneizados as amostras foram mantidas em banho maria a 37°C durante 30 minutos. Após esse período, as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, tendo o reagente FRAP como branco para calibração do equipamento, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Com base nos resultados obtidos, foram plotados os valores de concentração de sulfato ferroso (em mM) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y em uma planilha. A equação da reta foi calculada a partir desses dados. Utilizando essa equação, foi possível calcular a absorbância correspondente a uma concentração de 1000 μM de sulfato ferroso

3.2.7.4.1 Determinação da atividade antioxidante total dos extratos

A partir do extrato da melhor condição definida pelas análises anteriores, foram preparadas três diluições diferentes (1:5, 1:10 e 1:20) em triplicata. Para cada diluição, transferiu-se 30 μL da amostra para cada eppendorf, adicionando 90 μL de água destilada e 900

μL do reagente FRAP. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse período, as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, utilizando o reagente FRAP como branco para calibração do equipamento.

Para determinar a atividade antioxidante total (AAT), utilizou-se a equação da reta, substituindo a absorbância correspondente a $1.000 \mu\text{M}$ do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo "x" (Equação 3) correspondeu à diluição da amostra (em mg/L) equivalente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso.

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

y = Absorbância correspondente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso

Para obter o valor em gramas (g), o valor de x obtido na Equação 3 foi dividido por 1.000. Em seguida, para calcular o resultado (Equação 4), 1.000 (μM) foi dividido pelo valor de x (em g) e multiplicado por 1 (g) para obter o valor final (Z) (Equação 5), expresso em μM de sulfato ferroso por grama de biomassa.

$$X(g) = \frac{x}{1.000} \quad (\text{Equação 4})$$

$$Z = \frac{1.000}{X(g)*1 g} \quad (\text{Equação 5})$$

3.2.8 Liofilização do extrato

Com base na condição de extração ótima determinada pelo planejamento experimental e nos resultados obtidos para CFT e ATT, foram realizadas extrações sucessivas para obter um volume adequado de extrato. Em seguida, o extrato foi liofilizado com os seguintes parâmetros: temperatura de -22°C e pressão de -705mmHg , por um período de 48 horas, até que a massa (g) atingisse um valor constante.

A extração foi conduzida de acordo com as condições descritas na Tabela 8, visando o congelamento das amostras. Para remover o etanol presente no extrato, utilizou-se um

evaporador rotativo. O processo foi realizado até que a proporção inicial de etanol adicionado fosse recuperada. Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos de vidro e congeladas completamente. Após o congelamento, as amostras foram submetidas à liofilização e armazenadas em um ultrafreezer até o momento da análise de viabilidade celular.

Tabela 8 – Condições utilizadas na extração para a liofilização do extrato

Variáveis	Condição
Temperatura (°C)	80
Razão sólido/líquido (mg/mL)	25
Concentração de etanol (%)	60
Potência de ultrassom (%)	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS

3.3.1 Cultivo celular

Para a realização do cultivo celular, foram utilizadas células de linhagem de melanoma cutâneo da linhagem SK-MEL-28 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), com código ATCC (Do inglês, American Type Culture Collection) HTB-72 e Fibroblastos normais de humanos da linhagem celular CCD 1059 Sk.

As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com saturação de 5% de CO₂ (Thermo Scientific™), e cultivadas utilizando o meio de cultivo DMEM (Do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescido de 1% de antibiótico e antifúngico (penicilina/estreptomicina 10 mg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL, respectivamente). As células foram avaliadas diariamente, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias, até atingir a confluência necessária para realização dos protocolos experimentais. Ao atingirem a quantidade de células necessárias, com confluência de 80-95%, estas foram destacadas das garrafas de cultivo utilizando Tripsina/EDTA e, de acordo com cada protocolo, semeadas em placas de 96 ou 6 poços para que assim pudessem atingir 100% de confluência celular.

3.3.2 Tratamento das células

Para realização dos ensaios as células foram tratadas por 24 horas com o extrato do murici (*Byrsonima crassifolia*). Para isso, o extrato foi diluído em meio de cultivo DMEM. As concentrações de tratamento dos extratos SK-Mel-28 e CCD 1059 Sk foram 250, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 µg/mL. Os compostos isolados quercetina e ácido p-Cumárico foram selecionados com base em suas concentrações no extrato. Eles foram diluídos em DMSO (0,2%) e meio DMEM. Para o tratamento das células com quercetina, foram utilizadas as concentrações de 20, 50 e 80 µg/mL, enquanto para o ácido p-Cumárico foram utilizadas as concentrações de 0,5, 2,5 e 4,5 µg/mL. O controle da reação foi realizado utilizando apenas o meio DMEM. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao controle.

3.3.3 Análise da viabilidade Celular (MTT)

Para a avaliação da viabilidade celular nas células da linhagem CCD 1059 Sk e SK-MEL-28, utilizou-se o reagente de ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O reagente MTT foi utilizado na concentração de 5 mg/mL e quantificado colorimetricamente a 560 nm. Ao ser facilmente incorporado às células viáveis, o MTT é reduzido, pela atuação de enzimas desidrogenases formando o sal formazan, de coloração roxo-púrpura quando solubilizado com a adição de DMSO, sendo a intensidade de cor proporcional à quantidade de células viáveis. (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010).

3.4 PERFIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS POR HPLC-MS

Os compostos bioativos foram identificados utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado a um detector de massa (HPLC-MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI (-)), seguindo a metodologia descrita por Arruda *et al.* (2018) com adaptações. Para a separação, utilizou-se a coluna Shim-pack VP-ODS fase reversa (150mm x 2,0 mm (i.d) x 4,6 um), fase móvel A contendo ácido fórmico 0,3% e fase móvel B contendo metanol 50%. O modo gradiente foi aplicado de acordo com a Tabela 9, a um fluxo de 0,4 mL/min e a temperatura do forno foi mantida a 40°C. A construção da curva padrão foi realizada diluindo-se os padrões em metanol para obter uma concentração de 1000 ppm. A partir dessa solução, uma mistura de padrões foi preparada, contendo concentrações de 1,5; 3,12; 6,25; e 12,5 ppm.

A curva padrão foi construída diluindo-se os padrões em metanol a uma concentração de 1000 ppm, a partir dos quais foi preparada uma mistura de padrões com concentrações de 1,5; 3,12; 6,25; e 12,5 ppm. Foram avaliados onze padrões, incluindo quercetina, mirecetina, caempferol, ácido cafeíco, epicatequina, flavona, ácido p-cumárico, ácido siríngico, pirocatecol, ácido gálico e epigallocatequina. A identificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção dos padrões injetados e a concentração dos compostos foi expressa em mg/L e posteriormente convertida para mg/g_{biomassa}.

Tabela 9 – Utilização de gradiente de concentração da fase móvel B ao longo do tempo na determinação de compostos bioativos

Tempo*	Concentração de B em ppm
0,01	5%
1,00	5%
4,00	60%
7,00	70%
10,00	100%
11,5	100%
12,5	5%
15,0	5%
15,0	Stop

Fonte: elaborado pela autora.

*: tempo em minutos; ppm: parte por milhão.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 Análise estatística da cinética e da viabilidade celular

Os dados cinéticos e da viabilidade celular foram avaliados pela normalidade conforme Shapiro-Wilk, e posteriormente os valores discrepantes foram excluídos pelo teste de *outliers* denominado teste de Grubbs. Os dados paramétricos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A citotoxicidade foi expressa como porcentagem de viabilidade em relação a poços de controle não tratados, usando média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

3.5.2 Análise estatística do planejamento experimental

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Protimiza, executando análise de variância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

4.1.1 Secagem dos frutos

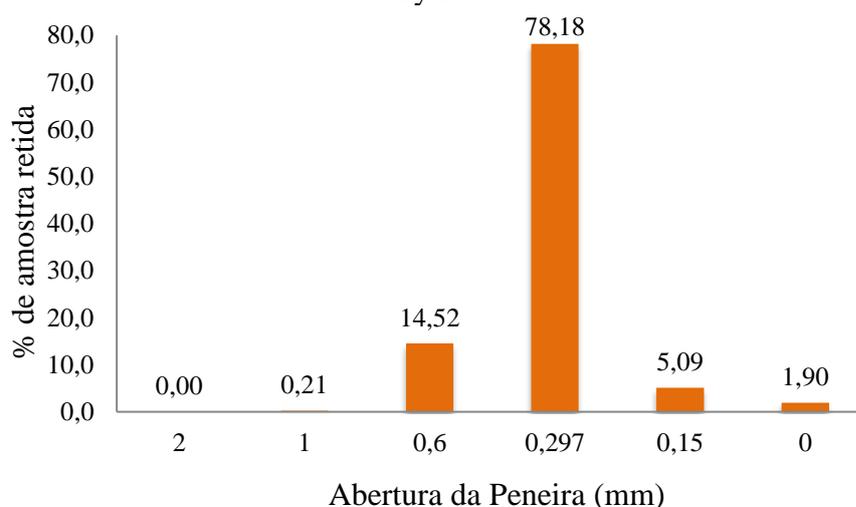
Após o processo de higienização, as amostras foram submetidas ao congelamento. A primeira etapa do processo de preparação consistiu na secagem dos frutos, uma etapa essencial para garantir a estabilidade das amostras durante o armazenamento, prevenir o crescimento de microrganismos e evitar a perda de compostos bioativos. Para atingir esse objetivo, foram empregados dois métodos de secagem. O primeiro método consistiu em utilizar uma estufa a uma temperatura de 50 °C, com o intuito de evitar uma exposição prolongada da matéria-prima a temperaturas mais elevadas. Esse procedimento foi adotado para preservar as propriedades dos frutos, evitando danos térmicos excessivos que poderiam comprometer a qualidade dos compostos presentes nas amostras. O segundo método de secagem foi realizado por meio de liofilização, utilizando um liofilizador sob as condições de temperatura de -22°C e pressão de -705 mmHg ao longo de 48 horas, até atingir a massa constante. Ambos os métodos foram comparados para avaliar qual resultaria na menor perda de compostos bioativos. Após a conclusão do processo de secagem, verificou-se que os frutos apresentavam um teor de umidade de 80,34%, valor este próximo ao estudo de Araujo *et al.* (2018) onde o teor de umidade foi de 79,5%.

4.1.2 Granulometria

Após a etapa de secagem, foi realizado o processo para determinação do tamanho desejado das partículas para o processo de extração. Essa etapa tornou-se crucial, pois o tamanho das partículas pode influenciar a composição do extrato e afetar a transferência de massa durante a extração. A análise granulométrica do material vegetal desempenhou um papel fundamental na padronização do processo extrativo. A uniformidade do tamanho das partículas é essencial, pois ela aumenta a área de contato entre o material e o líquido extrator, o que, por sua vez, pode aumentar a eficiência da extração. Partículas menores possuem uma área superficial maior, o que facilita o processo de extração (COSTA; BUCEK, 2017).

Foi realizada a separação das partículas do material vegetal triturado por meio de uma série de peneiras Tyler com diferentes aberturas: 10 (2mm), 16 (1mm), 30 (0,6mm), 60 (0,297mm) e 100 (0,15mm) *mesh*. Em seguida, o pó resultante passou por uma análise granulométrica para determinar a fração mássica retida em cada peneira. Os resultados dessa análise estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Porcentagem de partículas retidas em função da abertura da peneira pela série Tyler.



Fonte: Elaborado pela autora. 2023 *0: fundo das peneiras.

Ao analisar os dados apresentados na Figura 16, é possível notar que a maior parte das partículas, cerca de 78%, ficou retida na malha de 0,297 mm (*mesh* 60), indicando assim, que as maiores partículas ficaram retidas nessa malha.

Para a realização dos ensaios experimentais, a biomassa com partículas menores que 0,6 mm, retidas nas peneiras de 60 *mesh* (0,297mm) e 100 *mesh* (0,15mm), juntamente com o material de fundo, correspondente a 85,17% da biomassa, foi selecionada. Essa fração da biomassa foi escolhida por apresentar um material mais homogêneo e com tamanho de partícula menor em relação à biomassa inicialmente obtida.

A Figura 22 ilustra a amostra seca triturada após a remoção da biomassa retida nas peneiras de 30 *mesh* (0,6 mm). O pó resultante foi armazenado em potes de vidro envoltos em papel alumínio, protegendo-o da luz, e mantido a uma temperatura de -18°C até o momento das análises.

Figura 22 – Biomassa do Murici seco após passar nas peneiras pela série Tyler



Fonte: Acervo da autora, 2023.

4.2 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.2.1 Cinética de extração

Muitos fatores influenciam significativamente no rendimento de uma extração, dentre eles a influência do tempo é variável crucial para processos extrativos, principalmente na obtenção de extratos para compostos bioativos, onde tempos reduzidos ou muito longos podem prejudicar a extração dos compostos desejados (GONG et al., 2012; YINGNGAM; SUPAKA; RUNGSEEVIJITPRAPA, 2015 LIMA et al., 2018). Dado isso, inicialmente foi realizado uma cinética para a definição do tempo de extração. As condições de extração foram com variações de tempo entre 0 e 120 min. Os ensaios decorreram à temperatura de 50 °C, razão sólido líquido de 40 mg. mL⁻¹ e concentração de etanol de 70%. A cinética foi realizada para ambos os tipos de secagem, estufa e liofilizador.

Ao analisarmos a Tabela 10, podemos observar que para compostos fenólicos totais, os resultados variaram entre 5,81 e 18,20 mg AGE/g amostra seca, onde o maior resultado refere-se ao ensaio 9 (120 min). Enquanto para a atividade antioxidante total temos valores entre 28,18 e 93,84 µmol TE/g amostra seca, diferentemente dos compostos fenólicos totais, o maior resultado foi obtido no ensaio 8 (105 min).

