

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
GABRIELA ROSO CIBIN

CHÁ SOLÚVEL DOS FRUTOS DE *POUTERIA RAMIFLORA* MART.
RADLK: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO
FITOQUÍMICA

BRASÍLIA, 2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA ROSO CIBIN

**CHÁ SOLÚVEL DOS FRUTOS DE *POUTERIA RAMIFLORA* MART.
RADLK: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO
FITOQUÍMICA**

**Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yris Maria
Fonseca-Bazzo**

BRASÍLIA, 2021

RC567c Roso Cibin, Gabriela
 CHÁ SOLÚVEL DOS FRUTOS DE POUTERIA RAMIFLORA MART. RADLK:
 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA / Gabriela
 Roso Cibin; orientador Yris Maria Fonseca-Bazzo. --
 Brasília, 2021.
 75 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências da Saúde) --
 Universidade de Brasília, 2021.

 1. curriola. 2. Pouteria. 3. metabólitos secundários. 4.
 atividade antioxidante. 5. chá. I. Fonseca-Bazzo, Yris
 Maria, orient. II. Título.

GABRIELA ROSO CIBIN

**CHÁ SOLÚVEL DOS FRUTOS DE *POUTERIA RAMIFLORA* MART. RADLK:
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Yris Maria Fonseca-Bazzo - Presidente
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

Dr^a. Maria de Fátima Borin
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

Dr^a. Bruna Klein
Instituto Federal Farroupilha – IFFar

Dr^a. Paloma Michelle de Sales
Secretaria de Saúde do Distrito Federal

Dr. Guilherme Martins - Suplente
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

BRASÍLIA, 2021

Dedico este trabalho aos meus filhos Théo e Lucas, que nasceram durante a realização deste projeto, e mesmo pequenos, compreenderam a ausência da mamãe em alguns momentos. Vocês são a razão da minha vida e o motivo pelo qual me esforço para ser cada dia melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o guia da minha vida. Por ter me feito uma pessoa de fé, capaz de transformar as fraquezas em força e as derrotas em vitória.

A minha orientadora, Professora Dr^a Yris Maria Fonseca-Bazzo, pela oportunidade dada em realizar este trabalho. Pela sua compreensão, humildade, paciência, zelo durante todo esse período (principalmente nos momentos mais difíceis), capacitação e competência, sendo minha referência como profissional. Por ter confiado em mim e acreditado no meu potencial desde o início. É um prazer enorme trabalhar com uma pessoa tão humana como você. Toda minha admiração e gratidão!

As professoras Dr^a Dâmaris Silveira e Dr^a Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista pelo acolhimento desde o primeiro dia de trabalho nos laboratórios, incentivo e sugestões que foram extremamente construtivas para a realização desta pesquisa. Ao professor Dr. Christopher William Fagg pelas coordenadas na busca pelos meus frutos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais e Controle de Qualidade de Medicamentos: Amanda, Diegue, Yuri, Lorena, Gislane, Juliana, Paula Garcia, Marcela, Paula Souza, Edson, Samuel, Thais, Kellen, João Victor, Cristhian, Manoel, Márcia, Kícia, Renata, Lucas e Vítor pelo convívio diário, por tornar os dias mais leves e divertidos em um ambiente agradável e acolhedor, de muita união e que, para mim, fez toda a diferença. Em especial ao Diegue que, por diversas vezes, me auxiliou na realização dos ensaios. Por trocar ideias e experiências, pelas discussões de análises estatísticas e interpretação de dados.

As técnicas Patrícia e Júlia por toda paciência, compreensão e auxílio no dia-a-dia do laboratório e disposição nas buscas e coletas das minhas amostras. Ao técnico do Laboratório de Ensino André, pela paciência e ajuda física na utilização do spray dryer enquanto estava grávida de 7 meses.

A Paula Martins (LTMAC) pelo auxílio e acompanhamento nos primeiros usos do spray dryer.

As queridas amigas da UFSM Amandinha, Dani F. e Dani B. pelo auxílio no entendimento e interpretação do método ORAC.

Ao LABTOX pela disponibilidade de uso do liofilizador.

A toda minha família, por acreditar que sou capaz e sempre me dar o incentivo necessário, mesmo longe, mandando energias positivas. Em especial ao meus pais, por vibrarem e se orgulharem com as minhas conquistas e estarem sempre rezando para que tudo desse certo.

Ao meu esposo Alexandre, pelo auxílio e dedicação durante todo esse período. Passamos por alguns momentos difíceis ao longo dessa caminhada, mas unidos, nós vencemos juntos. Obrigada por ser a minha base e por zelar tanto pela nossa família.

À família Cibir, por estar presente em todos os momentos de alegrias e adversidades, dando conselhos e apoiando minhas decisões, pelo cuidado e preocupação, principalmente com meus pequenos. Imensamente grata por tudo que fazem por mim!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, e suporta uma ampla variedade de espécies. Algumas delas, são conhecidas como fonte de compostos de alto interesse biotecnológico. Além disso, devido às suas propriedades funcionais aliadas ao potencial de agregar valor e conservar a biodiversidade do Cerrado, essas espécies vêm sendo utilizadas como plantas medicinais. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um chá solúvel da polpa do fruto de *P. ramiflora* (Mart.) Radlk, avaliar os compostos fitoquímicos presentes nos extratos, além de avaliar o potencial antioxidante destes. Os frutos foram coletados na área de Cerrado do Campus UnB Planaltina-DF, processados (separação da casca, polpa e semente) e preparados os extratos aquosos, etanólicos e hexânicos de suas partes. O perfil fitoquímico dos extratos foi analisado por CLAE/DAD. A determinação da atividade antioxidante foi realizada por métodos de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e complexo fosfomolibdênio. Para a obtenção do chá solúvel, o extrato aquoso líquido foi submetido à secagem por spray dryer e o processo foi otimizado por meio de planejamento fatorial. O perfil cromatográfico dos extratos mostrou a presença de ácido gálico e catequina, definidos como marcadores químicos da planta. Para atividade antioxidante pelo método ORAC, o extrato etanólico da polpa foi o que apresentou maior valor de equivalência de Trolox (429,40 $\mu\text{mol ET/g}$ de amostra), e pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, o extrato que apresentou maior teor de equivalência foi o extrato aquoso da semente (0,126 $\mu\text{g EAA/mL}$ de amostra). O processo de otimização para obtenção do chá definiu as condições de secagem, onde o extrato aquoso da polpa, juntamente com a maltodextrina foram submetidos ao processo de atomização, que garantiu boa aceitabilidade do produto final. Os resultados deste trabalho destacaram o desenvolvimento e futuro potencial de um chá promissor da polpa de *P. ramiflora*, podendo ser uma fonte econômica de antioxidantes naturais.

Palavras-chave: curriola; *Pouteria*; metabólitos secundários; atividade antioxidante; chá.

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest Brazilian biome and supports a wide variety of species. Some of them are known as a source of compounds of high biotechnology interest. Additionally, to their value-added properties and their significant role in the conservation of Cerrado's biodiversity, these species are used as medicinal plants. *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk, popularly known as "curriola," is not well documented in the scientific literature. Therefore, research on the production of secondary metabolites produced by this plant is of extreme importance, as well as biological activities. This work developed a soluble tea from the fruit pulp of *P. ramiflora* (Mart.) Radlk, to evaluate the phytochemical compounds and the antioxidant potential of its extracts. The fruits were collected in the Cerrado area of Campus UnB Planaltina, DF, processed (separation of bark, pulp and seed), and aqueous, ethanolic and hexane extracts were prepared. The phytochemical profile of the extracts was analyzed by HPLC/DAD using phosphoric acid and acetonitrile as eluents. The determination of the antioxidant activity was performed using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and phosphomolybdenum complex. To obtain the soluble tea, the liquid aqueous extract was subjected to spray dryer and the process was optimized through factorial planning. The chromatographic profile of the extracts revealed gallic acid and catechin, defined as chemical plant markers. The antioxidant activity was measured using the ORAC method and the phosphomolybdenum complex reduction method. Results revealed that the ethanolic extract of the pulp had the highest Trolox equivalence (429.40 $\mu\text{mol TE/g}$ sample) and by the phosphomolybdenum complex reduction method, the highest equivalence was the aqueous extract of the seed (0.126 $\mu\text{g AAE/mL}$ sample). The results of this work highlighted the development and future potential of a promising tea from the pulp of *P. ramiflora*, which could be an economical source of natural antioxidants.

Keywords: curriola; *Pouteria*; secondary metabolites; antioxidant activity; tea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore e frutos de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	18
Figura 2	Material vegetal liofilizado da casca, polpa e semente de <i>P. ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	26
Figura 3	Processo de obtenção do extrato liofilizado das partes do fruto de <i>P. ramiflora</i>	27
Figura 4	Fluxograma de preparação e obtenção dos extratos aquosos, etanólicos e hexânicos das partes liofilizadas de <i>P. ramiflora</i>	28
Figura 5	Testes de formulações do EAP com base na utilização de diferentes excipientes farmacêuticos	34
Figura 6	Processo de secagem do chá de <i>P. ramiflora</i> por atomização	36
Figura 7	Perfil cromatográfico de EAP em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto ácido gálico referente ao pico $tR=5,19$ minutos	40
Figura 8	Perfil cromatográfico de EAP em 280 nm e ácido gálico identificado	41
Figura 9	Perfil cromatográfico de EES em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto ácido gálico referente ao pico $tR=5,19$ minutos	41
Figura 10	Perfil cromatográfico de EAS em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto catequina referente ao pico $tR=14,54$ minutos	42
Figura 11	Perfil cromatográfico de EAS em 354 nm	42
Figura 12	Perfil cromatográfico de EAS em 280 nm e catequina identificada	43
Figura 13	Perfil cromatográfico de EEP em 280 nm	43
Figura 14	Curva padrão da atividade antioxidante de Trolox pelo método ORAC	46
Figura 15	Atividade antioxidante demonstrada pelas leituras das fluorescências de EAS, EEP e EES.....	47
Figura 16	Atividade antioxidante demonstrada pelo método ORAC dos extratos de <i>P. ramiflora</i>	48
Figura 17	Curva padrão da atividade antioxidante de ácido ascórbico pelo método de inibição do complexo fosfomolibdênio.....	50
Figura 18	Atividade antioxidante demonstrada pelo método de inibição do complexo fosfomolibdênio dos extratos de <i>P. ramiflora</i>	51
Figura 19	Gráfico de superfície de resposta para o rendimento da variável dependente, em função das variáveis independentes: temperatura versus concentração de maltodextrina	57

Figura 20 O gráfico de Pareto indica o efeito da temperatura do ar de entrada e da concentração de maltodextrina no rendimento final do pó do chá solúvel57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos extratos brutos dos frutos de <i>Pouteria ramiflora</i>	28
Tabela 2 - Matriz de planejamento do delineamento experimental do composto central rotacional (DCCR) com fatorial 2 ² e as variáveis operacionais de entrada e seus níveis utilizados para otimização do processo de secagem em spray dryer.....	35
Tabela 3 - Caracterização físico-química da casca, polpa e semente de <i>P. ramiflora</i>	37
Tabela 4 - Caracterização e quantificação dos extratos de <i>P. ramiflora</i> por CLAE-DAD.....	38
Tabela 5 - Atividade antioxidante demonstrada através dos valores totais de ORAC dos extratos de <i>P. ramiflora</i>	48
Tabela 6 - Atividade antioxidante avaliada por inibição do complexo fosfomolibdênio dos extratos de <i>P. ramiflora</i>	50
Tabela 7 - Planejamento do delineamento do composto central rotacional (DCCR) usado na otimização do processo de secagem do chá solúvel de <i>P. ramiflora</i> por spray dryer	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP - 2,2'-Azobis 2-amidinopropanedihydrochloride

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Área sob a curva

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD - Detector de arranjo de diodos

DCCR - Delineamento experimental do composto central rotacional

EAPL - Extrato aquoso da polpa liofilizado

EAL – Extrato aquoso líquido

EHL – Extrato hexânico líquido

EEL – Extrato etanólico líquido

EAP - Extrato aquoso da polpa

EAS - Extrato aquoso da semente

EEP - Extrato etanólico da polpa

EES - Extrato etanólico da semente

EEC - Extrato etanólico da casca

EHP - Extrato hexânico da polpa

EHS - Extrato hexânico da semente

EHC - Extrato hexânico da casca

EAA - Equivalente em ácido ascórbico

ET - Equivalente em Trolox

ORAC - Oxygen radical absorbance capacity

TAC – Total antioxidant capacity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	13
2.2 <i>POUTERIA RAMIFLORA</i> MART. RADLK	16
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	20
2.4 CHÁ SOLÚVEL	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DOS FRUTOS	26
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS	27
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	29
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	30
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS.....	30
4.5.1 Método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)	30
4.5.2 Redução do complexo fosfomolibdênio	32
4.6 CHÁ SOLÚVEL DE <i>P. RAMIFLORA</i>	33
4.6.1 Delineamento experimental	33
4.6.2 Desenvolvimento e secagem do chá solúvel de <i>P. ramiflora</i>	35
5 RESULTADOS	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	37
5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE <i>P. RAMIFLORA</i> (MART.) RADLK	38
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>P. RAMIFLORA</i> (MART.) RADLK	45
5.3.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	45
5.3.2 Redução do complexo de fosfomolibdênio	49
5.3.3 Relação da composição fitoquímica e atividade antioxidante dos extratos de <i>P. ramiflora</i>	52
5.4 CHÁ SOLÚVEL DA POLPA DE <i>P. RAMIFLORA</i> (MART.) RADLK.....	53
5.4.1 Desenvolvimento e obtenção do chá solúvel	53
5.4.2 Otimização e rendimento do chá solúvel	55
6 CONCLUSÃO	61

7 PERSPECTIVAS.....	62
8. REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A informação de que há associação entre uma planta, utilizada para fins medicinais e as substâncias presentes nela serem responsáveis pela sua ação curativa, no contexto das ciências naturais e farmacêuticas, ainda é relativamente recente, remetente a meados do século XIX (1, 2). O fato é que dentre as inúmeras plantas conhecidas e utilizadas hoje para fins curativos, o gênero *Pouteria*, da família Sapotaceae, se destaca pela diversidade de espécies com características biológicas ativas, podendo ser encontradas em quantidades significativas no Cerrado.

As partes de espécies do gênero *Pouteria*, entre elas as folhas e cascas já foram avaliadas como fontes de enzimas a serem usadas como reagente de síntese (3). O extrato de *Pouteria ramiflora* demonstrou forte atividade inibitória sob as enzimas α -amilase e α -glucosidase, que hidrolisam carboidratos presentes no trato digestivo (4), bem como para fins de atividade biológica (3, 5-7). Muitas dessas espécies produzem frutos comestíveis, madeiras de alta qualidade, látex e substâncias utilizadas para a produção de fármacos (8), além de possuírem alto interesse biotecnológico com aplicação em diversos setores industriais. Todavia, os constituintes presentes nos frutos da planta ainda não foram totalmente estudados.

Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk, ou curriola, como é popularmente conhecida, produz frutos comestíveis (9) e na medicina popular é utilizada no tratamento de doenças como hiperlipidemias e obesidade, verminoses (cascas), disenteria (cascas), dor e inflamação (10, 11). Estudos fitoquímicos realizados com espécies deste gênero revelaram a presença de alcaloides, benzenoides, fenilpropanoides, e componentes como triterpenos e flavonoides são os constituintes em maior proporção.

Paralelamente, taninos e saponinas foram encontrados nos extratos etanólicos da casca, caule e raiz desta espécie. Estes mesmos extratos apresentaram redução nos níveis de glicose no sangue em ratos, além de diminuir a atividade da amilase salivar (12).

Das atividades biológicas reportadas na literatura conferidas para *P. ramiflora*, a maioria diz respeito às suas folhas. As principais são: antioxidante, anti-

inflamatória e atividade antinociceptiva, além da toxicidade para larvas de *Artemia salina* (13-15), antitumoral, antihelmíntica, e fotoproteção (contra raios UVA e UVB). Há uma importância econômica relatada para *P. ramiflora*, uma vez que fornece látex usado na produção de goma comercial, madeira de qualidade, e frutos comestíveis (16).

Nesse sentido, considerando a grande variedade de espécies nativas no Cerrado como possíveis fontes de novas moléculas bioativas, e a inexistência de estudos acerca das demais partes da planta, o desenvolvimento do chá da polpa de *P. ramiflora* auxilia na exploração de outras formas de seu consumo, que não somente *in natura*, beneficiando alimentos com potencial de promover a saúde e bem-estar. Além disso, corrobora para a realização desta investigação, o fato de o tema ser ainda pouco explorado até o momento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais como recurso farmacêutico é antigo, e por muito tempo produtos minerais, vegetais e animais constituíram uma vasta gama de produtos de origem terapêutica. Além disso, a utilização de produtos naturais foi, e por vezes ainda é acompanhada de significados religiosos e visões peculiares de saúde e doença dentro de cada cultura. Com o passar dos anos e a descoberta da penicilina, produzida a partir de microrganismos no desenvolvimento de terapia infecciosa, os recursos terapêuticos de origem natural passaram a ter espaço junto aos produtos sintéticos já existentes (17). Comunidades que ocupam florestas tropicais convivem com a alta diversidade existente nesses territórios e desenvolvem, cada qual à sua maneira, diversas formas de explorá-los para sua sobrevivência (18).

Os medicamentos fitoterápicos são definidos pela legislação sanitária brasileira como aqueles obtidos por meio do uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia estejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (19). Grande parte das práticas relacionadas ao uso popular de plantas medicinais e fármacos derivados dessas plantas foram originalmente descobertas por meio de estudos sobre curas tradicionais e do conhecimento popular de povos indígenas. Ademais, são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde, e alguns deles, apesar do grande avanço na química de produtos sintéticos, não podem ser substituídos (20).

