

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LEONARDO LUIZ BORGES**

**BIOPRODUTOS PADRONIZADOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS  
OBTIDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DAS CASCAS DOS  
FRUTOS DE *MYRCIARIA CAULIFLORA* (MART.) O. BERG**

**BRASÍLIA, 2014**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LEONARDO LUIZ BORGES**

**BIOPRODUTOS PADRONIZADOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS  
OBTIDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DAS CASCAS DOS  
FRUTOS DE *MYRCIARIA CAULIFLORA* (MART.) O. BERG**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade  
de Brasília, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição**

**BRASÍLIA**

**2014**

**Não autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1015422.

B732b Borges, Leonardo Luiz.  
Bioprodutos padronizados em compostos fenólicos obtidos de resíduos agroindustriais das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg / Leonardo Luiz Borges. -- 2014.  
105 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Dâmaris Silveira ; Coorientação: Edemilson Cardoso da Conceição.

1. Jabuticaba - Análise. 2. Resíduos agrícolas. 3. Resíduos industriais. 4. Reaproveitamento (Sobras, refugos, etc.). I. Silveira, Dâmaris. II. Conceição, Edemilson Cardoso da. III. Título.

CDU 615.1

LEONARDO LUIZ BORGES

BIOPRODUTOS PADRONIZADOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS  
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DAS CASCAS DOS FRUTOS DE  
*MYRCIARIA CAULIFLORA* (MART.) O. BERG

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.**

Aprovada em 15 de abril de 2014.

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dra. Dâmaris Silveira (FS/UnB)-Presidente**

---

**Profa. Dra. Yris Maria Fonseca (FS/UnB)**

---

**Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (FS/UnB)**

---

**Profa. Dra. Telma Alves Garcia (FF/UFG)**

---

**Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)**

Dedico este trabalho à memória de meu pai Sebastião, por contribuir todos os dias para a renovação de minhas forças. A minha querida mãe Conceição pelo apoio incondicional e por sempre acreditar em mim. A minha esposa Elisa pelo amor e paciência e a meus irmãos por serem meu modelo de força e caráter.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Professora Dra. Dâmaris Silveira por me dar a oportunidade de realizar um sonho e por me ajudar ao longo desses anos de trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Edemilson Cardoso da Conceição por prestar um apoio integral a este trabalho, pela amizade e pela incansável capacidade que possui de motivar as pessoas ao seu redor.

Aos novos amigos que fiz na UnB e aos antigos amigos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN/UFG) por todo o apoio e ajudas prestadas no curso do meu doutorado.

A toda a minha família pelos momentos de conforto e paz necessários para manter o equilíbrio para a execução desse estudo.

Aos funcionários da Vinícola Jabuticabal por gentilmente cederem os resíduos que se transformaram em valiosa matéria-prima para esta pesquisa.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.*  
(George Bernard Shaw)

## RESUMO

**BORGES, Leonardo Luiz.** Bioprodutos padronizados em compostos fenólicos obtidos de resíduos agroindustriais das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. Brasília, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente como "jabuticabeira", bastante cultivada em pomares domésticos em grande parte do território brasileiro. O fruto dessa espécie ("jabuticaba") apresenta grande valor nutricional, com altos teores de compostos fenólicos, em sua maior parte localizados nas cascas dos frutos, o que ressalta a importância de desenvolver produtos que permitam sua utilização. Além disso, uma quantidade média equivalente a 50% de cascas e sementes são desperdiçadas no processo de obtenção industrial de muitos derivados, mostrando a necessidade do desenvolvimento de métodos capazes de reaproveitar esses resíduos gerados com o objetivo de obter produtos com valor agregado. Este trabalho iniciou-se pela obtenção e caracterização do material vegetal (resíduo agroindustrial de jabuticaba) previamente dessecado e posteriormente o extrato hidroalcoólico foi obtido pela técnica de percolação com álcool 45% (v/v). Os experimentos de secagem seguiram inicialmente um planejamento fatorial  $2^3$  que forneceu os parâmetros para a construção de um planejamento do tipo Box-Behnken ( $3^3$ ) associado à função de desejabilidade com o objetivo de obter extratos secos com propriedades otimizadas. Os seguintes fatores foram avaliados: temperatura do ar de secagem, vazão do ar de secagem e fluxo de alimentação do extrato sobre as propriedades do extrato seco. A substância quantificada por CLAE nos resíduos foi o ácido elágico (AE), no entanto também foi determinada a quantificação de compostos fenólicos totais (FT), flavonoides totais (Fv), atividade antioxidante (AAO), atividade de água (Aw) nos extratos secos obtidos. A partir da função de Desejabilidade global, as variáveis resposta EA, FT, AAO e Aw apresentaram valores preditos que foram verificados experimentalmente, resultando em  $0,0844 \pm 0,0013\%$ ,  $16,27 \pm 0,63\%$ ,  $54,45 \pm 0,92\%$  e  $0,176 \pm 0,02$ , respectivamente. Os valores experimentais apresentaram boa concordância com os valores preditos, o que mostrou que o modelo encontrado é válido para a obtenção de extratos secos otimizados de resíduos agroindustriais de jabuticaba.

Palavras-chave: jabuticaba, ácido elágico, extrato seco, *spray drying*.

## ABSTRACT

**BORGES, Leonardo Luiz.** Bioproducts standardized in phenolic compounds obtained from agroindustrial wastes from fruit peels of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. Brasília, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg is a species belonging to the Myrtaceae family, known as "jabuticabeira", widely grown in home gardens in several places of the Brazilian territory. The fruit, commonly known as "jabuticaba" presents high nutritional value, with high levels of phenolic compounds, mostly located in the fruit peels, which highlights the importance of developing products that enable its use. In addition, an amount equivalent to 50% constituted of peels and seeds are wasted during the industrial process to obtaining many products, this fact shows the necessity of developing methods to reuse these wastes generated in order to obtain a product with added value. This work was beginning by obtaining and characterization of previously dried plant material (agroindustrial wastes) and later the hydro-alcoholic extract was obtained by percolation using as solvent ethanol at 45% (v/v). The drying experiments initially followed a  $2^3$  factorial design which provided parameters for constructing a Box-Behnken design ( $3^3$ ) associated with the desirability function aiming to find dry extracts with optimized properties. The following factors were evaluated: inlet drying air temperature, spray nozzle airflow rate and feed flow rate on the properties of the spray-dried extract. The compound quantified by HPLC in wastes was the phenolic compound ellagic acid (*EA*), however, measurement of total phenolic compounds (*TP*), total flavonoids (*TF*), antioxidant activity (*AOA*), and water activity (*Aw*) was also determined the dried extracts. From the overall Desirability function, the responses *EA*, *TP*, *AOA*, and *Aw* variables had predicted values that were experimentally verified, resulting in  $0.0844 \pm 0.0013\%$ ,  $16.27 \pm 0.63\%$ ,  $54.45 \pm 0.92\%$  and  $0.176 \pm 0.02$ , and  $0.02\%$ , respectively. The experimental results were in good agreement with the predicted values, which showed that the model is valid for obtaining dry extracts optimized from "jabuticaba" agroindustrial wastes.

Key words: jabuticaba, ellagic acid, dried extract, spray-drying.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da formação de ácido elágico a partir da hidrólise de taninos..... 8
- Figura 2. Metabolismo de elagitaninos e ácido elágico no trato gastrointestinal de mamíferos. .... 9
- Figura 3. Esquema para a obtenção do subproduto (cascas) de jaboticaba a partir da fermentação de frutos de *Myrciaria cauliflora*..... 14
- Figura 4. Distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*. .... 42
- Figura 5. Curva padrão para o doseamento de fenóis totais em *Myrciaria cauliflora*. Concentração de ácido tânico em mg/mL versus Absorbância (ABS). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão em triplicata. .... 44
- Figura 6. Cromatograma, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do padrão de ácido elágico. Condições de análise: Fase móvel: Metanol:Água (60:40); Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura: 25°C;  $\lambda=252$  nm; Coluna: Zorbax eclipse XDB-C18 5 $\mu$ m; 250 mmx4,6mm. .... 48
- Figura 7. Perfil cromatográfico do extrato líquido obtido por ultrassom a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*. Condições de análise: Fase móvel: Metanol:Água (60:40); Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura: 25°C;  $\lambda=252$  nm; Coluna: Zorbax eclipse XDB-C18 5 $\mu$ m; 250 mmx4,6mm..... 49
- Figura 8. Espectro de absorvância na região do UV-visível, referente ao pico do padrão de ácido elágico ( $t_R = 7,7$  min). .... 49

Figura 9. Espectro de absorvância na região do UV-visível, referente ao pico do ácido elágico (tR = 7,7 min) determinado no extrato líquido dos resíduo de <i>Myrciaria cauliflora</i> . .....	50
Figura 10. Curva padrão do padrão de ácido elágico, em µg/mL. Cada ponto representa a média ± desvio padrão em triplicata.....	51
Figura 11. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados (em relação às variáveis codificadas) referentes ao Planejamento A para a extração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> e suas respectivas capacidades antioxidantes. PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático. ....	56
Figura 12. Gráfico de distribuição normal dos efeitos para o Planejamento A para a extração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> e suas respectivas capacidades antioxidantes. PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático. ....	57
Figura 13. Gráfico de superfície da concentração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> em função da graduação alcoólica e proporção sólido:solvente (Planejamento A). ....	58
Figura 14. Gráfico de Pareto para os efeitos referentes à atividade antioxidante (AAO) do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> em função de diferentes variáveis (Planejamento A). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q:quadrático.....	59
Figura 15. Gráfico de distribuição normal dos efeitos para a atividade antioxidante do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> , utilizando o método do DPPH (Planejamento	

A). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático..... 59

Figura 16. Gráfico de superfície da atividade antioxidante (AAO) do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, em função da graduação alcoólica (EtOH) e proporção sólido:líquido (PSL) (Planejamento A). ..... 60

Figura 17. Gráfico de Pareto para a influência dos efeitos referentes à extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica. .... 62

Figura 18. Gráfico de distribuição normal da influência dos efeitos referentes à extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático. .... 63

Figura 19. Superfícies de resposta da extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B) em função de PSL e Tempo (A); PSS e graduação alcoólica (B); graduação alcoólica e tempo (C); em função das três variáveis simultaneamente (D). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica. .... 65

Figura 20. Superfície de resposta do teor de ácido elágico no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função do  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem. .... 68

Figura 21. Superfície de resposta do teor de flavonoides totais no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido

por nebulização, em função de  $F_E$  e  $V_A$ . Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem..... 69

Figura 22. Superfície de resposta da atividade antioxidante do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função do fluxo de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $F_E$  e  $V_A$  (b). Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ = Vazão do ar de secagem. .... 70

Figura 23. Superfície de resposta da atividade água no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $T_S$  e  $V_A$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem. .... 72

Figura 24. Superfície de resposta do teor de ácido elágico presente no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem. .... 75

Figura 25. Superfície de resposta do teor de fenóis totais do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização em  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem..... 76

Figura 26. Superfície de resposta da atividade antioxidante do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização, em função de  $F_E$  e  $T_S$ . Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem. .... 77

Figura 27. Superfície de resposta da atividade água no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por

nebulização, em função de  $T_S$  e  $V_A$ . Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  
 $V_A$ =Vazão do ar de secagem. .... 79

Figura 28. Gráfico de contorno representando a Desejabilidade global relativa as seguintes respostas:  $A_w$ ,  $AE$ ,  $FT$  e  $AAO$  em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c), no processo de obtenção do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização.  $T_S$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem;  $A_w$ : Atividade de água;  $AE$ : Teor de ácido elágico;  $FT$ : Teor de fenóis totais;  $AAO$ : Porcentagem de inibição do radical DPPH..... 82

Figura 29. Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos extrato seco obtido dos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* por nebulização (Amostra 7). .... 84

Figura 30. Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos extrato seco obtido dos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* por nebulização (Amostra referente ao experimento de verificação). .... 85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores codificados e seus níveis nos planejamentos Box-Behnken A e B, para o método de extração de resíduo de cascas de <i>Myrciaria cauliflora</i> por ultrassom.....	30
Tabela 2. Fatores codificados e seus níveis no Planejamento fatorial $2^3$ , para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas de frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	34
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial $2^3$ , para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	35
Tabela 4. Fatores codificados e seus níveis no Planejamento fatorial Box-Behnken ( $3^3$ ), para a obtenção de extratos secos padronizados de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	35
Tabela 5. Planejamento fatorial Box-Behnken para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	36
Tabela 6. Classes de metabólitos secundários presentes na matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	43
Tabela 7. Porcentagem (m/m) de compostos fenólicos totais (FT) para a matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	44
Tabela 8. Condições de separação para o parâmetro de conformidade do sistema.....	47
Tabela 9. Repetibilidade e precisão intercorrida para a solução do padrão de ácido elágico.....	52

Tabela 10. Resultados do parâmetro de exatidão de quantificação do ácido elágico presente no extrato hidroalcoólico obtido de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	53
Tabela 11. Resultados do parâmetro de robustez do teor de ácido elágico presente no extrato hidroalcoólico obtido de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	54
Tabela 12. Planejamento A (fatorial fracionário 3 <sup>3</sup> ) e as concentrações de ácido elágico e suas respectivas capacidades antioxidantes. ....	55
Tabela 13. Planejamento B (fatorial fracionário 3 <sup>3</sup> ) e as concentrações de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> , e suas respectivas capacidades antioxidantes ...	61
Tabela 14. Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para o processo de secagem do extrato hidroalcoólico obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> e o resultado das respostas analisadas.....	67
Tabela 15. Sumário dos efeitos de variáveis de secagem e suas significâncias ( <i>p</i> ) sobre as propriedades do extrato seco resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> , obtido por nebulização. ....	67
Tabela 16. Equações ajustadas e coeficientes de correlação ( <i>r</i> ) dos resultados experimentais de obtenção de extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> , obtido por nebulização,.....	71
Tabela 17. Planejamento fatorial Box-Behnken (3 <sup>3</sup> ) e o resultado das respostas analisadas. ....	73
Tabela 18. Sumário dos efeitos de variáveis de secagem e suas significâncias ( <i>p</i> ) sobre as propriedades do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> obtido por nebulização empregando o Planejamento Box-Behnken.....	74

Tabela 19. Equações ajustadas e coeficientes de correlação dos resultados experimentais para o Planejamento Box-Behnken da secagem por nebulização, do extrato de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*..... 80

Tabela 20. Valores preditos para as respostas analisadas na otimização do processo de obtenção do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização. .... 81

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAO - Atividade antioxidante  
AE- Ácido elágico  
ANOVA - Análise de Variância  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
 $A_w$  - Atividade de água  
CG - Cromatografia Gasosa  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CV - Coeficiente de variação  
FDA - *Food and Drug Administration*  
 $F_E$  - Fluxo de alimentação de extrato  
FM - Fase móvel  
FT - Fenóis totais  
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*  
LD - Limite de detecção  
LQ - Limite de quantificação  
 $\lambda$  - Lambda (comprimento de onda)  
MEV - Microscopia Eletrônica por Varredura  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
DAD - Detector de arranjo de diodos  
P.A - Para análise (produtos químicos de grau analítico)  
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada  
 $R_f$  - Fator de retenção  
SUS - Sistema Único de Saúde  
 $t_R$ =Tempo de retenção  
 $T_s$  - Temperatura do ar de secagem  
UV - Ultravioleta  
 $V_A$  - Vazão do ar de secagem

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A jabuticaba e seus benefícios ainda pouco explorados .....	5
1.2 Justificativa .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1. Objetivo Geral .....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO RESÍDUO .....	14
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	15
3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais .....	15
3.2.2 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido.....	15
3.2.3 Determinação da distribuição granulométrica .....	16
3.2.4 Determinação do teor de umidade .....	16
3.2.5 Determinação do Índice de Intumescência.....	17
3.2.6 Prospecção fitoquímica .....	17
3.2.6.1 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	17
3.2.6.2 Pesquisa de heterosídeos digitálicos .....	18
3.2.6.3 Pesquisa de heterosídeos flavonoides .....	19
3.2.6.4 Determinação do índice de espuma.....	20
3.2.6.5 Pesquisa de taninos .....	21
3.2.6.6 Pesquisa de alcaloides.....	22
3.3 Análises quantitativas.....	23
3.3.1 Doseamento de fenóis totais (FT) .....	23
3.3.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por CLAE .....	25
3.3.2.1 <i>System suitability</i> .....	25
3.3.2.2 Especificidade .....	25
3.3.2.3 Linearidade e Intervalo .....	26
3.3.2.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	26
3.3.2.5 Precisão .....	27
3.3.2.6 Exatidão .....	27
3.3.2.7 Robustez .....	27

3.3.3 Determinação da atividade antioxidante (AAO).....	28
3.4 Obtenção e caracterização do extrato líquido de resíduos de cascas dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	29
3.4.1. Extração utilizando ultrassom.....	29
3.4.2 Extração por percolação.....	31
3.4.3 Extração por refluxo .....	31
3.4.4 Determinação do teor de sólidos.....	31
3.4.5 Determinação do pH .....	32
3.4.6 Determinação da viscosidade .....	32
3.4.7 Determinação da densidade.....	32
3.4.8 Determinação do teor de fenóis totais (FT) .....	32
3.4.9 Determinação do teor de ácido elágico .....	33
3.5 Obtenção do extrato seco padronizado dos resíduos dos frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i> .....	33
3.5.1 Caracterização dos extratos secos obtidos .....	38
3.5.1.1 Rendimento da secagem ( $R_s$ ) .....	38
3.5.1.2 Determinação da atividade de água ( $A_w$ ).....	38
3.5.1.3 Determinação dos teores de fenóis totais .....	38
3.5.1.4 Determinação dos teores de flavonoides totais.....	39
3.5.1.5 Determinação do teor de ácido elágico por CLAE.....	39
3.5.1.6 Caracterização microscópica .....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido.....	41
4.2 Determinação da distribuição granulométrica .....	41
4.3 Determinação do Índice de Intumescência.....	42
4.4 Prospecção fitoquímica .....	43
4.5 Quantificação de fenóis .....	43
4.6 Determinação da atividade antioxidante .....	45
4.7 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico.....	46
4.7.1 Determinação do teor de sólidos do extrato concentrado .....	46
4.7.2 Determinação da densidade relativa do extrato concentrado de <i>M. cauliflora</i> .....	47
4.8 Validação do método analítico para a quantificação de ácido elágico .....	47
4.8.1 Especificidade do método analítico desenvolvido para o ácido elágico ..	48

4.8.2 Linearidade.....	50
4.8.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	51
4.8.4 Precisão .....	52
4.8.5 Exatidão .....	52
4.8.6 Robustez .....	53
4.9 Planejamento experimental do método de extração de ácido elágico.....	54
4.9.1 Planejamento experimental A.....	54
4.9.2 Planejamento experimental B.....	61
4.10 Planejamento $2^3$ na obtenção do extrato seco .....	66
4.11 Planejamento Box-Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco .....	72
4.12 Caracterização microscópica dos extratos secos.....	83
5. CONCLUSÕES .....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

O emprego de derivados de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é uma prática que acompanha a humanidade há milênios em várias culturas por todo o mundo e por isso está relacionada à atenção primária à saúde atualmente em vários países (CALIXTO, 2000). Várias substâncias ativas foram obtidas a partir de plantas, o que reforça a importância dos produtos naturais como fontes ainda pouco exploradas quanto à caracterização química (SIANI, 2003).