Tabela 10 – Cinética compostos fenólicos (Murici seco em estufa)¹

Ensaio	Tempo	CFT ² (mg AGE/g amostra seca) ²	AAT ³ (μmol TE /g amostra seca) ³	Potencial Ativo ⁴
1	0	5,81 ± 0,1 ^e	28,18 ± 2,0 ^f	0,65 ± 0,1 ^f
2	15	9,53 ± 0,5 ^d	38,24 ± 2,9 ^e	1,00 ± 0,1 ^{ef}
3	30	11,21 ± 0,6 ^c	55,04 ± 1,2 ^d	1,28 ± 0,1 ^{de}
4	45	12,52 ± 0,2 ^{bc}	58,81 ± 2,7 ^d	1,46 ± 0,2 ^{bcd}
5	60	12,75 ± 0,3 ^{bc}	59,13 ± 1,5 ^d	1,34 ± 0,04 ^{cde}
6	75	12,80 ± 0,6 ^b	67,53 ± 1,7 ^c	1,40 ± 0,06 ^{bcd}
7	90	14,01 ± 0,7 ^b	77,19 ± 1,3 ^b	1,68 ± 0,2 ^{abc}
8	105	16,44 ± 0,1 ^a	93,84 ± 3,6 ^a	1,90 ± 0,03 ^a
9	120	18,20 ± 0,9 ^a	76,40 ± 2,4 ^b	1,81 ± 0,1 ^{ab}

Fonte: Elaborado pela autora, (2023).

¹Os resultados são expressos como média das triplicatas ± desvio padrão; ²CFT (mg AGE/ g amostra seca): Compostos fenólicos totais em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca; ³AAT (μmol TE/g amostra seca): Atividade antioxidante total em micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca.

⁴Potencial ativo se dá pelo cálculo: valor analisado do composto fenólico total, dividido pelo seu maior resultado somado ao valor analisado da atividade antioxidante total dividido pelo seu maior resultado. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey (p>0,05).

Quando aplicado o teste de Tukey com 95% de confiança obteve-se uma diferença significativa entre os ensaios onde podemos definir a melhor condição no ensaio 8 com 105 minutos de extração, resultado que também pode ser observado analisando o potencial ativo, sendo o ensaio que obteve o maior valor.

Na tabela 11 observa-se que o ensaio 8 (105 min) também é o que apresenta melhores e maiores resultados para os compostos fenólicos totais, com valores variando entre 8,34 e 30,45 mg AGE/g amostra seca; e para atividade antioxidante total, a qual variou entre 11,68 e 62,97 μmol TE/g amostra seca.

Tabela 11– Cinética compostos fenólicos (Murici seco em liofilizador)¹

Ensaio	Tempo	CFT ² (mg AGE/g	AAT ³ (μmol TE /g	Potencial
		amostra seca) ²	amostra seca) ³	Ativo ⁴
1	0	8,34 ± 0,9 ^e	11,68 ± 0,5 ^f	0,46 ± 0,02 ^f
2	15	12,99 ± 0,1 ^d	26,19 ± 1,1 ^e	0,84 ± 0,01 ^{ef}
3	30	15,69 ± 0,8 ^c	33,78 ± 1,3 ^d	1,05 ± 0,02 ^{de}
4	45	15,95 ± 1,1 ^{bc}	40,64 ± 0,8 ^d	1,16 ± 0,04 ^{bcd}
5	60	19,31 ± 1,3 ^{bc}	40,75 ± 0,2 ^d	1,27 ± 0,05 ^{cde}
6	75	19,42 ± 0,9 ^b	45,89 ± 1,0 ^c	1,34 ± 0,04 ^{bcd}
7	90	19,51 ± 0,3 ^b	45,91 ± 1,1 ^b	1,36 ± 0,01 ^{abc}
8	105	30,45 ± 0,4 ^a	62,97 ± 0,7 ^a	2,00 ± 0,01 ^a
9	120	23,42 ± 0,5 ^a	49,93 ± 0,1 ^b	1,56 ± 0,02 ^{ab}

Fonte: Elaborado pela autora, (2023).

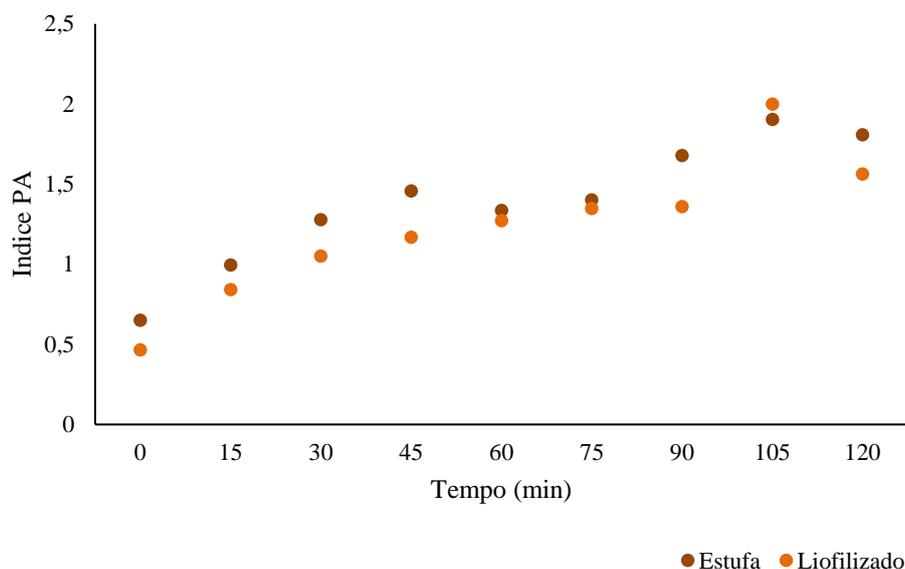
¹Os resultados são expressos como média das triplicatas ± desvio padrão; ²CFT (mg AGE/ g amostra seca): Compostos fenólicos totais em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca; ³AAT (μmol TE/g amostra seca): Atividade antioxidante total em micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca.

⁴Potencial ativo se dá pelo cálculo: valor analisado do composto fenólico total, dividido pelo seu maior resultado somado ao valor analisado da atividade antioxidante total dividido pelo seu maior resultado. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey (p>0,05).

Após aplicação do teste de Tukey com 95% de confiança, foi observada diferença significativa entre os ensaios. O melhor resultado foi obtido no ensaio 8 com 105 minutos de extração, tanto para os compostos fenólicos totais quanto para a atividade antioxidante total. Esse resultado indica que essa é a condição mais eficiente para a extração dos compostos de interesse.

Ao analisarmos as Tabelas 10 e 11, é possível observar que os melhores resultados em termos de índice foram obtidos em um tempo de 105 minutos. Tanto na estufa quanto no liofilizador, o ensaio número 8 com esse tempo apresentou o maior rendimento de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante total (AAT), como evidenciado na Figura 23.

Figura 23 – Cinética de extração com base no índice do Potencial Ativo



Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Dessa forma, decidiu-se realizar os ensaios do planejamento experimental para otimização da extração com o tempo de 105 minutos fixado como referência.

4.2.2 Planejamento experimental para otimização da extração dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total dos extratos obtidos

4.2.2.1 Planejamento de experimentos para a biomassa seca em estufa

A técnica de planejamento de experimentos emprega conceitos matemáticos e estatísticos para aprimorar, desenvolver e otimizar processos. Na indústria, é amplamente utilizada para melhorar projetos e produtos que são influenciados por diversas variáveis, impactando diretamente na qualidade e desempenho do produto ou processo final (COMPARINI et al., 2012). Para a biomassa seca em estufa, foi executado o primeiro planejamento de experimentos utilizando a matriz DCCR 2^3 , com dois níveis e três variáveis, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 23 contendo as variáveis independentes - Temperatura; Razão sólido/líquido e; Concentração ([]) de Etanol - e dependentes - Compostos fenólicos totais (CFT); Atividade antioxidante total (AAT) e Índice PA - murici seco em estufa.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido/líquido (mg/mL)	[] de etanol (%)	CFT (mg AGE/g fruta seca) *	AAT (µmol TE/g fruta seca) *	Índice PA**
1	40 (-1)	25 (-1)	20 (-1)	5,44 ± 0,1	47,21 ± 0,5	1,03
2	70 (1)	25 (-1)	20 (-1)	8,99 ± 0,5	48,39 ± 0,6	1,27
3	40 (-1)	55 (1)	20 (-1)	4,49 ± 0,1	26,28 ± 2,4	0,73
4	70 (1)	55 (1)	20 (-1)	4,96 ± 0,7	28,96 ± 2,0	0,84
5	40 (-1)	25 (-1)	60 (1)	5,44 ± 0,6	51,93 ± 3,1	1,11
6	70 (1)	25 (-1)	60 (1)	6,47 ± 0,3	70,79 ± 3,0	1,45
7	40 (-1)	55 (1)	60 (1)	4,56 ± 0,3	38,07 ± 1,3	0,84
8	70 (1)	55 (1)	60 (1)	6,04 ± 0,2	46,93 ± 1,2	1,07
9	30 (-1,68)	40 (0)	40 (0)	3,3 ± 0,3	29,99 ± 0,8	0,63
10	80 (1,68)	40 (0)	40 (0)	14,78 ± 0,6	70,39 ± 0,5	1,97
11	55 (0)	15 (-1,68)	40 (0)	7,09 ± 0,7	60,02 ± 2,9	1,35
12	55 (0)	65 (1,68)	40 (0)	3,46 ± 0,3	25,19 ± 0,6	0,56
13	55 (0)	40 (0)	6 (-1,68)	2,75 ± 0,4	34,09 ± 0,7	0,69
14	55 (0)	40 (0)	74 (1,68)	4,88 ± 0,2	32,73 ± 1,0	0,79
15	55(0)	40 (0)	40 (0)	3,4 ± 0,19	30,98 ± 1,1	0,71

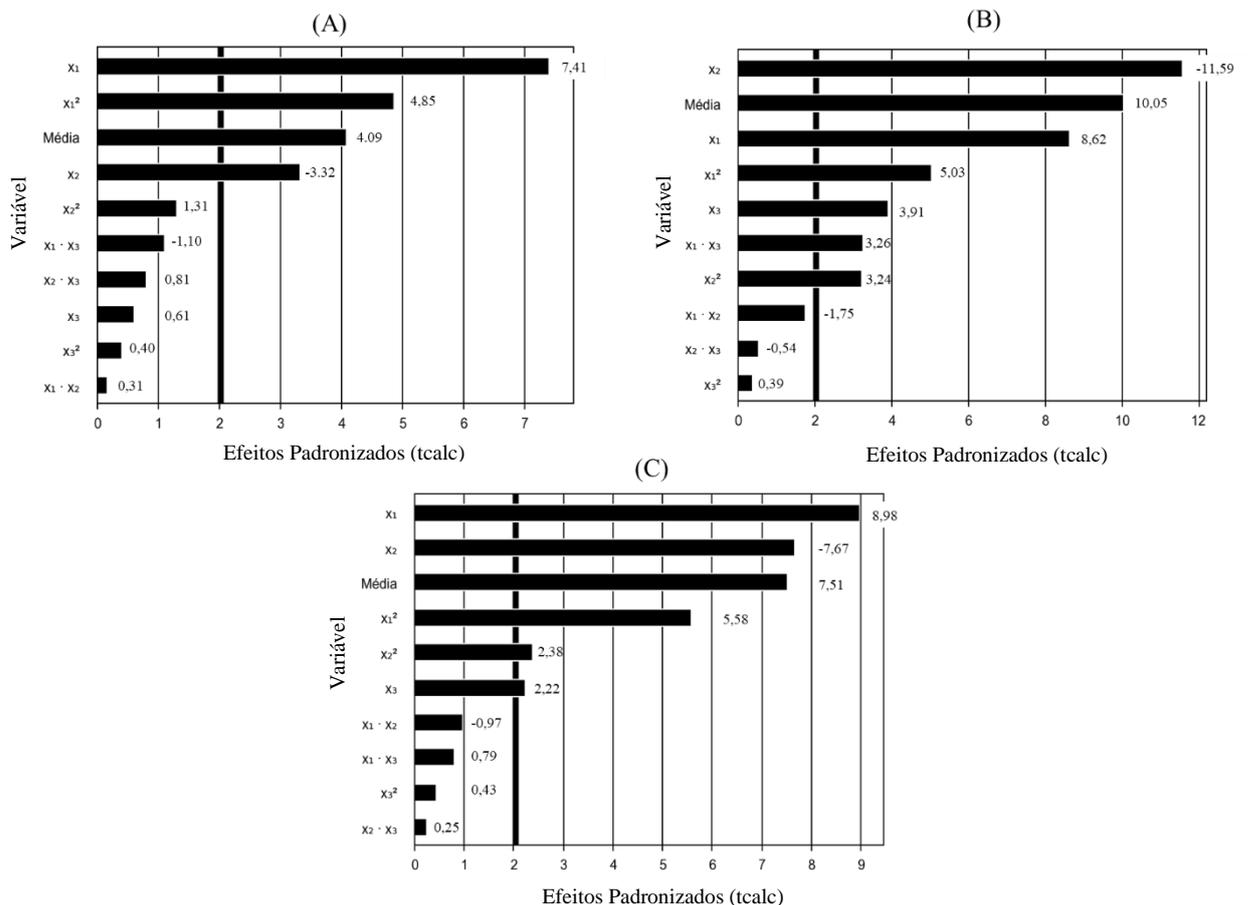
Fonte: elaborado pela autora.

*valores da média das triplicatas ± desvio padrão; mg AGE/g fruta seca: miligramas de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca; µmolTE/g amostra: micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca. [] de etanol (%): concentração de etanol.**Para o cálculo do índice PA utilizou-se 14,78 como CFT_{maior} e 70,39 como AAT_{maior}.