O uso das plantas medicinais está bem estabelecido nos dias atuais, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que 85% da população que utiliza a atenção primária consome plantas ou suas preparações (21). A indicação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos na medicina humana, no entanto, não é para substituir medicamentos já comercializados com sua eficácia comprovada, mas sem dúvida, tem um papel primordial na medicina, uma vez que aumenta a opção

terapêutica na oferta de medicamentos equivalentes. Ressalta-se que muitos medicamentos fitoterápicos, assim como os sintéticos, também possuem registro e eficácia comprovada (17).

No cenário atual da indústria farmacêutica, a pesquisa por produtos naturais é cada vez mais incentivada, o que tem feito aumentar o interesse pelas plantas medicinais. Nesse contexto, o Brasil se encontra em uma posição de destaque, sendo detentor de grande diversidade biológica, não só pela grande diversidade de espécies vegetais que há disponível, mas também pela diversidade química presente nesses organismos. Isso faz com que essas plantas se tornem um excelente alvo para isolamento de moléculas e/ou metabólicos primários ou secundários com potencial para utilização e aplicações em indústrias médicas, farmacêuticas e alimentícias (22, 23).

O interesse por produtos oriundos das plantas medicinais aumenta também frente ao alto custo na industrialização de medicamentos e suas patentes tecnológicas, uma vez que os medicamentos fitoterápicos possuem um custo mais baixo. Eles são produzidos com o mesmo rigor de qualquer medicamento industrializado e podem contribuir para melhorar as principais funções fisiológicas no organismo, restaurando as capacidades perdidas e promover bem-estar. Nesse sentido, os fitoterápicos tornam-se uma alternativa acessível à saúde pública (24-26).

Assim como o uso de qualquer medicamento, também se recomenda atenção na opção pela fitoterapia quanto ao perfil tóxico conhecido e, sua utilização inadequada. Alguns medicamentos fitoterápicos possuem princípios ativos com capacidade de alterar funções orgânicas, bem como interferir na ação de fármacos quando utilizados de forma simultânea. Por isso, é importante identificar propostas terapêuticas que auxiliem no tratamento adequado, com reduzidos efeitos colaterais que contribuem de maneira positiva na saúde pública (27).

Mundialmente, cerca 53.000 espécies de plantas já são utilizadas com propósito medicinal nos dias atuais, sendo que a Organização Mundial da Saúde, em 2011, estimou que por volta de 70-95% dos cidadãos de países em desenvolvimento dependem principalmente da medicina tradicional como cuidados primários de tratamento para necessidades básicas de saúde, e o gasto com a

compra desses produtos pode ultrapassar de 15-30% da fonte total de renda (20, 28, 29).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, e abriga cerca de 160.000 espécies, entre elas animais, fungos e plantas (30). Algumas destas plantas são bastante conhecidas como fonte de compostos de crescente interesse comercial, devido às suas propriedades nutricionais e funcionais aliadas ao potencial de agregar valor e conservar a biodiversidade do bioma. No entanto, esse manancial de espécies consideradas “Plantas do futuro”, ainda não foi inserido no contexto do agronegócio brasileiro, e poucas espécies foram estudadas a partir do ponto de vista fitoquímico (31).

Visando o custo de desenvolvimento dessa categoria de produtos, os países em desenvolvimento como o Brasil oferecem integrativa terapêutica bastante promissora para a população. O país é visto em destaque por possuir um terço da flora mundial, além de ter a Amazônia como a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta (32). Esta vasta disponibilidade de biodiversidade deixa o país em excelente posição estratégica para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de metabólitos com valor terapêutico (33). As observações populares sobre o uso e eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos benéficos a saúde que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos totalmente esclarecidos.

De acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), de 24% do total das espécies superiores encontradas no Brasil (21), apenas 1% delas foi estudada química e farmacologicamente (34, 35); na maioria dos casos, apenas estudos preliminares são realizados, não tendo sua potencialidade terapêutica comprovada (36, 37). Apesar de várias delas produzirem frutos comestíveis amplamente consumidos pela população, poucas referências são encontradas em relação à identificação dos metabólitos responsáveis por grande espectro de atividades biológicas de frutos pertencentes a espécies de diversas famílias (38).

Considerando a grande diversidade de espécies nativas do Cerrado, e que para grande parte delas ainda não há estudos visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, estudos abordando estes temas mostram-se importantes incentivadores para o desenvolvimento de pesquisas (39).

2.2 *POUTERIA RAMIFLORA* MART. RADLK

A família Sapotaceae possui cerca de 1250 espécies subdivididas em cinco tribos com 53 gêneros (40) representantes desde o sul dos Estados Unidos até Paraguai, Uruguai e Chile, sendo que 103 dessas espécies são encontradas no Brasil (41, 42), principalmente na região amazônica e no litoral, encontradas frequentemente na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (43). Existem muitos gêneros de Sapotaceae que produzem frutos comestíveis, tais como *Chrysophyllum*, *Manilkara*, *Mimusops* e *Pouteria* (44), além de produzirem substâncias utilizadas para a produção de fármacos (8).

Espécies do gênero *Pouteria*, considerado o maior gênero da família (43), possuem fruto ovoide ou globoso contendo polpa, com epicarpo de textura firme, cor amarela, ou até mesmo verde quando maduro, contendo de uma a duas sementes que são envoltas por polpa gelatinosa, possivelmente de origem placentar (8, 45). É comum no Cerrado, estando presente nas fisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito ou *strito senso*, cerrado ralo, borda de vereda e mata mesofítica ou seca (43, 46).

Uma diversidade de espécies do gênero *Pouteria* possui quantidades significativas de ativos antioxidantes, compostos polifenólicos, incluindo ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, dihidromiricetina e miricetina. Foi relatada a presença de alcaloides, benzenoides e fenilpropanoides, hidrocarbonetos de cadeia longa, álcoois, ácidos e ésteres (47). Especificamente os flavonoides são apontados como marcadores quimiotaxonômicos (miricitrina) para este gênero, encontrados além das folhas, nos demais órgãos (3).

Atividades biológicas exercidas por essas plantas têm auxiliado na medicina popular para tratar enfermidades como febre, inflamação, erupções na pele, úlceras, diabetes, diarreia, náuseas, vômitos, dores nas costas, e até mesmo para estimular a lactação (48). O potencial anti-inflamatório dentro desse gênero tem sido ligado à presença de constituintes químicos como triterpenos e flavonoides (3, 49, 50).

Os frutos destas espécies constituem uma fonte de compostos, atribuindo a elas, propriedades benéficas à saúde, o que pode estimular seu uso pela indústria

farmacêutica e de alimentos, para o desenvolvimento de novos produtos, promovendo a sustentabilidade das regiões com as características do Cerrado.

Destaca-se dentro do gênero *Pouteria*, a espécie *P. ramiflora* (Mart.) Radlk (Figura 1), frutífera do tipo arbustivo-arbóreo não cultivada e frequente na natureza, que mede aproximadamente 10 m de altura, sendo distribuída nas regiões centrais e sul do Brasil, podendo se estender ao norte para a Amazônia e oeste da Bolívia, com registro no Paraguai (16). Em época de frutificação, entre novembro e janeiro, é muito visitada pela fauna, devido ao cheiro intenso e sabor agradável do fruto, possível de ser detectado a cerca de 1 m de distância das árvores floridas, sendo a zoocoria sua principal forma de dispersão (8, 51).



Figura 1 Árvore e frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Amostras coletadas em Planaltina-DF Campus UnB Planaltina

Em estudo realizado por Gama e colaboradores em 2011 (52), foi avaliada a frutificação em *P. ramiflora* com a maturação dos frutos ocorrendo durante a estação chuvosa do ano, não havendo maturação no ano seguinte, pois todos os frutos foram abortados no início do desenvolvimento. No ano de frutificação, a intensidade máxima ocorreu no período em que os frutos ainda estavam jovens. Quanto à maturação dos frutos no período chuvoso, trata-se de uma situação comum em

espécies arbóreas zoocóricas de ambientes sazonais. Nesta época, os frutos permanecem atrativos por mais tempo, favorecendo a dispersão das sementes (53).

Pouteria ramiflora é popularmente conhecida como “abiu-do-cerrado”, “curriola”, “guapeva” ou “pitomba de leite”. Se destaca pela produção de frutos que apresentam uma polpa doce que envolve a semente, frequentemente consumida *in natura* pela população, ou na forma de produtos como cremes e sorvetes, o que representa um significativo valor econômico (54).

Compostos fenólicos como miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo e miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo foram encontrados em estudos realizados com as folhas desta espécie nas concentrações de 13,55 mg/g e 9,61 mg/g, respectivamente, utilizando extratos hidroalcoólicos. Além disso, foram encontrados flavonoides a 48,82 mg/g e fenóis a 125,87 mg/g, indicando presença de substâncias com interesse terapêutico (55).

Dentro das atividades biológicas atribuídas a essa planta, em destaque, na medicina popular do Cerrado mato-grossense, é utilizada no tratamento de hiperlipidemias e obesidade (11), e suas raízes são úteis para tratar verminoses, disenteria, dor e inflamação (56). Apresenta potencial anti-inflamatório, analgésico e antinociceptivo (10), citotóxico (3), antimicrobiano, antifúngico (57), amilolítico e inibitório, com atividade neuroprotetora e antitumoral (58), mutagênica (59), além do potencial antioxidante e fotoprotetor (60).

Considerando trabalhos sobre a atividade alelopática com a espécie *P. ramiflora*, estes foram realizados com extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas de exemplares coletados em Brasília sobre sementes de alface e tomate (*Solanum lycopersicum*) (56). Foi avaliado também, o potencial alelopático, tendo como base, a determinação da classe de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso e etanólico da parte interna e externa da casca de *P. ramiflora*, e seus efeitos sobre a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa*, não sendo observada alteração na germinação pelos extratos testados. Porém, diferentes concentrações do extrato etanólico da parte interna da casca prejudicaram o desenvolvimento da planta, efeito associado à presença de esteroides e triterpenos, neste extrato.

A casca de *P. ramiflora*, apesar de não afetar negativamente as taxas de germinação, possui aleloquímicos que interferiram negativamente no crescimento

das plântulas de alface, indicando efeito alelopático e potencial de utilização (61). Paralelamente, o extrato etanólico das raízes desta planta evidenciou o efeito analgésico em camundongos, produzindo inibição de contrações abdominais. Além disso, o mesmo extrato inibiu o processo inflamatório, diminuindo o número de células inflamatórias, os níveis de metabolitos de óxido nítrico e a atividade da adenosina desaminase em 65%, 77% e 68%, respectivamente (10).

É fato que os estudos encontrados sobre as atividades reportadas para *P. ramiflora* estão diretamente ligados às diferentes classes de metabólitos secundários. Nesse cenário, a avaliação fitoquímica e o potencial antioxidante dos extratos de *P. ramiflora* bem como o desenvolvimento de um chá solúvel da sua polpa contribui para o enriquecimento das informações sobre as propriedades terapêuticas da planta, além de ser considerado um alimento que, consumido na alimentação cotidiana, pode trazer benefícios fisiológicos à saúde graças aos seus componentes ativos.

Espera-se que, além destes constituintes e atividades biológicas, outros oriundos do metabolismo secundário da planta sejam encontrados em partes dela ainda pouco ou nunca investigadas (polpa e semente), assim como no chá do fruto em desenvolvimento no presente trabalho.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de um substrato, diminuindo a velocidade do processo de oxidação envolvendo principalmente, moléculas de lipídeos. Essa ação ocorre através de um ou mais mecanismos de proteção em vários níveis dentro das células, tais como inibição da formação de espécies de radicais livres, capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura, evitando a fase de iniciação da oxidação e quelando íons metálicos (62).

Os radicais livres, acumulados nas células devido a fatores como radiações, poluentes ambientais, componentes químicos, toxinas, alimentos com alto teor de gordura e picantes, bem como o estresse físico causam o esgotamento de

antioxidantes presentes no sistema imunológico, modificam a expressão dos genes, e induzem proteínas anormais (63). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resultante da ação pelos radicais livres é chamado de estresse oxidativo (64).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos estão relacionados com o aparecimento de alguns distúrbios, podendo incluir doenças degenerativas como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (65-68), além de artrite, lesão de isquemia e reperfusão de muitos tecidos, lesão no sistema nervoso central, gastrite, câncer, entre outros (69, 70). As moléculas antioxidantes atuam auxiliando as células a lidar com o estresse, sequestrando os radicais livres, de modo que eles estejam ligados à prevenção dessas doenças.

Da classe dos antioxidantes sintéticos, o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) são os mais importantes e comercialmente disponíveis. Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se os tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos, presentes particularmente em frutos e vegetais. Um aumento exponencial no interesse por estes antioxidantes tem sido relatado, devido à presença de certos componentes oriundos do metabolismo secundário das plantas.

Estudos epidemiológicos reportados indicam que o consumo frequente destes ativos está associado a um menor risco de doenças crônico-degenerativas e câncer (71), podendo ser usados para controlar o equilíbrio entre radicais livres e estresse oxidativo, o que torna uma alternativa menos prejudicial aos produtos antioxidantes sintéticos (72).

As plantas medicinais constituem uma fonte inesgotável de antioxidantes. De acordo com Bakkali et al. (2008) (73), o teor de substâncias ativas e a composição química dos fitobióticos nos produtos finais podem variar amplamente, dependendo das partes da planta utilizadas, da origem geográfica e da época de colheita. Além disso, foi demonstrado que as propriedades antioxidantes desses produtos naturais estão principalmente relacionadas ao seu conteúdo fenólico, portanto, sua ação é semelhante aos antioxidantes fenólicos sintéticos (74).

A tendência à substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na saúde e na funcionalidade. A nível preservacionista, favorece o homem e o meio ambiente na medida em que as

indústrias alimentícias geram resíduos. A industrialização de produtos como sucos, doces e geleias geram resíduos (cascas e sementes) que são importantes fontes naturais de antioxidantes, e estas, na maioria das vezes são descartadas. O aproveitamento destes resíduos torna-se uma alternativa economicamente vantajosa, por meio da exploração completa do conteúdo antioxidante presente nestes produtos (75).

Apesar dos benefícios na conservação de alimentos, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido restringido em alguns países por seus possíveis efeitos adversos e toxicológicos. Dentre eles estão carcinomas após exposição ao BHA e efeitos adversos nos pulmões, fígado e sangue causado por BHT (76, 77). Além disso, a preferência por antioxidantes naturais possui vantagem de ordem físico-química, uma vez que estes apresentam maior solubilidade tanto em água como em óleo, e auxiliam na preparação de emulsões e outras formulações como os hidrogéis (78).

Uma série de metodologias já foram desenvolvidas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, e componentes do metabolismo secundário das plantas são cada vez mais utilizados para este fim. Nesse contexto, a exploração por substâncias oriundas de extratos vegetais e seus produtos se faz importante, com o objetivo de sequestrar radicais livres, no sentido de serem utilizados a fim de inibir processos oxidativos e auxiliar na prevenção das doenças.

2.4 CHÁ SOLÚVEL

Com origem na China, de um modo geral, o chá é uma bebida muito popular, largamente consumida por grande parte da população mundial, devido a suas características de aroma e sabor e propriedades medicinais. Seu consumo frequente se dá devido ao efeito benéfico à saúde caracterizado pela ação antioxidante, geralmente atribuída às altas concentrações de componentes como flavonoides, que por sua vez atuam em diferentes níveis de proteção do organismo (79).

Por definição, segundo o que é referenciado no Informe Técnico nº 45 de 28 de Dezembro de 2010, no item IV das Instruções Normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, um esclarecimento sobre a regulamentação de chás, na

qual, há a definição para o Chá Solúvel: “*Os produtos solúveis são aqueles resultantes da desidratação do extrato aquoso de espécie(s) vegetal(is) prevista(s) neste Regulamento e em Regulamento Técnico específico, obtidos por métodos físicos, utilizando água como único agente extrator. Estes podem ser adicionados de aroma.*” Neste contexto, é viável a utilização das espécies vegetais previstas pela ANVISA e/ou em Farmacopeias que são consumidos tradicionalmente como alimentos para o preparo de extratos aquosos.

Consumidos geralmente sob a forma de infusões ou decocções, preparadas a partir de diferentes partes das plantas, isto é, ervas, flores, frutas, folhas, sementes, cascas e raízes (inteiras, fragmentadas ou moídas) que passaram por processo de secagem, os chás solúveis aromáticos são classificados como a segunda bebida mais consumida no mundo, pertencente a um mercado de rápido crescimento de bebidas *wellness* e possui múltiplos valores econômicos, sanitários e culturais (80, 81).

As formulações de plantas medicinais desempenham um papel importante e preventivo no tratamento de distúrbios mediados por radicais livres e terapia de suporte para diferentes doenças crônicas (82-84). Os benefícios à saúde relatados na literatura pelo consumo de chás destas plantas estão relacionados à diversas atividades biológicas como: antioxidante, hepatoprotetora, com propriedades diuréticas, inflamatórias e até mesmo anticancerígenas (84-88) e anti-anêmicas, com efeitos hipoglicêmicos e neuroprotetores (85, 89), além de estimulantes, relaxantes, calmantes, desintoxicantes e reguladores metabólicos.

O consumo habitual de chás a base de plantas não está associado somente às suas propriedades terapêuticas e curativas (85, 90), como também ao seu baixo custo, baixa incidência de efeitos colaterais e agressividade biológica, além de uma tendência à complementação de medicamentos convencionais. Os consumidores estão cada vez mais cautelosos em relação à saúde e, por isso, estão exigindo uma alimentação mais natural e saudável, muitas vezes dando preferência à bebidas como o chá, tornando este, um bom veículo a este respeito.

A FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) destacou que a produção e o consumo global de chás continuam a crescer globalmente (91), uma vez que aproximadamente 2 bilhões de xícaras de chá são consumidas diariamente em todo o mundo (92). A taxa de crescimento da produção

de chá verde, por exemplo, até 2027, deve chegar a mais de 7,5% ao ano, com demanda estimada em 3,6 milhões de toneladas (91), enquanto o mercado global de chá de ervas (significando diferente de *Camelia* derivados sinensis, sem cafeína) espera atingir uma CAGR (taxa composta de crescimento anual) de 4,94% e envolve US\$ 4.226,9 milhões até 2025, estimulando o lançamento de produtos funcionais com sabores novos e inovadores (93).

A ascensão desse mercado se deve principalmente ao aumento da conscientização e do interesse da população em geral por esses produtos, pelos benefícios à saúde humana ou pelas funções biorregulatórias (94). As formulações a base de ervas desempenham um papel vital na redução do dano oxidativo por meio de diferentes mecanismos, como eliminação de radicais, quelação de metais e efeitos redutores, e são ricas em diferentes componentes antioxidantes naturais (95).

Estudos têm demonstrado que o chá brasileiro possui maior quantidade de compostos fenólicos em comparação aos chás de outros países, fato que pode ser atribuído às características do clima e do solo (96, 97). Assim, eles têm um papel importante na manutenção da saúde de seus consumidores (95).

Aliado à melhora das propriedades organolépticas do produto final como cor, aroma, sabor, adstringência, em geral, o chá pertence a um mercado em crescimento rápido de bebidas de bem-estar (98), resultando em boa aceitabilidade devido às suas características químicas já relatadas, conferindo-lhe propriedades benéficas devido aos componentes ativos presentes e um produto que influencia na qualidade e expectativa de vida da população em geral.

Nesse cenário, como uma opção alternativa ao consumo dos frutos *in natura* de *P. ramiflora*, a polpa do fruto, juntamente com excipiente farmacêutico adequado, permite o desenvolvimento de um chá solúvel promissor devido aos componentes bioativos naturalmente presentes na planta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo desenvolver um chá solúvel da polpa do fruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk, avaliar os compostos fitoquímicos presentes nos extratos, bem como avaliar o potencial antioxidante destes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos aquoso, etanólico e hexânico a partir da polpa e semente de *P. ramiflora*;
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos por CLAE/DAD;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos por meio de diferentes métodos;
- Desenvolver um chá solúvel a partir da polpa de *P. ramiflora*;
- Otimizar o processo de obtenção do chá através da secagem por atomização, utilizando planejamento fatorial.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DOS FRUTOS

Os frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk foram identificados pelo botânico Prof. Dr. Christopher William Fagg, e coletados no Campus Universitário de Planaltina, da Universidade de Brasília – UnB, coordenadas latitude -15.6008169, longitude - 47.65821119999998, altitude 979 m. Uma amostra foi depositada no herbário da UnB sob a exsicata de número CW Fagg 2296. O material botânico foi processado, onde as partes do fruto foram separadas (casca, polpa e semente) e cada parte *in natura* foi liofilizada (Figura 2) (liofilizador modelo Advantage Plus XL-70, SP Scientific), triturada e destinada à preparação dos extratos brutos aquoso, etanólico e hexânico. Além de ser utilizado para o preparo do extrato aquoso, parte do material botânico (polpa liofilizada) foi destinado à preparação do chá solúvel, seguindo as Boas Práticas de Higiene e Manipulação de Alimentos (99). A escolha por liofilizar o material botânico se deu a fim de preservar a matéria-prima (frutos frescos) e obter quantidades suficientes para realizar análises adicionais, uma vez que a frutificação ocorre a cada dois anos.



Figura 2 Material vegetal liofilizado da casca, polpa e semente de *P. ramiflora* (Mart.) Radlk para produção dos extratos aquoso, etanólico e hexânico

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Foram preparados extrato aquoso da polpa (EAP), extrato aquoso da semente (EAS), extrato etanólico da polpa (EEP), extrato etanólico da semente (EES), extrato etanólico da casca (EEC), extrato hexânico da polpa (EHP), extrato hexânico da semente (EHS) e extrato hexânico da casca (EHC), de *P. ramiflora* aplicando a proporção de 1:10 (P/V) das partes do fruto em relação ao solvente. O extrato aquoso bruto foi submetido à extração por infusão com água destilada aquecida a 70°C. O recipiente foi tampado e o infuso deixado arrefecer a 50°C, sendo, em seguida, submetido à filtração a vácuo em funil de Büchner. O filtrado coletado foi levado ao freezer a -80°C para congelamento e posteriormente foi submetido à secagem por liofilização (Figura 3).

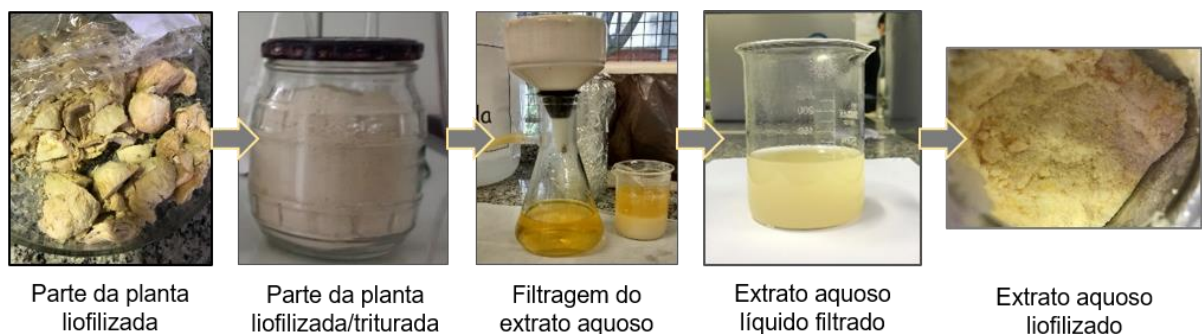


Figura 3 Processo de obtenção do extrato liofilizado das partes do fruto de *P. ramiflora*

Além dos extratos aquosos, os extratos etanólicos e hexânicos foram submetidos ao processo de maceração pelo período de nove dias, com troca de solvente a cada três dias. A solução extrativa hexânica foi coletada, e o material vegetal residual (torta) da extração foi macerado com etanol 95% nas mesmas condições. Os extratos foram submetidos à evaporação do solvente extrator utilizando rota evaporador (Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v - Heidolph) sob pressão reduzida à temperatura de até 40°C, obtendo os extratos hexânico e etanólico brutos (Figura 4).

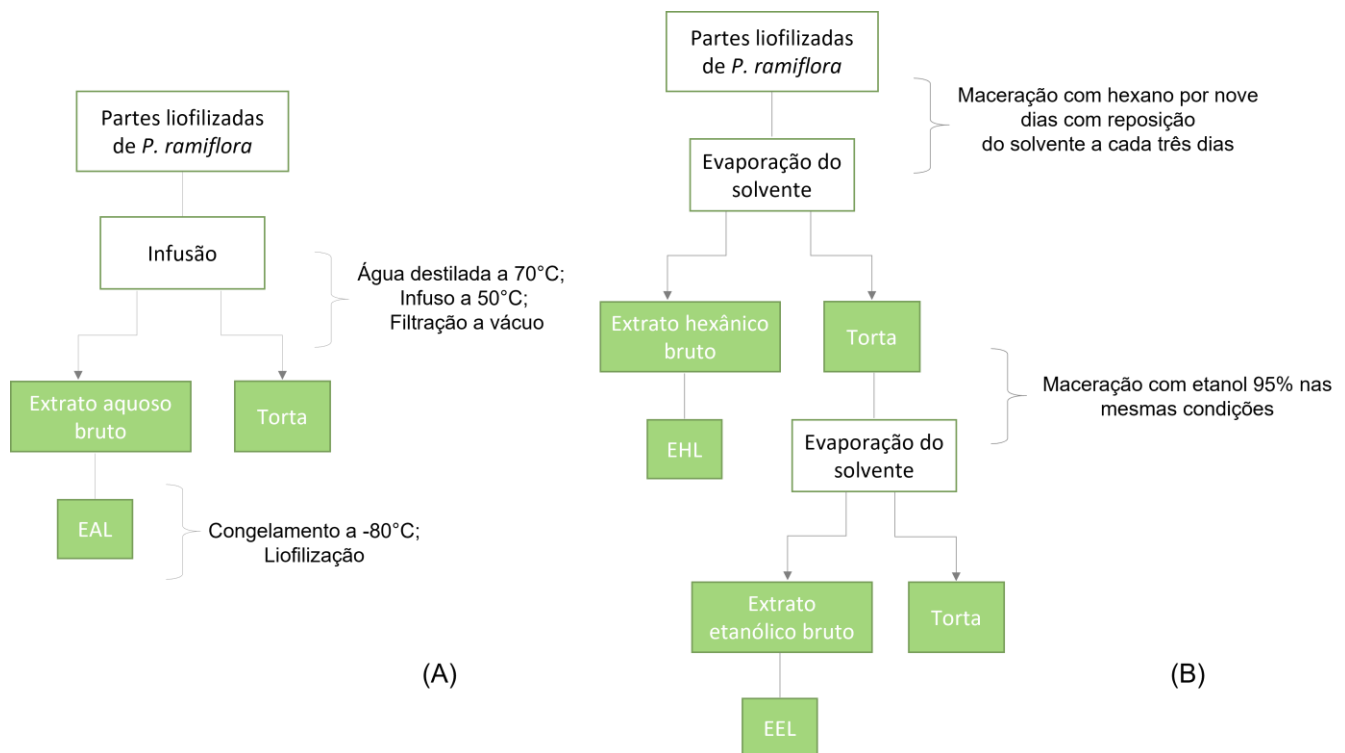


Figura 4 Fluxograma de preparação e obtenção dos extratos aquosos (A), etanólicos e hexânicos (B) das partes liofilizadas de *P. ramiflora*

Após o processo de extração, foi obtido o rendimento final de cada extrato através da razão entre o peso do extrato seco e o peso total do material botânico utilizado antes da extração, dado em porcentagem (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento dos extratos brutos dos frutos de *Pouteria ramiflora*

Extrato	Rendimento (%)
EAP	49,18
EAS	6
EAC	-
EEP	6,73
EES	4,09
EEC	18,36
EHP	13,97
EHS	7,31
EHC	2,33

Nesse estudo, apenas os extratos aquosos e etanólicos da polpa e semente foram avaliados devido às características de solubilidade das amostras e compatibilidade com as técnicas utilizadas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As diferentes partes liofilizadas do fruto (casca, polpa e semente) foram submetidas às seguintes análises físico-químicas: acidez total, pH, sólidos solúveis e teor de umidade. Acidez total titulável foi determinada por volumetria potenciométrica (100), utilizando hidróxido de sódio 0,1 M. Foram pesados 5 g de cada uma das amostras, e diluídas em um Becker com 100 mL de água destilada. Para melhor limpidez, filtrou-se essa solução. Com pHmetro digital (modelo 3510, Jenway®) e o auxílio de um eletrodo, as amostras foram tituladas com a solução de hidróxido de sódio até uma faixa de pH (8,2 - 8,4). O cálculo utilizado para os valores de acidez total titulável (ATT) foi:

$$ATT\% = \frac{V \times f \times 10}{P}$$

onde:

V= volume gasto da solução de hidróxido de sódio (mL)

f= fator de correção de hidróxido de sódio

P= massa da amostra (g).

O pH foi medido por pHmetro digital. Os sólidos solúveis foram determinados utilizando um refratômetro de campo (Briobrix, Modelo 2 WAJ). Ao equipamento, foram adicionadas duas gotas das amostras (solução filtrada anteriormente) e as leituras foram realizadas. A umidade foi determinada por analisador de umidade por infravermelho (Modelo IV2000 Gehaka) (100). Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada amostra.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento LaChrom Elite (Hitachi, Toquio, Japão) com coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e - 5 µm, utilizando detector de arranjo de diodos (DAD) e pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e - 5 µm mantidas a 25°C com fluxo de vazão de 0,6 mL por minuto e tempo de análise de 55 minutos. Os eluentes usados foram: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) (Sigma-Aldrich) e acetonitrila (bomba B) (Sigma-Aldrich) em sistema de eluição por gradiente (101), com intervalo de análise de 230 a 600 nm. O detector DAD foi usado e ajustado para os dados extraídos em 280 nm e 354nm. Os extratos aquosos e etanólicos da polpa e semente de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk foram preparados em concentração de 10 mg/mL (102).

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

A atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico da polpa e semente de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk foi medida por dois métodos: método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity), e método da formação do complexo fosfomolibdênio.

4.5.1 Método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). Uma solução de fluoresceína foi preparada a 10,1 mM em tampão fosfato sob abrigo da luz. A solução de ABAP [(dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metil-propanoamida)] foi preparada a 398 mM. Trolox [(±ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)], um

análogo da vitamina E solúvel em água, foi utilizado como padrão. Uma solução estoque de trolox foi preparada a uma concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato, e a partir desta solução foram preparadas diferentes concentrações (8; 12; 16; 24; 32; 48; 64 e 96 µM) para construção de curva analítica (103). As amostras foram preparadas da mesma maneira que o padrão. Em uma microplaca preta de 96 poços (Perkin Elmer), foram adicionados em cada poço, 20 µL do padrão ou amostra previamente diluídos, que foram misturados a 120 µL da solução de trabalho de fluoresceína e 60 µL da solução de ABAP recém preparada. Foi realizada leitura em leitor de microplaca Elisa (Perkin Elmer Envision Leitor de Microplacas), com monitoramento da fluorescência (excitação 485 nm e emissão 528 nm) por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Para controle do ensaio, foram preparados os brancos da placa (200 µL de tampão fosfato), branco do tampão (20 µL de tampão fosfato, 120 µL de fluoresceína e 60 µL de ABAP) e branco da fluoresceína (200 µL de fluoresceína). O cálculo da perda de fluoresceína ou área sob a curva (ASC) foi realizado por meio da fluorescência relativa do branco e de cada amostra e ponto da curva por meio da fórmula:

$$Fr = \frac{Fn}{F0}$$

Onde:

Fr = fluorescência relativa

Fn = fluorescência no tempo n

F0 = fluorescência no tempo inicial

A partir das frequências obtidas, a área sob a curva (ASC) foi calculada:

$$ASC = 1 + \frac{f1}{f0} + \frac{f2}{f0} + \frac{f3}{f0} \dots \frac{fn}{f0}$$

Foi calculada a ASC de todas as amostras e padrão, em cada concentração, subtraindo-se o valor do branco do valor de cada amostra. A construção da curva analítica de trolox pelo cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína foi realizada de modo que o eixo Y refere-se à ASC e o eixo X à concentração de trolox

na placa. Após regressão linear dos dados, pela equação da reta obtida, para cada amostra foi calculado o equivalente de trolox (ET). Todas as amostras foram testadas em triplicata e o resultado final foi expresso em $\mu\text{M ET/g}$ de extrato, de acordo com a equação (104):

$$\mu\text{M ET} = \frac{[(\text{ASC}_{\text{amostra}} - \text{ASC}_{\text{branco}})]}{(\text{ASC}_{\text{trolox}} - \text{ASC}_{\text{branco}})} \times \text{Fator de diluição}$$

4.5.2 Redução do complexo fosfomolibdênio

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio foi baseada na metodologia proposta por Pietro, Pineda e Aguilar (1999) (105), com algumas modificações.

Neste ensaio, primeiramente foi preparada uma solução reagente contendo: 1) 1,199 g de fosfato de sódio monobásico anidro (0,1 M), pH 6,9; 2) 3,0896 g de molibdato de amônio (0,025 M); e 3) 12,645 mL de ácido sulfúrico (2,4 M), todas diluídas em 100 mL (qsp) de água destilada. Após o preparo de cada solução, para obter a solução reagente, estas soluções foram diluídas nas quantidades de 11,2 mL de fosfato de sódio monobásico anidro, 10 mL de ácido sulfúrico e 6,4 mL de molibdato de amônio, adicionado de água destilada (qsp), considerando o volume final da solução reagente de 40 mL.

Ácido ascórbico foi utilizado como padrão, e uma solução estoque dele foi preparada (1 mg/mL) em etanol. A partir dessa solução, foram obtidas diluições em concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2 mg/mL. Para obtenção da curva de calibração, em microtubo de fundo cônico de 2 mL foram adicionados 0,1 mL das diluições e 1,0 mL da solução reagente, em triplicata. Para o branco do experimento, foi adicionado 1,0 mL da solução reagente, seguido de 0,1 mL de etanol. Os microtubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após esse processo, as amostras foram deixadas arrefecer para que fosse iniciada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 695 nm. A

curva de calibração foi construída utilizando as concentrações versus absorbâncias obtidas, estabelecendo a regressão linear dos dados.

As amostras testes foram preparadas na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada juntamente com 1 mL da solução reagente. O mesmo procedimento descrito na obtenção da curva de calibração de ácido ascórbico foi utilizado nas amostras. Por fim, a determinação quantitativa do índice antioxidante realizou-se através da equivalência da amostra em relação ao padrão, com base no coeficiente de absorção e, aplicados à equação da reta obtida (105). O resultado da atividade antioxidante foi expresso em equivalente de ácido ascórbico (EAA µg/mg).

4.6 CHÁ SOLÚVEL DE *P. RAMIFLORA*

4.6.1 Delineamento experimental

Inicialmente, o desenvolvimento do chá solúvel de *P. ramiflora* se deu através de inúmeras tentativas de formulações do EAPL com base na utilização de diferentes excipientes farmacêuticos (carbonato de cálcio, fosfato tricálcico, goma arábica, maltodextrina, manitol, dextrose anidra, lactose, polissorbato 20 e ácido cítrico) em diferentes concentrações, de forma a adequar as características tecnológicas e organolépticas ideais ao chá. Entretanto, devido à alta higroscopicidade do extrato, o que é comum em extratos oriundos de frutos, o processo de formulação tornou-se inviável para tal funcionalidade (Figura 5).