Nas últimas décadas as pesquisas relacionadas aos produtos naturais úteis, principalmente de origem vegetal, têm sido incentivadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considerando que o uso de plantas medicinais e seus derivados como parte da Medicina Tradicional e Complementar continua tendo um papel de extrema relevância na saúde pública de diversos países (WHO, 2013). O Brasil, atendendo às estratégias da OMS, publicou políticas para inserção das práticas complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo a Fitoterapia (BRASIL, 2006). Contudo, alguns desafios relacionados a eficácia, segurança e qualidade dos derivados vegetais ainda persistem.

A obtenção de produtos a partir de fontes naturais, que apresentem constância de qualidade e rendimento está sujeita a diversas variáveis que constituem dificuldades a serem superadas. No caso de produtos naturais obtidos de plantas, podem ser citados: condições de cultivo, época de coleta, métodos extrativos empregados, secagem e as condições de armazenagem (CASTRO *et al.*, 2004). Devido a esses vários fatores torna-se necessária a utilização de marcadores químicos para o acompanhamento da qualidade e para a padronização desses produtos (CHAVES, J. S., 2005). Marcador químico consiste na substância ou conjunto de substâncias que estejam presentes em uma espécie vegetal e que preferencialmente sejam responsáveis pela atividade biológica da espécie (como flavonoides, alcaloides, ácidos graxos, etc). Além disso, o marcador deve ser passível de ser analisado por técnicas analíticas, como espectrofotometria e cromatografia, por exemplo, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRASIL, 2012).

Com o objetivo de obter produtos com alto valor agregado, em paralelo às etapas de processamento é necessário estabelecer um rigoroso controle da

qualidade em todas as fases de desenvolvimento, desde o cultivo, passando pelas etapas de processamento do insumo vegetal (cominuição, extração, secagem, etc), até o produto final, pois somente desta forma é possível garantir a segurança e eficácia do produto obtido. Assim, para a obtenção de insumos padronizados para serem utilizados no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, cosméticos ou alimentos, torna-se necessário definir parâmetros físicos e físico-químicos desejáveis, como concentração de marcadores químicos, propriedades organolépticas, distribuição granulométrica e morfologia das partículas (CALIXTO, 2000).

A secagem de matérias-primas vegetais é um processo crucial, cuja finalidade é levá-las a baixos teores de umidade, favorecendo sua conservação, mantendo sua qualidade físico-química por um tempo maior (RADÜNZ; MELO; MARTINS, 2002). Existem diversos métodos de secagem utilizados, tais como estufa com circulação de ar forçada, forno de micro-ondas, liofilização, secagem por aspersão (*spray-drying*) e leito fluidizado. Além dessas técnicas de secagem, é possível realizar a secagem de materiais vegetais utilizando temperatura ambiente (BORGO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, 2010). Após a obtenção do extrato seco, é necessária a determinação de compostos ou classes de substâncias que apresentem atividade biológica e o monitoramento das concentrações dessas substâncias durante todo o processo até a obtenção do produto seco garante a padronização do processo. Além disso, parâmetros físico-químicos também devem ser avaliados durante todo o processo com o objetivo de estabelecer limites de valores para o controle de qualidade do material a ser obtido (CHAVES, J. S. ; DA COSTA; FREITAS, 2007).

A técnica de secagem por aspersão ou nebulização (*spray-drying*) tem sido muito empregada por vários segmentos da indústria, como o alimentício e farmacêutico principalmente devido à série de vantagens que podem ser atribuídas a esta tecnologia, como sua flexibilidade operacional, a diversidade de produtos que podem ser submetidos a esta modalidade de secagem (tanto termosensíveis como termoestáveis), possibilidade de obter produtos com características otimizadas, além do custo atrativo (OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, 2010; COUTO *et al.*, 2011).

Essa técnica tem como objetivo eliminar a umidade contida em uma solução, dispersão ou emulsão para a obtenção de produtos secos (FELLOWS, 2006). O material submetido à secagem é disperso em uma câmara de secagem por meio do

processo de atomização, em que ocorre a divisão do líquido em milhões de partículas gerando o aspecto de uma "nuvem" (*spray*), que entra em contato com um fluxo de ar quente e resulta no produto seco. Diversos fatores como as propriedades físico-químicas do fluído, a estrutura do equipamento e as condições operacionais podem influenciar as características do extrato seco obtido (SHARAPIN *et al.*, 2000; TONON, R. V. ; BRABET;HUBINGER, 2008).

Devido à redução do fluído a pequenas gotículas, ocorre o aumento da superfície de contato o que facilita a evaporação da umidade, de tal forma que o tempo necessário para transformar as gotículas do fluído em partículas sólidas é bastante pequeno, levando de 1 a 20 s (BRENNAN, 2006). O rápido contato existente entre as partículas do material a ser seco e o ar quente permite que, a temperatura seja mantida relativamente baixa, e por isso esta técnica é adequada para produtos que sejam sensíveis ao calor (RÉ, 1998).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse sobre a qualidade de produtos obtidos por atomização. COUTO *et al.* (2012) realizaram a caracterização e otimização do extrato seco de *Rosmarinus officinalis* L. por atomização. Naquele neste estudo os autores avaliaram a influência do fluxo de alimentação do extrato, temperatura de entrada do ar de secagem e vazão do ar de secagem sobre as características do extrato seco, como teor do marcador químico (ácido rosmarínico), teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides totais, teor de taninos e atividade antioxidante total. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores, foi investigada a influência da concentração e tempo de incorporação de diferentes adjuvantes de secagem (Aerosil<sup>®</sup>, Maltodextrina e Manitol) sobre as propriedades físico-químicas (atividade de água, índice de Hausner, índice de Carr, rendimento do processo de secagem, teor de compostos voláteis, diâmetro médio do pó e ângulo de repouso) do extrato seco de *Eugenia dysenterica* DC, uma espécie do Cerrado conhecida popularmente como "cagaita" (COUTO *et al.*, 2011).

BANU *et al.* (2010) desenvolveram um trabalho em que foi avaliada a influência da temperatura de saída e entrada do ar de secagem e temperatura de alimentação de extrato no processo de secagem por atomização de iogurte natural, que teve as seguintes características avaliadas nos produtos secos: atividade de água, pH, acidez titulável em relação ao ácido lático. Além da relevância da tecnologia de *spray drying* para a área de alimentos, outra aplicação possível consiste na microencapsulação de compostos de interesse, visando o aumento na

proteção contra reações de degradação e aumento de estabilidade (KANAKDANDE; BHOSALE; SINGHAL, 2007). ALVES *et al.* (2014) obtiveram microcápsulas de óleos essenciais de *Pterodon emarginatus* Vogel utilizando a tecnologia de *spray drying* e goma arábica e maltodextrina como materiais de parede. OSORIO *et al.* (2010) realizaram o isolamento e microencapsulação de antocianinas dos frutos de *Bactris guineensis* empregando maltodextrina como adjuvante tecnológico.

Diversos produtos padronizados são encontrados no mercado brasileiro, principalmente medicamentos fitoterápicos como: *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Camellia sinensis* (chá verde) e *Paullinia cupana* (guaraná), ambos padronizados em metilxantinas; *Brosimum gaudichaudii* (mamacadela), padronizado em psoraleno e bergapteno, *Panax ginseng* (Ginseng), padronizado em ginsenosídeos; *Mikania glomerata* (guaco), padronizado em cumarinas; *Hypericum perforatum* (hipérico), padronizado em hipericina); *Passiflora incarnata* L. (maracujá), padronizado em vitexina (BARATA, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008).

No setor alimentício, a padronização de produtos, visando garantir sua estabilidade e, ainda, atribuindo aos alimentos não só o valor nutricional, mas também outros benefícios à saúde, tais como, propriedades antioxidantes, regulação de funções fisiológicas de forma a auxiliar na prevenção de agravos tais como hipertensão, câncer, osteoporose, etc (MORAES, F. P.; COLLA, 2006).

Devido à maior preocupação com a saúde humana, novas investigações com compostos com atividade antioxidante têm aumentado de modo que, são descobertos novos alimentos ou produtos com capacidade de combater os radicais livres, diminuindo os danos oxidativos no organismo que essas entidades podem desencadear (BARROS, J. A. C.; CAMPOS; MOREIRA, 2010). Os radicais livres são estruturas instáveis (apresentam elétrons desemparelhados) que são produzidos em muitos processos fisiológicos e participam de funções importantes no organismo, como a fagocitose, processos de sinalização celular, além de estarem envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (POEJO, 2009; BORGES *et al.*, 2011).

Dentro desse contexto, a nutrição pode atuar de maneira decisiva na saúde da população, por meio de benefícios atribuídos à redução dos danos gerados pela presença dos radicais livres, ressaltando a importância de estudos capazes de comprovar a ação de compostos antioxidantes presentes em alimentos (BERGER, 2005). Dentre diversas substâncias presentes os alimentos, os compostos polifenólicos são os antioxidantes mais abundantes da dieta, com um consumo

diário que pode atingir 1 g, o que supera o consumo de outras substâncias de origem natural classificadas como antioxidantes (MANACH *et al.*, 2004). Dentre os compostos polifenólicos, destacam-se as seguintes categorias de compostos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos, metabólitos que exercem importantes funções nas plantas (participando do crescimento, reprodução e defesa contra patógenos). Esses compostos também exercem importante participação como pigmentos de várias espécies vegetais (GEÔCZE, 2007; BARROS, J. A. C.; CAMPOS; MOREIRA, 2010).

Nesse sentido, o Brasil, com sua extensa biodiversidade, condições climáticas favoráveis à agricultura e fruticultura, ocupa uma posição muito favorável. Os produtos alimentícios derivados da pitanga, acerola, abacaxi, manga, maracujá, goiaba, melão e outras frutas tropicais estão tendo um consumo vertiginoso no mercado brasileiro e internacional nos últimos anos (BRUNINI *et al.*, 2004). O aumento do consumo e exportação de sucos, doces em conserva, polpas e extratos, pode ser atribuído aos seguintes fatores: a) boas práticas de cultivo e manejo agrônomico; b) emprego de métodos de processamento e conservação sofisticados e validados; c) adoção de sistemas logísticos eficientes e d) aumento do poder aquisitivo e o interesse do consumidor pelas propriedades benéficas dos alimentos. Inúmeras pesquisas têm mostrado a importância para a saúde de um grande número de substâncias bioativas contidas nestas frutas ou produtos delas derivados pelas propriedades antioxidantes e reguladoras do metabolismo, como a vitamina C, vitamina A, carotenoides, compostos fenólicos, óleos essenciais, alcaloides, etc (HALLIWELL, 1996; BORGES *et al.*, 2011).

### **1.1 A jabuticaba e seus benefícios ainda pouco explorados**

A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é um fruto pertencente à família Myrtaceae, originária da região centro-sul do Brasil. Suas principais características são: baga globosa de até 3 cm de diâmetro, casca avermelhada quase negra, polpa esbranquiçada mucilagínosa com sabor agridoce. Apresenta de uma a quatro sementes (ANDERSEN, 1989; GOMES, 2007). A espécie *M. cauliflora* é conhecida popularmente como “jabuticabeira”, “jabuticaba”, “jabuticaba paulista”, “jabuticaba-açu”, “jabuticaba-do-mato” e “jabuticaba-sabará” (CITADIN; DANNER; SASSO,

2010). É uma espécie frutífera que desperta grande interesse em produtores rurais de várias regiões no Brasil, por apresentar alta produtividade, rusticidade e aproveitamento dos frutos de várias formas diferentes (BRUNINI *et al.*, 2004).

Os frutos de *M. cauliflora* são coletados ainda de maneira extrativista e comercializados livremente, sempre com grande aceitação popular. O período de comercialização é relativamente curto e estudos indicaram que, em apenas dois dias após a colheita, ocorre uma rápida alteração da aparência e do sabor decorrente da intensa perda de água o que resulta em deterioração e fermentação da polpa (BARROS, R. S.; FINGER; MAGALHAES, 1996; BRUNINI *et al.*, 2004).

Diversas atividades biológicas são relatadas para os frutos de *M. cauliflora* como: atividade antioxidante, que pode ser atribuída principalmente às antocianinas presentes no epicarpo (REYNERTSON, KURT A; BASILE; KENNELLY, 2005; LEITE *et al.*, 2011), efeitos hipoglicemiantes e hipolipidemiantes (LENQUISTE *et al.*, 2012) e atividade anti-inflamatória (REYNERTSON, K. A. *et al.*, 2006). As folhas e cascas de *M. cauliflora* são adstringentes e o decocto é empregado popularmente em diarreia e irritações de pele (SOUZA, 2007). MACEDO-COSTA *et al.* (2009) investigaram a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *M. cauliflora* contra bactérias formadoras do biofilme dental (*Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *Lactobacillus casei*) e os resultados encontrados mostraram a eficácia do extrato quando comparado a clorexidina.

As propriedades biológicas encontradas para *M. cauliflora* podem ser atribuídas principalmente à vasta quantidade de compostos polifenólicos presentes nessa espécie. Dentre esses compostos, além das antocianinas (glicosídeos penidínicos) e agliconas (cianidinas), destacam-se taninos, isoquercitrina, miricetina e ácido elágico (REYNERTSON, K. A. *et al.*, 2008; LANDETE, 2011; WU, S. B. *et al.*, 2012; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

O ácido elágico e os elagitaninos (Figura 1) podem ser encontrados em vários outros frutos comestíveis (LANDETE, 2011; BERNI *et al.*, 2012) e são considerados promissores constituintes da dieta na prevenção de várias doenças degenerativas. Esses compostos apresentam diversas atividades biológicas como: antioxidante, atuando também na prevenção da peroxidação lipídica (MAJID *et al.*, 1991; PRIYADARSINI *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2011), proteção vascular (LARROSA *et al.*, 2010), atividade anti-inflamatória (MARÍN *et al.*, 2013), anticâncer (LARROSA; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2006), antiaterosclerótica (YU *et al.*, 2005; AVIRAM *et*

*al.*, 2008), anti-hepatotóxica (LIN *et al.*, 2001) e antibacteriana (AKIYAMA *et al.*, 2001). O ácido elágico é uma substância originária da hidrólise (ácida ou básica) de elagitaninos, que promove a formação do intermediário ácido hexaidroxidifênico, que sofre uma reação espontânea de lactonização, resultando em ácido elágico (Figura 1) (DANIEL *et al.*, 1989; LANDETE, 2011). Além disso, elagitaninos podem ser metabolizados pela microbiota do trato gastrointestinal humano e outros animais resultando na liberação de ácido elágico, conforme mostra a Figura 2 (CERDÁ *et al.*, 2003).