Ao analisar a Tabela 12, é possível observar uma variação nos resultados para compostos fenólicos totais, que variaram de 3,3 a 14,78 mg de equivalente de ácido gálico por grama de fruta seca (AGE/g fruta seca). Quanto à atividade antioxidante total, os valores da

resposta variaram de 25,19 a 70,79 $\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca. Verificou-se que o ensaio 10 apresentou a maior efetividade para os compostos fenólicos totais, enquanto o ensaio 6 mostrou-se mais efetivo para a atividade antioxidante total. No que diz respeito ao índice PA, os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 10 e 6, com valores de 1,97 e 1,45, respectivamente. Por outro lado, os ensaios 12 e 9 apresentaram os menores valores de índice PA, com 0,56 e 0,63, respectivamente. Utilizando o gráfico de Pareto (Figura 24), foram identificadas as variáveis que apresentaram um efeito significativo (linear e quadrático), com um nível de confiança ($p < 0,05$) de 95%.

Figura 24 – Gráfico de Pareto referente ao DCCR 23 para a variável resposta: A) Compostos fenólicos totais; B) Atividade antioxidante e; C) Índice PA – murici seco em estufa



Fonte: elaborado pela autora.

Variáveis: X_1 : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : razão sólido/líquido (mg/mL); X_3 : concentração de etanol (%).

Ao analisar a Figura 19-A, é possível constatar que a temperatura foi a variável de maior significância, com um efeito positivo na extração dos compostos fenólicos totais. Além disso, a temperatura quadrática também apresentou um efeito positivo, indicando que um aumento na temperatura resultará em uma maior extração desses compostos. A segunda variável mais

significativa foi a razão sólido/líquido, a qual demonstrou um efeito negativo, sugerindo que uma menor quantidade de biomassa em relação ao volume de solvente favorece a extração.

Ao analisar a Figura 19-B, fica evidente que a razão sólido/líquido exerceu um impacto significativo, com efeito negativo, indicando que uma menor quantidade de biomassa em relação ao volume de solvente favorece a extração. Além disso, a temperatura demonstrou um efeito positivo e robusto na atividade antioxidante total do extrato, ou seja, quanto maior a temperatura empregada, maior será a atividade antioxidante. A interação entre as variáveis temperatura e concentração de etanol também se mostrou significativa, exibindo um efeito positivo. Isso indica que o aumento da temperatura e da concentração de etanol resultaram em um incremento na atividade antioxidante total do extrato. Em comparação com os resultados obtidos para compostos fenólicos, a temperatura também se mostrou uma variável de extrema relevância nesse estudo.

A variabilidade observada nos resultados das análises da atividade antioxidante pode ser atribuída à escolha do método utilizado. O método amplamente utilizado na literatura para medir a atividade antioxidante de extratos vegetais é o sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; HAMINIUK et al., 2011; MACHADO et al., 2015). A fim de realizar a avaliação da atividade antioxidante utilizando o método do DPPH, é essencial mensurar a redução da concentração do radical DPPH por meio de um espectrofotômetro, quando ocorre a interação com um antioxidante. No entanto, mesmo em sistemas de análise simplificados, esse método enfrenta diversos desafios que podem impactar os resultados obtidos. Dentre as dificuldades encontradas, destaca-se a influência da quantidade e do tipo de solvente empregado para dissolver o antioxidante, bem como o teor de água e as concentrações de íons metálicos presentes no sistema, que podem exercer uma interferência direta na quantidade de DPPH não reagido. Além disso, é importante ressaltar que, apesar da reputação de estabilidade do reagente DPPH, a literatura científica relata uma decomposição gradual ao longo do tempo (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

Os resultados obtidos para a variável resposta índice PA (Figura 19-C) também foram submetidos a análises estatísticas, evidenciando a extrema importância da variável temperatura no aumento do índice. Ao analisar os ensaios apresentados na Tabela 14, é possível verificar a relevância da temperatura e a influência negativa da variável significativa razão sólido-líquido. Em ensaios nos quais uma maior quantidade de amostra foi utilizada, mesmo com uma temperatura elevada, o índice PA apresentou valores inferiores a 1, como também evidenciado no gráfico de Pareto.

Com base nos resultados obtidos, foi possível validar, com 95% de confiança, os modelos matemáticos de segunda ordem para a extração de compostos fenólicos¹ (Equação 6) e atividade antioxidante total² (Equação 7) que descrevem todos os parâmetros dos modelos. Pela análise de variância, o valor de F_{calc}^1 (11,5) e F_{calc}^2 (30,9) foi cinco vezes e treze vezes maior que o F_{tab} , respectivamente, possibilitando a obtenção de uma superfície de resposta $R^2 = 74,80\%$ para compostos fenólicos totais e $R^2 = 88,81\%$ para atividade antioxidante. No entanto, para o índice P.A, o modelo não foi validado pela análise de variância.

$$Y = 3,60 + 1,78 \cdot X_1 + 1,75 \cdot X_1^2 - 0,80 \cdot X_2 + 0,47 \cdot X_2^2 + 0,15 \cdot X_3 + 0,14 \cdot X_3^2 - 0,05 \cdot X_1 X_2 - 0,34 \cdot X_1 X_3 + 0,25 \cdot X_2 X_3 \quad (\text{Equação 6})$$

$$Y_1 = 32,78 + 7,65 \cdot X_1 + 6,70 \cdot X_1^2 - 10,28 \cdot X_2 + 4,31 \cdot X_2^2 + 3,47 \cdot X_3 + 0,52 \cdot X_3^2 - 2,03 \cdot X_1 X_2 + 3,78 \cdot X_1 X_3 - 0,63 \cdot X_2 X_3 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

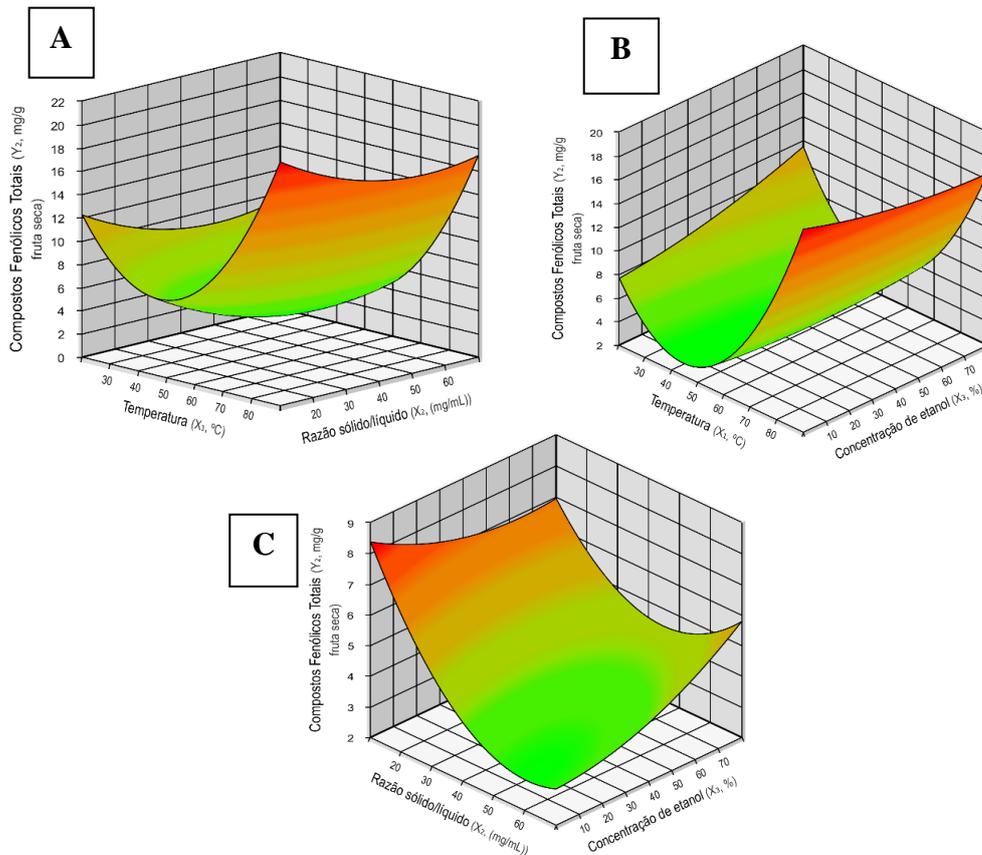
X_1 = Temperatura (°C);

X_2 = Razão sólido/líquido

X_3 = Concentração de etanol (%);

Após a validação do modelo matemático de segunda ordem, foram geradas as superfícies de resposta correspondentes aos compostos fenólicos totais (Figura 25) e à atividade antioxidante total (Figura 26), conforme mostrado.

Figura 25 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais – murici seco em estufa.

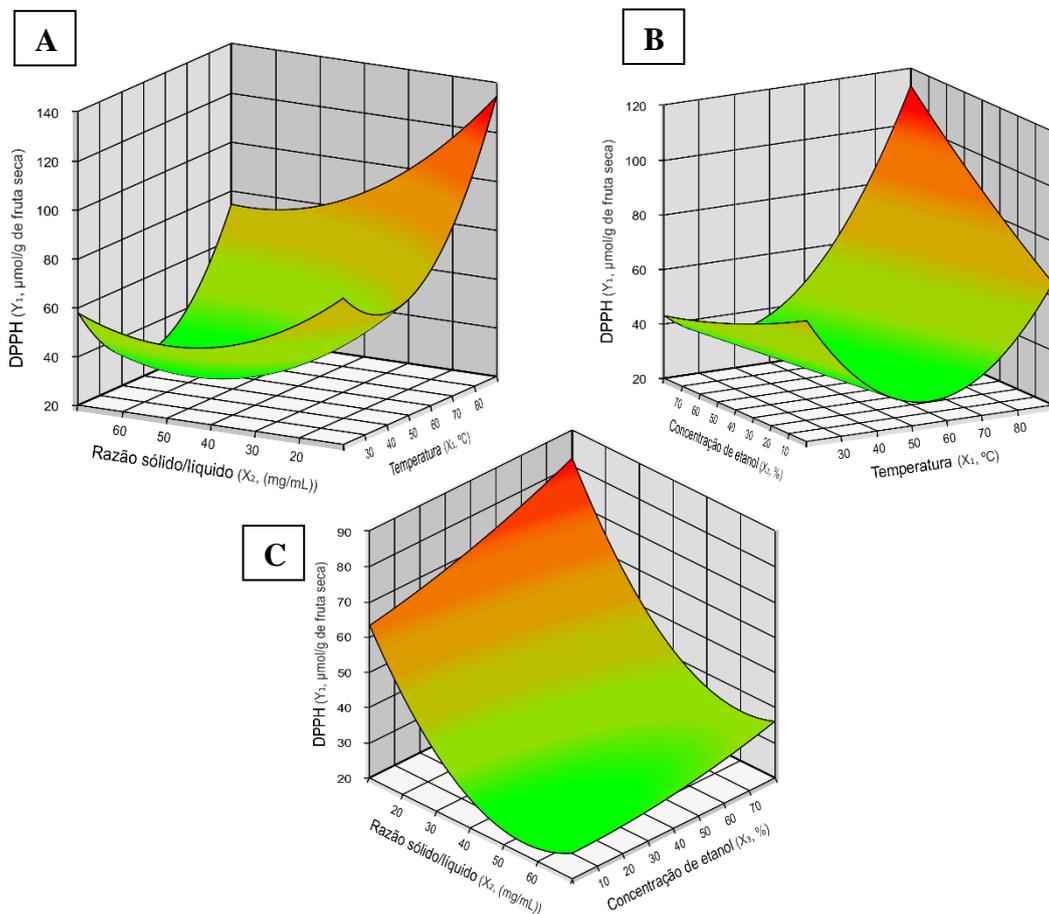


Fonte: elaborado pela autora.

*mgAGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₂); Figura B: temperatura (X₁) e concentração de etanol (X₃); Figura C: razão sólido/líquido (X₂) e concentração de etanol (X₃)

Ao examinar a Figura 25-A, é possível observar que a extração de compostos fenólicos aumenta com o diminuição da razão sólido/líquido. A Figura 25-B mostra uma correlação entre a temperatura e a concentração de etanol, demonstrando que, para compostos fenólicos totais, o aumento da temperatura e a diminuição da concentração de etanol podem ser interessantes para o aumento dos compostos fenólicos totais.

Figura 26 – Superfícies de resposta para atividade antioxidante total – murici seco em estufa.



Fonte: elaborado pela autora.

mgAGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₂); Figura B: temperatura (X₁) e concentração de etanol (X₃); Figura C: razão sólido/líquido (X₂) e concentração de etanol (X₃)

Ao examinar a Figura 26, é possível observar que as superfícies de resposta, Figuras 26-A e 26-C, indicam um aumento na atividade antioxidante do extrato à medida que a razão sólido/líquido diminui. É importante destacar que uma razão maior não conduz a resultados melhores, pois, ao adicionar uma grande quantidade de amostra em um volume fixo de solvente, pode ocorrer a saturação do solvente, o que impede a extração eficiente de compostos fenólicos. Em relação à temperatura, que também foi significativa, a Figura 26-B mostra o efeito da temperatura na concentração de etanol, onde quanto maior a concentração de etanol combinada com a temperatura, maiores são os resultados da atividade antioxidante.

Em suma, a análise estatística dos resultados para as amostras secas em estufa permitiu concluir que a temperatura é a variável mais significativa e com efeito positivo na extração de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante total do extrato. A razão sólido/líquido

também é uma variável crucial, com um efeito negativo na extração desses compostos, o que sugere que uma menor quantidade de amostra pode levar a resultados melhores. A validação dos resultados com 95% de confiança permitiu a obtenção de superfícies de resposta para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. As melhores condições para a extração de compostos fenólicos totais foram encontradas com uma temperatura superior a 80°C. No entanto, é importante notar que o método utilizado para avaliar a atividade antioxidante pode ter limitações. De maneira geral, os resultados indicam que a temperatura é um fator crucial na extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, e podem ser úteis para otimizar futuros processos de extração dos compostos do murici.

4.2.2.2 Planejamento de experimentos para a biomassa seca em liofilizador

O segundo planejamento de experimentos para a biomassa seca no liofilizador foi executado utilizando também a matriz DCCR 2³. Na Tabela 13, é possível observar a quantidade de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total do extrato.