Figura 5 Testes de formulações do EAP com base na utilização de diferentes excipientes farmacêuticos. (A) EAP, carbonato de cálcio, fosfato tricálcico, goma arábica e maltodextrina; (B) EAP, goma arábica e maltodextrina; (C) EAP, goma arábica, maltodextrina e manitol (D) EAP, manitol e lactose (E) EAP, goma arábica, maltodextrina, manitol, dextrose anidra e lactose

Nesse caso, foi realizada a otimização do processo de secagem do chá por atomização, onde o extrato aquoso líquido da polpa (100 mL) foi utilizado, juntamente com a maltodextrina como excipiente carreador. As condições operacionais utilizadas no teste preliminar foram definidas com base na literatura e apresentadas na Tabela 2, utilizando um delineamento experimental do composto central rotacional (DCCR), com fatorial 2^2 completo. Quatro ensaios principais foram feitos, com três repetições no ponto central (106), totalizando 7 ensaios para determinar a influência das variáveis independentes: temperatura da entrada de ar (100-140°C) e concentração de maltodextrina (15-35%) na variável resposta rendimento (%). Para a validação da resposta ótima foi considerada a função desejabilidade calculada com o auxílio do programa Protimiza Experimental Design.

Tabela 2 - Matriz de planejamento do delineamento experimental do composto central rotacional (DCCR) com fatorial 2^2 e as variáveis operacionais de entrada e seus níveis utilizados para otimização do processo de secagem em spray dryer

VARIÁVEIS INDEPENDENTES		NÍVEL (-)	NÍVEL (0)	NÍVEL (+)
Temperatura de secagem (°C)		100	120	140
Concentração de excipiente (%)		15	25	35

Experimento	Variáveis		
	T°C	C%	TxC
1	-	-	+
2	+	+	+
3	-	+	-
4	+	-	-
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

O processo foi realizado por meio do equipamento Spray Dryer (modelo MSD 1.0 LabMaq) com capacidade de secagem de 1 L.h^{-1} de água, utilizando-se um bico atomizador duplo fluido de 1,2 mm de diâmetro, fluxo de ar de entrada ou vazão da amostra utilizando $0,35 \text{ L.h}^{-1}$, pressão relativa de atomização de 4,5 bar. A temperatura de saída do ar de 87°C . A temperatura do ar de entrada utilizada foi 120°C .

4.6.2 Desenvolvimento e secagem do chá solúvel de *P. ramiflora*

Após serem definidas as condições de secagem, aproximadamente 400 g de polpa liofilizada foram utilizados para a porção experimental (extrato aquoso líquido), que consistiu de aproximadamente 3 L utilizados para secagem do chá. A maltodextrina foi o excipiente escolhido para melhorar o manuseio do produto final, pois protege a adsorção de umidade devido à sua baixa higroscopia e possui alta solubilidade em água.

A maltodextrina foi formulada e adicionada ao chá com porcentagem determinada sobre o teor dos sólidos totais da mistura extrato/água. Após homogeneização, até a completa solubilização, a mistura foi injetada no spray dryer (Figura 6). Os pós obtidos foram acondicionados em recipientes de vidro (evitar o contato com o oxigênio), protegidos com papel alumínio e armazenados em dessecador com sílica gel a temperatura ambiente.



Figura 6 Processo de secagem do chá de *P. ramiflora* por atomização

Além disso, o pó foi pesado para o efeito de rendimento, expresso em porcentagem através da razão entre a quantidade de pó obtida após o processo de secagem e a quantidade total de sólidos presentes no chá da polpa, mais maltodextrina, conforme a equação:

$$\% \text{Rendim.} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

A = quantidade de pó obtido após o processo de secagem (g)

B = quantidade total de sólidos presentes no chá da polpa mais maltodextrina

(g)

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Após separação da casca, polpa e semente, as diferentes partes *in natura* do fruto foram submetidas ao processo de liofilização. O material liofilizado foi caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas, e os resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização físico-química da casca, polpa e semente de *P. ramiflora*

Característica	Casca	Polpa	Semente
Acidez titulável (%)	0,42 ± 0,02	0,53 ± 0,06	0,30 ± 0,03
pH	5,15 ± 0,02	5,90 ± 0,03	6,53 ± 0,03
Sólidos solúveis	1335 ± 1,73	1343 ± 0,28	1335 ± 0
Umidade (%)	6,70 ± 0,30	5,53 ± 0,15	4,80 ± 0,20

Os dados representam a média das triplicatas ± desvio padrão.

Todos os extratos realizados com a casca apresentaram aspecto pegajoso de difícil dispersão, o que inviabilizou a realização dos demais ensaios previstos, sendo assim descartado deste estudo.

O fruto de *P. ramiflora* apresentou acidez total titulável que variou de 0,30 a 0,53%, sendo a polpa a parte que demonstrou teor mais elevado deste parâmetro, explicado pelo sabor exótico (doce com leve acidez), característico deste fruto.

O pH aproximou-se da neutralidade, sendo que a semente possui o valor mais alto (6,53).

De maneira geral, as três partes do fruto apresentaram um moderado teor de sólidos solúveis, uma vez que grande parte dos teores deste parâmetro presentes nas frutas também estão presentes em seus resíduos. Valores expressivos de sólidos solúveis são valorizados para o consumo *in natura* ou também por parte da indústria de alimentos, uma vez que estão intimamente relacionados a um maior rendimento durante o processamento de produtos oriundos das partes do fruto (107).

A parte do fruto que apresentou maior conteúdo de umidade foi a casca, seguido da polpa e da semente (4,80 a 6,70%). Após os frutos passarem pelo processo de liofilização há uma redução significativa no teor de umidade, o que implica na redução da atividade de água e uma conseqüente diminuição da perecibilidade do produto. Como esse processo é realizado a baixa temperatura e ausência do ar atmosférico, ele permite que as propriedades químicas e organolépticas praticamente não se alterem (108).

Os valores de caracterização físico-química encontrados neste trabalho para as partes do fruto de *P. ramiflora* podem ser comparados com valores apresentados em estudos realizados com frutos do Cerrado, entre eles a curriola (9) e mangaba (109).

5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE *P. RAMIFLORA* (MART.) RADLK

Os extratos EAP, EAS, EEP e EES do fruto foram analisados por CLAE-DAD para identificação dos compostos presentes e obtenção dos seus perfis cromatográficos. Os dados foram extraídos em dois comprimentos de onda: 280 nm e 354 nm. Nos perfis cromatográficos de EAP, EAS e EES foi possível observar a presença de picos principais, podendo confirmar a identificação de dois destes picos (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização e quantificação dos extratos de *P. ramiflora* por CLAE-DAD

Amostra	<i>tR</i> (min)	Eluição (nm)	Composto	Concentração (µg/mL)
EAP	5,19	280	ácido gálico	3,07
EES	5,19	280	ácido gálico	3,42
EAS	14,54	280	catequina	8,13

tR: tempo de retenção

No cromatograma do EAP, um pico foi identificado em $tR=5,19$ minutos, o qual apresentou espectro UV com similaridade >99% com o ácido gálico (Sigma-Aldrich) (Figura 7).

De acordo com o perfil cromatográfico do padrão de ácido gálico eluído a 280 nm, foi possível identificar este composto, pertencente à classe dos ácidos fenólicos, no extrato aquoso da polpa eluído nas mesmas condições. A identificação foi confirmada avaliando-se a similaridade entre tempos de retenção e espectros na região do UV da amostra e do padrão (Figura 8). Quanto à análise quantitativa, o conteúdo de ácido gálico encontrado no EAP foi de 3,07 $\mu\text{g/mL}$.

No cromatograma do EES quando eluído em 280 nm, o mesmo pico de ácido gálico (similaridade >99%) aparece em igual tempo de retenção (Figura 9), porém com teor de 3,42 $\mu\text{g/mL}$.

No cromatograma do EAS foi observada a presença de um pico dominante em $tR=14,54$ minutos com eluição em 280 nm (Figura 10) e $tR=14,55$ minutos em 354 nm (Figura 11). O pico eluído em 280 nm apresentou espectro UV com similaridade >99% com o flavonoide catequina (Sigma-Aldrich). Através do perfil cromatográfico da catequina, a identificação deste flavonoide foi confirmada avaliando-se a similaridade entre tempos de retenção e espectros na região do UV da amostra EAS eluída em 280 nm (Figura 12) e do padrão. Quantitativamente, o conteúdo de catequina encontrado no EAS foi de 8,13 $\mu\text{g/mL}$.

Uma série de outros padrões foram eluídos junto das amostras, entre eles: isoquercitrina, miricetina, epicatequina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico, ácido elágico, kaempferol, hesperidina, hiperosídeo, quercetina e rutina.

O perfil cromatográfico de EEP não mostrou similaridade com os padrões identificados (ácido gálico e catequina), porém pela característica do pico principal com eluição em 280 nm e $tR=7,02$ minutos, possivelmente pertence à classe dos ácidos fenólicos (Figura 13).

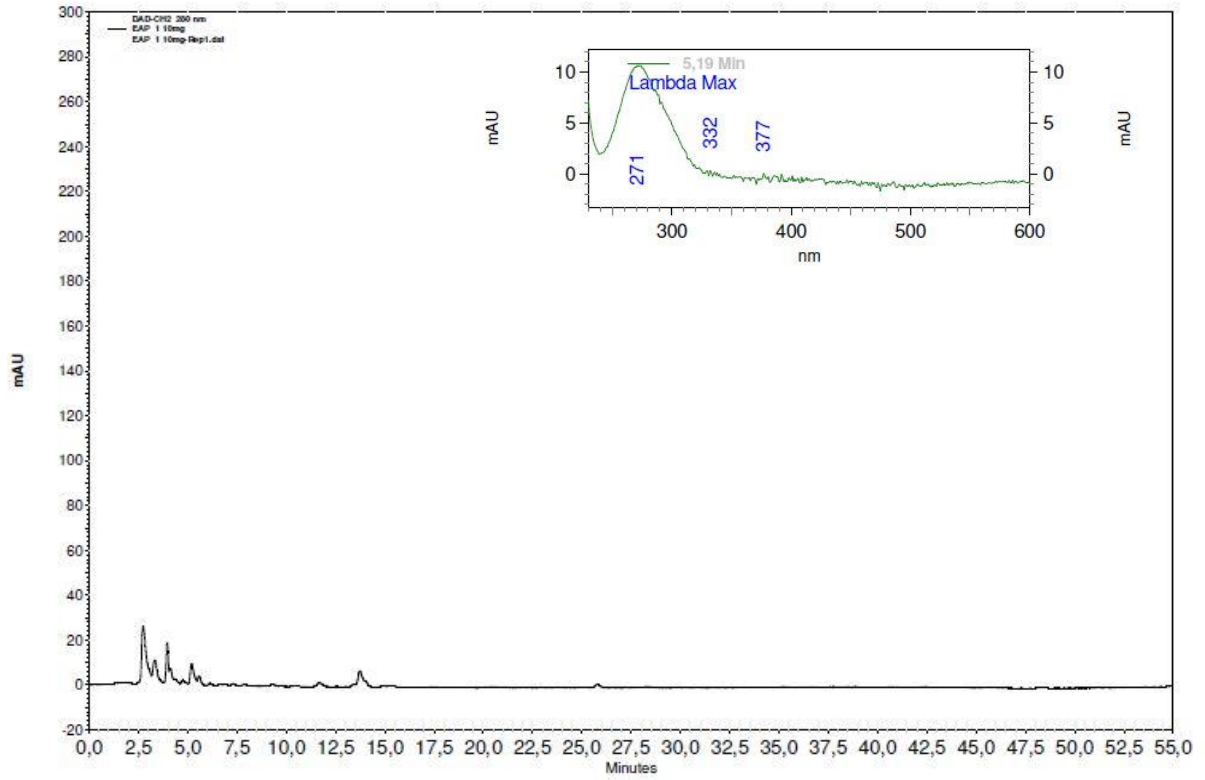


Figura 7 Perfil cromatográfico de EAP em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto ácido gálico referente ao pico $t_R=5,19$ minutos

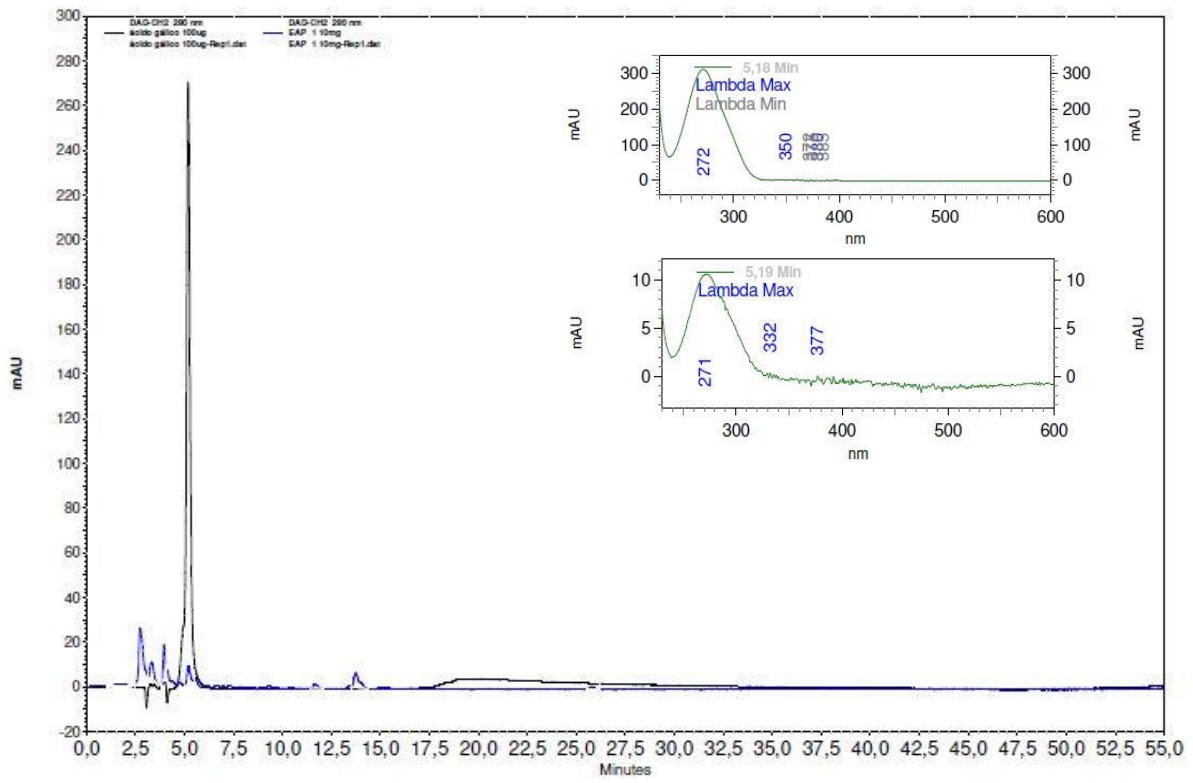


Figura 8 Perfil cromatográfico de EAP em 280 nm e ácido gálico identificado por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção no UV referente aos picos em $tR=5,18$ minutos e $tR=5,19$ minutos da amostra com o padrão analítico

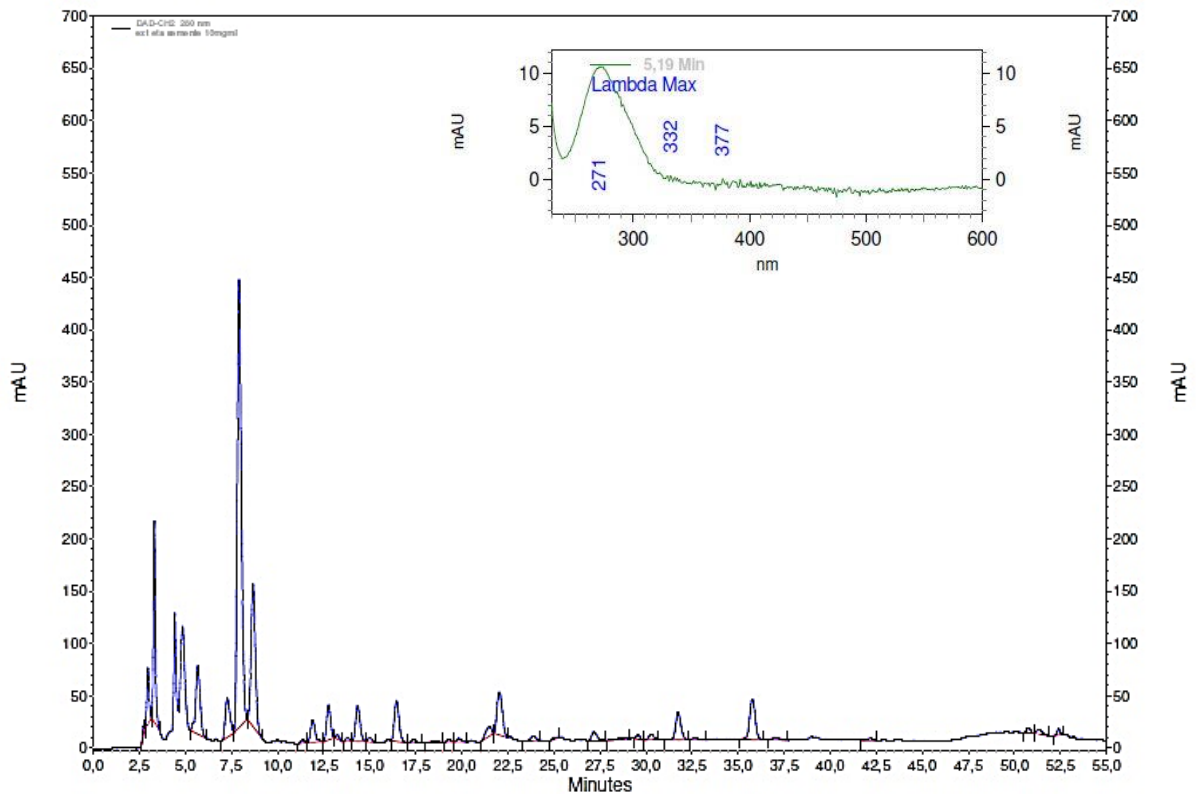


Figura 9 Perfil cromatográfico de EES em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto ácido gálico referente ao pico $tR=5,19$ minutos