*Myrciaria cauliflora* também contém outras substâncias antioxidantes, além dos compostos polifenólicos, como por exemplo, ácido ascórbico (VIEITES *et al.*, 2011; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

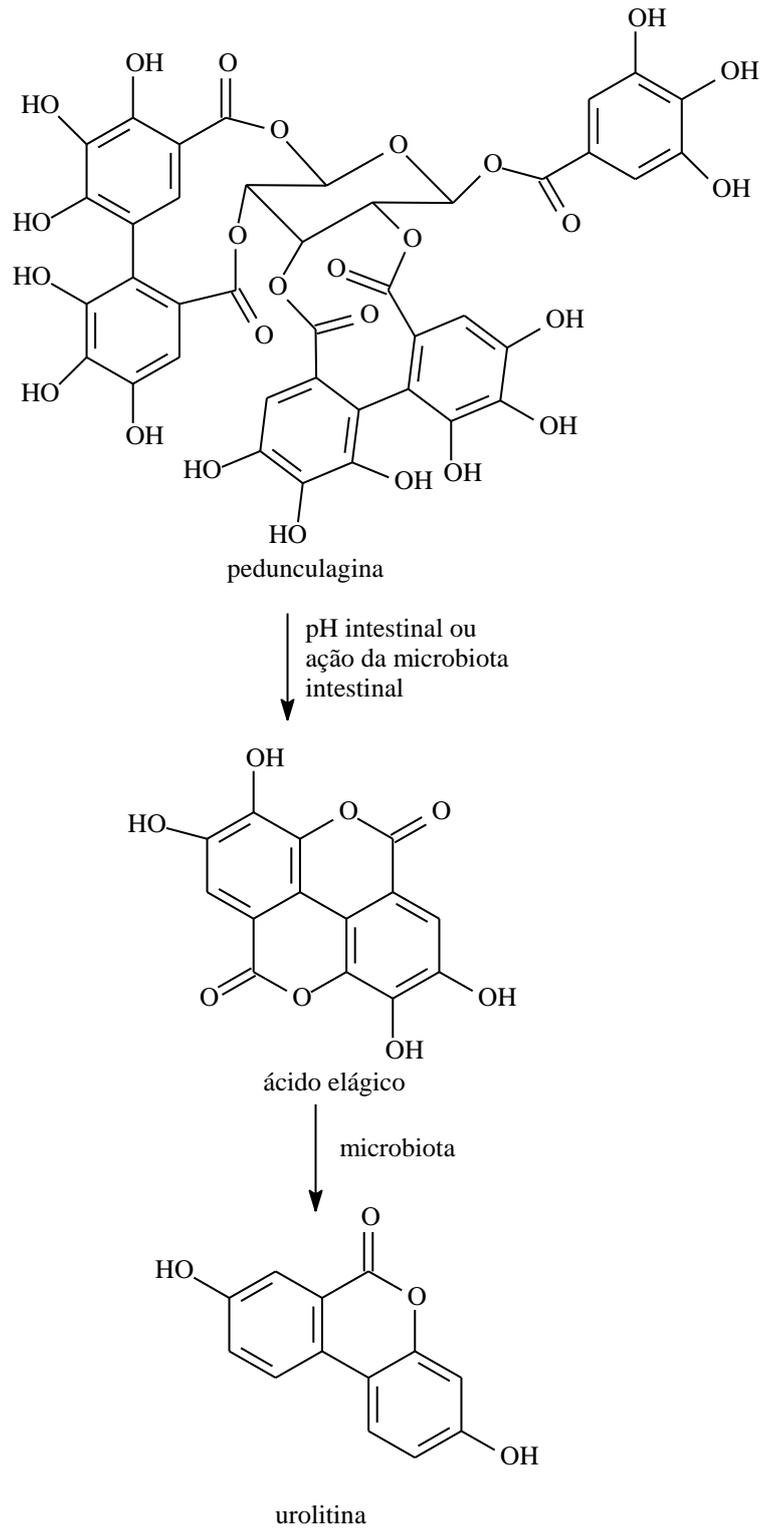
A importância industrial dos frutos da jabuticabeira tem sido relatada por diversos autores. É possível encontrá-los beneficiados na forma de sucos, sorvetes, fermentados, destilados, geleias, compotas, licor e vinagre. Também podem ser utilizadas na fabricação de fermentados e destilados (OLIVEIRA, A. L. *et al.*, 2003; VIEITES *et al.*, 2011; WU, S.-B.; LONG; KENNELLY, 2013).

Na industrialização, as cascas e sementes são desprezadas representando aproximadamente uma perda de 50% do fruto. Uma parte desse resíduo usualmente é utilizada *in natura* como alimentação animal, mas a maior parte é descartada ou usada em compostagem.

Considerando a variedade de substâncias úteis e de alto valor agregado presentes nesse resíduo [por exemplo, o preço de 1 Kg de ácido elágico (grau técnico) pode variar desde US\$999 a US\$1.500], um melhor aproveitamento desses subprodutos agregaria valor comercial e evitaria problemas ambientais gerados pelo seu descarte no solo (GUO *et al.*, 2003; SOONG; BARLOW, 2004). As cascas ricas em corantes naturais poderiam ser utilizadas como matéria-prima pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética (OLIVEIRA, A. L. *et al.*, 2003), como matéria-prima para o isolamento de fitofármacos, ou na forma de extratos padronizado, da mesma forma que é possível encontrar no mercado diversos fornecedores de extratos de romã padronizados em ácido elágico, por exemplo.

Apesar do potencial existente nos resíduos de jabuticaba, ainda existem poucos estudos que investigam o potencial de reaproveitamento dessa matéria-prima.





**Figura 2.** Metabolismo de elagitaninos e ácido elágico no trato gastrointestinal de mamíferos.

ASQUIERI; SILVA; CANDIDO (2009) desenvolveram um método de reaproveitamento de cascas e borra de jabuticaba que passaram por processo de

fermentação para a produção de aguardente. SILVA *et al.* (2014) realizaram um estudo com resíduo de jabuticaba para produção de pigmentos com propriedades funcionais por meio da técnica de *spray-drying*, utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem, e o produto resultante mostrou atividade antioxidante, antimicrobiana e também atividade inibidora da arginase, uma enzima produzida pelo protozoário *Leishmania amazonensis*.

Por meio da caracterização e padronização do extrato seco, as potencialidades dos resíduos gerados pelo processo de fermentação da jabuticaba podem ser aproveitadas de forma mais racional, valorizando assim todos os elos da cadeia produtiva. Dessa forma, tornam-se necessárias e imediatas a valorização das potencialidades e a visibilidade das possibilidades de utilização e exploração econômica dos resíduos agroindustriais, que acenam com amplo espectro de uso e que ainda não estão sendo exploradas comercialmente de forma racional. Neste contexto, é importante desenvolver e otimizar processos de extração e secagem para a obtenção de extratos secos padronizados com amplo espectro de aplicações nas áreas farmacêutica, alimentícia e cosmética.

## **1.2 Justificativa**

A exploração de subprodutos do processamento de frutas e vegetais como fonte de compostos funcionais e sua aplicação em alimentos é um campo promissor, devido à grande variedade de espécies vegetais contendo categorias de compostos com atividade biológica comprovada. Esses subprodutos são parcialmente aproveitados na fabricação de ração animal, mas a maior parte do resíduo é descartada ou utilizada em compostagem.

Existe a necessidade de explorar um possível aproveitamento do resíduo de jabuticaba, proveniente da agroindústria, com a finalidade de diminuir o impacto ambiental ocasionado pelo descarte deste subproduto e conseqüentemente, atender às Boas Práticas de Fabricação na Indústria de Alimentos exigidas pela legislação sanitária, ambiental e do mercado consumidor. Além disso, o conhecimento do valor nutricional dos subprodutos da jabuticaba e do potencial antioxidante contribui para agregar valor à cadeia produtiva desse fruto nativo. E tal aproveitamento atente às políticas públicas relacionadas a plantas medicinais e fitoterápicos, bem como ao Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Os processos para a total utilização dos subprodutos resultantes do processamento de alimentos em larga escala e de forma viável devem ser desenvolvidos e otimizados, contribuindo de forma decisiva para o setor de alimentos, resultando em produção sustentável.

Outro ponto importante consiste no interesse que vem aumentando nos últimos anos por produtos com atividade antioxidante e funcional. A indústria de produtos naturais e orgânicos, em 2010, foi uma das que mais cresceram mundialmente, movimentando cerca de US\$3.000 bilhões. Esse montante inclui alimentos funcionais e suplementos alimentares, que cresceram naquele ano, 4,8% e 5,4%, respectivamente (NBJ, 2012). Em 2013, de acordo com a *IndustryARC*, o mercado mundial de alimentos funcionais movimentou cerca de US\$175 bilhões. Com uma taxa média de crescimento anual de cerca de 15%, a previsão é que as vendas nesse mercado ultrapassem US\$230 bilhões em 2015 (INDUSTRYARC, 2013).

Assim, agregar valor a produtos genuinamente nacionais, com grande apelo de mercado, tem grande importância para o desenvolvimento da indústria farmoquímica e de alimentos brasileira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Obter extratos secos padronizados em compostos fenólicos a partir de resíduos das cascas de jaboticaba - *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae).

### 2.2. Objetivos específicos

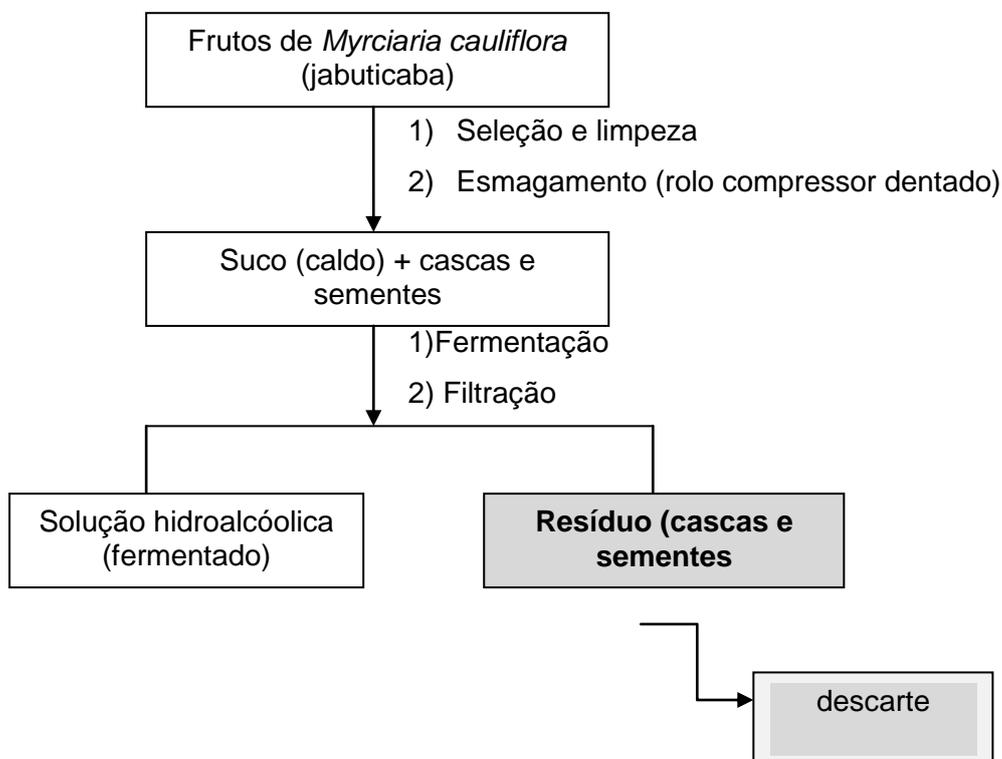
- Processar e caracterizar os resíduos de cascas de jaboticaba provenientes da Vinícola Jaboticabal, localizada no município de Hidrolândia, Goiás;
- Desenvolver um método analítico para a identificação e quantificação de ácido elágico nos resíduos e produtos obtidos destes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC);
- Obter, concentrar e caracterizar extratos líquidos a partir do material processado;
- Obter o extrato seco a partir dos resíduos das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg através de secagem por nebulização (*spray-dryer*);
- Aplicar o Planejamento fatorial para a obtenção de extratos secos com melhores características;
- Padronizar e avaliar as características do extrato seco padronizado obtido.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO RESÍDUO

A produção do fermentado de jabuticaba envolve frutos de *Myrciaria* sp. que, após as etapas de seleção e limpeza, são esmagados e o suco resultante transferido para tanques de aço inox com capacidade de 500 L, onde ocorre a fermentação. A matéria-prima utilizada nesse trabalho foi o subproduto resultante da produção de fermentado de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg.], composto predominantemente de cascas dos frutos (Figura 3), gentilmente cedido pela Vinícola Jabuticabal, localizada no município de Hidrolândia-GO (16° 55' 32.35" S 49° 21' 39.76" W). Após a coleta dos resíduos, o material vegetal foi dessecado a 40 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas com tamis número 100 (150 µm) e o pó resultante do material vegetal devidamente acondicionado em sacos plásticos e armazenados a uma temperatura de -10°C.



**Figura 3.** Esquema para a obtenção do subproduto (cascas) de jabuticaba a partir da fermentação de frutos de *Myrciaria cauliflora*.

## **3.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

### **3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais**

Uma amostra de 3 g da material foi pesada em balança analítica e transferida para um cadinho, previamente calcinado em mufla a 450° C. A amostra foi uniformemente distribuída no cadinho e incinerada a temperatura de 450 °C durante 4h, resfriada em dessecador e novamente pesada (BRASIL, 2010). O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação à amostra seca ao ar conforme fórmula abaixo:

$$\text{Teor de cinzas totais (\%)}=100 \times N/P$$

Onde:

N – massa de cinzas totais da amostra em gramas;

P – massa da amostra em gramas.

### **3.2.2 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido**

Os resíduos obtidos na determinação do teor de cinzas totais foram fervidos durante 5 min com 25 mL de HCl 10% (V/V) em cadinhos cobertos com vidros de relógio. O resíduo foi filtrado em papel de filtro quantitativo, os cadinhos e os vidros de relógio foram lavados com água quente. O papel de filtro contendo o resíduo foi lavado com água quente até o filtrado tornar-se neutro (BRASIL, 2010).

O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original o qual foi aquecido em chapa elétrica para secagem do resíduo. Em seguida, o cadinho contendo o resíduo foi transferido para mufla, incinerando-se o resíduo por 4 h, a 500°C, até a obtenção de cinzas brancas. O cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido clorídrico foi calculada em relação à amostra inicial, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Teor de cinzas insolúveis em ácido (\%)}=100 \times \text{RI/N}$$

Onde:

RI – massa de cinzas insolúveis obtido após incineração;

N – massa de cinzas totais da amostra em gramas.

### **3.2.3 Determinação da distribuição granulométrica**

Uma amostra de 20 g do material vegetal pulverizado foi vertido sobre um grupo de tamises de aço inox previamente pesados, de malhas 710, 355, 250, 180 e 125 mesh, providos de tampa e recipiente para a coleta do pó. Os tamises foram submetidos a vibrações em velocidade padronizada nível 5 durante 20 min em tamis vibratório (Bertel<sup>®</sup>). Posteriormente, as massas de pó, retidas em cada um dos tamises, foram pesadas separadamente. O percentual de pó em relação a cada tamis foi calculado e o pó foi classificado de acordo com os parâmetros da Farmacopeia Brasileira 5ª edição. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em % (m/m) das médias (BRASIL, 2010).

### **3.2.4 Determinação do teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade foi utilizada uma balança com elemento de aquecimento halógeno marca Ohaus<sup>®</sup> modelo MB35. Cerca de 0,5 g de amostra foi submetido a aquecimento a 105 °C até peso constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre a massa inicial e a massa final. O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de umidade foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Teor de umidade (\%)}=100 \times \text{MF/MI}$$

Onde:

MV – Massa final;

MI – Massa inicial.

### 3.2.5 Determinação do Índice de Intumescência

Uma amostra de 1 g do material vegetal foi colocada em uma proveta de 25 mL com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. O volume ocupado pelo pó foi medido. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água destilada e a proveta foi agitada a cada 10 min durante 1h. Após repouso de 3 h à temperatura ambiente (22°C), foi verificado o volume final ocupado pelo material vegetal (BRASIL, 2010). O experimento foi realizado em triplicata. O índice de intumescência foi obtido de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de intumescência} = (V_2 - V_1) / V_1$$

Onde:

$V_1$  = volume inicial do pó

$V_2$  = volume final do pó

### 3.2.6 Prospecção fitoquímica

A análise qualitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes nos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* foi realizada na amostra pulverizada, por meio de técnicas específicas descritas por MATOS, F. J. A. (1988), MATOS, F. M. D.; MATOS (1989) e COSTA (2001).

#### 3.2.6.1 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Para avaliar a possível presença de heterosídeos antraquinônicos, 1 g da amostra pulverizada foi transferido para um erlenmeyer e 30 mL de etanol a 75% (V/V) foram acrescentados. A mistura foi aquecida durante 3 min em chapa aquecedora e, em seguida, filtrada ainda quente através de papel de filtro.

Para a caracterização dessa classe de metabólitos secundários, 10 mL do filtrado foram transferidos para um béquer de 40 mL que foi designado (I) e 10 mL para outro béquer que foi designado (II). O conteúdo do béquer (I) foi acidificado

com 0,5 mL de solução de HCl 10% (V/V) e levado à fervura por 2 min em chapa aquecedora. O mesmo procedimento foi realizado com o béquer (II), exceto a acidificação.

Os filtrados foram transferidos para tubos de ensaio designados (I) e (II), respectivamente e, após o resfriamento, foram adicionados 10 mL de hexano P. A. a cada um, com leve agitação. Em seguida, 5 mL da fase hexânica dos tubos (I) e (II) foram separadas nas quais foram acrescentados 4 mL de solução NH<sub>4</sub>OH 50% (V/V), e os tubos foram mantidos em repouso por 5 min. A formação de coloração do róseo ao vermelho na fase amoniacal caracteriza reação positiva para heterosídeos antraquinônicos.