Tabela 13 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 23 contendo as variáveis independentes - Temperatura; Razão sólido/líquido e; Concentração ([]) de Etanol - e dependentes - Compostos fenólicos totais (CFT); Atividade antioxidante total (AAT) e Índice PA - murici seco em liofilizador.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido/líquido (mg/mL)	[] de etanol (%)	CFT (mg AGE/g fruta seca) *	AAT (µmol TE/g fruta seca) *	Índice PA**
1	40 (-1)	25 (-1)	20 (-1)	3,02 ± 0,4	41,63 ± 1,2	0,36
2	70 (1)	25 (-1)	20 (-1)	10,52 ± 0,3	97,22 ± 0,4	0,96
3	40 (-1)	55 (1)	20 (-1)	4,49 ± 0,5	39,04 ± 0,5	0,39
4	70 (1)	55 (1)	20 (-1)	11,73 ± 0,6	61,20 ± 0,8	0,77
5	40 (-1)	25 (-1)	60 (1)	11,36 ± 0,2	89,66 ± 2,0	0,93
6	70 (1)	25 (-1)	60 (1)	31,04 ± 0,3	134,45 ± 1,3	1,85
7	40 (-1)	55 (1)	60 (1)	11,67 ± 0,3	53,02 ± 1,8	0,71
8	70 (1)	55 (1)	60 (1)	29,25 ± 0,2	143,21 ± 0,3	1,85
9	30 (-1,68)	40 (0)	40 (0)	4,32 ± 0,4	40,19 ± 1,4	0,39
10	80 (1,68)	40 (0)	40 (0)	28,13 ± 1,0	157,79 ± 1,5	1,91
11	55 (0)	15 (-1,68)	40 (0)	5,44 ± 0,1	103,56 ± 2,2	0,83
12	55 (0)	65 (1,68)	40 (0)	4,88 ± 0,3	23,83 ± 1,2	0,31
13	55 (0)	40 (0)	6 (-1,68)	2,04 ± 0,3	37,71 ± 0,6	0,30
14	55 (0)	40 (0)	74 (1,68)	7,59 ± 0,4	60,20 ± 0,7	0,63
15	55(0)	40 (0)	40 (0)	3,98 ± 0,3	47,04 ± 0,9	0,43

Fonte: elaborado pela autora.

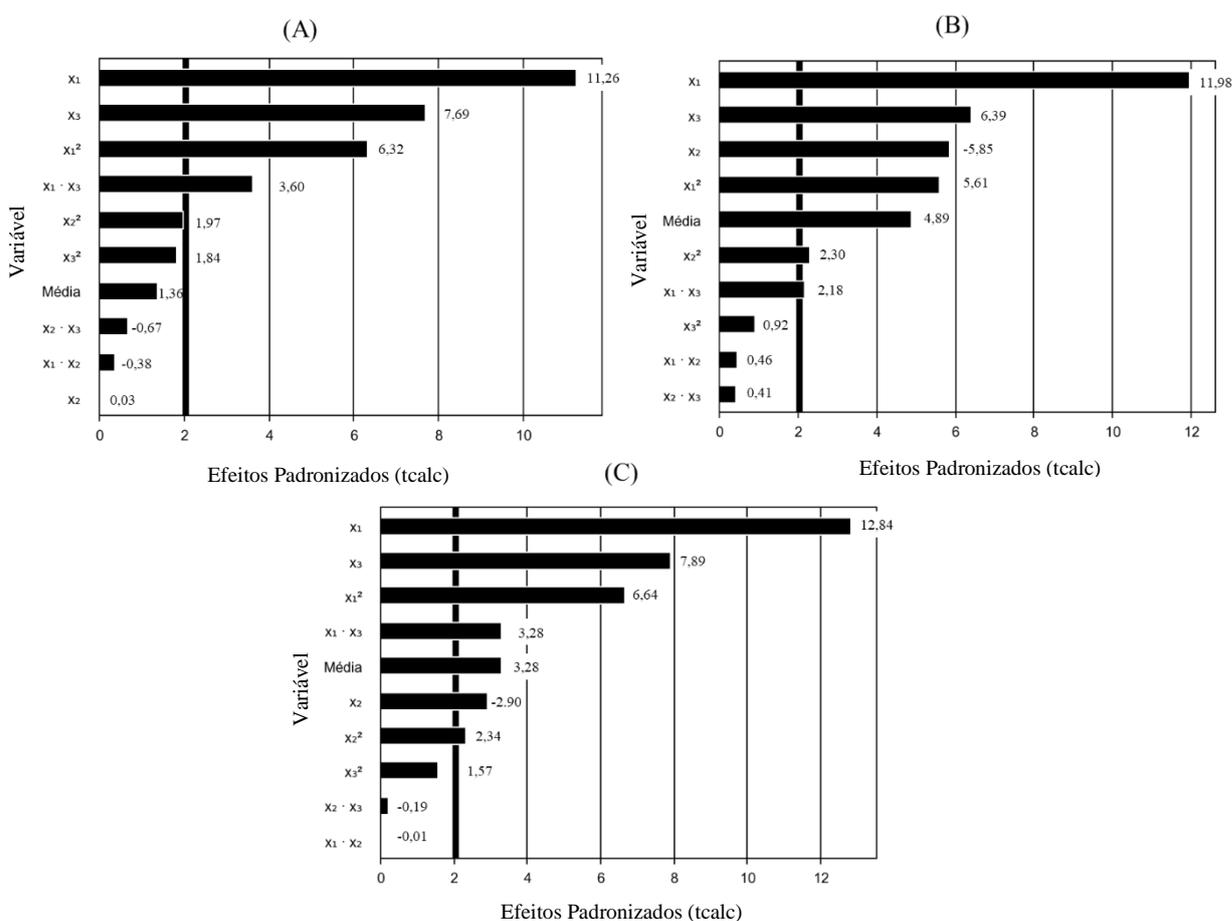
*valores da média das triplicatas ± desvio padrão; mg AGE/g fruta seca: miligramas de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca; µmolTE/g amostra: micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca. [] de etanol (%): concentração de etanol.

A Tabela 13 apresentou resultados variando de 2,04 a 31,04 mg AGE/g fruta seca para compostos fenólicos totais, demonstrando uma diferença significativa na quantidade extraída em relação à secagem pela estufa (Tabela 12), o que indica uma maior retenção de compostos

fenólicos no processo de liofilização. Além disso, os valores da atividade antioxidante total foram aproximadamente duas vezes maiores (23,83 a 157,79 $\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca) nos frutos secos pelo liofilizador em comparação com os frutos secos na estufa, o que reforça a eficácia da liofilização na preservação desses compostos. Os ensaios 10, 8 e 6 apresentaram os melhores resultados para o índice PA, com valores de 1,91, 1,85 e 1,85, respectivamente, enquanto os ensaios 12 e 13 apresentaram os menores valores (0,31 e 0,30, respectivamente).

Os resultados indicam a eficácia da liofilização na preservação dos compostos antioxidantes dos frutos do murici, sendo que a utilização do liofilizador permite a remoção da água dos frutos sem comprometer a estrutura química dos compostos antioxidantes devido à baixa temperatura empregada, evitando a perda de compostos sensíveis ao calor e preservando a integridade dos compostos antioxidantes presentes nos frutos. A técnica de liofilização mostrou-se mais eficiente que a secagem convencional na estufa, com uma diferença significativa na quantidade de compostos fenólicos extraídos e valores mais altos de atividade antioxidante total. Estudos anteriores indicam que essa técnica de preservação pode aumentar significativamente a concentração de compostos antioxidantes em frutos e plantas. Em um desses estudos, a liofilização dos frutos do murici preservou mais de 90% dos compostos antioxidantes, enquanto a secagem convencional reduziu a concentração desses compostos em até 70% (ARLINDO et al., 2017; GIRALDO-ZUNIGA et al., 2006). Utilizando o gráfico de Pareto (Figura 27), foram identificadas as variáveis que apresentaram efeito (linear e quadrático) significativos ($p < 0,05$) com um nível de confiança de 95%.

Figura 27 – Gráfico de Pareto referente ao DCCR 23 para a variável resposta: A) Compostos fenólicos totais; B) Atividade antioxidante e; C) Índice P.A – murici seco em liofilizador.



Fonte: elaborado pela autora.

Variáveis: X₁: Temperatura (°C); X₂: razão sólido/líquido (mg/mL); X₃: concentração de etanol (%).

De fato, de acordo com o gráfico de Pareto na Figura 27-A, a temperatura e a concentração de etanol foram as variáveis mais significativas na extração de compostos fenólicos em amostras liofilizadas de murici, com um nível de confiança ($p < 0,05$) a 95%. Este resultado é consistente com o que foi observado para amostras de biomassa seca na estufa. A temperatura afeta diretamente a cinética de transferência de massa e a solubilidade dos compostos, o que pode levar a um aumento na taxa de extração dos compostos fenólicos.

Quando a temperatura aumenta, os compostos fenólicos tornam-se mais solúveis e sua taxa de transferência de massa para o solvente aumenta. No entanto, temperaturas muito elevadas podem danificar as moléculas sensíveis ao calor, incluindo vitaminas, antioxidantes e proteínas. Por isso, é necessário encontrar uma temperatura ótima que maximize a extração dos compostos fenólicos desejados sem afetar negativamente outras moléculas importantes. Essa temperatura ideal pode variar dependendo do tipo de matriz, do solvente utilizado e das

condições experimentais específicas. Em resumo, a temperatura é um parâmetro crucial na extração de compostos fenólicos, e seu efeito deve ser cuidadosamente considerado em experimentos de extração.

Estudos como o de Gordon *et al.* (2011) e Neves *et al.*, (2015a) realizaram análises com amostras de murici liofilizada, utilizando o método espectrofotométrico com o reagente de *Folin-Ciocalteu* obtendo resultados de 2,54 e 31,99 (mg AGE/g fruta seca) respectivamente. Indicando assim que os resultados obtidos para compostos fenólicos totais estão em concordância com o que foi descrito nesses estudos.

Ao comparar com as metodologias de extração convencionais, como descrito por Sousa *et al.* (2018b) que utilizou o método de extração por maceração, podemos verificar que o resultado obtido de 8,36 mg AGE/g fruta seca é significativamente menor do que o resultado obtido em nosso estudo. Isso demonstra a eficiência da realização da extração por ultrassom, que intensifica os resultados e aumenta a extração de compostos fenólicos totais.

Ao analisar a Figura 27-B, é possível identificar que os três parâmetros principais demonstraram ser significativos quanto à atividade antioxidante total do extrato. A temperatura exerceu forte efeito positivo sobre a atividade antioxidante, no sentido de que quanto maior a temperatura utilizada, maior será a atividade antioxidante do extrato.

A variável concentração de etanol também se mostrou significativa, demonstrando que quanto maior a quantidade de etanol, maior seria a atividade antioxidante do extrato. Por sua vez, a variável razão sólido/líquido foi significativa, mas com efeito negativo, ou seja, uma menor quantidade de biomassa para o mesmo volume de solvente favorece a extração dos compostos antioxidantes presentes no murici.

A interação entre as variáveis temperatura e concentração de etanol na extração de compostos antioxidantes do murici foi significativa e apresentou um efeito positivo. Esse resultado indica que o aumento da temperatura e da concentração de etanol contribuíram para um aumento da atividade antioxidante total do extrato, o que pode ser uma estratégia interessante para maximizar a extração desses compostos bioativos.

A sinergia entre temperatura e concentração de etanol pode ser explicada pelo efeito combinado desses fatores na solubilização dos compostos presentes na matriz. A temperatura influencia diretamente na solubilidade dos compostos, permitindo uma maior difusão dos mesmos para o solvente e reduzindo a viscosidade da matriz. Já a concentração de etanol pode alterar a polaridade do solvente e influenciar na solubilidade dos compostos.

No entanto, é importante ressaltar que a interação entre temperatura e concentração de etanol pode variar de acordo com a matriz de interesse e o tipo de compostos bioativos

presentes. Assim, é fundamental realizar estudos experimentais específicos para determinar as melhores condições de extração para cada caso.

Comparando com os resultados obtidos para compostos fenólicos totais, novamente observa-se que a temperatura também foi muito significativa neste planejamento experimental, reforçando a importância desse parâmetro para a extração de compostos bioativos do murici.

Stafussa *et al.* (2018) demonstrou em seu estudo, também realizado por métodos convencionais, que para a determinação de DPPH foram obtidos 29 $\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca. Deste modo é possível concluir que o murici é uma fruta com altos níveis de atividade antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2011)

Após realizar análises estatísticas dos resultados obtidos para o índice PA, verificou-se a influência das variáveis temperatura, concentração de etanol e razão sólido/líquido na determinação dos melhores resultados do extrato. A partir do gráfico de Pareto (Figura 27-C), pode-se observar a grande influência da temperatura e da concentração de etanol, assim como a influência negativa da razão sólido/líquido no resultado das amostras. Quando a razão sólido/líquido é muito alta, pode ocorrer um impacto negativo na eficiência da extração, uma vez que o solvente não consegue penetrar completamente na matriz sólida e alcançar os compostos bioativos presentes em seu interior. Além disso, a área de contato entre a amostra sólida e o solvente é reduzida, limitando a transferência de massa dos compostos para o solvente. Portanto, é importante escolher uma razão sólido/líquido adequada para garantir uma extração eficiente e obter melhores resultados.