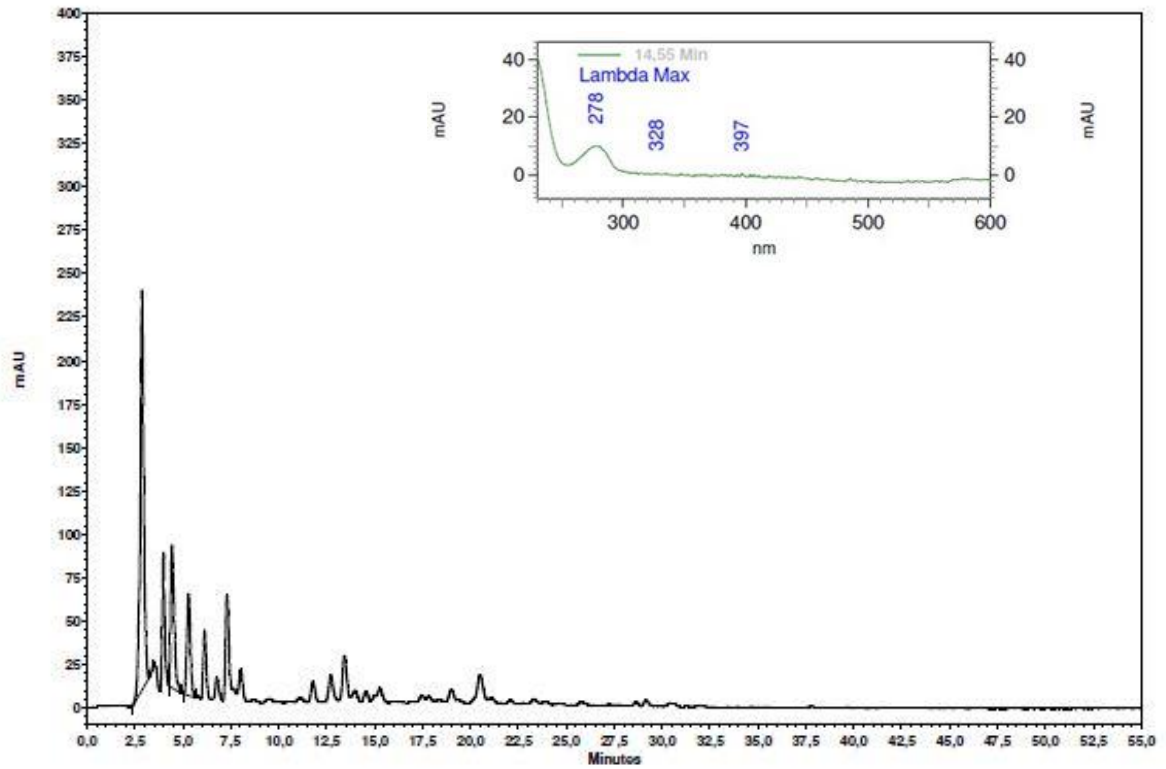


Figura 10 Perfil cromatográfico de EAS em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto catequina referente ao pico $t_R=14,54$ minu

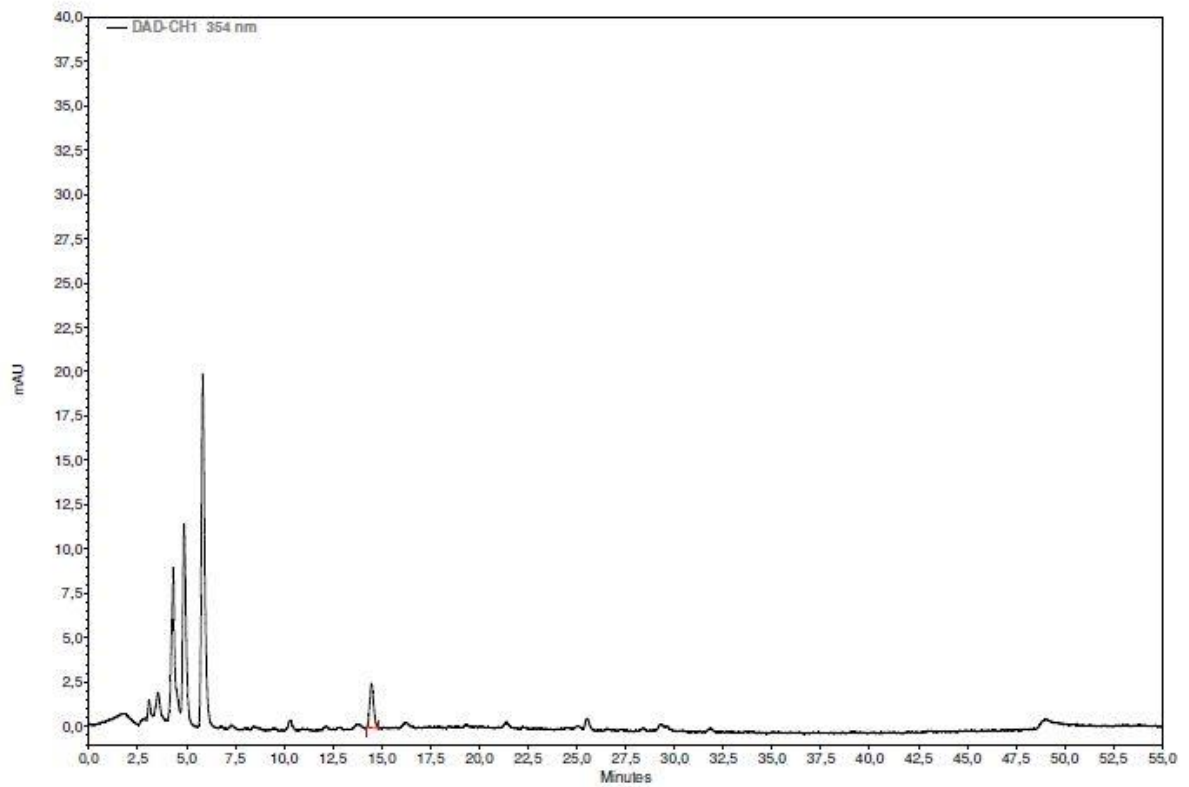


Figura 11 Perfil cromatográfico de EAS em 354 nm

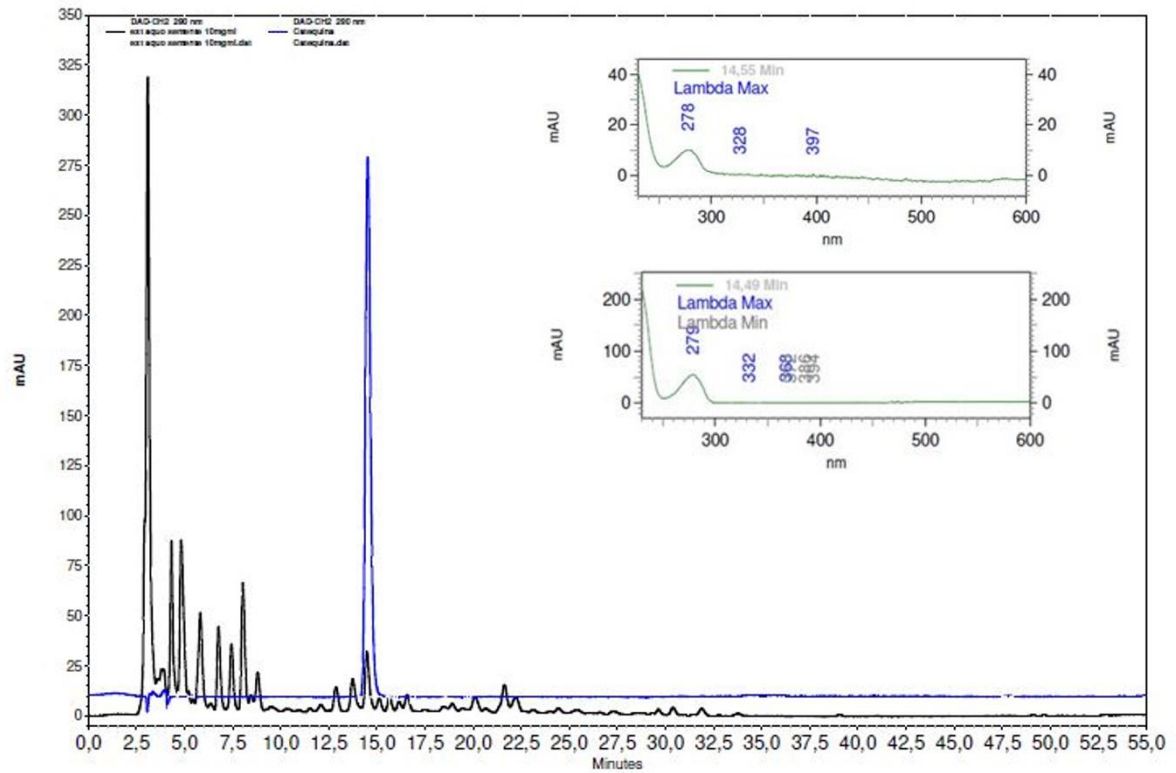


Figura 12 Perfil cromatográfico de EAS em 280 nm e catequina identificada por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção no UV referente aos picos em $t_R=14,55$ minutos e $t_R=14,49$ minutos da amostra com o padrão analítico

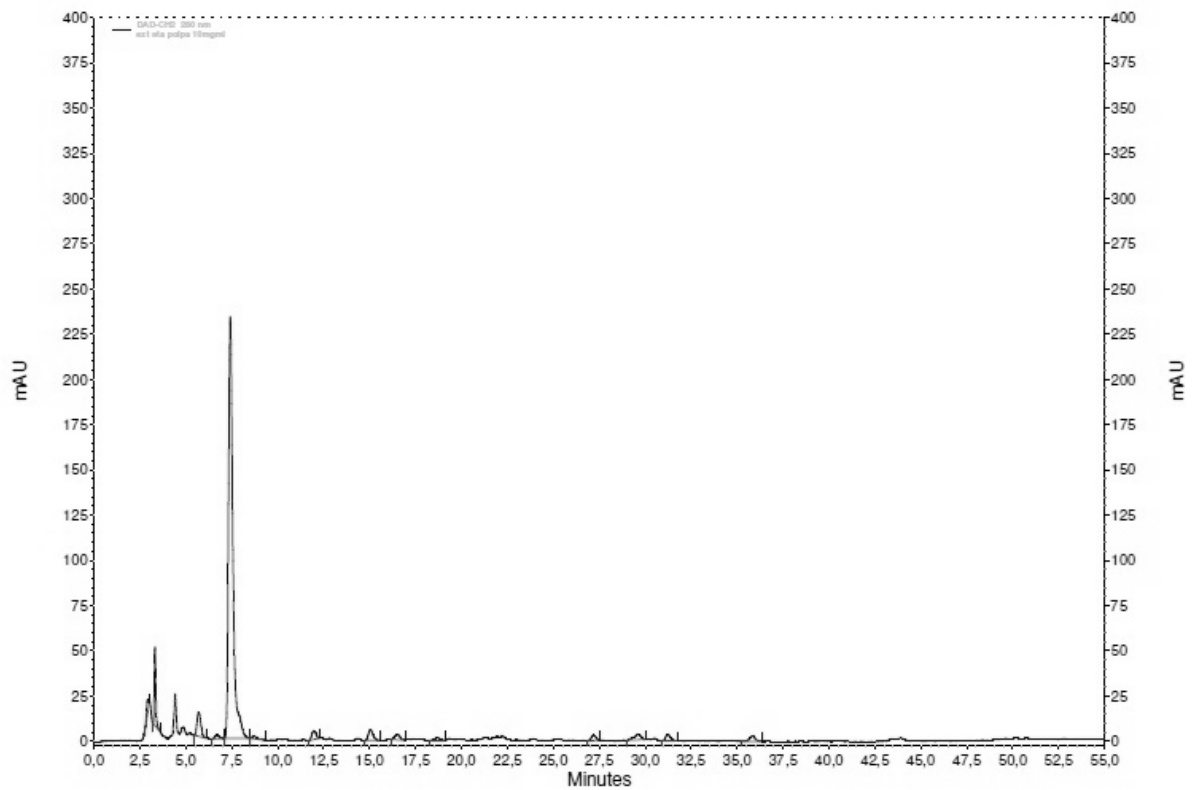


Figura 13 Perfil cromatográfico de EEP em 280 nm

Os perfis cromatográficos dos extratos eluídos foram analisados, nos quais foram detectados dois componentes majoritários em EAP, EES e EAS: ácido gálico nos dois primeiros e catequina no último.

A análise quantitativa dos extratos permitiu concluir que o EAS é o extrato que naturalmente contém o maior valor de componentes bioativos. Nesse sentido, pôde ser observado que a semente de *P. ramiflora*, além de ter grande utilidade para extração de óleo, pode também atuar como uma possível matriz exploratória para desenvolvimento de chá solúvel ou outros produtos, uma vez que apresenta quantidades substanciais de compostos da classe dos ácidos fenólicos, assim como descrito com a polpa do fruto neste trabalho.

Dos perfis cromatográficos de *P. ramiflora* obtidos em estudos anteriores, a maioria diz respeito às suas folhas. Nas folhas, o composto miricitrina foi isolado e definido como marcador químico da planta segundo estudos realizados em 2014 e 2016 (55, 110).

Apenas um estudo, realizado recentemente (111) elucidou os compostos fenólicos na polpa, onde o teor de ácido gálico foi o maior ($5,659 \pm 0,881 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$) entre os compostos identificados. Isso confirma a evidencialidade da presença deste composto, demonstrada neste estudo através da análise qualitativa de identificação por CLAE-DAD.

Há ausência na literatura sobre os metabólitos secundários presentes na semente desta planta.

Através da identificação destes compostos presentes no extrato da polpa, é esperado que eles se mantenham quando submetidos ao processo de desenvolvimento do chá solúvel bem como durante o armazenamento do produto final, já que os resultados obtidos neste estudo corroboram com os trabalhos citados acima.

Dentre os estudos existentes na literatura, Kongpichitchoke et al. (2016) (112) detectaram ácido gálico em chá preto ($0,14 \text{ mg}/\text{g DW}$) e chá verde ($2,79 \text{ mg}/\text{g DW}$) (folhas de *Camellia Sinensis*) com base na absorvância a 280 nm. A presença de ácido gálico também foi confirmada em outros chás de ervas como *Cistus incanus*, em que sua concentração variou de 253,8 a 1079,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ (113).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *P. RAMIFLORA* (MART.) RADLK

Uma série de metodologias diferentes já foram descritas com o objetivo de avaliar e mensurar a atividade antioxidante de substâncias em plantas, e todas elas possuem em comum a presença de um agente oxidante, sendo este um substrato adequado e uma estratégia de medida da reação (114). Essas metodologias baseiam-se em diversos fundamentos teóricos e podem estar sujeitas a possíveis interferências. Sendo assim, uma vez que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente na capacidade antioxidante total de uma amostra (115), neste estudo, optou-se por avaliar essa atividade pelos diferentes métodos já citados na metodologia.

5.3.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O ensaio pela capacidade de absorção do radical oxigênio, ou ORAC tem por finalidade verificar a capacidade sequestradora de uma molécula antioxidante frente à formação de um radical peroxila, induzido pelo dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamida) (ABAP) a uma temperatura de 37°C (103). Durante este experimento, o radical peroxila reage com um composto fluorescente (fluoresceína), utilizado como indicador, formando um produto não fluorescente. Os radicais peroxila formados degradam a estrutura química da fluoresceína, levando à perda da conformação inicial, com conseqüente decréscimo da emissão de fluorescência (103). O efeito protetor de uma molécula antioxidante é verificado, justamente por impedir esse decréscimo. Então, quanto maior a fluorescência medida no aparelho, maior é o poder antioxidante da amostra.

Neste estudo, foram investigadas as atividades antioxidantes dos extratos da polpa e semente de *P. ramiflora*. A atividade foi expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{M ET/g}$ de amostra), sendo os valores obtidos pela equação da reta obtida com o padrão ($y = 0,6333x + 1,9567$, $R^2=0,9968$) (Figura 14).

As curvas das amostras testes foram construídas por cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área sob a curva, descontando o branco (ASC-BR), versus a concentração. A partir da regressão linear foram obtidas as curvas de EAS $r = 0,9935$, EES $r = 0,9961$ e EEP $r = 0,993$ (Figura 15).