### 3.2.6.2 Pesquisa de heterosídeos digitálicos

Para avaliar a possível presença de heterosídeos digitálicos na amostra, 2,5 g da amostra pulverizada foram transferidos para um béquer. Em seguida, 25 mL de solução hidroetanólica 50% (V/V) e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10% (p/V) foram adicionados e a mistura foi levada à fervura por 4 min. Após o resfriamento, o volume foi completado para 25 mL com solução hidroetanólica 50% (V/V) e filtrado. O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído por 2 vezes com 15 mL de clorofórmio P. A. A fração clorofórmica foi utilizada nas reações de pesquisa de heterosídeos digitálicos descritas abaixo:

*Reação de Liebermann-Burchard (reação de caracterização do núcleo esteroideal):* Uma alíquota de 3 mL da fração clorofórmica foi transferida para um tubo de ensaio e levada à secura em banho-maria. Ao resíduo do tubo, foi adicionado 1 mL do reagente de Liebermann-Burchard recém-preparado (1 mL de clorofórmio P. A., 1 mL de anidrido acético P. A. e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado). A mistura foi mantida em repouso por 5 min para observação da formação de coloração. O aparecimento de cor do acastanhado ao esverdeado indica reação positiva.

*Reação de Pesze (caracterização do núcleo esteroideal):* Uma alíquota de 3 mL da fração clorofórmica foi evaporada à secura numa cápsula de porcelana, em chapa aquecedora. Ao conteúdo da cápsula, após resfriamento, foram adicionadas 3–6 gotas de ácido fosfórico concentrado e a mistura foi homogeneizada. A solução foi

observada sob luz ultravioleta: o aparecimento de fluorescência verde-amarelada indica reação positiva.

*Reação de Keller-Kiliani (detecção de desóxi-açúcares):* Uma alíquota de 5 mL da fração clorofórmica foi transferida para tubo de ensaio e evaporada à secura, em banho-maria. Ao resíduo, foi adicionado o reagente recém preparado [3 mL de ácido acético glacial P. A. e 0,1 mL de cloreto férrico 9% (p/V)]. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e lentamente vertido para outro tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de um anel de coloração castanho-avermelhada na zona de contato e/ou o aparecimento de coloração azul-esverdeada na camada acética são indicativos da presença de desóxi-açúcares..

*Reação de Kedde (reação específica para anel lactônico):* Uma alíquota de 6 mL da fração clorofórmica foi transferida para um tubo de ensaio e levada à secura em banho-maria. Ao resíduo do tubo foram acrescentados 2 mL de solução hidroetanólica 50% (V/V), 2 mL de água, 2 mL do reagente de Kedde recém-preparado [solução etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico 1% (p/V) e 2 mL de hidróxido de potássio 1:10]. Após repouso de 5 min, o desenvolvimento de uma coloração castanho-avermelhada a vermelho-violeta indica reação positiva.

### 3.2.6.3 Pesquisa de heterosídeos flavonoides

Para avaliar a possível presença de heterosídeos flavonoides na amostra pulverizada, 7 g da amostra foi transferida para um béquer e 60 mL de solução hidroetanólica 70% (V/V) foram adicionados. A mistura foi levada a ebulição durante 5 min e filtrada em papel de filtro umedecido com solução hidroetanólica 70% (V/V).

O filtrado obtido foi, então, utilizado nas seguintes reações a fim de caracterizar essa classe de metabólitos secundários:

*Reação com cloreto férrico:* Uma alíquota de 3 mL da solução extrativa foi transferida para um tubo de ensaio e adicionada de 2 gotas de cloreto férrico a 4,5% (p/V). O aparecimento de coloração verde, amarela ou enegrecida indica reação positiva para compostos fenólicos.

*Reação com ácido sulfúrico concentrado:* Uma alíquota de 3 mL da solução extrativa foi vertida em uma cápsula de porcelana e deixada a evaporar até estado xaroposo (semi-secura). Ao resíduo foi adicionado 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e a

solução foi observada sob luz ultravioleta: o aparecimento de fluorescência é indicativo da presença de flavonoides.

*Reação com hidróxidos alcalinos:* Uma alíquota de 3 mL da solução extrativa foi transferida para um tubo de ensaio e adicionada de 1 mL de NaOH a 20% (p/V) sob agitação. A presença de heterosídeos flavônicos na amostra leva ao desenvolvimento de coloração amarela.

*Reação de Shinoda:* Uma alíquota de 3 mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio. Cerca de 1 cm de fita de magnésio fina foi adicionada à solução e 1 mL de HCl concentrado foi cuidadosamente acrescentado. A presença de heterosídeos flavonoides na amostra é observada pelo aparecimento de coloração vermelha (flavonol), laranja (flavona) ou violeta (flavanona).

*Reação oxalo-bórica:* Uma alíquota de 5 mL da solução extrativa foi evaporada em uma cápsula de porcelana. Ao resíduo semi-seco foram adicionados 3 mL de solução de ácido bórico 3% (p/V) e 1 mL de solução de ácido oxálico 10% (p/V). A mistura foi evaporada até seca e ao resíduo seco foram adicionados 7 mL de éter etílico P. A. A solução foi observada sob luz ultravioleta: quanto a ocorrência fluorescência amarelo-esverdeada, indicativo da presença de flavonóis.

*Reação com cloreto de alumínio:* Uma alíquota de 5 mL da solução extrativa foi transferida para um béquer ou cápsula de porcelana e o volume foi reduzido à metade, em banho-maria. Um pedaço de papel de filtro foi embebido com a solução concentrada espalhando sobre toda a superfície. A seguir, uma das regiões do papel foi adicionada de solução de cloreto de alumínio 5% (p/V) e observada sob luz ultravioleta: aparecimento de fluorescência ou intensificação da mesma na região contendo o reagente é indicativo da presença de flavona, flavonol ou isoflavona (amarela), chalcona (amarela ou violeta).

#### **3.2.6.4 Determinação do índice de espuma**

Para avaliar a possível presença de heterosídeos saponínicos na amostra pulverizada, 1 g da amostra foi transferido para um béquer e 100 mL de água fervente foram adicionados. A mistura foi mantida sob fervura em chapa aquecedora durante 30 min. Em seguida, a mistura foi resfriada e filtrada em papel de filtro para

balão volumétrico de 100 mL. A extração do mesmo material foi repetida utilizando porções de 10 mL de água fervente até completar o volume de 100 mL.

Para a caracterização dessa classe de metabólitos secundários uma bateria contendo 10 tubos de ensaio de tamanhos e diâmetros iguais foi preparada. Os tubos de ensaio foram marcados em duas graduações diferentes: a primeira correspondente a 10 mL e a segunda 1 cm acima desta. Em seguida, foi adicionado ao primeiro tubo 1 mL de solução extrativa e 9 mL de água destilada. Ao segundo tubo, 2 mL de solução extrativa e 8 mL de água destilada. Ao terceiro tubo 3 mL de solução extrativa e 7 mL de água destilada e assim sucessivamente até o décimo tubo (10 mL da solução extrativa). Cada tubo foi vigorosamente agitado com movimentos verticais por 15 s e deixados em repouso por 15 min. Decorrido este tempo a altura da espuma formada em cada tubo foi medida.

O índice de espuma (IE) foi definido na maior diluição capaz de formar 1 cm de espuma persistente e calculado pela fórmula:

$$IE = 1000/a$$

Onde:

a = volume (mL) do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada (menor volume capaz de formar 1 cm de espuma) (BRASIL, 2010).

### **3.2.6.5 Pesquisa de taninos**

Para avaliar a possível presença de taninos na amostra pulverizada, 2 g da amostra foram transferidos para um béquer e 50 mL de água destilada foram adicionados. A mistura foi levada à fervura durante 5 min. Em seguida, a mistura foi filtrada ainda quente, utilizando papel de filtro. O volume do filtrado obtido foi completado para 100 mL e a solução foi utilizada para os ensaios.

Uma bateria contendo cinco tubos de ensaio foi preparada e a cada tubo foram adicionados 5 mL da solução extrativa:

*Reação com gelatina:* ao primeiro tubo foram adicionadas 5 gotas de solução de gelatina 2,5% (p/V) em solução de cloreto de sódio a 5% (p/V). A presença de taninos na amostra é evidenciada pelo aparecimento de precipitado branco.

*Reação com alcaloides:* se ao segundo tubo foram adicionadas 5 gotas de solução de sulfato de quinino 1% (p/V). A presença de precipitado é indicativo de presença de taninos na amostra.

*Reação com sais metálicos:* ao terceiro tubo foram adicionadas 5 gotas de acetato de cobre 4% (p/V). O aparecimento de precipitado indicaria presença de taninos. Ao quarto tubo foram adicionadas duas gotas de cloreto férrico a 2% (p/V). O aparecimento de cor azul ou violeta intenso é indicativa da presença de compostos fenólicos.

*Reação com hidróxidos alcalinos:* Ao quinto tubo foram adicionadas 5 gotas de solução de hidróxido de sódio ou potássio a 20% (p/V). A presença de taninos na amostra seria observada pelo escurecimento da solução.

Como controle positivo, para cada uma dessas reações, paralelamente, foi preparado um tubo contendo 5 mL de ácido tânico 0,5% (p/V) e os reagentes da reação correspondente

### **3.2.6.6 Pesquisa de alcaloides**

Para avaliar a possível presença de alcaloides na amostra pulverizada, 2 g da amostra foram transferidos para um béquer e adicionados de 20 mL de ácido sulfúrico a 5% (V/V). Essa mistura foi levada à fervura por 3 min e, em seguida, filtrada em papel de filtro e resfriada. O filtrado foi transferido para um funil de separação e alcalinizado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% (V/V). Em seguida a solução alcalina foi extraída com duas porções de 10 mL de clorofórmio. A fração clorofórmica foi separada e filtrada em algodão. O solvente foi eliminado do novo filtrado o sob vácuo, e o resíduo foi dissolvido em 2 mL de ácido sulfúrico a 5% (V/V).

Esse resíduo dissolvido foi submetido à pesquisa de alcaloides utilizando os reagentes gerais de acordo com metodologia adaptada de COSTA (2001). Alíquotas da solução extrativa foram distribuídas em seis lâminas de vidro (2-3 gotas), sendo que em cada lâmina, respectivamente, foram acrescentadas 3–6 gotas dos reativos gerais para alcaloides (Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff, Reativo de

Bouchardat, Reativo de Bertrand e Reativo de Hager). Como controle positivo, outra bateria de seis lâminas de vidro foi preparada, contendo 2-3 gotas de solução padrão de sulfato de quinino 1% (p/V), sendo submetida à mesma sequência de reação. *Reagente de Mayer*: solução A: contendo 1,36 g de cloreto mercúrico em 60 mL de água. Solução B: solução contendo 5 g de iodeto de potássio em 20 mL de água. Misturar as duas soluções na proporção 1:1, no momento de uso. A formação de precipitado branco é indicativo de alcaloide.

*Reagente de Bouchardat*: solução de 4 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo ressublimado em 100 mL de água. Formação de precipitado alaranjado é indicativo de alcaloide

*Reagente de Dragendorff*: solução A: contendo 8 g de subnitrito de bismuto em 20 mL de ácido acético. Solução B: contendo 27,2 g de iodeto de potássio em 50 mL de água. Misturar as duas soluções na proporção 1:1, no momento de uso. A formação de cor ou precipitado alaranjado é indicativo de alcaloide.

*Reagente de Bertrand*: solução aquosa de ácido sílico-túngstico 5% (p/V). O aparecimento de precipitado branco é indicativo de alcaloides.

*Reagente de Hager*: solução aquosa de ácido pícrico 2% (p/V). O aparecimento de precipitado bege é indicativo de alcaloides.

### **3.3 Análises quantitativas**

#### **3.3.1 Doseamento de fenóis totais (FT)**

Para a determinação quantitativa de compostos fenólicos totais presentes nos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* foi utilizado o método de HAGERMAN; BUTLER (1978) adaptado (WATERMAN; MOLE, 1987). Nesse método a reação de complexação do cloreto férrico com fenóis produz coloração que pode ser medida a 510 nm.

No processo extrativo utilizando refluxo, 1 g do material vegetal pulverizado foi transferido para um erlenmeyer e 150 mL de água destilada foram adicionados. A mistura foi aquecida até a fervura e mantida sob refluxo entre 80 °C e 90°C durante 30 min. O extrato aquoso resultante foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 250 mL, onde teve seu volume completado com água destilada. A

mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo, sendo desprezados os 50 mL iniciais.

Para o processo extrativo por ultrassom, 0,1 g do material vegetal foi submetido a extração por 10 mL de água destilada durante 10 min em banho de ultrassom. Posteriormente o resíduo gerado na primeira extração foi separado e submetido a nova extração durante 10 min com mais 10 mL de água destilada, juntando-se o primeiro ao segundo filtrado. Finalmente o resíduo foi submetido ao mesmo método extrativo por 10 min com 5 mL de água. O último filtrado foi transferido para o mesmo balão dos dois primeiros, resultando em um volume de 25 mL utilizado na quantificação de fenóis totais.

Para a quantificação de fenóis totais no extrato concentrado obtido por percolação, 1 mL desse extrato foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL que teve seu volume completado com água destilada. Essa solução foi diluída novamente 50 vezes antes de ser submetida à quantificação. Todos os experimentos para a quantificação de fenóis foram realizados em triplicata.

Em um tubo de ensaio foram acrescentados 2 mL de solução de laurilsulfato de sódio/trietanolamina, 1 mL da solução de cloreto férrico e 1 mL de cada do extrato preparado (o procedimento foi aplicado aos três tipos de extrato descritos anteriormente). Após 15 min de repouso, a leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm. O “branco” foi preparado com a seguinte composição: 2 mL de laurilsulfato de sódio/trietanolamina, 1 mL da solução de cloreto férrico e 1 mL de água destilada.

A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mg/mL. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de fenóis totais no extrato aquoso e a porcentagem presente no material vegetal pulverizado, a partir das seguintes fórmulas.

Onde:

A= Coeficiente linear

ABS= Absorbância

B= Coeficiente angular

C= Concentração de ácido tânico em mg/mL

V=Volume do frasco utilizado no preparo do extrato

FT= Teor de fenóis totais

$$C = \frac{ABS - A}{B}$$

$$FT(\%) = \frac{C \times V \times 10^{-3} \times 100}{m(g)}$$

### **3.3.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por CLAE**

As análises foram realizadas usando-se um Sistema Cromatográfico da marca Waters® modelo HPLC Alliance® com módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodo (DAD) 2998 e sistema de processamento de dados Enpower 3. As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna Zorbax eclipse XDB 5 µ C18, 250X4.6 mm. A fase móvel empregada foi uma mistura de metanol/ água (60:40), com fluxo isocrático de 0,5 mL/min por 10 min, e detecção a 252 nm. Os seguintes parâmetros foram analisados na validação do método de quantificação do ácido elágico. Os ensaios de validação foram realizados com a solução padrão de ácido elágico com concentração de 0,025 mg/mL.

#### **3.3.2.1 System suitability**

Antes da execução da validação, todo o sistema cromatográfico utilizado para a análise foi avaliado para verificar a capacidade do sistema em fornecer resultados reprodutíveis. Esta avaliação foi alcançada com experimentos de conformidade do *system suitability*, que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis.

A metodologia foi validada quanto aos parâmetros analíticos de especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez, seguindo os parâmetros e critérios de aceitação baseados na RE n° 27/12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e USP-FDA (BRASIL, 2010; FDA, 2010).

#### **3.3.2.2 Especificidade**

A especificidade do método foi avaliada através da identificação do ácido elágico na amostra por comparação entre os tempos de retenção e espectro de absorção ultravioleta dos picos obtidos na amostra e no padrão de referência, com

base nos critérios de aceitação da RE nº 27/12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e US-FDA (FDA, 2010; BRASIL, 2012).

### 3.3.2.3 Linearidade e Intervalo

Para a construção da curva-padrão, foram preparadas 7 soluções nas concentrações: 0,025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,0125, 0,015 e 0,025 mg/mL de ácido elágico. As soluções padrão foram filtradas em membrana de 0,45 µm Millex® e injetadas, em triplicata, no cromatógrafo, em volume de 20 µL. As médias das áreas de cada concentração dos marcadores foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por  $y = a + bx$ , onde o coeficiente angular ( $a$ ) é a inclinação da reta em relação ao eixo  $x$  e o coeficiente linear ( $b$ ) é a interseção da reta com o eixo  $y$ . Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

### 3.3.2.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente. Para a determinação desses parâmetros foi utilizada uma solução do padrão de ácido elágico com concentração de 0,025 mg/mL.

$$\text{Equação 1} \quad \text{LD} = (Dp \times 3) / IC$$

$$\text{Equação 2} \quad \text{LQ} = (Dp \times 10) / IC$$

Onde:

LD= limite de detecção

LQ = limite de quantificação

Dp= desvio padrão do intercepto com o eixo do  $y$  de 3 curvas das 3 curvas padrão

IC= inclinação da curva padrão

### 3.3.2.5 Precisão

Para a avaliação da precisão, a repetibilidade (precisão intracorrída) e a precisão intermediária (precisão intercorrídas) foram determinadas. Por meio do coeficiente de variação (CV) foi possível estabelecer esses parâmetros. Para a repetibilidade foram preparadas um total de nove soluções, contendo 100 mg do material vegetal em 5 mL de metanol e levados a extração por ultrassom durante 30 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm e filtradas em membranas de 0,45 µm Millex<sup>®</sup> e amostras de 10 µL foram injetadas em triplicata no equipamento.

A precisão intermediária foi executada por diferentes analistas e em dias diferentes, com o preparo das amostras respeitando as condições anteriores.

### 3.3.2.6 Exatidão

Para a avaliação da exatidão, triplicatas de 80 mg, 100 mg e 120 mg do material vegetal foram adicionadas volumetricamente em 5 mL de metanol. Após o término da preparação, foram contaminadas com solução padrão de 4 µg/mL de ácido elágico 1:1(v/v). Em seguida foram filtradas em membrana de 0,45 µm Millex<sup>®</sup> e amostras de 10 µL foram injetadas em triplicata no equipamento. A percentagem do erro relativo foi utilizada para a determinação da exatidão.