Com base nos resultados obtidos, foi possível validar, com 95% de confiança, os modelos matemáticos de segunda ordem para a extração de compostos fenólicos¹ (Equação 8) e atividade antioxidante total² (Equação 9) que descrevem todos os parâmetros dos modelos. Pela análise de variância, o valor de F_{calc}^1 (27,7) e F_{calc}^2 (29,9) foi maior que o F_{tab} , respectivamente, possibilitando a obtenção de uma superfície de resposta $R^2 = 87,68\%$ para compostos fenólicos totais e $R^2 = 88,38\%$ para atividade antioxidante. No entanto, para o índice P.A, o modelo não foi validado pela análise de variância.

$$Y = 3 + 6,74 * X_1 + 5,69 * X_1^2 + 0,02 * X_2 + 1,77 * X_2^2 + 4,61 * X_3 + 1,65 * X_3^2 - 0,29 * X_1 X_2 + 2,82 * X_1 X_3 - 0,52 * X_2 X_3 \quad (\text{Equação 8})$$

$$Y = 45,04 + 30,06 * X_1 + 21,14 * X_1^2 - 14,69 * X_2 + 8,66 * X_2^2 + 16,04 * X_3 + 3,45 * X_3^2 + 1,50 * X_1 X_2 + 7,15 * X_1 X_3 + 1,34 * X_2 X_3 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

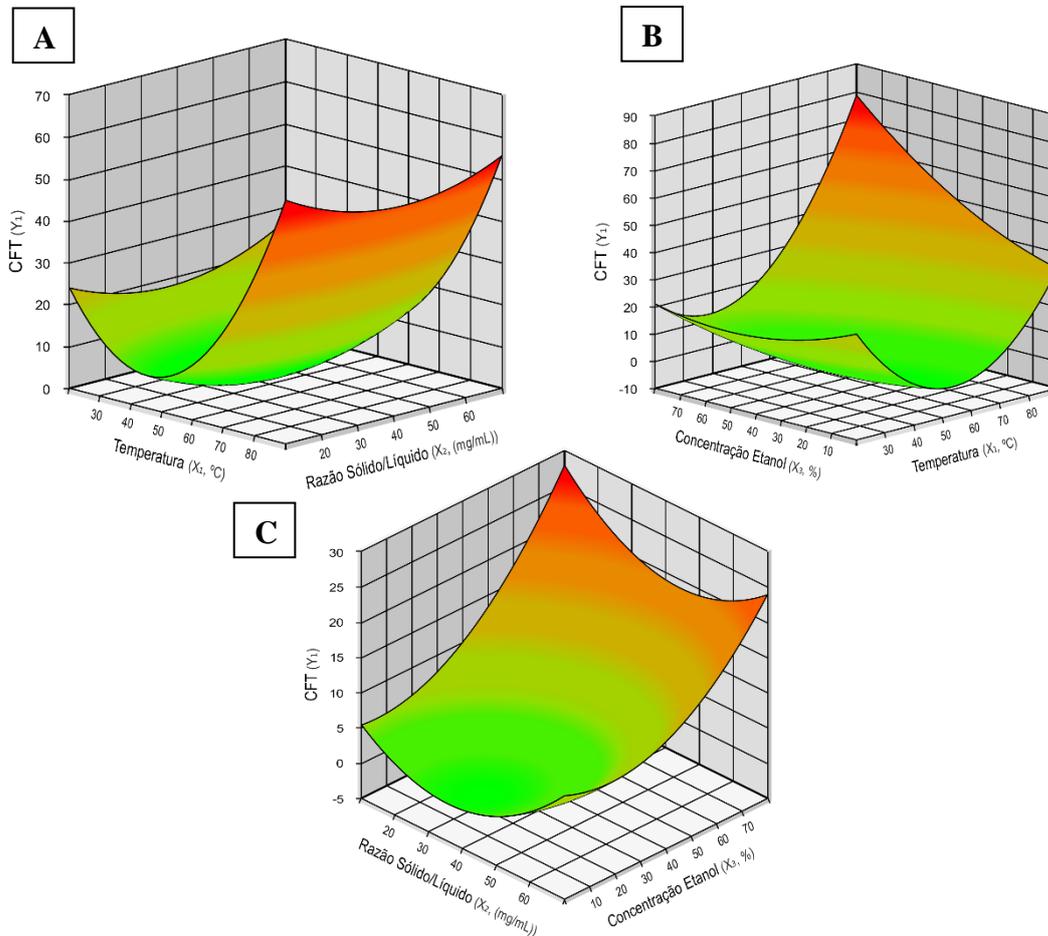
X_1 = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

X_2 = Razão sólido/líquido (g/mL)

X_3 = Concentração de etanol (%);

Com a validação do modelo matemático de segunda ordem, foi possível reproduzir as superfícies de resposta do planejamento para os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Na Figura 28, pode-se observar que as variáveis que apresentaram influência significativa foram a temperatura e a concentração de etanol. Já na Figura 29, as variáveis que tiveram influência significativa foram a temperatura, a razão sólido/líquido e a concentração de etanol na solução de extração.

Figura 28 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais – murici seco em liofilizador.



Fonte: elaborado pela autora.

mgAGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₂); Figura B: temperatura (X₁) e concentração de etanol (X₃); Figura C: razão sólido/líquido (X₂) e concentração de etanol (X₃)

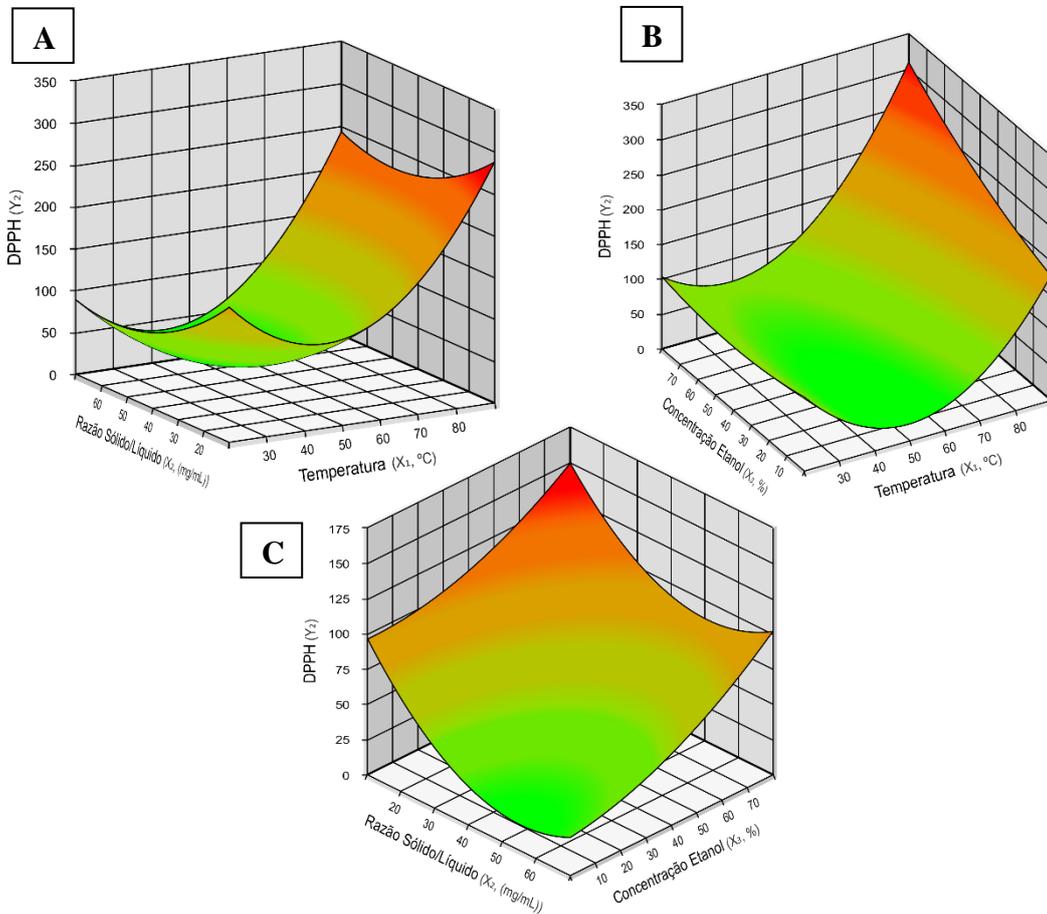
Ao analisar a superfície de resposta na Figura 28-A, é possível observar que a razão sólido/líquido juntamente da temperatura influenciam no resultado das amostras de compostos fenólicos totais. Isso ocorre porque a baixa razão sólido/líquido permite que o solvente penetre melhor na amostra sólida, aumentando a área de contato e facilitando a transferência dos compostos bioativos para o solvente.

Já na Figura 28-B, é possível verificar que o aumento da temperatura influencia positivamente na extração de compostos fenólicos totais. Isso ocorre porque o aumento da temperatura aumenta a solubilidade dos compostos na solução de extração, favorecendo a extração dos compostos bioativos.

Tabart *et al.* (2007) observaram que a presença de acetona na mistura de solventes de extração resultou em melhores resultados para a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total, ao analisar a composição do solvente. O estudo também demonstrou que a composição da solução de extração afeta mais a extração dos compostos fenólicos do que a atividade antioxidante. Sousa *et al.* (2018b) também realizou análises com o uso de acetona na extração de compostos bioativos do murici, obtendo resultados equivalentes aos deste estudo. Demonstrando assim que não houve tantas mudanças ao utilizar o etanol, além extração com etanol ser amplamente aceita pela indústria alimentícia por ser menos tóxica quando comparado com outros solventes.

No estudo conduzido por Weremfo *et al.* (2022), que avaliou a cinética de extração da baga de peru, foi observado que a temperatura teve uma influência direta nos extrativos, e os maiores índices de extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram obtidos a uma temperatura máxima de 80 °C. A partir desses resultados, pode-se inferir que o perfil dos compostos fenólicos contidos no murici, bem como os compostos que exercem a atividade antioxidante total, também toleram temperaturas acima de 80 °C de extração, apresentando bons resultados.

Figura 29 – Superfícies de resposta para atividade antioxidante total – murici seco em Liofilizador



Fonte: elaborado pela autora.

mgAGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₂); Figura B: temperatura (X₁) e concentração de etanol (X₃); Figura C: razão sólido/líquido (X₂) e concentração de etanol (X₃)

Ao analisar a superfície de resposta na Figura 29-A, podemos observar que a diminuição da razão sólido/líquido aumenta a atividade antioxidante do extrato. Isso pode ser explicado pelo fato de que, com uma menor razão sólido/líquido, há uma maior disponibilidade de solvente para extrair os compostos antioxidantes da amostra sólida. Além disso, a Figura 29-B demonstra que a temperatura também teve um efeito significativo na atividade antioxidante, uma vez que o aumento da temperatura pode facilitar a extração de compostos antioxidantes da amostra sólida. Finalmente, a Figura 29-C mostra que a concentração de etanol teve um efeito positivo na atividade antioxidante, indicando que quanto maior a concentração de etanol e menor a razão sólido/líquido, maior é a atividade antioxidante obtida. Isso ocorre porque o

etanol é um solvente polar capaz de extrair compostos antioxidantes da amostra sólida, e uma maior concentração de etanol pode aumentar a solubilidade desses compostos.

Sendo assim, podemos observar que a temperatura e a concentração de etanol foram as variáveis mais significativas na extração de compostos fenólicos em amostras liofilizadas de murici, com a temperatura afetando diretamente a cinética de transferência de massa e a solubilidade dos compostos. É importante encontrar uma temperatura ótima que maximize a extração dos compostos fenólicos sem afetar negativamente outras moléculas importantes. A realização da extração por ultrassom também se mostrou eficiente na intensificação dos resultados e na extração de compostos fenólicos totais. Portanto, os resultados deste estudo indicam que a liofilização é uma técnica de preservação promissora para frutos do murici.

Por fim, neste trabalho, a condição escolhida como ideal para a extração dos compostos fenólicos e atividade antioxidante total por ultrassom foi: temperatura 80 °C, razão sólido/líquido 25 mg/mL, concentração de etanol 60%.

4.2.3 Validação do método estatístico

Após obter um modelo matemático validado estatisticamente, foi realizada uma condição experimental diferente das anteriores para verificar experimentalmente o resultado proposto pelo modelo matemático. As condições experimentais utilizadas incluíram temperatura de 80 °C, razão sólido/líquido de 25 mg/mL e concentração de etanol de 60%. As variáveis codificadas para essas condições foram inseridas nas equações 6 e 7 para as amostras secas na estufa e 8, 9 e para as amostras secas no liofilizador; para calcular os resultados para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante preditos pelos respectivos modelos matemáticos. Os resultados experimentais para a condição estudada, bem como os resultados obtidos pelos modelos matemáticos, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total para ambas as amostras de murici. Obtidos tanto estatisticamente quanto experimentalmente.

Melhor condição	CFT² (mg AGE/ g amostra seca)*	AAT³ (µmol TE / g amostra seca)**
Modelo Estufa	12,35	93,51
Experimental Estufa	18,48 ± 0,57	116,76 ± 1,38
Erro (%)	33,17	19,91
Modelo Liofilizado	44,13	206,19
Experimental Liofilizado	39,84 ± 0,31	229,31 ± 2,58
Erro (%)	9,72	10,08

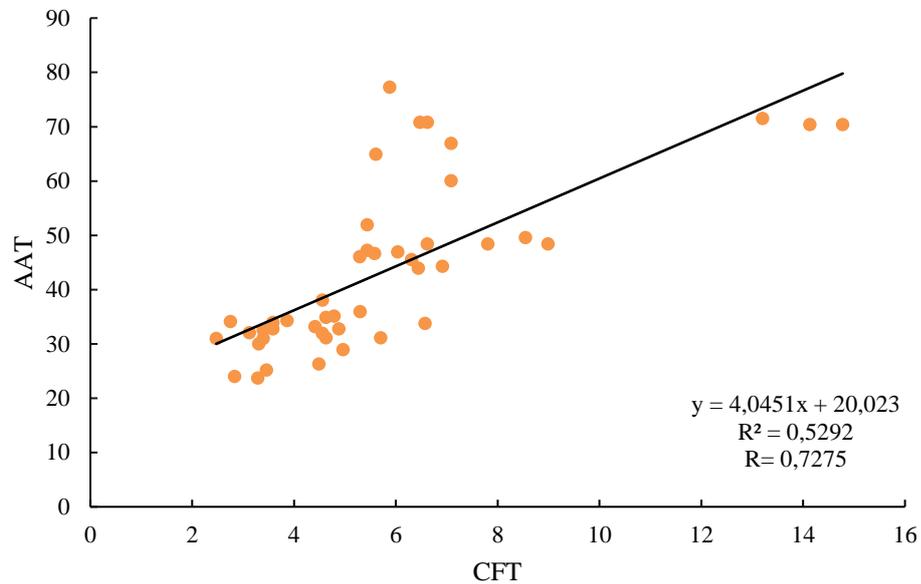
Fonte: Elaborado pela autora, (2023).