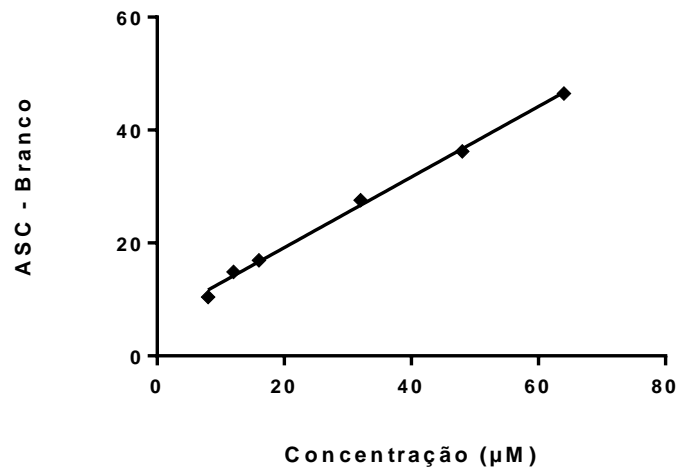


Figura 14 Curva padrão da atividade antioxidante de Trolox pelo método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) nas concentrações de 8 a 64 µM. $y=0,6333x + 1,9567$ $R^2=0,9937$

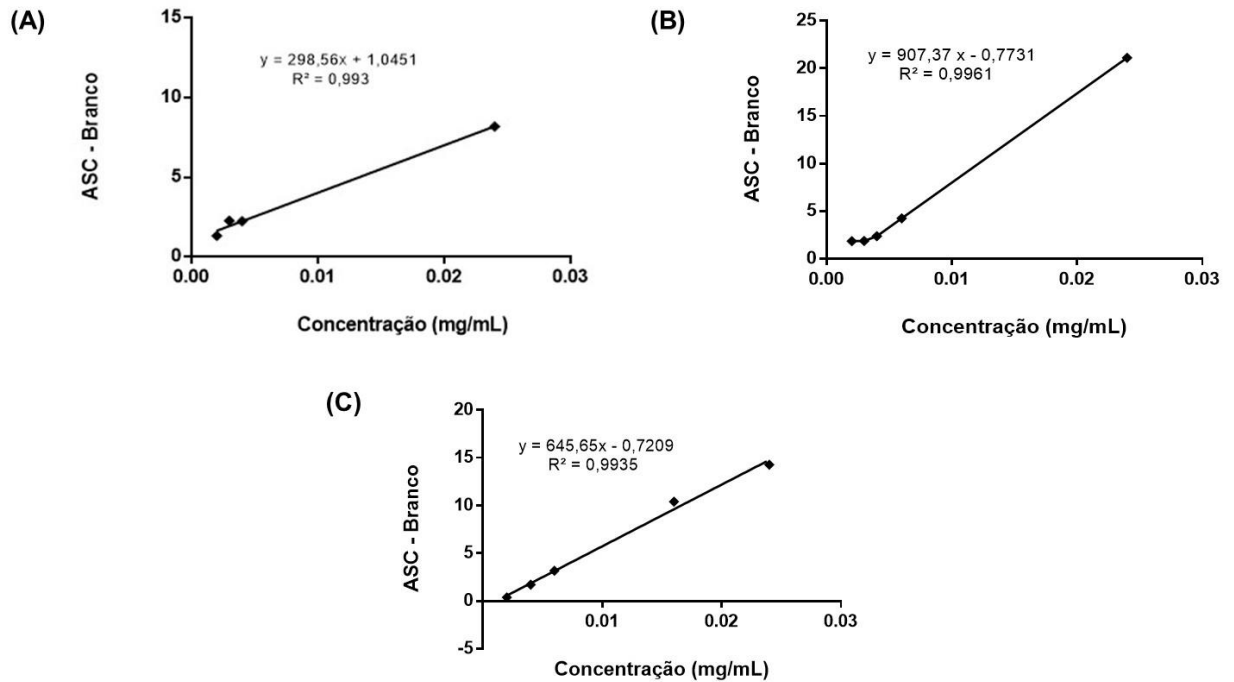


Figura 15 Atividade antioxidante demonstrada pelas leituras das fluorescências de (A) EAS, (B) EEP e (C) EES, respectivamente, nas concentrações de 0,002 a 0,024 mg/mL obtidas por método ORAC

A Tabela 5 mostra os valores de equivalente Trolox encontrados para as diferentes amostras. Foi possível observar que os extratos apresentaram boa capacidade de sequestro dos radicais livres, sendo capazes de proteger a molécula fluorescente. O EEP (429,40 $\mu\text{mol ET/g}$ de amostra) foi o que apresentou maior capacidade antioxidante, seguido do EES (384,12 ET/g) e EAS (95,38 ET/g). A partir do teste de comparação de Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Dunn's, foi observado que os extratos não mostraram diferenças significativas entre as amostras (Figura 16).

Embora perceba-se que existe uma diferença entre os valores, há uma limitação matemática onde o conjunto de dados ou número amostral muito pequeno ($n=3$) não permite mostrar esta diferença pelo método estatístico escolhido. Mesmo não sendo diferentes significativamente, o EEP foi 1,18 vezes mais ativo que EES e 4,5 vezes mais ativo que EAS. Ao mesmo tempo, EES foi 4 vezes mais ativo que EAS.

Tabela 5 - Atividade antioxidante demonstrada através dos valores totais de ORAC dos extratos de *P. ramiflora*

Amostra	Atividade (ET/g)
EAS	95,38 ± 16,83
EEP	429,40 ± 96,05
EES	384,12 ± 60,16
EAP	não ativo

Os valores são expressos em equivalência de μmol Trolox por g de extrato. Os dados representam a médias das triplicatas \pm desvio padrão

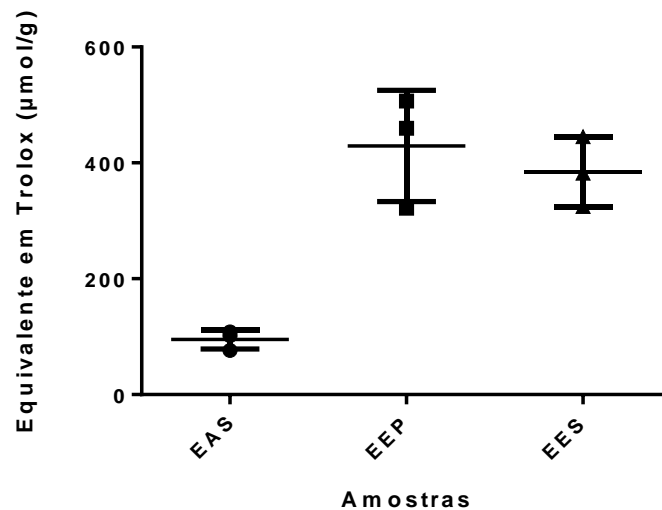


Figura 16 Atividade antioxidante demonstrada pelo método ORAC dos extratos de *P. ramiflora*. O teste estatístico aplicado foi Kruskal-Wallis-Dunn's. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$)

Os valores totais de ORAC foram analisados também seguindo distribuição t através do teste de t-Student, no qual é indicado para amostras pequenas e independentes. Nesse caso, foi observado que os extratos mostraram diferenças significativas entre as amostras EEP e EAS ($p=0,0237$) e EES e EAS ($p=0,0098$).

Os resultados dos diferentes ensaios utilizados nesse estudo para determinar o quão ativo foram os extratos de *P. ramiflora*, podem ser comparados com estudos semelhantes realizados ao longo dos últimos anos, de suma importância para a comunidade científica. Valores de atividade antioxidante obtidos pelo ensaio ORAC neste estudo foram representados por equivalência de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET/g}$) e variaram de 95,38 a 429,40 $\mu\text{mol ET/g}$ amostra, sendo que o EAP não apresentou atividade antioxidante frente a este método.

Um estudo foi realizado com extratos de frutos como graviola, abiu e polpas de cagaita e cambuci, onde as atividades antioxidantes desses extratos foram de 156 $\mu\text{mol ET/g}$, 136 $\mu\text{mol ET/g}$, 455 $\mu\text{mol ET/g}$, 182 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente (116). Paralelamente, Hogan et al., 2010 encontraram atividade antioxidante para uva vermelha no valor de 245,3 $\mu\text{mol/g}$, uva branca 197,7 $\mu\text{mol/g}$ e maçã vermelha 168,8 $\mu\text{mol/g}$ expressos também em $\mu\text{mol ET/g}$ (117). Frutos como mirtilo, cramberry e morango corresponderam a 9621 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$, 8394 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ e 8348 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (118). Além dos frutos citados, Hogan e colaboradores, em 2010 analisaram extrato de açaí rico em antocianina e encontraram atividade antioxidante no valor de 2589 $\mu\text{mol/g}$ (119).

Foi observado que os valores encontrados em nosso estudo foram semelhantes aos descritos na literatura, conforme citados acima, utilizando o mesmo método.

5.3.2 Redução do complexo de fosfomolibdênio

Esse ensaio é realizado por método espectrofotométrico para determinar a capacidade antioxidante total, no qual baseia-se na redução de molibdênio VI (Mo^{6+}) em molibdênio V (Mo^{5+}) pela amostra e a formação de complexo de cor verde-azulado fosfato/molibdênio em pH ácido (105).

Ácido ascórbico foi o padrão utilizado como referência para determinar de modo quantitativo a atividade das amostras, a qual foi expressa em equivalente ácido ascórbico. A equação da reta ($y=4,3057x - 0,0221$, $R^2=0,9984$) obtida após regressão linear dos dados resultantes das absorbâncias foi utilizada para determinação da atividade das amostras (Figura 17).

As amostras de *P. ramiflora* demonstraram boa capacidade de inibir a formação do complexo de fosfomolibdênio, sendo que o EAS mostrou a maior atividade (126,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra), seguido do EAP (116,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$), EEP (82,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$) e EES (67,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto a atividade antioxidante dos diferentes extratos frente ao teste de Kruskal Wallis-Dunn's (Figura 18).

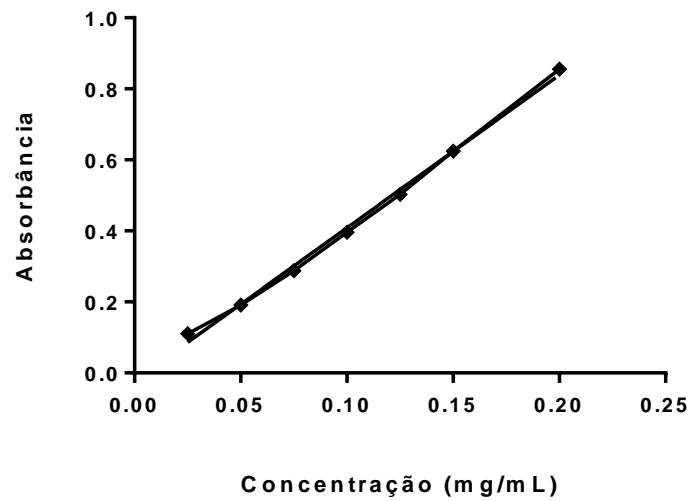


Figura 17 Curva padrão da atividade antioxidante de ácido ascórbico pelo método de inibição do complexo fosfomolibdênio nas concentrações de 0,025 a 0,2 mg/mL

Tabela 6 - Atividade antioxidante avaliada por inibição do complexo fosfomolibdênio dos extratos de *P. ramiflora*

Amostra	Atividade (EAA $\mu\text{g}/\text{mg}$)
EAP	116,35 \pm 54,08
EAS	126,35 \pm 15,06
EEP	82,35 \pm 26,18
EES	67,85 \pm 27,47

Os valores são expressos em equivalência de μg ácido ascórbico por mg de extrato. Os dados representam as médias das quadruplicatas \pm desvio padrão.

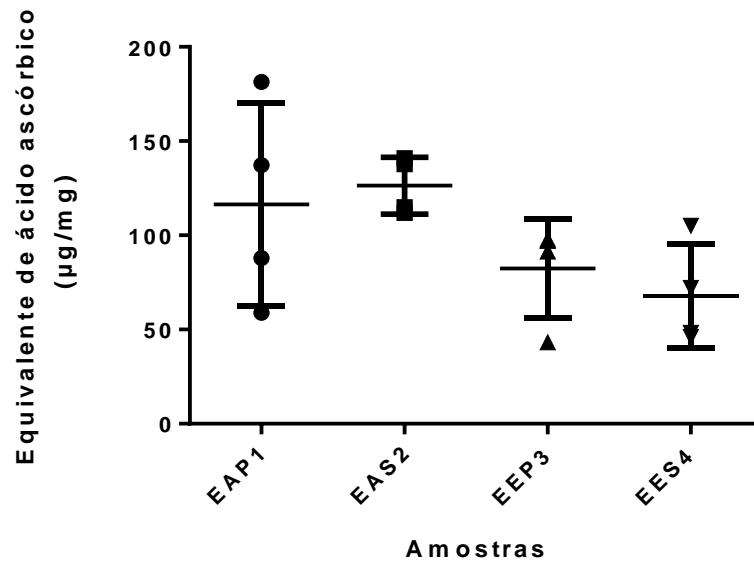


Figura 18 Atividade antioxidante demonstrada pelo método de inibição do complexo fosfomolibdênio dos extratos de *P. ramiflora*. O teste estatístico aplicado foi Kruskal-Wallis-Dunn's. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas

Os resultados encontrados neste ensaio encontraram-se dentro de uma faixa de 67,8 a 126,3 EAA $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra (Tabela 6). Estudos da literatura com matrizes semelhantes aos extratos das partes de *P. ramiflora* e valores expressos em equivalência de ácido ascórbico foram comparados. Os resultados para extratos aquosos e etanólicos de frutos como ameixa seca, damasco, uva passa e figo foram de 5,4 e 22 g EAA/100g; 5,9 e 17,2 g EAA/100g respectivamente (120).

Paralelamente, em 2018 foi realizado um estudo com extratos aquosos e etanólicos da planta medicinal *Lophira procera* A. Chev. (Ochnaceae) que apresentou valores de atividade antioxidante entre 50,26 e 85,67 VitCE mg/g. Além disso, Mladenović e colaboradores, estudaram uma série de 15 derivados sintetizados de 4-hidroxycumarina e os valores da capacidade antioxidante total encontrados foram expressos como μg de capacidade antioxidante total por mL (TAC = 26,76 - 742,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (121).

Em 2020, Cunha e colaboradores (111) realizaram a primeira investigação acerca da capacidade antioxidante da polpa de *P. ramiflora*, assim como de uma geléia produzida através dela. As condições metodológicas de preparo do extrato diferiram das demais preparações realizadas em outros e neste estudo. O resultado

encontrado para esta atividade foi de 419,92 mg (polpa) e 559,51 mg de ácido ascórbico/100 g⁻¹ (geléia).

Embora a metodologia utilizada na bibliografia supracitada esteja em consonância com a prática estabelecida no presente estudo, diante dos inúmeros fatores que influenciam diretamente na determinação da atividade antioxidante de frutos, como a época de colheita, o processamento e armazenamento das amostras, a preparação dos extratos, dentre outros, não é possível estabelecer uma comparação direta entre os resultados apresentados na citada produção acadêmica com os valores aferidos neste estudo.

5.3.3 Relação entre a composição fitoquímica e atividade antioxidante dos extratos de *P. ramiflora*

A divergência entre os valores de capacidade antioxidante dos extratos pode ser atribuída a diferenças na composição química dos mesmos, que neste caso, é rica em componentes da classe dos ácidos fenólicos, conforme identificados por cromatografia líquida de alta eficiência no item 5.2. Outro fator relevante é a diferença de polaridade destes compostos, uma vez que o solvente de extração afeta significativamente o teor da atividade antioxidante medida (122). Esta afirmação é consistente com o fato de que compostos não fenólicos modificam a capacidade antioxidante geral de um extrato (123, 124), como é o caso da fração hexânica de um extrato, por exemplo, notavelmente enriquecida com triterpenos bioativos.

Uma vez que as polaridades dos componentes antioxidantes presentes em cada extrato são diferentes, o tipo de solvente e a polaridade destes podem afetar a transferência de um único elétron e a transferência do átomo de hidrogênio, que são aspectos fundamentais nas medições da capacidade antioxidante (125). Nesse caso, todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante são fortemente afetados pela extração com solvente (126).

Ensaio baseado na transferência de átomos de hidrogênio, como é o caso do ORAC, possui uma correlação baixa em relação aos ensaios que utilizam outros

mecanismos de reação. Ao contrário dos outros, o ensaio ORAC leva em consideração a cinética de ação dos antioxidantes e o tempo de indução depende do extrato utilizado, o que pode explicar a discrepância entre os resultados obtidos entre este e outros ensaios (127).

As interações entre os antioxidantes também se refletem no valor do ensaio. No estudo realizado por Číž e colaboradores em 2010, foi mostrado que os valores de ORAC são estritamente dependentes do conteúdo de polifenol, existindo uma correlação linear entre o teor de polifenóis e a função antioxidante (122).

Os resultados dos ensaios apresentados neste estudo quando avaliados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio foram consistentes entre si, com indicativo de grande poder redutor no caso das amostras EAS e EAP. Paralelamente, é plausível que os maiores valores de atividade antioxidante dos extratos avaliados pelo método de ORAC (EEP e EES) possam estar relacionadas à facilidade com que os compostos fenólicos neles contidos conseguem liberar átomos de hidrogênio (128).

Por esta razão, recomenda-se o uso de diferentes solventes de extração para melhor avaliar a atividade antioxidante dos produtos naturais, além da utilização de duas ou mais metodologias diferentes, com mecanismos de ação distintos para a confirmação e exploração dos resultados.

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que ambos os solventes utilizados para obtenção dos extratos produzem uma composição polifenólica e valores antioxidantes interessantes. Além disso, a quantidade de polifenóis não representa o potencial sinergismo ou antagonismo entre os compostos individuais nas amostras, o que depende de sua estrutura e interações mútuas (129).

5.4 CHÁ SOLÚVEL DA POLPA DE *P. RAMIFLORA* (MART.) RADLK

5.4.1 Desenvolvimento e obtenção do chá solúvel

Na necessidade cada vez maior de garantir elementos essenciais suficientes, muitas vezes ausentes em nossas dietas, que têm efeitos adversos em nossa saúde e produtividade, esse tópico está ganhando reconhecimento (130, 131). Neste trabalho, estudamos a melhor forma de obter chá solúvel da polpa de *P. ramiflora* e otimizar esse processo, de forma a preservar seus constituintes fitoquímicos e manter bom rendimento e aceitabilidade do produto final.