### 3.3.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada variando o fluxo da fase móvel (0,4 e 0,6 mL/min), coluna (Waters<sup>®</sup>, 5 µm C18, 250X4.6 mm) e a composição da fase móvel (metanol:água na proporção de 62:38). Os resultados foram comparados àqueles obtidos nas condições descrita no item 3.3.2 (página 25). A robustez foi expressa através do coeficiente de variação entre os teores médios dos marcadores na amostra.

### 3.3.3 Determinação da atividade antioxidante (AAO)

A determinação da atividade antioxidante do material vegetal foi realizada por meio da avaliação da capacidade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme metodologia de BRAND-WILIAMS; CUVELIER; BERSET (1995), com algumas modificações. O método é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, o que desencadeia um decréscimo da absorbância a 515 nm. Inicialmente foi preparada a solução controle constituída de metanol 50%: acetona 70%: água destilada (4:4:2 v/v). Para o preparo da solução de DPPH, 2,4 mg desse radical livre foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol, resultando em uma concentração de 0,06 mM (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

A solução para análise foi obtida a partir de um extrato do material vegetal, preparado adicionando 0,25 g do material pulverizado dos resíduos das cascas de jabuticaba em um erlenmeyer contendo 20 mL de metanol 50%. Após 1h de agitação em mesa agitadora a 60 r.p.m., a mistura foi filtrada e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. O resíduo passou pelo mesmo processo por mais 1 h. Após reunir o primeiro ao segundo filtrado, o volume foi completado para 50 mL com água destilada (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997; RUFINO *et al.*, 2007).

A curva para a determinação da concentração capaz de inibir 50% dos radicais DPPH (IC<sub>50</sub>) foi construída transferindo-se as alíquotas de 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL e 100 µL do extrato obtido conforme descrito anteriormente para tubos de ensaio com 3,9 mL de solução de DPPH 0,06 mM. Posteriormente os volumes de todos os tubos foram completados para 4 mL com metanol e homogeneizados. Após 30 min em repouso e ao abrigo da luz, a avaliação foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro/SP22) no comprimento de onda 515 nm, utilizando metanol como "branco". Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Uma solução de BHT (butilato de hidroxitolueno) com concentração 2,5 mg/mL foi preparada para ser empregada como controle positivo e o valor de IC<sub>50</sub> também foi determinado.

Para as amostras de extratos secos obtidos por atomização, a comparação entre as atividades antioxidantes foi realizada através da porcentagem de captura de radicais DPPH e não através do valor de IC<sub>50</sub>.

A atividade sequestradora do radical livre DPPH para cada solução foi determinada pela porcentagem de inibição conforme a equação seguinte:

$$AAO = 100 - \frac{(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100}{A_{controle}}$$

Onde:

*Aamostra*=Absorbância da amostra;

*Abranco*=Absorbância do branco;

*Acontrole*=Absorbância do controle.

### **3.4 Obtenção e caracterização do extrato líquido de resíduos de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora***

#### **3.4.1. Extração utilizando ultrassom**

O processo de otimização do método extrativo por ultrassom foi conduzido por dois planejamentos Box-Behnken com três pontos centrais cada. Foram avaliadas a influência do tempo de extração - X<sub>1</sub> (min), proporção sólido/solvente - X<sub>2</sub> (mg/mL) e teor alcoólico - X<sub>3</sub> (% v/v), na quantificação de ácido elágico por CLAE e atividade antioxidante.

Valores de massa de 120, 150 e 180 mg foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL contendo soluções hidroalcoólicas conforme definidas pelos níveis dos planejamentos A e B (Tabela 1) e posteriormente submetidos a extração em banho de ultrassom.

Para comparar o rendimento da extração por ultrassom, também foi realizada uma extração com 0,75 g do sólido vegetal em água destilada sob refluxo a 90°C durante 30 min.

Para análise estatística foi utilizado o STATISTICA 7.0, na análise dos dados empregou-se técnica de análise de variância (ANOVA) .

Os fatores e respectivos níveis com valores codificados e decodificados estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Fatores codificados e seus níveis nos planejamentos Box-Behnken A e B, para o método de extração de resíduo de cascas de *Myrciaria cauliflora* por ultrassom.

Planejamento A			
Fatores	Níveis		
	-1	0	1
X1	10	20	30
X2	0,12	0,15	0,18
X3	45	70	95

Planejamento B			
Fatores	Níveis		
	-1	0	1
X1	5	25	45
X2	0,12	0,15	0,18
X3	15	30	45

X1= tempo de extração; X2= proporção sólido/solvente; X3= teor alcoólico

Os resultados experimentais foram ajustados a um modelo polinomial, que pode ser expresso por um modelo genérico, onde  $y$  é a resposta,  $\beta_0$  é o termo constante,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes das variáveis dos termos lineares, quadráticos e de interação, e  $k$  é o número de fatores.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). Foram empregadas três etapas para a realização do processo extrativo: 1 - pré-intumescimento durante um intervalo de 2 h com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 - a mistura anteriormente

preparada foi deixada em repouso durante 24 h, fase conhecida como maceração intermediária; 3 - transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min (LIST;SCHMIDT, 2000).

#### **3.4.2 Extração por percolação**

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). O processo extrativo foi constituído por três etapas: 1 - pré-intumescimento: durante um intervalo de 2 h com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 – repouso: a mistura anteriormente preparada foi deixada em repouso durante 24 h, fase conhecida como maceração intermediária; 3 – empacotamento: transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min (LIST;SCHMIDT, 2000).

#### **3.4.3 Extração por refluxo**

Para a obtenção do extrato utilizando refluxo, 1 g do material vegetal pulverizado foi transferido para um erlenmeyer e 150 mL de água destilada foram adicionados. A mistura foi aquecida até a fervura e mantida sob refluxo entre 80 °C e 90°C durante 30 min. O extrato aquoso resultante foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 250 mL, onde teve seu volume completado com água destilada. A mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo, sendo desprezados os 50 mL iniciais.

#### **3.4.4 Determinação do teor de sólidos**

Para a determinação do teor de sólidos presentes no extrato líquido foi empregada uma balança com lâmpada de halogênio (utilizada para a determinação do teor de umidade de produtos sólidos). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.5 Determinação do pH

Por meio do método potenciométrico utilizando um pHmetro previamente calibrado (pH 4,0 e 7,0), o pH do extrato concentrado dos resíduos das cascas de jabuticaba foi determinado.

### 3.4.6 Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada empregando o viscosímetro DV-III+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, USA), utilizando aproximadamente 80 g de extrato, com spindle 2 (S2), velocidade de 120 rpm à temperatura média de 26°C.

### 3.4.7 Determinação da densidade

A densidade relativa foi determinada utilizando o método do picnômetro, no qual foram medidas as massas do picnômetro vazio, com água destilada a 20 °C e com a amostra a 20 °C. A partir da seguinte equação abaixo a densidade foi calculada.

$$d (\text{g/cm}^3) = \frac{(me-mp)}{(ma-mp)}$$

Onde:

*me*= massa do picnômetro + extrato

*ma*= massa do picnômetro + água;

*mp*=massa do picnômetro vazio.

### 3.4.8 Determinação do teor de fenóis totais (FT)

O teor de fenóis totais foi determinado de acordo com o método de HAGERMAN;BUTLER (1978) adaptado por WATERMAN;MOLE (1987) conforme descrito no item 3.3.1 (página 23).

### 3.4.9 Determinação do teor de ácido elágico

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.3.2 (página 25).

### 3.5 Obtenção do extrato seco padronizado dos resíduos dos frutos de *Myrciaria cauliflora*

Os experimentos de secagem do extrato concentrado dos resíduos de *M. cauliflora* foram realizados em um *spray dryer* com regime de fluxo co-corrente que apresenta capacidade evaporatória máxima de 1,0 L/h a uma temperatura de entrada do ar de secagem de 200°C. O equipamento é composto de: sistema de alimentação de extrato, composto por uma bomba peristáltica e um atomizador pneumático (duplo-fluido) com orifício de 1,2 mm de diâmetro interno; ar de secagem fornecido por um soprador circular, aquecido eletricamente e com temperatura regulada por um termostato digital do tipo PID; câmara de secagem, de formato cilíndrico (160 mm de diâmetro e 645 mm de comprimento), feita de vidro borosilicato; sistema de separação do produto seco do ar (ciclone), feito de aço inoxidável; recipiente de coleta do produto seco.

Com a finalidade de obter produtos secos com propriedades melhores, alguns parâmetros relacionados ao processo, como: temperatura do ar de secagem ( $T_S$ ), fluxo de alimentação do extrato ( $F_E$ ) e vazão do ar de aspersão ( $V_A$ ), foram determinados seguindo um planejamento fatorial completo com 3 fatores e dois níveis.

**Tabela 2.** Fatores codificados e seus níveis no Planejamento fatorial  $2^3$ , para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas de frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
X1. $T_S$ (°C)	110	120	130
X2. $F_E$ (mL.min <sup>-1</sup> )	3	4	5
X3. $V_A$ (L.min <sup>-1</sup> )	40	45	50

$T_S$ =Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ = Fluxo de alimentação do extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de aspersão.

Os níveis dos fatores estudados são apresentados na Tabela 2, onde estão representados os valores codificados e não codificados de cada fator. A matriz de planejamento fatorial com os fatores e níveis analisados se encontram na Tabela 3. Os valores foram codificados seguindo a regra de codificação dada pela equação:

$$\text{Valor codificado} = \frac{[(\text{valor não codificado} - 0,5 \times (\text{nível alto} + \text{nível baixo}))]}{0,5 \times (\text{nível alto} - \text{nível baixo})}$$

A Tabela 4 apresenta os valores codificados e não codificados de cada fator investigado na secagem pelo processo de nebulização no segundo planejamento utilizado (Box-Behnken).

A matriz do planejamento Box-Behnken utilizado na secagem está representado na Tabela 5, foram adotados 5 pontos centrais para esse planejamento (experimentos 13 até 17).

**Tabela 3.** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$ , para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas dos frutos de *Myrciara cauliflora*.

Experimento	$T_S$	$F_E$	$V_A$
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

**Tabela 4.** Fatores codificados e seus níveis no Planejamento fatorial Box-Behnken ( $3^3$ ), para a obtenção de extratos secos padronizados de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
$X1.T_S$ (°C)	100	110	120
$X2.F_E$ (mL.min <sup>-1</sup> )	3	4	5
$X3.V_A$ (L.min <sup>-1</sup> )	40	45	50

$T_S$ =Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ = Fluxo de alimentação do extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de aspersão.

As análises estatísticas dos resultados obtidos do Planejamento experimental  $2^3$  foram realizadas por ANOVA e regressão linear utilizando a Metodologia de superfície de resposta (MSR), por meio do módulo *Visual General Linear Model* (VGLM) do software Statistica 7.

O modelo de resposta encontrado foi uma equação polinomial linear, dada pela equação abaixo:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

Onde:

$y$  = a variável dependente (resposta predita),  $\beta_0$  é a constante do modelo;

$X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  = variáveis independentes;

$\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  = coeficientes lineares

$\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  = coeficientes de interação.

**Tabela 5.** Planejamento fatorial Box-Behnken para a obtenção do extrato seco padronizado de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Experimento	$T_S$	$F_E$	$V_A$
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

$T_S$ =Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ = Fluxo de alimentação do extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de aspersão.

As respostas preditas foram: teores de ácido elágico, fenóis totais e flavonoides totais. Além dessas respostas, a porcentagem de captura do radical DPPH, o rendimento e a atividade de água também foram analisados.

A fim de otimizar as propriedades dos produtos secos obtidos, os parâmetros avaliados anteriormente tiveram seus efeitos avaliados em três níveis seguindo um

Planejamento fatorial do tipo Box-Behnken (BOX; HUNTER;HUNTER, 1978). Os respectivos níveis dos fatores estudados estão apresentados na Tabela 4, onde podem ser encontrados os valores codificados e não codificados para cada fator.

Os resultados experimentais obtidos do Planejamento Box-Behnken foram também submetidos a ANOVA e regressão linear utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR) também empregando os softwares Statistica 7 e Design-Expert 8.0.7.1 . Um modelo polinomial quadrático foi empregado para expressar as respostas em função das variáveis independentes como segue abaixo:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

Onde:

$y$  = variável dependente (resposta predita);

$\beta_0$  = constante do modelo;

$x_i$  = conjunto de variáveis independentes;

$\beta_i$  = os coeficientes lineares;

$\beta_{ii}$  = coeficientes quadráticos

$\beta_{ij}$  = coeficientes de interação.

Para a otimização do processo de secagem, foi empregada a "Desejabilidade global" (*Desirability function*), que consiste em uma ferramenta capaz de encontrar condições ótimas para uma série de respostas analisadas.

As respostas analisadas de cada conjunto são transformadas em uma escala adimensional, conhecida como "desejabilidade", que varia de 0 a 1 correspondendo a uma resposta completamente indesejável até uma resposta completamente desejável, respectivamente. A partir dos valores individuais, o valor de "Desejabilidade global" é determinado, obtido a partir da média geométrica dos resultados individuais (HARRINGTON, 1965; DERRINGER;SUICH, 1980).

O seguinte conjunto de condições foi fixado em todas as secagens: pressão do ar de aspersão, 4 bar; fluxo do ar de secagem 1m<sup>3</sup>/min; massa do extrato de alimentação, 50 g, com 20% de adjuvante maltodextrina (em relação a massa seca contida no extrato). Os extratos secos foram posteriormente coletados, pesados e armazenados ao abrigo da luz e da umidade em dessecadores.

### 3.5.1 Caracterização dos extratos secos obtidos

#### 3.5.1.1 Rendimento da secagem ( $R_s$ )

O rendimento das secagens foi determinado pela diferença da massa do frasco de coleta vazio e a massa do frasco após o processo de secagem, contendo o material seco ( $M_s$ ). A equação abaixo mostra as considerações relacionadas à massa do extrato de alimentação ( $M_a$ ) e ao seu resíduo seco ( $C_s$ ).

$$R_s (\% \text{ m/m}) = \frac{M_s}{M_a \times \left(\frac{C_s}{100}\right)} \times 100$$

Onde:

$R_s$ = Rendimento de secagem

$M_s$ = Massa do material seco;

$M_a$ = Massa do extrato de alimentação (líquido);

$C_s$ = Resíduo seco (teor de sólidos) do extrato líquido.

#### 3.5.1.2 Determinação da atividade de água ( $A_w$ )

Para a determinação da atividade de água dos extratos secos, foi empregado um aparelho de atividade de água composto por um termo-higrômetro Testo® 650 (Testo AG, Alemanha) e uma câmara hermética. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 3.5.1.3 Determinação dos teores de fenóis totais

A determinação dos teores de polifenóis e taninos totais seguiu a metodologia proposta por HAGERMAN; BUTLER (1978) com adaptações (item 3.3.1) (WATERMAN; MOLE, 1987). Para a quantificação de fenóis totais, foram preparadas,

em triplicata, soluções das amostras de extrato seco, com concentração de 1 mg/mL.

#### **3.5.1.4 Determinação dos teores de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais foi determinado, como equivalentes de rutina, utilizando o método de ROLIM *et al.* (2005), modificado. Amostras de aproximadamente 10 mg (base seca) dos extratos secos foram solubilizadas em balões volumétricos de 25 mL com solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Em seguida, foram adicionados a tubos de ensaio, 2 mL das soluções obtidas e logo em seguida a leitura das absorvâncias foi efetuada em 361 nm.

Por meio da construção de uma curva padrão de rutina, a porcentagem de flavonoides totais foi calculada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.5.1.5 Determinação do teor de ácido elágico por CLAE**

Os ensaios foram realizados conforme o método descrito no item 3.3.2 (página 25).

#### **3.5.1.6 Caracterização microscópica**

As análises microscópicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG). Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL<sup>®</sup>-JSM-6610).

Os extratos secos obtidos do Planejamento de secagem Box-Behnken foram distribuídos em uma fita de carbono adequada e logo em seguida fixada a um porta-amostras ("*stub*") para que as amostras fossem submetidas à etapa de deposição de material condutor, que foi realizada com o equipamento Sputtering, modelo Desk V, da Danton Vacuum.b

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido

O teor de cinzas representa a proporção de minerais essenciais para a formação do vegetal e também de material estranho (areia, poeira, etc) que porventura estivesse aderido à superfície da planta. Um teor elevado pode ser indicativo de contaminações por impurezas inorgânicas, como metais e sílica (VIGO; NARITA; MARQUES, 2004). A avaliação do teor de cinzas solúveis em ácido, por sua vez, revela a presença de sílica na amostra, principalmente na forma de areia.

A Farmacopeia Brasileira, na monografia de algumas drogas vegetais, define limite para teor de cinzas. Para as cascas do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], por exemplo, o limite máximo preconizado é 5% de cinzas totais (BRASIL, 2010). Para a amostra analisada (resíduo de cascas de *M. cauliflora*), os valores encontrados para os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, foram 21,88 %  $\pm$  0,005 e 1,75 %  $\pm$  0,002, respectivamente.

De acordo com SOUZA *et al.* (2007), o teor de cinzas totais em folhas de *M. cauliflora*, foi 11%. Para frutos e cascas dos frutos dessa espécie, no entanto, não há relatos prévios de avaliação desse parâmetro.

O fato do material utilizado neste trabalho consistir em resíduos agroindustriais, descartado após o processo fermentativo e armazenado em condições que podem favorecer um acúmulo de contaminantes, pode ter refletido nos elevados teores de cinzas totais observados.