*CFT (mg AGE/ g amostra seca): Compostos fenólicos totais em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca; **AAT (µmol TE/g amostra seca): Atividade antioxidante total em micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca. ***Potencial ativo se dá pelo cálculo: valor analisado do composto fenólico total, dividido pelo seu maior resultado somado ao valor analisado da atividade antioxidante total dividido pelo seu maior resultado.

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que o modelo utilizado para calcular os compostos fenólicos, atividade antioxidante total foi eficiente na previsão dos resultados experimentais. Portanto, pode-se afirmar que o modelo foi validado experimentalmente.

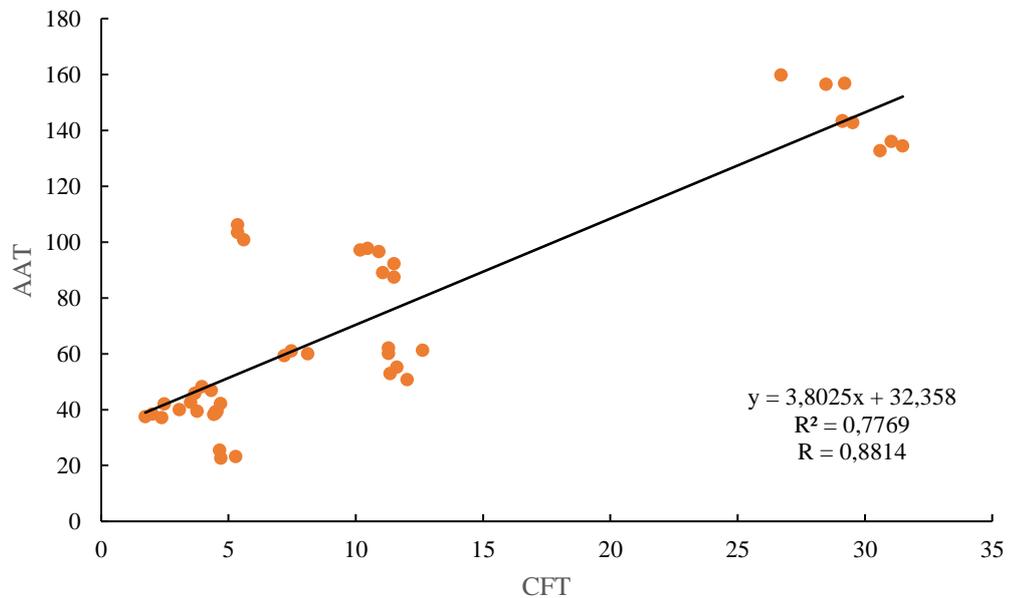
Além disso, é importante destacar que este planejamento experimental mostrou que as condições aplicadas nas análises podem afetar significativamente a correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total. Em alguns casos, foi observado que a temperatura utilizada afetou a extração de forma significativa. É válido salientar que, ao analisar os resultados obtidos para cada condição experimental, observou-se que nem sempre um aumento na quantidade de compostos fenólicos totais resultou em um aumento proporcional na atividade antioxidante total. Para avaliar a correlação entre essas duas análises, foi realizada a correlação de Pearson (r) entre CFT e AAT. Esta correlação foi realizada para ambos os tipos de secagem, tanto em estufa, quanto em liofilizador.

Figura 30 – A correlação de Pearson (r) calculada entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total para as amostras secas em estufa.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 31 – A correlação de Pearson (r) calculada entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total para as amostras secas em liofilizador.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A correlação de Pearson (r) é utilizada para estimar a linearidade entre duas variáveis, podendo variar de 1 a -1, onde 1 indica uma forte correlação direta e -1 indica uma forte correlação inversa. No presente estudo, os valores da correlação de Pearson foram de 0,7275 e 0,8814 para as amostras secas em estufa e liofilizador, respectivamente. Foi observado que as amostras secas em liofilizador apresentaram uma correlação alta, enquanto as amostras secas em estufa apresentaram uma correlação moderada.

Na literatura, é comum encontrar estudos que reportam a falta de correlação entre os compostos fenólicos totais (CFT) e a atividade antioxidante total (AAT) em alimentos e plantas. Isso pode ocorrer devido a uma série de fatores, tais como o estágio de maturação da fruta, o genótipo, as condições ambientais, o sistema de plantio e a fertilidade do solo. Além disso, o método de extração, o tamanho da amostra, o tempo e o tipo de armazenamento, bem como a escolha dos reagentes e a presença de interferentes na amostra, como gorduras, açúcares e ceras, também podem afetar a correlação entre CFT e AAT (SUN *et al.* 2007). É importante ressaltar que o método de avaliação da atividade antioxidante total utilizando o DPPH pode apresentar limitações, pois o radical DPPH pode reagir não apenas com os compostos fenólicos, mas também com outros compostos presentes no extrato, como a vitamina C, que possui alta atividade antioxidante. Dessa forma, é possível que a atividade antioxidante total medida pelo método DPPH não reflita completamente a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na amostra.

Considerando que os modelos matemáticos foram validados após a análise dos dois planejamentos realizados, foi possível definir a concentração ideal para a extração e a amostra que será utilizada. Levando em consideração que as amostras secas em liofilizador apresentaram os maiores resultados, será utilizada a amostra liofilizada nas condições de 80°C, 25 g/mL e 60% de etanol, conforme analisado na Tabela 17. O extrato obtido por meio deste ensaio também passou por avaliação de atividade antioxidante pelo método FRAP, demonstrando um resultado de $700,16 \pm 3,06 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g de biomassa.

4.2.4 Teste complementar para extração de compostos fenólicos

Neste estudo, realizou-se uma extração por Soxhlet sob uma condição específica para efeitos comparativos com o método de extração por ultrassom. Os resultados para CFT e AAT são apresentados na Tabela 15.

Observa-se que, neste método, o valor obtido para CFT total foi próximo ao valor da condição avaliada no planejamento experimental. No entanto, para AAT, o resultado obtido foi inferior em 39% à condição avaliada pelo planejamento experimental.

Tabela 15 – Extração por Soxhlet em comparação à ultrassom

Melhor Condição	Temperatura (°C)	Razão sólido/líquido (g/mL)	Concentração de etanol (%,v:v)	CFT² (mg AGE/g amostra seca)²	AAT³ (µmol TE/g amostra seca)³	Índice e PA
Soxhlet	80	25	60	38,06 ± 0,15	89,69 ± 0,08	1,36
Liofilizado	80	25	60	39,84 ± 0,31	229,31 ± 2,58	2,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados obtidos para AAT demonstram que a exposição prolongada a altas temperaturas durante a extração por Soxhlet podem degradar os compostos bioativos presentes na amostra, reduzindo assim a sua capacidade antioxidante. Não foram encontrados na literatura estudos de extração por Soxhlet de compostos bioativos do murici, apenas estudos para extração de pigmentos, como o realizado por Miranda *et al.* (2021) e para extração lipídica da polpa do murici por Silva (2016). Apesar de ser um método convencional amplamente utilizado, a exposição prolongada a altas temperaturas não é recomendada para a extração de compostos bioativos do murici. Na literatura, são encontrados mais estudos utilizando o método de maceração para análises antioxidantes em amostras de murici (DE SOUZA *et al.*, 2019; GORDON *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2021; SOUSA; DE SOUZA BUARQUE, 2020). De posse desses resultados, a etapa seguinte foi determinar o perfil dos compostos fenólicos dos extratos.

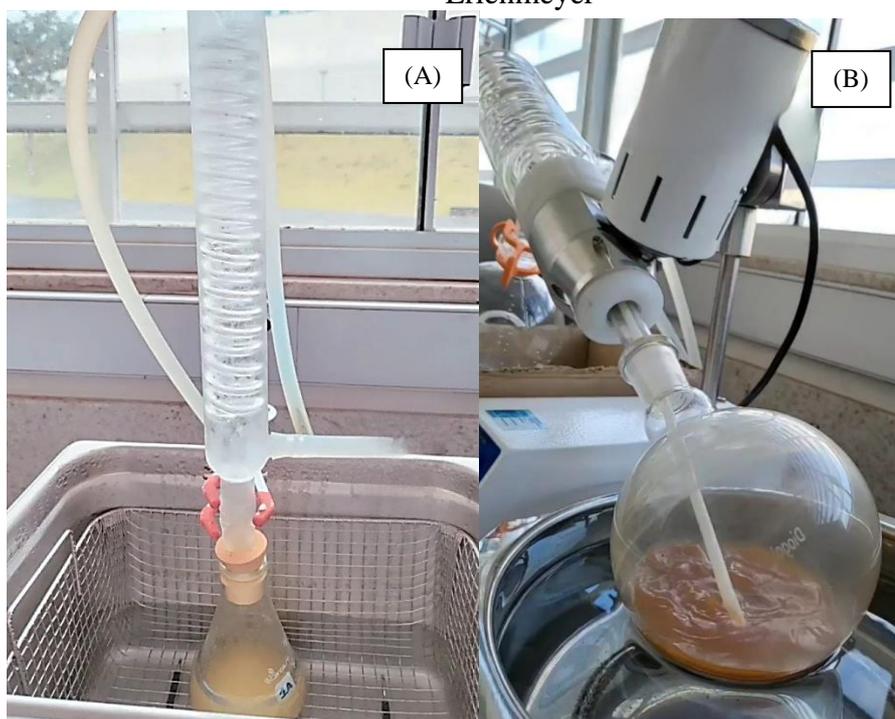
4.2.5 Extração em larga escala

Com o objetivo de aumentar o volume de extrato, foram realizadas diversas extrações seguindo a melhor condição definida para a extração de compostos fenólicos. Para isso, foram usados 150 mL de solução extratora com 60% de etanol e razão sólido/líquido de 25 g/mL, submetidos a uma temperatura de 80°C por 105 minutos. Durante o processo, foi acoplado um condensador ao equipamento para evitar perdas de amostra (conforme ilustrado na Figura 32-A). Essa estratégia permitiu obter um volume significativamente maior de extrato em relação ao processo otimizado, mantendo a qualidade do extrato em termos de compostos fenólicos.

Os extratos obtidos foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais, apresentando um rendimento médio de $40,50 \pm 0,06$ mgAGE/g. Além disso, o extrato foi avaliado quanto à atividade antioxidante total, apresentando $255,76 \pm 2,83$ $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método DPPH e $720,82 \pm 3,65$ μM sulfato ferroso/g de biomassa pelo método FRAP. Em comparação à melhor condição definida na otimização do processo, todos os resultados obtidos foram superiores ao esperado.

Após a extração, os extratos foram evaporados em um evaporador rotativo (Figura 32-B) para retirar o etanol contido nas amostras, o que correspondeu a uma redução de 60% do volume inicial. Em seguida, as amostras foram congeladas e liofilizadas até restar apenas o material sólido. Esse material foi armazenado protegido da luz para posterior análise de compostos fenólicos.

Figura 32 – Extração em larga escala: A) Aparelho experimental utilizado para a extração de grandes volumes de amostra e; B) Etapa de evaporação do solvente após a extração em Erlenmeyer



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.3 PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DO MURICI HPLC-MS

Existem várias técnicas disponíveis para detecção de compostos fenólicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD), e cromatografia de fase reversa. No entanto, muitos compostos

fenólicos possuem estruturas semelhantes, o que torna difícil a identificação por meio de espectros de UV. Nesse sentido, a cromatografia líquida acoplada ao detector de massas (LC-MS) pode ser útil para a identificação de compostos de interesse, permitindo diferenciar as diferenças nas estruturas moleculares dos compostos (SUN *et al.* 2007).

Utilizando as condições analíticas adequadas para os compostos padrões, realizou-se a análise das amostras do extrato do murici. Os resultados da quantificação dos compostos individuais, relacionando-os com todas as condições experimentais avaliadas, CFT e AAT, foram apresentados na Tabela 16. Dos onze compostos individuais analisados por HPLC-MS, quatro foram identificados nos extratos do murici: quercetina, ácido p-Cumárico, ácido siríngico e ácido gálico.

Tabela 16 – Diferentes condições experimentais avaliadas e os resultados obtidos para CFT, AAT e compostos fenólicos individuais por HPLC-MS

Ensaio	CFT ² (mg AGE/ g amostra seca)*	AAT ³ (µmol TE / g amostra seca)*	Quercetina (mg/L)	Ácido p-Cumárico (mg/L)	Ácido siríngico (mg/L)	Ácido gálico (mg/L)
E10	14,04 ± 0,6	70,76 ± 0,5	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	55.0 ± 4.4	1.3 ± 0.2
EMC	18,48 ± 0,5	116,76 ± 1,3	5.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	50.0 ± 1.3	2.0 ± 0.2
L8	29,25 ± 0,2	143,21 ± 0,3	5.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	30.0 ± 0.2	1.5 ± 0.0
L10	28,13 ± 1,0	157,79 ± 1,5	± 0.2	0.4 ± 0.0	21.0 ± 0.1	1.2 ± 0.0
LMC	39,84 ± 0,3	229,31 ± 2,5	3.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	34.0 ± 1.5	0.9 ± 0.0
LMCLE	40,50 ± 0,1	255,76 ± 2,8	3.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	32.0 ± 2.8	1.0 ± 0.0
SOX	38,06 ± 0,1	89,69 ± 0,1	n.d. ^a	0.4 ± 0.0	115.0 ± 1.1	6.0 ± 0.2

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

*CFT (mg AGE/ g amostra seca): Compostos fenólicos totais em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca; **AAT (µmol TE/g amostra seca): Atividade antioxidante total em micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca. E10 – Estufa ensaio 10; EMC – estufa melhor condição; L8 e L10 – Liofilizador ensaios 8 e 10; LMC – Liofilizado melhor condição; LMCLS – Liofilizado melhor condição larga escala; SOX – extração Soxhlet;

A análise quantitativa dos compostos fenólicos no extrato revelou que o ácido siríngico foi o composto mais abundante, sendo detectado em todas as condições experimentais avaliadas. Em segundo lugar, em termos de quantidade, encontra-se a quercetina, cuja concentração variou de acordo com o método de extração utilizado. Observou-se que quanto maior a temperatura empregada no processo de extração, menor foi a concentração de quercetina. Notavelmente, a quercetina não foi detectada na análise por Soxhlet, enquanto a quantidade de ácido siríngico aumentou consideravelmente. Os compostos ácidos p-Cumárico e ácido gálico também foram identificados em todos os ensaios, porém em menor quantidade em relação ao ácido siríngico.