A secagem das plantas medicinais minimiza a perda de seus princípios ativos, mantendo seus componentes estáveis e retardando sua deterioração. Esse processo permite a conservação de plantas por um período mais longo para posterior comercialização e uso (132), bem como o desenvolvimento de um produto biotecnológico com características desejáveis.

A grande maioria das polpas de frutas possui grande quantidade de açúcar em sua composição, o que pode aumentar ainda mais essa quantidade quando as polpas são submetidas ao processo de desidratação. Esse fato pode levar à obtenção de produtos com alta higroscopicidade e diminuição do rendimento do processo, e neste caso, agentes secantes misturados aos extratos, ajudam a reduzir a higroscopia e melhorar as características finais dos pós obtidos (133).

A semente do fruto, embora tenha apresentado excelentes características fitoquímicas, é considerada um subproduto e não comestível. Além disso, para que ela possa ser utilizada como matriz exploratória para desenvolvimento do chá, testes de toxicidade devem ser realizados antes de ser submetida ao consumo humano.

Em virtude da natureza fenólica e capacidade antioxidante do EAS de *P. ramiflora*, foi realizado um teste com este extrato como uma fortificação ou suplementação ao chá da polpa com o intuito de reforçar a bioatividade do produto, que apresentou boas características físicas em relação à cor, aroma e solubilidade. Porém em relação às propriedades organolépticas, a semente foi insuficiente, uma vez que resultou em um leve amargor no sabor final do chá, mesmo em quantidades mínimas testadas.

No sentido de aproveitar os benefícios evidenciados pela semente neste trabalho, como alternativa, ela pode ser usada para o desenvolvimento de outros produtos como farinha, cereais, ração animal, entre outros.

A caracterização química e nutricional dos frutos de *P. ramiflora* (9) demonstrou um alto conteúdo de fibras, quantidades significativas de pectina, com

aroma intenso e sabor doce. O extrato aquoso da polpa, neste trabalho, evidenciou a presença de ácido gálico e apresentou boa atividade antioxidante.

O EAP, em tese, não foi o extrato que apresentou maior conteúdo fenólico e embora não tenha apresentado o melhor desempenho quanto à capacidade antioxidante, estes foram considerados satisfatórios. Em contrapartida, a escolha da polpa para o desenvolvimento do chá se deu principalmente por ser a parte comestível do fruto, por não apresentar toxicidade bem como devido às suas propriedades nutricionais e organolépticas já relatadas neste trabalho e possível potencial terapêutico.

Tratando-se de um fruto com teor de açúcar considerável, para a fase de preparo do chá foi imprescindível a adição de um excipiente com função de agente transportador, adicionado ao extrato antes da secagem por atomização, evitando diminuir o desempenho desse processo. A maltodextrina foi o excipiente escolhido para melhorar o manuseio do produto final, uma vez que possui excelente fluidez, alta solubilidade em água, protege a adsorção de umidade devido a sua baixa higroscopia e possui baixo custo (134).

5.4.2 Otimização e rendimento do chá solúvel

O processo de formulação do EAPL (extrato aquoso da polpa liofilizado) tornou-se inviável para desenvolvimento do chá devido a formação de pequenos cristais de difícil pulverização, mesmo com intensa maceração do extrato. Essa característica apresentada possivelmente se deu devido aos açúcares presentes na polpa serem responsáveis por fortes interações com a molécula de água em razão dos terminais polares presentes nelas (135), o que pode acarretar na obtenção de um produto final com alta pegajosidade, e assim diminuir o rendimento do processo.

Nesse sentido, a escolha pelo método de atomização para obtenção do chá bem como a utilização do agente carreador adequado, possibilitou um melhor aproveitamento do extrato e melhor rendimento do produto final.

A temperatura de secagem e a concentração de maltodextrina nos níveis utilizados indicaram que o modelo é compatível para predizer o efeito das variáveis.

Os modelos de predição das respostas do processo de produção foram gerados por análise de variância (ANOVA), conforme ajustados, mostraram significância ($p \leq 0,05$), com valor de p (0,0287) e R^2 (0,95).

O delineamento composto central rotacional utilizou como variáveis independentes temperatura de secagem ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de maltodextrina (%). A variação da concentração de maltodextrina, assim como a temperatura de secagem afetaram o rendimento do processo, gerando valores que variaram de 4,2 a 30,8%. Os resultados observados para a variável rendimento podem ser encontrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Planejamento do delineamento do composto central rotacional (DCCR) usado na otimização do processo de secagem do chá solúvel de *P. ramiflora* por spray dryer

Ensaio	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Maltodextrina (% m/m)	Rendimento (% m/m)
1	100	15	4,27
2	140	35	15,38
3	100	35	30,83
4	140	15	5,70
5	120	25	21,60
6	120	25	16,80
7	120	25	21,83

Foi gerada uma equação matemática e superfície de resposta, as quais forneceram uma aproximação ao verdadeiro sistema, observando uma forte correlação. A superfície de resposta gerada pelo modelo de regressão proposto indicou condições ótimas para o seguinte processo de secagem: temperatura de entrada do ar de secagem de 100°C e 35% de maltodextrina para obtenção do chá solúvel de *P. ramiflora*. A interpretação desses resultados pode ser esclarecida com o auxílio da Figura 19, na qual é representada graficamente de acordo com as variáveis estudadas.

Design-Expert® Software

R1
 24.42
 3.84
 X1 = A: A
 X2 = B: B

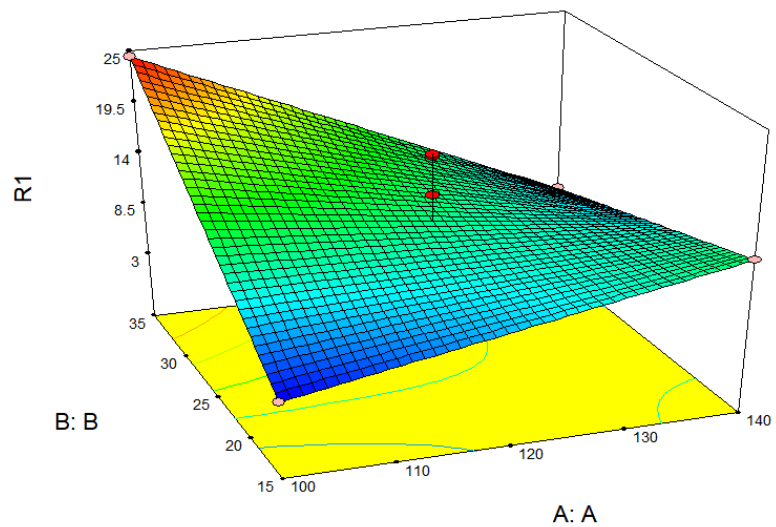


Figura 19 Gráfico de superfície de resposta para o rendimento da variável dependente, em função das variáveis independentes: temperatura versus concentração de maltodextrina

O diagrama de Pareto (Figura 20) mostra que apenas uma condição (temperatura de secagem ou concentração de maltodextrina) testada não foi significativa para definir a condição de secagem ideal para o chá solúvel. Para condições ideais de secagem, é necessária a combinação das duas condições.

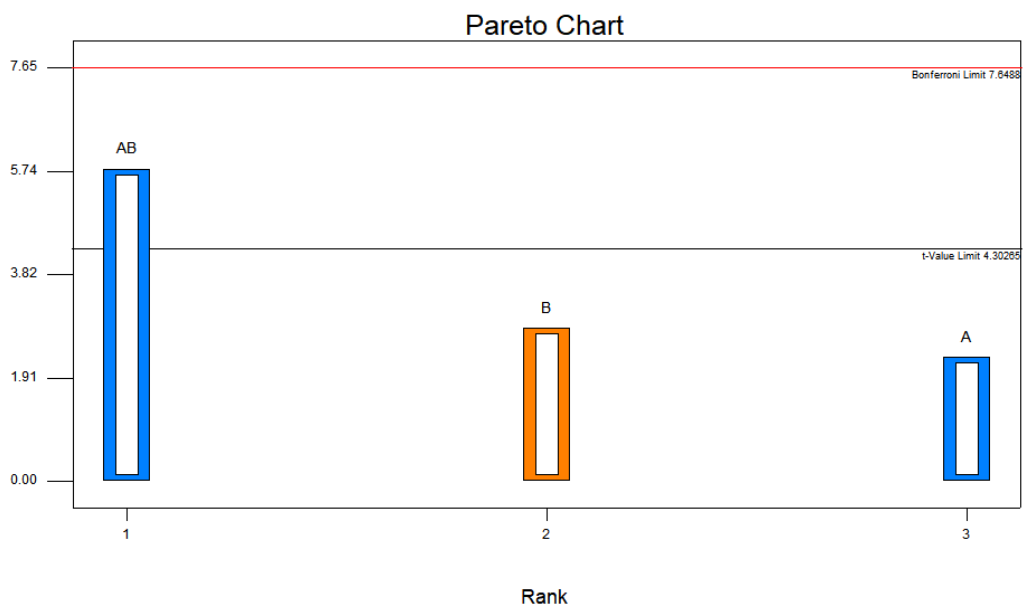


Figura 20 O gráfico de Pareto indica o efeito da temperatura do ar de entrada e da concentração de maltodextrina no rendimento final do pó do chá solúvel

Sabe-se que a instabilidade dos compostos fenólicos está associada as condições de processamento e armazenamento dos produtos, sendo a elevação da temperatura um dos fatores que mais atuam para a sua degradação (136). O aumento da temperatura durante o processo de secagem de frutos, e os possíveis efeitos da utilização do calor no processo, influenciam diretamente na capacidade antioxidante das plantas (137-139).

Quek et al. (2007) (140) verificaram uma redução do conteúdo de licopeno e beta-caroteno no processo de atomização do suco de melancia com o aumento da temperatura do ar de secagem. Ao analisar a retenção de betacianinas extraídas de amaranto, Cai e Corke (2000) (141) reportaram que temperaturas altas proporcionam uma maior perda dos pigmentos com o aumento da temperatura, e verificaram que as amostras produzidas em temperaturas menores apresentaram maior estabilidade ao armazenamento.

Temperaturas de secagem mais altas resultam em pós com umidades mais baixas e maior facilidade em adsorver água, ou seja, mais higroscópicos, o que está relacionado ao maior gradiente de concentração de água existente entre o produto e o ambiente (142).

Em contrapartida, os pós produzidos a temperaturas mais baixas apresentam uma tendência à aglomeração, devido à sua umidade mais alta, especialmente em amostras com elevado teor de açúcar. Esta aglomeração faz com que as partículas apresentem menor superfície exposta, diminuindo a exposição dos pós ao oxigênio, protegendo os compostos contra a degradação (140).

Em relação aos coadjuvantes de secagem no processo de atomização de frutos, no trabalho de Oliveira (2008) (143) avaliou-se a influência da secagem com maltodextrina e goma de cajueiro nas propriedades físico-químicas e bioativa do suco de caju. Observou que quanto maior o teor de adjuvantes, maior a retenção de ácido ascórbico, além de favorecer melhor fluidez, higroscopicidade e solubilidade.

No presente estudo, atingiu-se uma temperatura consideravelmente reduzida no processo de obtenção do chá, tendo o objetivo alcançado aos 100°C, o que, entende-se, pode ser caracterizado como um importante benefício para a manutenção da estabilidade da amostra. A utilização de temperaturas mais baixas no processo, em face da redução dos efeitos que contribuem para a degradação do pó, revela assim, a possibilidade de se obter uma elevação da qualidade do produto.

Essa condição, agregada à quantidade suficiente de maltodextrina adicionada, indica que o rendimento final foi considerado satisfatório, uma vez que o chá apresentou um pó fino e uniforme, com baixa aderência às paredes da câmara do atomizador e facilidade em ser removido do recipiente coletor. Esse fato tornou positiva a escolha da maltodextrina como excipiente para diminuir a higroscopia do extrato e melhorar as características do produto final.

Em qualquer processo de secagem, espera-se obter o máximo rendimento do produto final. Um extrato de produto natural é uma fonte rica em compostos bioativos, porém é um desafio para o desenvolvimento de produtos com bioatividade identificar que esses compostos apresentem o efeito biológico desejado (144) e, simultaneamente, obtenham um alto desempenho no rendimento final deste produto.

Alguns estudos que evidenciaram a secagem da polpa de frutas relataram dificuldade no processo devido ao alto caráter higroscópico desses produtos, como no trabalho realizado por De A Silva et al. (2014) (145), ao avaliar o efeito de alguns parâmetros de secagem sobre o rendimento da polpa de umbu submetida ao processo de atomização.

No estudo de Miravet et al. (2016) (146), que utilizou frutooligossacarídeos comerciais como agente carreador para a secagem por spray dryer de suco concentrado de romã, o rendimento de secagem foi considerado zero. Somente quando uma proporção maior foi usada, produziu-se um pó não pegajoso, mas com baixo rendimento.

Segundo Goula e Adamopoulos (2005; 2006) (147), os baixos rendimentos neste tipo de processo podem ser explicados pela natureza termoplástica do açúcar e das moléculas de ácido orgânico de baixo peso molecular, causando adesão de partículas na parede da câmara de secagem e a formação de indesejáveis *clusters* nos sistemas de transmissão.

Vale ressaltar que a atomização de produtos com alta higroscopicidade e que minimizam o rendimento do processo bem como o escoamento e a reconstituição desses alimentos em pó, embora seja de difícil utilização, é fundamental que haja a tentativa de utilização de temperaturas mais baixas. Além disso, é imprescindível a seleção correta de adjuvantes para garantir a estabilidade e a qualidade do produto final, tendo em vista que podem afetar fortemente a biodisponibilidade do produto (148).

Paralelamente, devido à elevada higroscopicidade, esse tipo de produto deve ser armazenado adequadamente em embalagens com barreira a troca de gases e umidade, bem como mantido em ambiente fresco e seco (149).

6 CONCLUSÃO

Este estudo possibilitou a obtenção de extratos aquoso e etanólico a partir da polpa e semente dos frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. O perfil fitoquímico das partes da planta foi obtido por CLAE-DAD, onde os compostos presentes nos extratos foram identificados como sendo ácido gálico e catequina, e definidos como os marcadores químicos da planta.

A capacidade antioxidante total foi determinada pelos métodos ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) e redução da formação do complexo fosfomolibdênio. O EEP (429,40 ET/g) apresentou maior atividade para ORAC e EAS (0,126 µg/mL) apresentou maior atividade antioxidante frente ao método do complexo de fosfomolibdênio.

Devido às características químicas e excelentes propriedades organolépticas da polpa de *P. ramiflora*, esta foi escolhida para o desenvolvimento do chá solúvel. O processo de otimização para obtenção do chá definiu as condições de secagem, onde o EAP, juntamente com a maltodextrina foram submetidos ao processo de atomização, que garantiu características favoráveis e boa aceitabilidade do produto final.

A crescente tendência no mercado de chás de plantas medicinais, cria oportunidade de traçar novas estratégias para o desenvolvimento de chás ricos em interesse comercial e utilização em nutrição e saúde humana. Além disso, possibilita a exploração da flora nativa e conservar a biodiversidade do bioma Cerrado.

Os resultados deste trabalho destacaram o desenvolvimento e futuro potencial de um chá promissor da polpa de *P. ramiflora*, podendo ser uma fonte econômica de antioxidantes naturais.

7 PERSPECTIVAS

Com o intuito de dar continuidade a este estudo, como próximos passos pretende-se:

- Determinar os parâmetros de qualidade do chá solúvel: higroscopicidade, grau caking e solubilidade;
- Realizar análise sensorial do chá da polpa de *P. ramiflora*;
- Determinar as frações fitoquímicas responsáveis pela atividade biológica dos extratos: flavonoides totais, polifenóis e triterpenos;
- Realizar identificação e potencial antioxidante do chá por CLAE/DAD e pelos métodos ORAC e fosfomolibdênio;
- Determinar a composição nutricional do chá;
- Avaliar estabilidade da polpa atomizada.

8 REFERÊNCIAS

1. Polito L, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MJ, Bolognesi A. Plants Producing Ribosome-Inactivating Proteins in Traditional Medicine. *Molecules*. 2016 21(11):1-27.
2. Waltenberger B, Mocan A, Šmejkal K, Heiss EH, Atanasov AG. Natural products to counteract the epidemic of cardiovascular and metabolic disorders. *Molecules*. 2016;21(6):1–33.
3. Silva C, Simeoni L, Silveira D. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(2A):501-9.
4. Souza P, Sales P, Simeoni L, Silva E, Silveira D, Magalhaes P. Inhibitory activity of alpha-amylase and alphasglucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Med*. 2012;78(04):393–9.
5. Lott RH, RJacks B. Isozyme analysis of rain forest plants using immature seeds *Biotropica*. 2001 33(1):197-204.
6. Solis A, Luna H, Manjarrez N, Perez HI. Study on the (R)-oxynitrilase activity of *Pouteria sapota* *Tetrahedron* 2004;60(46):10427-31.
7. Hernandez L, Luna H, Solis A, Vazquez A. Application of crude preparations of leaves from food plants for the formation of cyanohydrins with high enantiomeric excesses *Tetrahedron Asymmetr* 2006;17(19):2813-6.
8. Santana D, Ranal MAD, Oliveira MC. Despolpamento e reguladores de crescimento na emergência de plântulas de duas espécies do gênero *Pouteria*. Simpósio Nacional Cerrado, 9, Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 2 Anais Brasília, DF: Embrapa-Cerrados. 2008.
9. Morzelle M, Bachiega P, Souza E, Boas EVBV, Lamounier M. Caracterização química e física de frutos de Curriola, Gabiroba e Murici provenientes do Cerrado brasileiro. *Rev Bras Frut* 2015;37(1):96-103.
10. Júnior EF, Souza P, Nascimento J, Santos S, Espindola L, Ferreira V. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. *Lat Am J Pharm* 2009;28(6):812-8.
11. Silva M, Melo L, Ribeiro R, Souza J, Lima J, Martins D, et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2010;20(4):549-62.