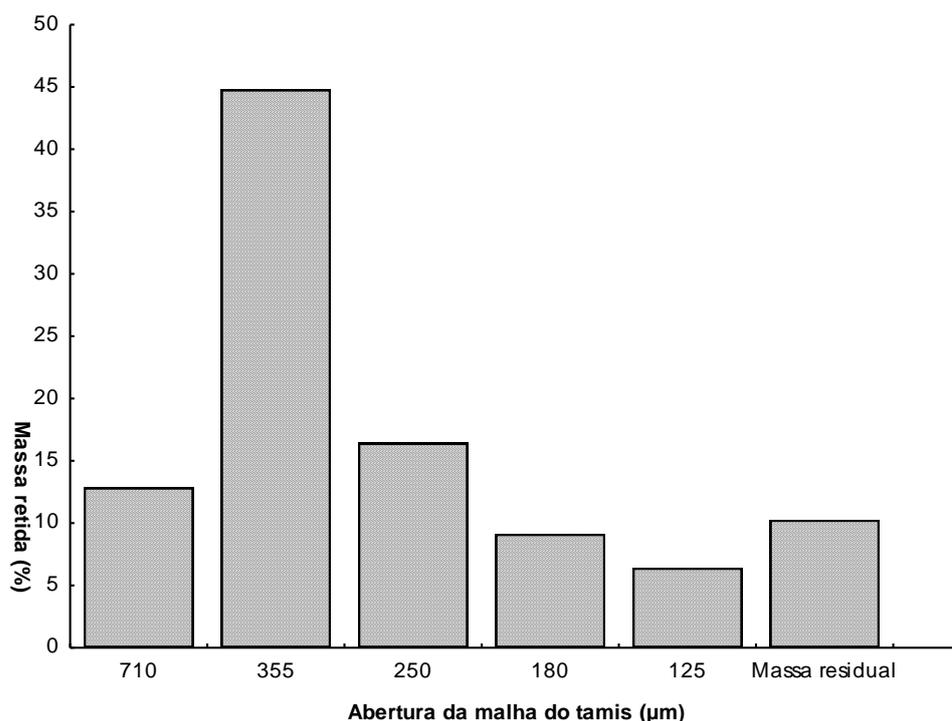
### 4.2 Determinação da distribuição granulométrica

A granulometria da matéria-prima vegetal pulverizada consiste num importante parâmetro, por estar diretamente relacionado ao processo extrativo e sua eficiência. Esse parâmetro é importante pois as partículas de material pulverizado que apresentam tamanho superior à classificação de fino é mais apropriada para processos extrativos, pois um pó muito fino pode resultar em empacotamento da amostra, impedindo o fluxo adequado do líquido extrator enquanto um pó muito

grosso pode favorecer formação de canais preferenciais para a passagem do líquido extrator, fazendo que a extração não seja homogênea (LIST;SCHMIDT, 2000).

Após a etapa de tamisação do pó do material vegetal, foi constatado que 57,66% das partículas encontraram-se na faixa de 355  $\mu\text{m}$  a 710  $\mu\text{m}$ , caracterizando-o como pó moderadamente grosso (Figura 4) de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

Portanto, o material vegetal pulverizado utilizado mostrou-se adequado para a extração (LIST;SCHMIDT, 2000).



**Figura 4.** Distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

### 4.3 Determinação do Índice de Intumescência

O índice de intumescência indica a presença de mucilagens, pectinas e hemicelulose, que absorvem água fazendo com que o material que as contenha aumente o seu volume quando em contato com o solvente (WHO, 2011). Em processos extrativos, principalmente em escala industrial, este parâmetro auxilia na determinação do volume de solvente a ser adicionado durante a extração, e na escolha das dimensões do recipiente extrator a ser utilizado (SIMÕES *et al.*, 2004).

O valor obtido para o resíduo de cascas do fruto foi  $4,2 \pm 0,005$ . E esse é o primeiro relato de valores para índice de intumescência de cascas de frutos de *M. cauliflora*.

#### 4.4 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica ou farmacognóstica permite a caracterização de classes de metabólitos secundários presentes no material vegetal

Os resultados dos testes de prospecção fitoquímica para a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes na amostra avaliada encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Classes de metabólitos secundários presentes na matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

<b>Classes de metabólitos</b>	
Alcaloides	-
Heterosídeos antraquinônicos	+
Heterosídeos digitálicos	-
Heterosídeos flavonoides	+
Saponinas	-
Taninos	+

(+) presença (-) ausência

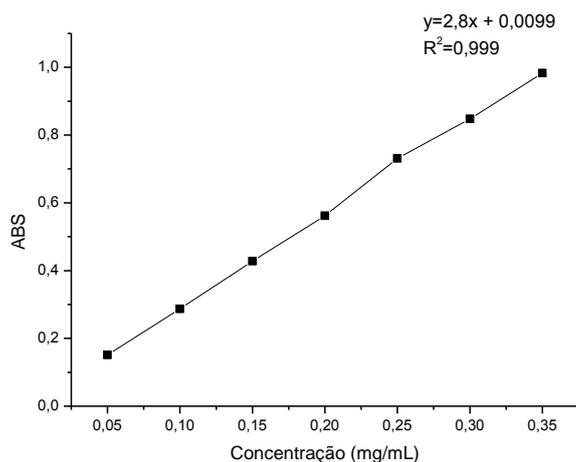
#### 4.5 Quantificação de fenóis

Usualmente, o teor de compostos fenólicos presentes em uma amostra tem correlação linear com a capacidade antioxidante e o tipo de extração influencia o teor de compostos fenólicos em um extrato (HODZIC *et al.*, 2009).

Flavonoides e taninos são representantes desse grupo de compostos. O mecanismo de ação envolve reações radicalares ou processos de quelação (KUMAR; KUMARAVEL; LALITHA, 2010). Dessa forma, a avaliação do teor em

fenóis totais da amostra analisada, além de ser indicativa da possível atividade antioxidante, pode ser utilizada como parâmetro de controle da qualidade.

Para a quantificação de compostos fenólicos totais, foi necessária a construção de uma curva padrão de ácido tânico, conforme está representado na Figura 5.



**Figura 5.** Curva padrão para o doseamento de fenóis totais em *Myrciaria cauliflora*. Concentração de ácido tânico em mg/mL versus Absorbância (ABS). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão em triplicata.

Os resultados das quantificações de compostos fenólicos totais foram representados como média  $\pm$  desvio padrão conforme a Tabela 7.

**Tabela 7.** Porcentagem (m/m) de compostos fenólicos totais (FT) para a matéria-prima vegetal pulverizada, obtida dos resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Amostra	FT (% m/m)
Extração a quente (refluxo)	3,99 $\pm$ 0,05
Extração com ultrassom	1,71 $\pm$ 0,01
Extração por percolação	11,66 $\pm$ 0,5%

Para os valores de concentração de fenóis totais (FT) expressos em mg/mL, os valores referentes aos extratos obtidos a quente por refluxo, por ultrassom e

percolação foram 0,16 mg/mL, 0,07 mg/mL e 8,75 mg/mL (extrato após ser concentrado em rota-evaporador), respectivamente.

A extração por percolação apresentou os melhores resultados para a extração de fenóis totais, devido provavelmente ao maior tempo de contato entre o resíduo com o solvente extrator (álcool 45%). O extrato obtido por percolação e posteriormente concentrado foi submetido ao doseamento de fenóis totais, apresentou teor de  $17,89 \pm 0,22$  % de fenóis em relação à porcentagem de sólidos (12%).

#### 4.6 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante jabuticaba e alguns de seus derivados têm sido relatados na literatura (TERCI, 2004; BARROS, J. A. C.; CAMPOS; MOREIRA, 2010). Contudo, como a matéria-prima utilizada no presente estudo consiste de resíduos agroindustriais das cascas dos frutos, torna-se necessária a confirmação de que este material apresenta também relevante atividade antioxidante, mesmo depois de ter sido submetido a um processo fermentativo.

Dessa forma, a partir do extrato obtido conforme o item 3.3.3 (página 28), foram preparadas cinco diluições diferentes e uma curva de Absorbância em função da Concentração foi construída para o cálculo e posterior obtenção do valor  $IC_{50} = 2,17$  mg/mL. A equação obtida foi:

$$ABS = -0,1087 C + 0,5729 \quad (R^2 = 0,9932)$$

Onde:

ABS = Absorbância da solução em contato com DPPH a 515 nm (após 30 min de reação)

C = Concentração do extrato mg/mL)

Considerando a natureza complexa do extrato, o valor encontrado é satisfatório, se comparado com o valor encontrado para o controle positivo (BHT,  $IC_{50} = 1,07$  mg/mL).

## 4.7 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Foi utilizado 1 Kg de material vegetal e 10 L de solução hidroalcoólica 45 % (v/v). A vazão do percolado foi de  $0,2 \pm 0,25$  mL/min. O extrato foi concentrado em rota-evaporador a 40 °C até a obtenção de um teor de sólidos de 12% (m/m).

### 4.7.1 Determinação do teor de sólidos do extrato concentrado

O teor de sólidos é uma importante variável para extratos e emulsões que serão submetidas à secagem por nebulização. De acordo com AZEREDO (2005) quanto maior o valor desse parâmetro, menor o tempo para a formação do produto seco obtido no *spray-dryer*. Além disso, o teor de sólidos pode influenciar no valor de viscosidade do extrato, de modo que com valores menores de viscosidade, o tamanho da gota formada no bico atomizador é diretamente afetada, enquanto que em níveis maiores de viscosidade, este efeito é menos pronunciado. De modo geral, quanto maior a viscosidade do líquido, maiores serão os tamanhos das partículas de pó formadas durante o processo de nebulização (FRASER; DOMBROWSKI; ROUTLEY, 1963).

Para minimizar a perda, podem ser adicionados, ao extrato, adjuvantes de secagem antes da nebulização. Os adjuvantes de secagem também são importantes para auxiliar na preservação de compostos de interesse durante o processo (CAI; CORKE, 2000).

O teor médio de sólidos para o extrato concentrado dos resíduos dos frutos de *Myrciaria cauliflora* foi de 12%, superior a outros extratos que foram submetidos a secagem por nebulização. MORAES, C. S. S. (2012) obteve extratos secos padronizados a partir de extratos concentrados das folhas da espécie *Ocimum gratissimum* com 9,5% de teor de sólidos, enquanto MARTINS (2012) obteve de um extrato das raízes de *Brosimum gaudichaudii* com teor de sólidos de 5,41% e também conseguiu realizar a secagem por nebulização, obtendo extratos secos padronizados.

O teor de sólidos obtido para o extrato utilizado neste trabalho mostrou ser satisfatório para ser empregado na etapa de secagem por nebulização.

#### 4.7.2 Determinação da densidade relativa do extrato concentrado de *M. cauliflora*

A densidade relativa média do extrato concentrado de *M. cauliflora* foi determinada através da metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª ed (BRASIL, 2010).

#### 4.8 Validação do método analítico para a quantificação de ácido elágico

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), os parâmetros de conformidade do sistema (*system suitability*) aceitáveis consistem em Fator de retenção (k) separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido ( $k > 2$ ); a repetitividade (RSD) deve apresentar coeficiente de variação inferior a 1% para no mínimo 5 replicatas; a resolução (Rs) deve apresentar valores acima de 2 entre o pico de interesse e o potencial pico mais próximo, que pode ser resultado de impureza ou produto de degradação de outras substâncias; fator de cauda (TF) deve ser menor ou igual a 2 e o número de pratos teóricos deve possuir valores maiores que 2000 (FDA, 2001).

Normalmente, no mínimo dois destes critérios são requeridos para assegurar a conformidade do sistema (RIBANI *et al.*, 2004). As condições para a conformidade do sistema estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Condições de separação para o parâmetro de conformidade do sistema.

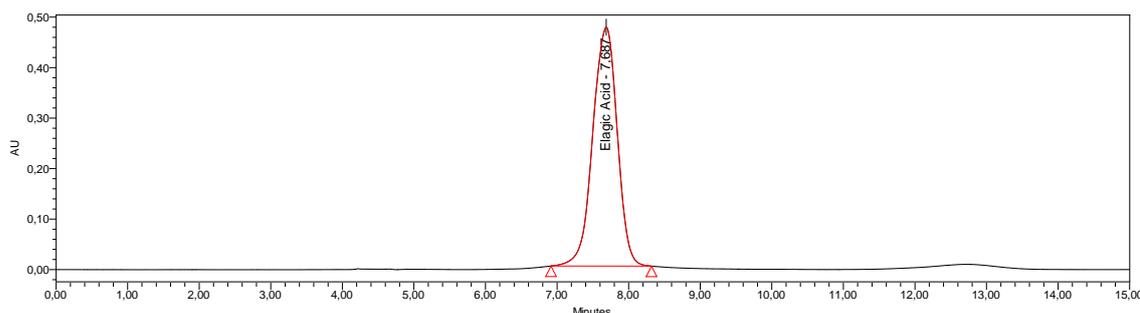
Parâmetros	Valores de referência	Ácido elágico
Rs	>2,0	568
TF	≤2,0	1,2
N	>2,0	2510

Rs: Resolução; TF: Fator de cauda; N: Número de pratos teóricos.

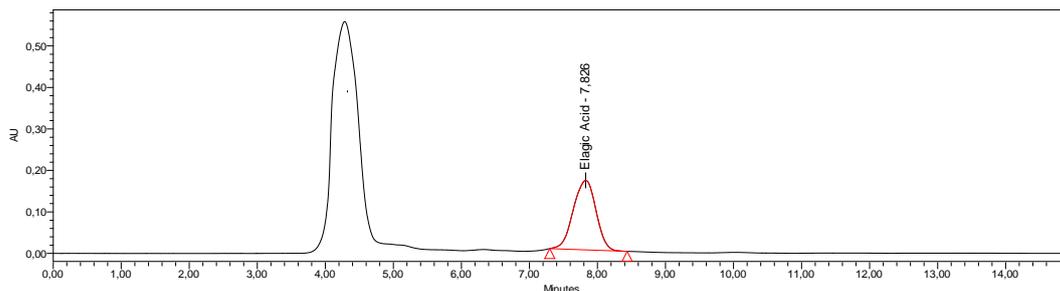
#### 4.8.1 Especificidade do método analítico desenvolvido para o ácido elágico

A especificidade é a capacidade de identificar a presença do marcador existente na amostra por meio da comparação com o composto padrão. A especificidade é importante para garantir o sucesso de outros parâmetros como: linearidade, exatidão e precisão (FDA, 2001; RIBANI *et al.*, 2004).

Nas condições de análise descritas no item 3.3.2 (página 25) o pico correspondente ao ácido elágico foi observado no tempo de retenção de aproximadamente 7,7 min (Figuras 6 e 7). O espectro na região do ultravioleta correspondente a esse pico mostrou absorbâncias máximas de 252 e 361 nm e perfil compatíveis com o esperado para o ácido elágico (Figuras 8 e 9).

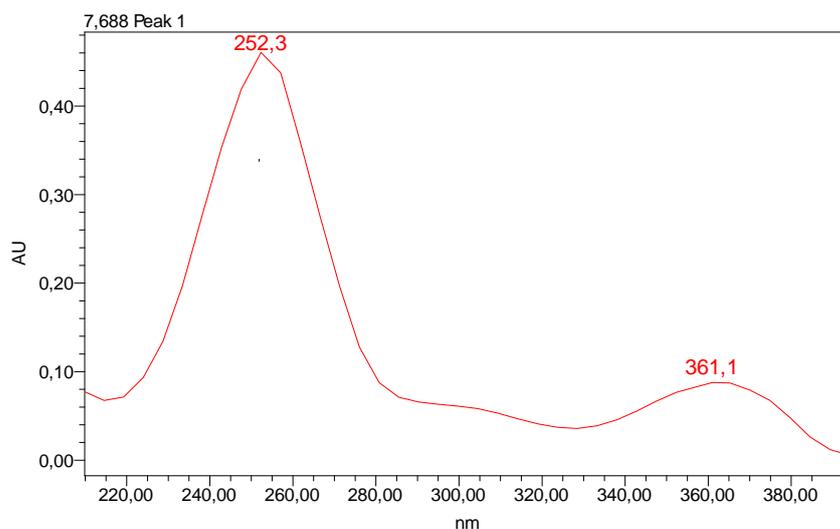


**Figura 6.** Cromatograma, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do padrão de ácido elágico. Condições de análise: Fase móvel: Metanol:Água (60:40); Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura: 25°C;  $\lambda=252$  nm; Coluna: Zorbax eclipse XDB-C18 5 $\mu$ m; 250 mmx4,6mm.

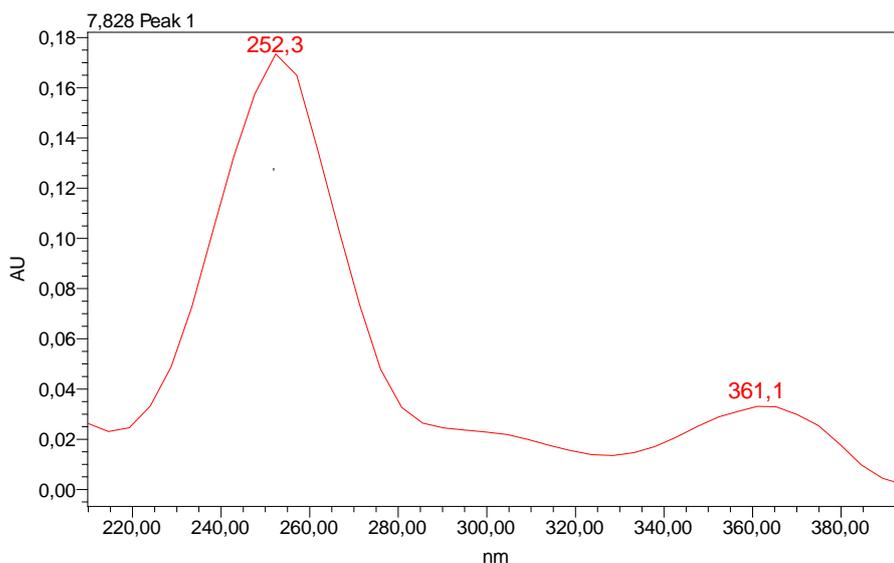


**Figura 7.** Perfil cromatográfico do extrato líquido obtido por ultrassom a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*. Condições de análise: Fase móvel: Metanol:Água (60:40); Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura: 25°C;  $\lambda=252$  nm; Coluna: Zorbax eclipse XDB-C18 5 $\mu$ m; 250 mmx4,6mm.