Mariutti *et al.* (2014) encontra uma concentração de compostos fenólicos para o murici liofilizado, sendo eles quercetina 0.23 ± 0.01 mg/g; ácido gálico 0,17 mg/g. Já Sousa *et al.* (2018a) traz resultados 1.29 ± 0.23 mg/g e 0.22 ± 0.04 mg/g para quercetina e ácido gálico respectivamente, estudo realizado com extrações em acetona e com a técnica de maceração. Utilizando a polpa de fruta *in natura* o estudo de Faria *et al.* (2021) demonstra que dentre os compostos fenólicos analisados, o que apareceu em maior quantidade foi o ácido siríngico com um resultado de 89 ± 7 ng/g, abaixo dele está o ácido p-Cumárico com 64 ± 1 ng/g já a concentração de quercetina foi a mais baixa encontrada quando comparada com os demais nesse estudo $7,42 \pm 1$ ng/g, na análise realizada, também foram encontrados outros compostos dentre eles: ácido gálico, ácido cafeico e luteína.

O ácido siríngico, junto com outros polifenóis, apresenta diversos efeitos benéficos para a saúde humana, de acordo com estudos científicos ele possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que ajudam a reduzir doenças crônicas. Além disso, o ácido siríngico atua como antiperoxidativo lipídico, protegendo as membranas celulares de danos oxidativos, e também pode prevenir a formação de mutações genéticas que levam ao desenvolvimento de tumores (MUTHUKUMARAN *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2016; SOMADE *et al.*, 2022).

Além do perfil fenólico, o extrato obtido a partir do murici também foi analisado quanto à concentração de carboidratos. Essa análise foi realizada uma vez que a presença de açúcares pode interferir na aplicação do extrato. Como o murici é uma fruta, é possível que o extrato contenha açúcares. Compreender a concentração de carboidratos é importante para determinar a melhor forma de utilizar o extrato em aplicações específicas.

Foi realizada a análise de carboidratos no extrato obtido, onde identificou-se uma concentração de 1,675 g/L de glicose e 2,75 g/L de xilose, resultando em uma média de 4,00 g/L de açúcares totais. A presença desses carboidratos na amostra pode interferir na aplicação

do extrato, porém, uma vez recuperados, eles também apresentam potencial de aplicação em diferentes áreas.

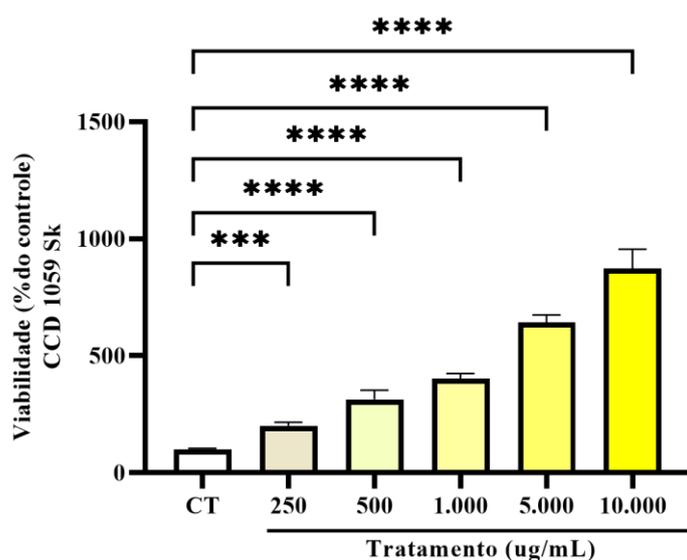
4.4 VIABILIDADES DOS EXTRATOS

4.4.1 Viabilidade celular Fibroblastos normais de humanos da linhagem celular CCD 1059 Sk

Avaliando a citotoxicidade celular em células saudáveis da linhagem CCD 1059 Sk (Figura 33), procedeu-se a exposição a cinco concentrações do extrato de murici (250, 500, 1000, 5000 e 10000 ug/mL) conforme protocolo empregado para as células cancerígenas SK-Mel-28.

Os resultados indicaram que, conforme as concentrações do extrato aumentaram, houve um aumento proporcional da viabilidade celular, sem apresentar citotoxicidade nas concentrações testadas. Foi possível verificar que as concentrações de 5.000 ug/mL e 10.000 ug/mL foram as que apresentaram os maiores resultados de viabilidade celular.

Figura 33 – Viabilidade celular de células CCD 1059 Sk expostas a crescente concentração de extrato do murici em 24 h.



Fonte: Elaborado pela autora

CT: Controle; Tratamento de células CCD 1059 Sk de extrato. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão, e foram analisados pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey; * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$); ns ($p > 0,005$).

4.4.2 Viabilidade celular (SK-Mel-28)

Para avaliação de viabilidade celular (Figura 34), realizou-se uma análise estatística dos resultados obtidos com o teste MTT a partir das células SK-Mel-28 expostas a cinco níveis de concentração de extrato (250, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 ug/mL).

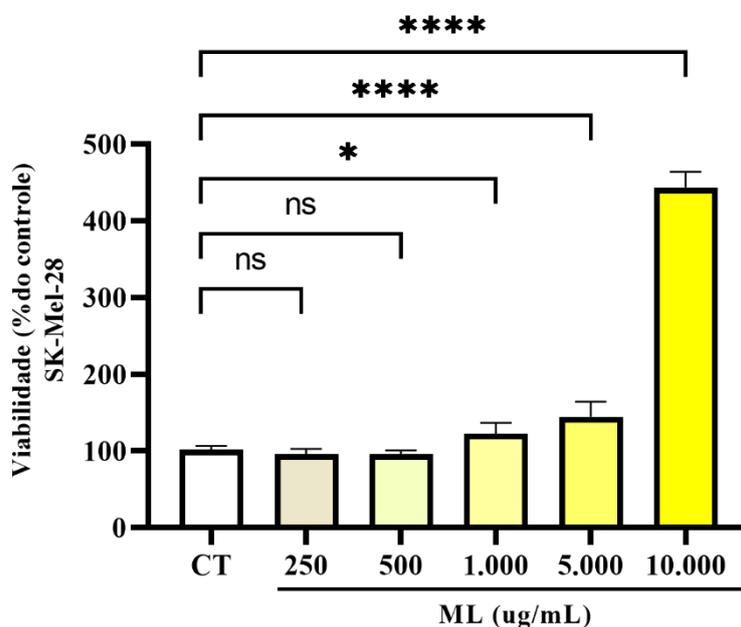
Os resultados indicaram um aumento proporcional na viabilidade celular à medida que as concentrações do extrato aumentaram. Entretanto, a concentração de 10.000 ug/mL apresentou um aumento de mais de 50% na viabilidade celular, indicando um enorme crescimento celular. Como resultado, os dados sugerem que o extrato de murici não é viável para o tratamento de células SK-Mel-28.

Apesar disso, um estudo anterior de Souza *et al.* (2019) extrato de murici foi capaz de inibir o crescimento da viabilidade celular em células do câncer de ovário da linha A2780, sugerindo um potencial uso no tratamento desse tipo de células. Vale ressaltar que o murici é uma fruta com alto teor de açúcar naturalmente presente em sua composição, com uma média de 13% de açúcares solúveis totais. Embora o consumo excessivo de açúcar possa ter efeitos negativos na saúde em geral, o consumo moderado de frutas com alto teor de açúcar, como o murici, pode ser benéfico devido à presença de compostos antioxidantes e outros nutrientes importantes.

No entanto, é importante lembrar que a utilização de extratos de murici em estudos de viabilidade celular em células cancerígenas envolve a extração dos compostos bioativos presentes na fruta. Portanto, a concentração de açúcares no extrato pode ser maior do que na fruta inteira, o que pode influenciar a viabilidade celular das células cancerígenas.

Ademais, é relevante destacar que a resposta das células cancerígenas à exposição a extratos de murici ou outros extratos ricos em açúcares pode depender de diversos fatores, como o tipo de célula cancerígena e as condições específicas do estudo. Portanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente os efeitos dos extratos de murici e outros extratos ricos em açúcares na viabilidade celular de células cancerígenas.

Figura 34 – Viabilidade celular de células SK-Mel-28 expostas a concentrações do extrato do murici pelo período de 24 horas.

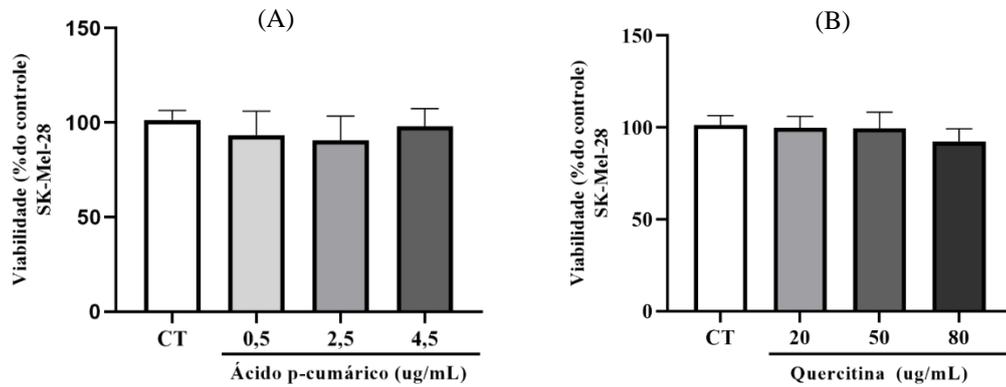


CT: Controle; Tratamento de células SK-MEL-28 de extrato. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão, e foram analisados pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey; * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$); ns ($p > 0,005$).

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nas Figuras 35, foram investigadas a viabilidade celular utilizando apenas os compostos concentrados encontrados no murici, em uma proporção equivalente ao encontrado nos extratos do murici liofilizado. Entretanto, ao analisar os testes de MTT, não foi observado diferenças significativas no parâmetro de viabilidade celular, o que sugere que a utilização de apenas um composto fenólico não teria uma grande interferência na diminuição das células de SK-Mel-28.

Figura 35 – Viabilidade celular de células SK-Mel-28 expostas a concentrações de (A) Ácido p-Cumárico e (B) Quercetina pelo período de 24 horas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

CT: Controle. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão, e foram analisados pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

5 CONCLUSÃO

Por meio da utilização da cinética e planejamento experimental, foi possível identificar as diferenças de cada condição de extração, considerando os dois tipos de extratos: seco na estufa e seco no liofilizador. Observou-se que, para ambos os extratos, o tempo definido foi de 105 minutos. As melhores condições para CFT e AAT foram praticamente as mesmas, levando em consideração ambos os extratos, o que indica uma correlação entre elas.

Foi constatado que a temperatura é o maior influenciador da extração, mostrando uma diferença significativa ($p < 0,05$) para ambos os extratos. Entretanto, também foi observado que o excesso de temperatura pode prejudicar os compostos bioativos na extração via Soxhlet. A partir do planejamento experimental, foi possível chegar à condição ideal de extração e à biomassa ideal para este estudo. Utilizando o murici seco no liofilizador, a condição ideal se deu por meio da validação do modelo estatístico, sendo de 80 °C, razão sólido/líquido 25 mg/mL, e 60% de da concentração de etanol, com CFT de $39,84 \pm 0,31$ mg AGE/g amostra seca e AAT de $229,31 \pm 2,58$ ($\mu\text{mol TE} / \text{g amostra seca}$), além do índice PA.

Quanto aos compostos individuais, a quantificação por HPLC mostrou que o ácido siríngico foi o composto identificado em 100% das condições avaliadas, mesmo em baixas concentrações. Os demais compostos não foram identificados em todas as condições, indicando que as condições de extração podem ser moduladas para a obtenção de um composto específico.

Avaliando a viabilidade celular em células saudáveis e cancerígenas, pode-se observar que extrato não foi viável para o tratamento das células cancerígenas, mas apresentou resultados positivos em células saudáveis. Os compostos fenólicos presentes no extrato demonstraram propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sugerindo benefícios na prevenção e tratamento de doenças relacionadas a esses processos. Para expandir o conhecimento sobre o extrato, futuras pesquisas podem explorar os mecanismos de ação envolvidos, realizar testes adicionais de citotoxicidade para avaliar sua segurança em diferentes linhagens de células cancerígenas, investigar mais a fundo sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, e considerar a formulação do extrato em diferentes formas farmacêuticas, como cápsulas, extratos líquidos ou pomadas, para explorar suas aplicações em terapias tópicas ou sistemas de liberação controlada. Essas abordagens têm o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o extrato de *Byrsonima crassifolia* e suas possíveis aplicações terapêuticas, proporcionando alternativas promissoras para o desenvolvimento de terapias complementares e mais eficazes.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista o potencial do extrato do murici e dos compostos fenólicos obtidos nesse estudo, sugerem-se as seguintes etapas para complementar e avançar na pesquisa com esse resíduo.