12. Gouveia Nd, Albuquerque Cd, Espindola L, Espindola F. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2013;85(3).
13. Fontes-Junior E. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará. 2004:110.
14. Nunes M. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae. Brasília Dissertação de Mestrado, Ciências Médicas, Universidade de Brasília 2004:60.
15. Castro C, Silva C, Perfeito J, Santos M, Resck I, Paula J, et al. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria* 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Águas de Lindóia 2006.
16. Pennington TD. Flora neotropica. Monograph 52. Sapotaceae. New York Botanical Garden for the Organization for Flora Neotropica. 1990.
17. Rates S. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2001;11(2):57-69.
18. Pinto E, Amorozo M, Furlan A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. *Acta botanica brasílica*. 2006;20(4):751-62.
19. de BMdSMAN, Diretoria VSARd, 26 C-Rn. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*. 13 de maio de 2014.
20. Malik Z, Bhat J, Ballabha R, Bussmann R, Bhatt A. Ethnomedicinal plants traditionally used in health care practices by inhabitants of Western Himalaya. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;172:133-44.
21. BRASIL MdS, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, & Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006:60.
22. Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites *Trends in Plant Science*. 2004;9(9):433–40.

23. Pan L, Chai HB, Kinghorn AD. Discovery of new anticancer agents from higher plants *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2012;4 142–56.
24. Oliveira A, Longhi J, Andrade C, Miguel O, Miguel M. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. *Visão Acadêmica*. 2006;7(2).
25. Barros F. Plantas de Uso Medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. *Lat Am J Pharm*. 2007;26(5).
26. Junior VV. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2008;18:308-13.
27. Silveira P, Bandeira M, Arrais P. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos: uma realidade. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(4):618-26.
28. Hamilton A. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity & Conservation*. 2204;13(8):1477-517.
29. Robinson M, Zhang X. The world medicines situation 2011, traditional medicines: Global situation, issues and challenges. World Health Organization, Geneva. 2011.
30. Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of botany*. 1997;80(3):223-30.
31. Rodrigues LJ. Desenvolvimento e processamento mínimo de pitaia nativa (*Selenicereus setaceus* Rizz.) do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Lavras, Lavras 2010;160.
32. França I, Souza JAd, Baptista RS, Britto VS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista brasileira de enfermagem*. 2008;61(2).
33. Meyer U. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *The Lancet*. 2000;356(9242):1667-71.
34. Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal - Moderna Santa Catarina: Editora Universitária. UNOSC/Argos. 2001.
35. Barata L. Fitomedicamentos no Brasil: realidade possível ou ficção? Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, X International Congress of Ethnopharmacology São Paulo. 2008.
36. Chadwick DJ, Marsh JE. Bioactive compounds from plants. John Wiley & Sons. 2008;154.

37. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 2012;75(3):311-35.
38. Salles P. Estudo biomonitorado do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk por ensaio de atividade de inibição da alfa-amilase. Dissertação de doutorado - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2012.
39. Foglio M, Queiroga C, Sousa I, Rodrigues R. Plantas Medicinais como Fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar MultiCiências. 2006;7(1):64-9.
40. Swenson U, Anderberg A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics*. 2005; 21(2):101-30.
41. Barroso G. Sistemática de angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária UFV Rio de Janeiro. 1991;2.
42. Joly AB. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1998.
43. Pennington TD. The genera of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens: Bronx, New York: Kew & New York Botanical Garden. 1991:1-13.
44. Ma J, Yang H, Basile M, Kennelly E. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(19):5873-8.
45. Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL, Ichaso CLF. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Por Icones, Anatomy and morphology, Keys Geog= 0 Anatomy and Morphology (KR, 200004518) - Viçosa: Universidade Federal de Vicososa. 2000:443.
46. Almeida S, Proença CE, Sano S, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC. 1998;464.
47. Montenegro LHM, Oliveira PES, MConserva L, Rocha EMM, Brito AC, Araújo RM, et al. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev bras farmacogn*. 2006 16(Supl.):611-7.
48. Nogueira L. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. Universidade Estadual Paulista - Araraquara-SP. 2012.

49. Tuttis K, Costa Dd, Nunes H, Specian A, Serpeloni J, Santos L, et al. *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. extract: Flavonoids quantification and chemopreventive effect on HepG2 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2018;81(16):792-804.
50. Rodrigues PM, Gomes JVD, Jamal CM, Neto AC, Santos ML, Fagg CW, et al. Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2017;109:1063-8.
51. Dalponte J, Lima E. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora-Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 1999;22(2):325-32.
52. Gama L, Barbosa A, Oliveira P. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *P. torta* (Sapotaceae). *Brazilian Journal of Botany*. 2011;34:375-87.
53. Batalha M, Martins F. Reproductive phenology of the cerrado plant community in Emas National Park (central Brazil). *American Journal of Botany* 2004;52:149-61.
54. Triono T, Brown A, West J, Crisp M. A phylogeny of *Pouteria* (Sapotaceae) from Malesia and Australasia. *Australian Systematic Botany*. 2007;20(2):107-18.
55. Costa D. Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae). Tese - Doutorado, Araraquara - SP. 2014.
56. Condessa M. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais. Dissertação de mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2011.
57. Costa A, Silva G, Escudero M. Estudo comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores Brasil Florestal. 2003;21:24-30.
58. da Costa AV, Calabria LK, Furtado FB, de Gouveia NM, Oliveira RJ, de Oliveira VN, et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis*. 2013;28(3):411-9.
59. Sousa J. Ensaio de mutação gênica reversa e teste do micronúcleo para avaliação da atividade mutagênica de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*. Araraquara-SP. 2011.

60. Silva A. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae). Dissertação - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2007.
61. Oliveira A, Pereira K, Muller J. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. Horticultura Brasileira. 2014;32(1):41-7.
62. Halliwell B, Aeschbach R, Lölliger J, Aruoma O. The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology. 1995;33(7):601-17.
63. Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African journal of biotechnology. 2006;5(11):1142-5.
64. Sies H. Strategies of antioxidant defense. In Ejb Reviews I 1993 Springer, Berlin, Heidelberg. 1994:101-7.
65. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(17):7915-22.
66. Witztum J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. The Lancet. 1994;344(8925):793-5.
67. Roy P, Kulkarni A. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. Food and chemical toxicology. 1996;34(6):563-70.
68. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. Diabetes. 1997;46(Supplement 2):S14-S8.
69. Kumpulainen J, Salonen J. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. Elsevier. 1999;240.
70. Cook N, Samman S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. The Journal of nutritional biochemistry. 1996;7(2):66-76.
71. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine. 1996;20(7):933-56.
72. S Meenakshi, Gnanambigai D, Mozhi S, Arumugam M, Balasubramanian T. Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. Global J Pharmacol. 2009;3(2):59-62.

73. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 2008;46(2):446-75.
74. Duong D, Qin J, Harris J, Hoang T, Bansemer M, Currie K, et al. Effects of dietary grape seed extract, green tea extract, peanut extract and vitamin C supplementation on metabolism and survival of greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) cultured at high temperature. *Aquaculture*. 2016;464:364-73.
75. Oliveira A, Valentim I, Goulart M, Silva C, Bechara E, Trevisan M. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*. 2009;32:689-702.
76. Ito N, Fukushima S, Tsuda H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*. 1985;15:109-50.
77. Ito N, Hiriso M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chemistry and Toxicology*. 1986;24:1071-82.
78. Dorko C. Ingredients/Additives-Antioxidants Used in Foods. *Food Technology*. 1994;48(4):33-4.
79. Saigg N, Silva M. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*. 2009;7(1):69-89.
80. Xia EH, Zhang HB, Sheng J, Li K, Zhang QJ, Kim C, et al. The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis. *Molecular plant*. 2017;10(6):866-77.
81. Xia E, Tong W, Hou Y, An Y, Chen L, Wu Q, et al. The reference genome of tea plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into genome evolution and adaptation of tea plants. *Molecular Plant*. 2020;13(7):1013-26.
82. Konieczynski P, Wesolowski M. Water-extractable magnesium, manganese and copper in leaves and herbs of medicinal plants. *Acta Pol Pharm*. 2012;69(1):33-9.
83. Suchacz B, Wesolowski M. Identification of similarities in metallic content of herbal infusions using non-linear approach. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(2): 575-82.
84. Lemberkovics É, Czinner E, Szentmihályi K, Balázs A, Szőke É. Comparative evaluation of *Helichrysi flos* herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro-and microelements. *Food Chemistry*. 2002;78(1):119-27.

85. Nookabkaew S, Rangkadilok N, Satayavivad J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(18):6939-44.
86. Saud S, Oud A. Heavy metal contents in tea and herb leaves. *Pakistan Journal of Biological Science*. 2003;6:208-2.
87. Konieczynski P, Wesolowski M, Radecka I, Rafalski P. Bioavailable inorganic forms of essential elements in medicinal plants from Northern Poland. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 2011;23(2):61-70.
88. Milani R, Morgano M, Saron E, Silva F, Cadore S. Evaluation of direct analysis for trace elements in tea and herbal beverages by ICP-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015;26(6):1211-7.
89. Magalhães IdS, Soares AdO, Araújo L, PRC da Costa, Roland IdA, Borrás M. Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the leaves and tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl. *Biological trace element research*. 2009;132(1-3):239–46.
90. Zapata L, Tenorio-Sanz R. Characterization and study of the essential mineral components of Spanish commercial herbal products and their infusions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013;52(3):172-80.
91. FAO. (Food and Agriculture Organization) prevê aumento da produção e consumo de chá no mundo. Portal do Agronegócio. 2018:Disponível na internet em: <https://www.portaldoagronegocio.com.br/agricultura/outros/noticias/fao-preve-aumento-da-producao-e-consumo-de-cha-no-mundo-172378>.
92. Drew L. The growth of tea. *Nature*. 2019;566(7742):S2-S.
93. Future MR. Herbal Tea Market Research Report - Global Forecast till 2025. <https://www.marketresearchfuture.com/reports/herbal-tea-market-5420>. 2020.
94. Gok I, Ulu EK. Functional foods in Turkey: marketing, consumer awareness and regulatory aspects. *Nutrition & Food Science*. 2019;49:668-86.
95. Bahadori M, Zengin G, Dinparast L, Eskandani M. The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*)-profiling phenolic and antioxidant activities. *European Journal of Integrative Medicine*. 2020;36:101-34.
96. Saito S, Fröhlich P, Gosmann G, Bergold A. Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camelia sinensis* var. *assamica*) using HPLC. *Chromatographia*. 2007a;65:607-10.

97. Saito S, Gosmann G, Saffi J, Presser M, Richter M, Bergold A. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007b;55:9409-14.
98. Byun J, Han J. A study on perception and actual status of utilization for green tea. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. 2004;19(2):184-92.
99. Anvisa G. Cartilha sobre Boas Práticas para Serviço e Alimentação. Disponível na internet por [http em:<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf). 2004.
100. Lutz IA. Normas Analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008;1.
101. Fonseca Y, Fernandes C, Monteiro B, Carvalho Id, Gomes S, Fagg C, et al. Determinación de rutina en el extracto *Erythroxylum suberosum* por cromatografía líquida: aplicación de la normalización de las hierbas y los estudios de estabilidad. . *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2014;13(2).
102. Leite F, Leite BM, Barros IdC, Gomes S, Fagg C, Simeoni L, et al. Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2014;13(2):135-43.
103. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R, . Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(10):4619-26.
104. Naguib Y. A fluorometric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants. *Analytical biochemistry*. 2000;284(1):93-8.
105. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. 1999;269(2):337-41.
106. Rodrigues M, Iemma A. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3ª Ed Campinas/SP. 2014.

107. Santos M, Cardoso R, Fonseca A, Conceição M. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do recôncavo sul da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 2010;32(4):1089-97.
108. Menezes A, Junior AS, Cruz H, Araújo D, Sampaio D. Estudo comparativo do pó da acerola verde obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2009;11(1-8).
109. Santos J, Costa F, Soares D, Campos A, Carnelossi M, Nunes T, et al. Avaliação de mangaba liofilizada através de parâmetros físico-químicos. *Scientia plena*. 2012;8(3):1-5.
110. Rodrigues P. Estudo químico de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.(Sapotaceae): biomonitoramento por inibição da alfa-amilase. Dissertação de mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2016.
111. Cunha MCD, Silva JS, Elias HHDS, Carvalho EEN, Vilas Boas EVDB. Effects of processing and packaging on bioactive compounds of curriola jelly [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.] during storage. *Food Science and Technology*. 2020;AHEAD(1-9).
112. Kongpichitchoke T, Chiu M, Huang T, Hsu J. Gallic Acid Content in Taiwanese Teas at Different Degrees of Fermentation and Its Antioxidant Activity by Inhibiting PKC δ Activation: In Vitro and in Silico Studies. *Molecules*. 2016;21(10):1346.
113. Jeszka-Skowron M, Zgoła-Grześkowiak A, Frankowski R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS Determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan ngoc herbal tea. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;74:71-81.
114. Lima A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.). Tese - Doutorado em Bromatologia Universidade de São Paulo. 2008.
115. Prior R, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(11/12):1173-81.

116. Gonçalves A. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo. 2008.
117. Hogan S, Zhang L, Li J, Sun S, Canning C, Zhou K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & metabolism*. 2010;7(71):1-9.
118. Wolfe K, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu R. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(18):8418-26.
119. Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*. 2010;118(2):208-14.
120. Ouchemoukh S, Hachoud S, Boudraham H, Mokrani A, Louaileche H. Antioxidant activities of some dried fruits consumed in Algeria. *LWT-Food Science and Technology*. 2012;49(2):329-32.
121. Mladenović M, Mihailović M, Bogojević D, Matić S, Nićiforović N, Mihailović V, et al. In vitro antioxidant activity of selected 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives—SAR, QSAR and DFT studies. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(5):2822-41.
122. Číž M, Čížová H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*. 2010;21(4):518-23.
123. Stevanovic T, Diouf P, Garcia-Perez M. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*. 2009;5(4):264-95.
124. Legault J, Girard-Lalancette K, Dufour D, Pichette A. Antioxidant potential of bark extracts from boreal forest conifers. *Antioxidants*. 2013;2(3):77-89.
125. Jayaprakasha G, Girenavar B, Patil B. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT-Food Science and Technology*. 2008;41(3):376-84.
126. Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna O, Galaverna G, Rio DD, et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(1):103-11.

127. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Mérillon J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(5):1768-74.
128. Kasangana P, Haddad P, Stevanovic T. Study of polyphenol content and antioxidant capacity of *Myrianthus arboreus* (Cecropiaceae) root bark extracts. *Antioxidants*. 2015;4(2):410-26.
129. Kratchanova M, Denev P, Ciz M, Lojek A, Mihailov A. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*. 2010;57(2):229-34.
130. White P, Brown P. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of botany*. 2010;105:1073-80.
131. Bouis H, Saltzman A. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global food security*. 2017;12:49-58.
132. Hertwig IV. Plantas aromáticas e medicinais; plantio, colheita, secagem, comercialização. 1986:414.
133. Ferrari C, Ribeiro C, Aguirre Jd. Secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2012;15(2):157-65.
134. Bhandari B, Datta N, Howes T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*. 1997;15:671-84.
135. Jaya S, Das H, . Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. *Journal of Food Engineering*. 2004 63:125–34.
136. Cabral B, Oliveira Pd, Gelfuso G, Quintão T, Chaker J, Karnikowski MdO, et al. Improving stability of antioxidant compounds from *Plinia cauliflora* (jabuticaba) fruit peel extract by encapsulation in chitosan microparticles. *Journal of Food Engineering*. (2018;238:195-201.
137. Garcia-Perez JV, García-Alvarado MA, Carcel JA, Mulet, A. Extraction kinetics modeling of antioxidants from grape stalk (*Vitis vinifera* var. Bobal): Influence of drying conditions. *Journal of Food Engineering*. 2010;101:49-58.

138. Suvarnakuta P, Chaweerungrat C, Devahastin S. Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthenes in mangosteen rind. *Food Chemistry*. 2011;125:240-7.
139. Djendoubi NM, Boudhrioua N, Kechaou N, Courtois F, Bonazzi C. Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*. 2012;90:433-41.
140. Quek S, Chok N, Swedlund P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2007;46(5):386-92.
141. Cai Y, Corke H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of food science*. 2000;65:1248-52.
142. Tonon R, Brabet C, Hubinger M. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 2008;88(3):411-8.
143. Oliveira M. Avaliação da influência de adjuvantes de secagem sobre as propriedades de suco de caju atomizado. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará. 2008:63f.
144. Wang Z, Hwang S, Quispe Y, Arce P, Lim S. Investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian tea plant infusions. *Food chemistry*. 2017;231:222-30.
145. De A Silva J, Maciel MIS, De Moura NP, Da S. J. M., De Melo JV. Influence of process conditions on drying by atomization pulp umbu. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 2014;4(2).
146. Miravet G, Alacid M, Obón J, Fernández-López J. Spray-drying of pomegranate juice with prebiotic dietary fibre. *International Journal of Food Science & Technology*. 2016;51(3):633-40.
147. Goula A, Adamopoulos K. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air. II. The effect on powder properties. *Journal of Food Engineering*. 2005;66 35-42.
148. Pifferi G, Restani P. The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco*. 2003;58(8):541-50.
149. Cavalcante C, Rodrigues S, Afonso M, Costa J. Avaliação dos parâmetros de secagem da polpa de graviola em pó obtida por secagem em spray dryer. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2017;20:e2016015.