Os espectros de absorção obtidos por meio da varredura do detector DAD (Figuras 8 e 9) mostraram que o método desenvolvido foi capaz de medir exatamente o marcador ácido elágico na presença de outros componentes.



**Figura 8.** Espectro de absorbância na região do UV-visível, referente ao pico do padrão de ácido elágico ( $t_R = 7,7$  min).



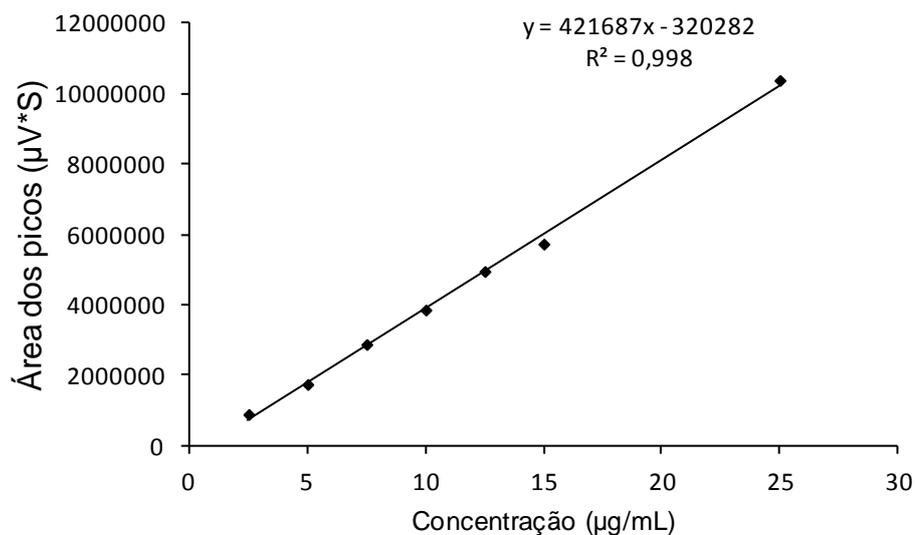
**Figura 9.** Espectro de absorvância na região do UV-visível, referente ao pico do ácido elágico (tR = 7,7 min) determinado no extrato líquido dos resíduo de *Myrciaria cauliflora*.

Conforme a RE n° 27/12 da ANVISA, que trata da validação de métodos analíticos (BRASIL, 2012), o método cromatográfico empregado para a determinação qualitativa e quantitativa de ácido elágico foi considerado específico.

#### 4.8.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados encontrados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um certo limite especificado (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2012). A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ), obtido por meio de regressão linear da curva padrão.

Segundo a RE n° 27/12 da ANVISA, coeficientes maiores ou iguais a 0,99 são adequados para métodos quantitativos, portanto o método pode ser considerado linear por apresentar coeficiente de correlação igual a 0,998, conforme equação presente na Figura 10, o que demonstra que os valores de área para o pico do ácido elágico são diretamente proporcionais à concentração do analito investigado (BRASIL, 2012).



**Figura 10.** Curva padrão do padrão de ácido elágico, em µg/mL. Cada ponto representa a média ± desvio padrão em triplicata.

#### 4.8.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

De acordo com RIBANI *et al.* (2004) a determinação do LQ representa uma importante informação que está relacionada com a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Assim, quanto menor o LQ, menos preciso torna-se o resultado medido. Portanto, para que haja maior precisão, deve-se trabalhar com maiores concentrações, ou seja, concentrações mais altas do que o LQ calculado para que o método possa garantir maior precisão nos resultados calculados.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados conforme as equações apresentadas no item 3.3.2.4, página 26.

Conforme preconizado pela RE nº 27/12 da ANVISA o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas e suas média da inclinação foram calculadas (BRASIL, 2012). Os valores obtidos de LD e LQ para o ácido elágico foram 3,90 e 13,01 µg/mL, respectivamente. Esses valores para LD e LQ fornecem informações para que a quantificação e a detecção do ácido elágico possam ser realizadas com segurança.

#### 4.8.4 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados encontrados experimentalmente em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Este parâmetro deve ser considerado em três níveis (BRASIL, 2012).

**Tabela 9.** Repetibilidade e precisão intercorrida para a solução do padrão de ácido elágico.

Replicatas	Teor (% m/m)		Teor médio	DP	CV (%)
	Analista 1	Analista 2	(% m/m)		
1	0,0689	0,0654	0,0652	0,0027	4,25
2	0,0695	0,0642			
3	0,0603	0,0661			
4	0,0622	0,0663			
5	0,0672	0,0664			
6	0,0694	0,0601			
7	0,0672	0,0646			
8	0,0632	0,0650			
9	0,0632	0,0650			

DP=Desvio padrão; CV=Coefficiente de variação. Condições de análise: Fase móvel: Metanol:Água (60:40); Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura: 25°C;  $\lambda$ =252 nm; Coluna: Zorbax eclipse XDB-C18 5 $\mu$ m; 250 mmx4,6mm.

Os resultados de precisão (intracorrida e intercorridas) estão representados na Tabela 9. Para um coeficiente de variação (CV) máximo de 5%, é possível observar que os resultados apresentam confiabilidade, com CV=4,25%. Os resultados de precisão estão de acordo com os valores estabelecidos pela RE nº 27/12 da ANVISA (BRASIL, 2012).

#### 4.8.5 Exatidão

Executada por meio de ensaios de recuperação, a exatidão pode ser definida como a quantidade de analito de interesse, presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e pode ser posteriormente quantificada (THOMPSON *et al.*, 1999). O "contaminante" é definido como uma substância pura que é adicionada ao material teste, em que o comportamento físico-químico é representativo do analito de interesse na forma isolada (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). A exatidão foi demonstrada por meio do percentual de recuperação do método, onde a média do recuperado não ultrapassou 1% de diferença entre o valor teórico e o obtido, mostrando que o ensaio é exato (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultados do parâmetro de exatidão de quantificação do ácido elágico presente no extrato hidroalcoólico obtido de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Concentração	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ ) s/pd	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ ) c/ pd	Conc ob. c/pd (mg/mL)	Média das recuperações	CV(%)
	4209927	12093542	0,0171		
80%	4201244	12014878	0,0169	100,29	0,448143
	4297441	12154744	0,0170		
	5141701	12977501	0,0170		
100%	5188342	12979582	0,0169	99,71	0,332501
	5146132	12936193	0,0169		
	5960114	13886840	0,0171		
120%	5947487	13884635	0,0172	101,11	0,357221
	5974891	13858463	0,0171		

Área s/pd: Área da amostra sem a adição de padrão; Área c/pd: Área da amostra com a adição de padrão; Conc ob. c/pd: Concentração da amostra com o padrão.

#### 4.8.6 Robustez

Segundo a RE n° 27/12 da ANVISA e o INMETRO, a robustez pode ser definida como a medida de sua capacidade em resistir a pequenas alterações dos parâmetros analíticos (INMETRO, 2010; BRASIL, 2012). Essas mudanças que são

testadas podem significar possíveis alterações quando um método é reproduzido em outros laboratórios, analistas ou equipamentos (MATTIJS *et al.*, 2004). Os parâmetros que sofreram variação foram o fluxo, a composição da fase móvel e o marca da coluna utilizada, conforme representado na Tabela 11. Para todas as mudanças de parâmetro avaliadas os coeficientes de variação foram inferiores a 5% (Tabela 11), o que revela que o método em questão é robusto.

**Tabela 11.** Resultados do parâmetro de robustez do teor de ácido elágico presente no extrato hidroalcolólico obtido de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*.

Condição analítica	Área	Conc.	Teor (% m/m)	DP	CV (%)
	( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	(mg/mL)			
0,4 mL/min	4082136	0,01044	0,0522	0,002	3,8301
0,6 mL/min	4132738	0,01056	0,0528	0,002	3,7886
Metanol: água (60:40)	4706233	0,01192	0,0596	0,0025	4,1975
Metanol: água (62:38)	4537558	0,01152	0,0576	0,002	3,4719
Coluna Waters	4799005	0,01214	0,0607	0,001	1,6476
Coluna Zorbax	4841173	0,01224	0,0612	0,003	4,9004

#### 4.9 Planejamento experimental do método de extração de ácido elágico

Foram realizados 2 planejamentos experimentais (A e B) para a extração de ácido elágico e medida da atividade antioxidante por potencial de captura do radical livre DPPH.

##### 4.9.1 Planejamento experimental A

O Planejamento experimental A avaliou a influência do Tempo de extração, proporção sólido:líquido e graduação alcoólica sobre a concentração de ácido elágico e a atividade antioxidante do extrato obtido (Tabela 12).

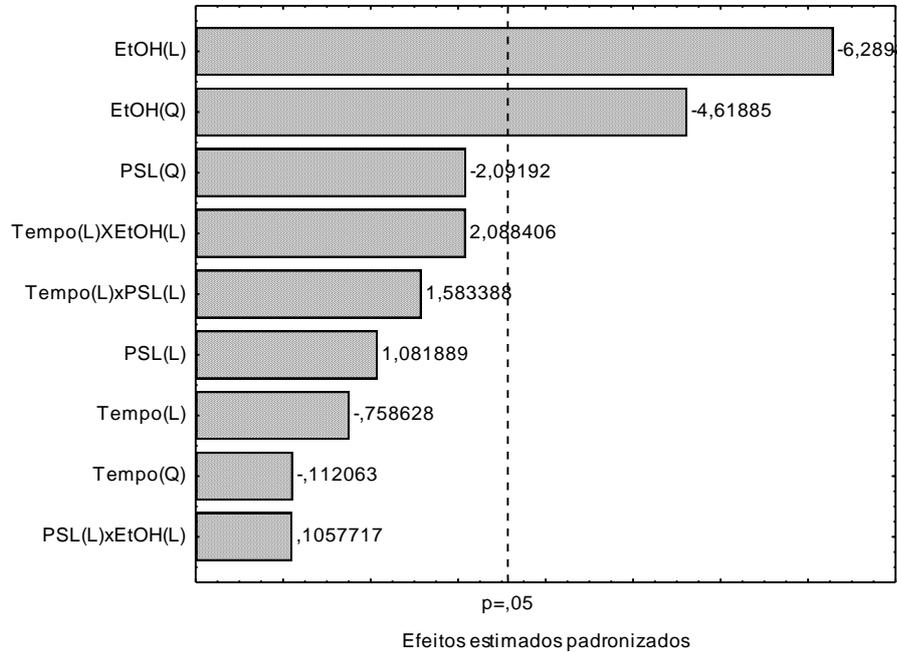
**Tabela 12.** Planejamento A (fatorial fracionário  $3^3$ ) e as concentrações de ácido elágico e suas respectivas capacidades antioxidantes.

<b>Tempo (min)</b>	<b>PSL (mg/mL)</b>	<b>EtOH (%)</b>	<b>Ácido elágico (mg/mL)</b>	<b>AAO</b>
10	0,12	70	0,01085	46,7043
30	0,12	70	0,0430	47,2693
10	0,18	70	0,0558	47,2693
30	0,18	70	0,01712	69,3032
10	0,15	45	0,03641	73,0697
30	0,15	45	0,01586	46,7043
10	0,15	95	0,0616	42,7495
30	0,15	95	0,0948	44,0678
20	0,12	45	0,03694	69,3032
20	0,18	45	0,04130	80,2260
20	0,12	95	0,0382	23,9171
20	0,18	95	0,0939	47,0810
20	0,15	70	0,0300	61,7702
20	0,15	70	0,0290	71,7514
20	0,15	70	0,0283	71,0000

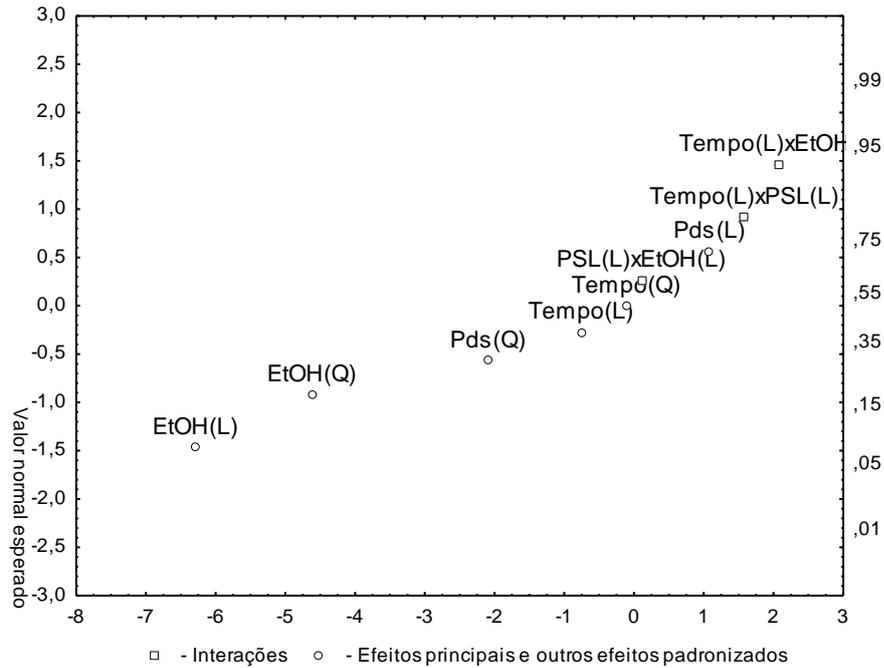
PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; AAO: Atividade antioxidante por porcentagem de inibição dos radicais DPPH.

Em relação ao Planejamento A (referente à extração de ácido elágico por ultrassom), por meio do Diagrama de Pareto representado na Figura 11 foi possível visualizar que apenas os fatores quadrático (Q) e linear (L) da graduação alcoólica foram significativos ao nível de 5%. A tendência dos efeitos relativos à graduação alcoólica exercerem influência significativa sobre o processo extrativo de ácido elágico a partir dos resíduos das cascas de jabuticaba pode ser visualizada no gráfico de distribuição normal representado na Figura 12, na qual os efeitos EtOH (L) e EtOH (Q) se distanciam dos demais efeitos, mostrando que sua variação não se

deve somente a distribuição normal dessa variável. O tempo de extração e a proporção sólido:líquido (PSL) não apresentaram efeitos significativos.

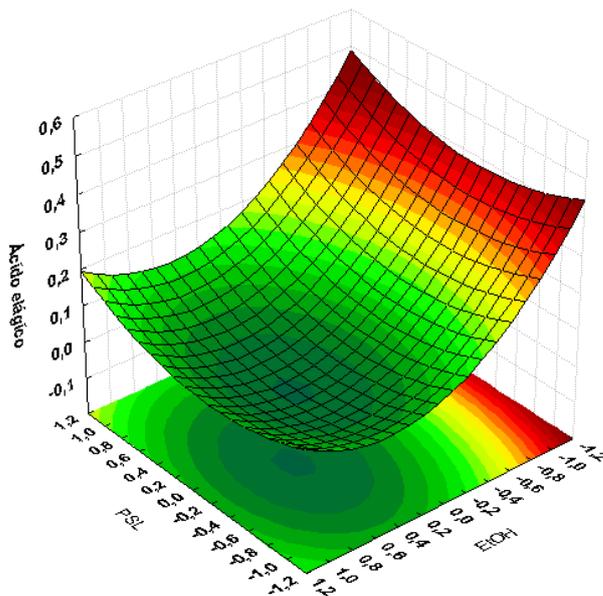


**Figura 11.** Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados (em relação às variáveis codificadas) referentes ao Planejamento A para a extração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* e suas respectivas capacidades antioxidantes. PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático.



**Figura 12.** Gráfico de distribuição normal dos efeitos para o Planejamento A para a extração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* e suas respectivas capacidades antioxidantes. PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático.

Por meio do gráfico de superfície de resposta (Figura 13), dentro da faixa alcoólica investigada, menores valores de teor alcoólico apontaram para condições de melhor extração de ácido elágico, a saber: a graduação de 45% mostrou ser a mais efetiva para a melhor extração desse marcador.



**Figura 13.** Gráfico de superfície da concentração de ácido elágico presente no extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* em função da graduação alcoólica e proporção sólido:solvente (Planejamento A).

A seguinte equação ajustada revela o comportamento quadrático existente entre a graduação alcoólica e o teor de ácido elágico encontrado (os demais coeficientes não estão presentes por não serem significativos ao nível de 5%).