- Verificar o armazenamento do material e a estabilidade dos compostos ao longo do tempo;
- Investigar a separação dos compostos e outras substâncias do extrato, como proteínas e lipídios;
- Realizar análises de atividade antioxidante por métodos diferentes do DPPH, como o ensaio ORAC;
- Avaliar a viabilidade econômica do processo de extração em larga escala;
- Investigar a possibilidade de utilizar solventes menos tóxicos na extração, visando a aplicação em indústrias alimentícias;
- Realizar testes com outras linhagens de células cancerígenas para avaliar o potencial do extrato em outras aplicações;
- Realizar testes de toxicidade para avaliar a segurança do extrato em diferentes concentrações e condições de uso.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, H.; RAGAIE, M. H.; ELMOWAFY, E. Unraveling the pharmaceutical and clinical relevance of the influence of syringic acid loaded linoleic acid transferosomes on acne. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 639, p. 122940, maio 2023.
- AGREDANO-DE LA GARZA, C. S. et al. Physicochemical characterization and dietary fiber of 15 Nance (*Byrsonima crassifolia* L.) fruits selections from Nayarit. **Scientia Horticulturae**, v. 289, n. July, 2021.
- AHMAD, F. et al. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. **JBUON**, v. 23, n. 5, p. 1505–1513, 2018.
- AL ZHRANI, N. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. **Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review**. **European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson s.r.l., , 15 out. 2020.
- ALMEIDA, A. F. et al. Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 714–731, 1 maio 2018.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, ago. 2011.
- ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. **Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich)** **Journal of Chromatography A**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Telefone (17) 3221-2200 Ramal: 2715 Rev. Inst. Adolfo Lutz**. [s.l: s.n.].
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Telefone (17) 3221-2200 Ramal: 2715 Rev. Inst. Adolfo Lutz**. [s.l: s.n.].
- ANTONIO ACCIOLI DE VASCONCELLOS, Z.; BINS ELY, J. **Skin melanoma in brazil SEE PROFILE**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/343838295>>.
- ANUNCIACÃO, P. C. et al. Identification and quantification of the native carotenoid composition in fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, n. July, 2019.
- ARAÚJO, R. R. DE et al. ***Byrsonima crassifolia* e *B. verbascifolia*: murici**. [s.l.] Embrapa Agroindústria Tropical - Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2018.
- ARLINDO, M. A. et al. Mathematical modeling of the pulp drying curves murici (*Byrsonima crassifolia*): The foam layer drying. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 18, p. 1547–1551, 4 maio 2017.
- ARRUDA, H. S. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738–749, 15 abr. 2018.

- BARRALES, F. M. et al. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 9–21, 1 nov. 2018.
- BORGES, A. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256–265, 2013a.
- BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256–265, 1 ago. 2013b.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. [s.l: s.n.].
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. **LWT - Food Science and Technology**, jan. 1995b.
- CARNIEL, N. et al. Acta Scientiarum The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *Physalis angulata* using response surface approach. p. 4–9, 2018.
- CHINEMBIRI, T. N. et al. **Review of natural compounds for potential skin cancer treatment**. **Molecules**MDPI AG, , 2014.
- COMPARINI, A. et al. **METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: UMA INTRODUÇÃO NOS SOFTWARES R E STATISTICA**. [s.l: s.n.].
- CONTE, R. et al. Indian Journal of Advances in Chemical Science Ultrasound-Assisted Extraction of Total Polyphenols from Black Poplar (*Populus nigra*) and Evaluation of Antioxidant Potential. n. ii, p. 25–30, 2016.
- COSTA, M. G.; BUCEK, E. U. Enemp 2017. v. d, p. 1–7, 2017.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. **PLE in the analysis of plant compounds - Part II: One-cycle PLE in determining total amount of analyte in plant material**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **Anais...Elsevier**, 29 abr. 2005.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 1 abr. 2012.
- DE FREITAS, F. A. et al. Biological evaluation and quantitative analysis of antioxidant compounds in pulps of the Amazonian fruits bacuri (*Platonia insignis* Mart.), ingá (*Inga edulis* Mart.), and uchi (*Sacoglottis uchi* Huber) by UHPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–10, 2018.
- DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic compounds. Em: **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 253–271.

- DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, set. 2012.
- DE SOUZA, V. R. et al. Amazon fruits inhibit growth and promote pro-apoptotic effects on human ovarian carcinoma cell lines. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019.
- DE SOUZA, V. R. et al. Fruit-based drink sensory, physicochemical, and antioxidant properties in the Amazon region: Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *verbascifolia* (L.) DC) and tapereba (*Spondia mombin*). **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2341–2347, 1 maio 2020.
- DÍAZ REINOSO, B.; GONZÁLEZ MUÑOZ, M. J.; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, H. **Introduction**. [s.l: s.n.].
- FARIA, J. V. et al. Comparative evaluation of chemical composition and biological activities of tropical fruits consumed in Manaus, central Amazonia, Brazil. **Food Research International**, v. 139, n. June 2020, 2021.
- GAMBIM, L. DE B., & BENDER, J. P. (2020). **Avaliação do potencial antitumoral de compostos fenólicos extraídos da goiaba-serrana (*acca sellowiana*) em células de melanoma cutâneo sk-mel-28 CUTÂNEO SK-Mel-28** (Vol. 1, capítulo 1) [Universidade Federal da Fronteira Sul]. <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/3917>
- GARCIA-SALAS, P. et al. **Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples**. **Molecules**, dez. 2010.
- GIRALDO-ZUNIGA, A. D. et al. Drying kinetics for murici (*Byrsonima crassifolia*) fruit. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 6, p. 699–705, dez. 2006.
- GONG, Y. et al. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 9–16, jan. 2012.
- GORDON, A. et al. **Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the amazon region**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **Anais...** 27 jul. 2011.
- GRZYBOWSKI, C. R. D. S. et al. Potencial fisiológico e conservação de sementes de muruci (*Byrsonima crassifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, 1 dez. 2017.
- HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.
- HEDAYATI, S. et al. Ultrasound-assisted extraction of mucilaginous seed hydrocolloids: Physicochemical properties and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, out. 2021.
- HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytotherapy**, v. 18, n. 14, p. 1255–1261, 15 nov. 2011.
- HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23 mar. 2005.

HUI, C. et al. Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 18 jan. 2013.

IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P.; EKATERINIADOU, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 382–388, 15 nov. 2018.

IRÍAS-MATA, A. et al. Carotenoids and xanthophyll esters of yellow and red nance fruits (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) from Costa Rica. **Food Research International**, v. 111, p. 708–714, 1 set. 2018.

JIANG, T.; GHOSH, R.; CHARCOSSET, C. **Extraction, purification and applications of curcumin from plant materials-A comprehensive review. Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2021.

KAMILOGLU, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332–349, 1 set. 2020.

KANDI, S.; CHARLES, A. L. Statistical comparative study between the conventional DPPH [rad] spectrophotometric and dropping DPPH [rad] analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity analysis. **Food Chemistry**, v. 287, p. 338–345, 30 jul. 2019.

KANG, J. et al. Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing mdoH gene expression. **Food Control**, v. 94, p. 147–154, 1 dez. 2018.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, mar. 2009.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology**, ago. 2011.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. **FLAVONOIDES E RADICAIS LIVRES FLAVONOIDS AND FREE RADICALS**. [s.l: s.n.]. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000500693&lng=en&tlng=enViewprojecthttps://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2013/AY/c3ay26263d#!divAbstractViewproject>.

LIMA, I. A. S. I. et al. Extração de compostos fenólicos do noni (*Morinda citrifolia* Linn) empregando energia ultrassônica. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, 18 maio 2018.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, ago. 1998.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015.

MAJZOBI, M.; HEDAYATI, S.; FARAHNAKY, A. Functional properties of microporous wheat starch produced by α -amylase and sonication. **Food Bioscience**, v. 11, p. 79–84, 3 ago. 2015.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 430–433, 21 abr. 2009.

MARIUTTI, L. R. B. et al. The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, v. 64, p. 618–625, 2014.

MARIUTTI, L. R. B.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 155–160, ago. 2013.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, H. B. K. M. et al. **Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia*** *Journal of Ethnopharmacology*. [s.l: s.n.].

MIRANDA, P. H. S. et al. **A scientific approach to extraction methods and stability of pigments from Amazonian fruits.** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2021.

MORALES-SOTO, A. et al. High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annum* L.) samples. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 977–984, maio 2013.

MUTHUKUMARAN, J. et al. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 4, p. 304–309, 2013.

NEVES, L. C. et al. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p. 188–196, 2015a.

NEVES, L. C. et al. Study to determine the optimum harvest date of Murici (*Byrsonima coccolobifolia* Kunth.) from quality and functional attributes. **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 49–56, 2015b.

OBOH, G. et al. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 627–634, 2016.

PALOS-HERNÁNDEZ, A. et al. Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 29, 1 out. 2022.

PAZ, W. H. P. et al. Remela de cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis. **Food Research International**, v. 109, n. November 2017, p. 112–119, 2018.

PEIXOTO ARAUJO, N. M. et al. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. **Food Research International**, v. 147, n. February, 2021.

- PELINSON, L. P. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2085–2092, 1 abr. 2019.
- PEREZ-GUTIERREZ, R. M. et al. Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 350–357, dez. 2010.
- PICÓ, Y. **Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 2013.
- PIRES, F. C. S. et al. Determination of process parameters and bioactive properties of the murici pulp (*Byrsonima crassifolia*) extracts obtained by supercritical extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, n. January, p. 128–135, 2019.
- PIRES, F. C. S. et al. Bioactive compounds and evaluation of antioxidant, cytotoxic and cytoprotective effects of murici pulp extracts (*Byrsonima crassifolia*) obtained by supercritical extraction in hepg2 cells treated with h₂o₂. **Foods**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.
- PLAZZOTTA, S. et al. Modelling the recovery of biocompounds from peach waste assisted by pulsed electric fields or thermal treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 290, 1 fev. 2021.
- POODI, Y. et al. Intensification of bioactive compounds extraction from Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) leaves using ultrasonic waves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 37–50, 2018a.
- POODI, Y. et al. Intensification of bioactive compounds extraction from Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) leaves using ultrasonic waves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 37–50, 2018b.
- REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. G. **Chemical and Aroma Determination of the Pulp and Seeds of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.)**. **J. Braz. Chem. Soc.** [s.l: s.n.].
- RIBEIRO, C. et al. PHYSIOLOGICAL POTENTIAL AND CONSERVATION OF MURUCI (*Byrsonima crassifolia*) SEEDS 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, 2017.
- RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L. **Cell Viability Assays** **Cell Viability Assays**. [s.l: s.n.].
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53–60, mar. 2007.
- RUFINO, M. DO S. M. et al. FRAP embrapa. **Comunicado Técnico, 125 Embrapa**, p. 3–6, 2006.
- SHI, C. et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane. **Food Chemistry**, v. 197, p. 100–106, 15 abr. 2016.
- SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012a.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, mar. 2012b.

SHUKLA, S. et al. **Emerging and advanced drug delivery systems for improved biopharmaceutical attributes of gallic acid: A review**. **Phytomedicine Plus** Elsevier B.V., , 1 nov. 2022.

SILVA, M. R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790–1793, 2008.

SILVA, R. V. UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA-CCSST DEPARTAMENTO DO CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS. [s.l.: s.n.].

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **52 POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS [14] [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent**. [s.l.: s.n.].

SOMADE, O. T. et al. Syringic and ascorbic acids prevent NDMA-induced pulmonary fibrogenesis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress through the regulation of PI3K-Akt/PKB-mTOR-PTEN signaling pathway. **Metabolism Open**, v. 14, p. 100179, jun. 2022.

SOUSA, M. S. B. et al. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 472–482, 1 jun. 2018a.

SOUSA, M. S. B. et al. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 472–482, 1 jun. 2018b.

SOUSA, M. S. B.; DE SOUZA BUARQUE, D. Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth): Antioxidant effects and application to aging. **Aging**, p. 259–265, 2020.

SRINIVASULU, C. et al. **Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2018.

STAFUSSA, A. P. et al. Bioactive compounds of 44 traditional and exotic brazilian fruit pulps: Phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 106–118, 1 jan. 2018.

SUGANTHY, N. et al. **Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2016.

SUN, G. et al. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 11, n. 1, p. 150–158, 1 jan. 2016.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 2007.

TABART, J. et al. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1268–1275, 31 dez. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TASHIRO, E.; IMOTO, M. **Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration**. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** Springer Verlag, , 1 mar. 2016.

TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 10, n. 4, p. 664–676, dez. 2007.

TER STEEGE, H. et al. Towards a dynamic list of Amazonian tree species. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2019.

TIVERON, A. P. et al. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943–8957, 2012.

UDAYA RAJESH, R.; SANGEETHA, D. A Critical Review on Quercetin Bioflavonoid and its Derivatives: Scope, Synthesis, and Biological Applications with Future Prospects. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 104881, abr. 2023.

VICENTE SILVA, R. DA. **ROSANA VICENTE DA SILVA USO DE TANINOS DA CASCA DE TRÊS ESPÉCIES DE EUCALIPTO NA PRODUÇÃO DE ADESIVOS PARA MADEIRA**. [s.l: s.n.].

WANG, W. et al. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. **Food Chemistry**, v. 178, p. 106–114, 1 jul. 2015.

WEREMFO, A. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from turkey berry (*Solanum torvum* Sw) fruits using response surface methodology. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 30, 1 set. 2022.

XIANG, B. et al. **Infrared assisted extraction of bioactive compounds from plant materials: Current research and future prospect**. **Food Chemistry** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2022.

YANG, L. et al. **A systematic review of acupuncture and Chinese herbal medicine for postpartum depression**. **Complementary Therapies in Clinical Practice** Churchill Livingstone, , 1 nov. 2018.

YINGNGAM, B.; SUPAKA, N.; RUNGSEEVIJITPRAPA, W. Optimization of process parameters for phenolics extraction of *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 129–140, 1 jan. 2015.