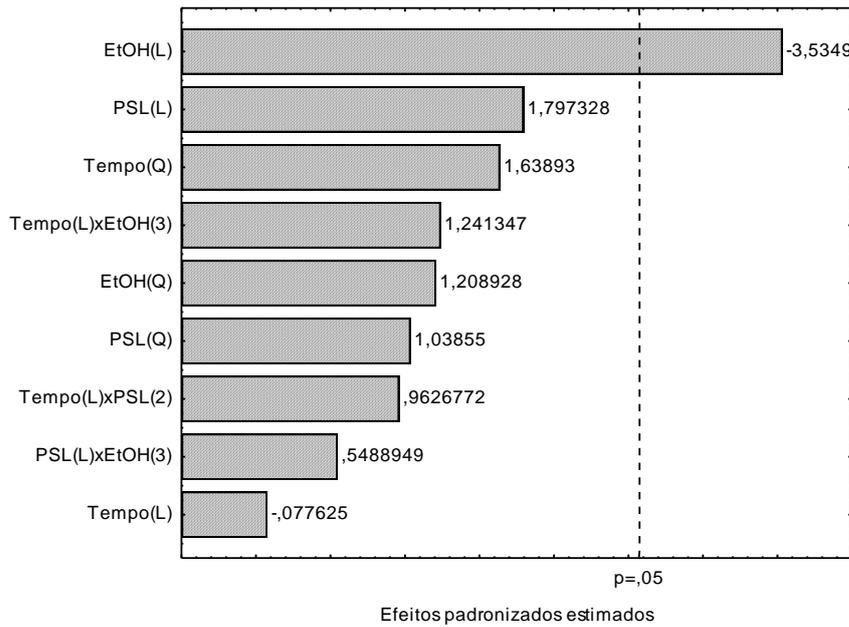
$$AE(\text{mg/mL}) = -0,0013\text{EtOH} + 0,0014\text{EtOH}^2 \quad (r=0,9672)$$

Onde:

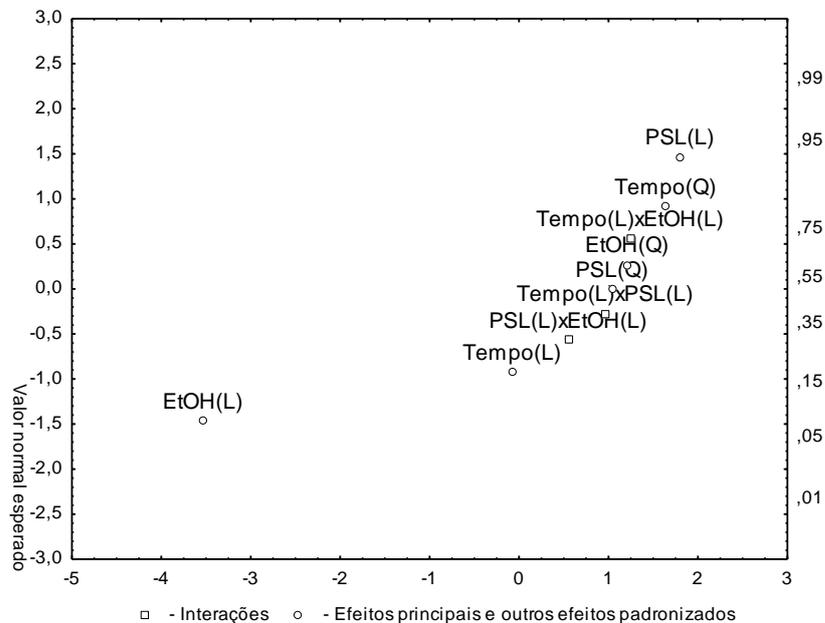
*AE*=Concentração de ácido elágico

*EtOH*=Graduação alcoólica

Quando foi investigada a segunda resposta para o Planejamento A (atividade antioxidante por captura de DPPH-AAO), foi possível observar, conforme mostrado na Figura 14, que apenas o efeito linear da graduação alcoólica mostrou ser significativo sobre a extração de compostos antioxidantes.



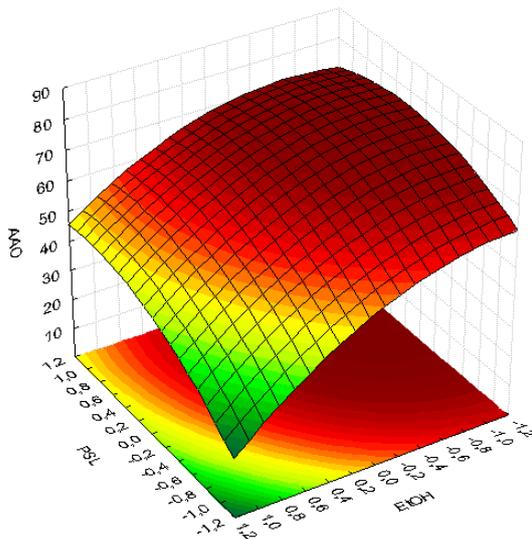
**Figura 14.** Gráfico de Pareto para os efeitos referentes à atividade antioxidante (AAO) do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* em função de diferentes variáveis (Planejamento A). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q:quadrático.



**Figura 15.** Gráfico de distribuição normal dos efeitos para a atividade antioxidante do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, utilizando o método do DPPH (Planejamento A). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático.

Essa mesma tendência pode ser observada na Figura 15, em que o efeito linear da graduação alcoólica -EtOH(L) - se distancia dos demais efeitos, revelando que sua influência é significativa e não apenas resultado da variabilidade normal deste parâmetro.

O gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 16 também aponta para a mesma tendência observada anteriormente para o marcador ácido elágico, ou seja, dentro da faixa de graduação alcoólica avaliada, menores concentrações de álcool favorecem o aumento da atividade antioxidante por captura de DPPH nos extratos obtidos por ultrassom.



**Figura 16.** Gráfico de superfície da atividade antioxidante (AAO) do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, em função da graduação alcoólica (EtOH) e proporção sólido:líquido (PSL) (Planejamento A).

A seguinte equação representa a relação existente entre os valores da variável EtOH (graduação alcoólica) e a atividade antioxidante do extrato obtido.

$$AAO(\%) = -0,12EtOH + 0,14EtOH^2 \quad (r=0,9356)$$

Onde:

AAO(%)= Atividade antioxidante por inibição dos radicais DPPH

EtOH=Graduação alcoólica

A partir desse experimento foi possível concluir que as condições ótimas para a extração utilizando ultrassom são: graduação alcoólica (EtOH) de 45% independente da proporção sólido:líquido (PSL) e tempo de extração, pois esses dois últimos fatores não foram significativos nos níveis investigados.

#### 4.9.2 Planejamento experimental B

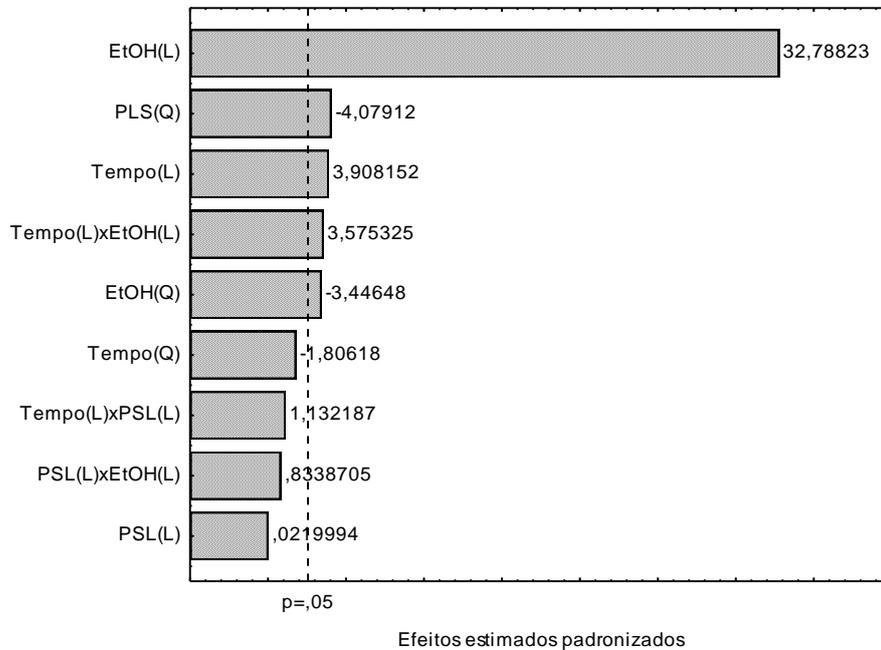
Para verificar se soluções mais polares (com menor concentração alcoólica) favorecem a extração do ácido elágico pelo método de extração por ultrassom, um segundo planejamento (Planejamento B) foi elaborado, com os níveis da graduação alcoólica fixados em 5, 25 e 45% (Tabela 13).

**Tabela 13.** Planejamento B (fatorial fracionário 3<sup>3</sup>) e as concentrações de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, e suas respectivas capacidades antioxidantes

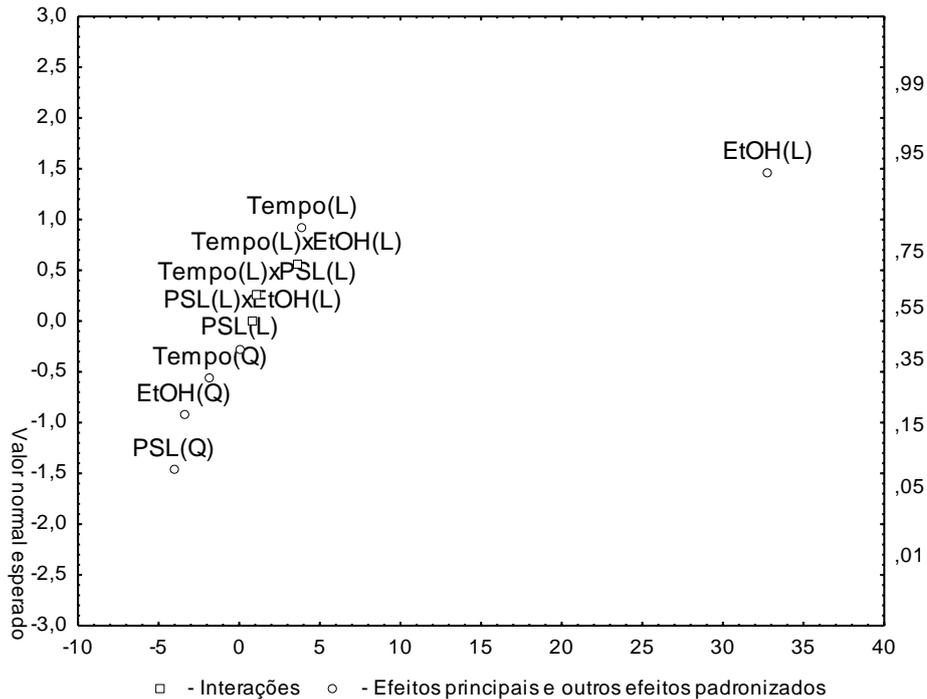
Tempo (min)	PSL (mg/mL)	EtOH	Ácido elágico (mg/mL)	AAO
10	0,12	25	0,0432	69,3032
30	0,12	25	0,0457	46,7043
10	0,18	25	0,0380	80,2260
30	0,18	25	0,0465	47,2693
10	0,15	5	0,0127	47,2693
30	0,15	5	0,0125	47,0810
10	0,15	45	0,0628	84,3691
30	0,15	45	0,0819	87,7590
20	0,12	5	0,0129	23,9171
20	0,18	5	0,0129	44,0678
20	0,12	45	0,0761	84,1808
20	0,18	45	0,0807	87,9473
20	0,15	25	0,0358	61,0856
20	0,15	25	0,0354	71,7514
20	0,15	25	0,0341	61,7702

PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; AAO: Atividade antioxidante por porcentagem de inibição dos radicais DPPH.

Nesse planejamento, foi possível observar que uma maior quantidade de efeitos foram significativos: tempo de extração, graduação alcoólica, proporção sólido:líquido, e a interação graduação alcoólica x tempo (Figuras 17 e 18).



**Figura 17.** Gráfico de Pareto para a influência dos efeitos referentes à extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica.



**Figura 18.** Gráfico de distribuição normal da influência dos efeitos referentes à extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica; L: linear; Q: quadrático.

Assim, com base nos resultados obtidos (Tabela 13) com a obtenção do novo modelo de regressão e a partir da superfície de resposta encontrada, foi possível concluir que o teor alcoólico responsável pelo melhor perfil de extração foi equivalente ao nível 45%.

Nos gráficos de superfície apresentados na Figura 19, pode ser observado o comportamento da extração de ácido elágico em função dos três parâmetros avaliados (Tempo de extração; Proporção sólido:líquido-PSL e Graduação alcoólica-EtOH), além da interação existente entre esses efeitos (Figuras 19a, 19b e 19c).

A superfície da Figura 19d expressa simultaneamente o comportamento da extração de ácido elágico frente aos três parâmetros analisados e é possível visualizar que na faixa investigada, maiores níveis de graduação alcoólica, maior proporção de sólido:solvente e maior tempo de extração são necessários para aumentar a quantidade de ácido elágico extraída em banho de ultrassom.

O resultado da graduação alcoólica obtida neste Planejamento coincide com o resultado encontrado para o primeiro, mostrando que níveis de 45% de graduação alcoólica devem ser utilizados para o aumento da extração do marcador escolhido.

A partir da seguinte equação, pode ser observado que os três fatores exercem influência significativa na concentração de ácido elágico extraído. Além disso, existe interação entre as variáveis tempo e graduação alcoólica. O modelo apresenta um alto valor preditivo, como pode ser concluído por meio de seu alto coeficiente de determinação ( $r=0,9956$ ), apresentando uma boa capacidade de explicar o comportamento dos dados do sistema em estudo.

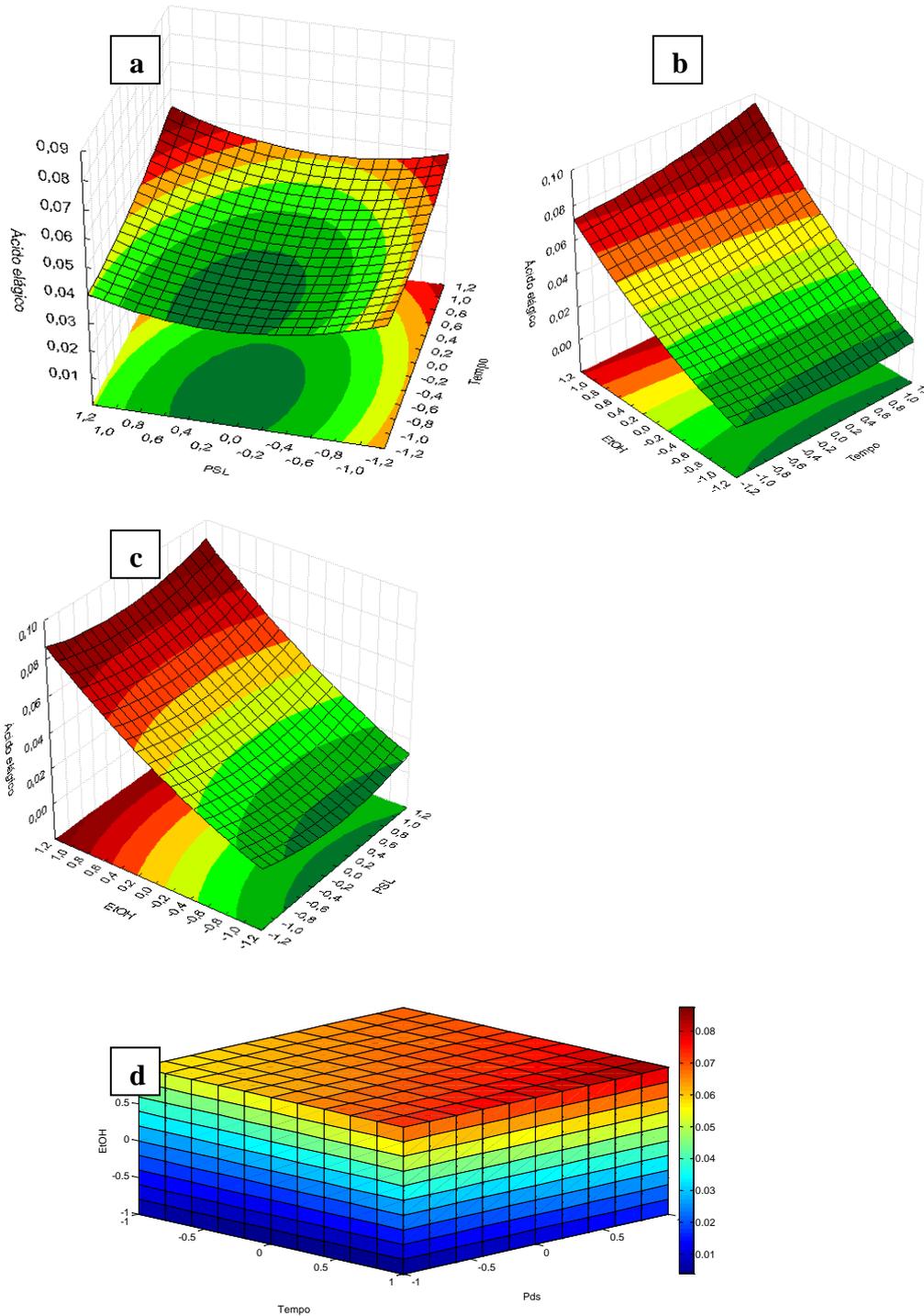
$$AE(\text{mg/mL}) = 0,035 + 0,004\text{Tempo} + 0,0025\text{Tempo}^2 + 0,006\text{PSL} + 0,03\text{EtOH} \\ + 0,005\text{EtOH}^2 + 0,005\text{Tempo} \times \text{EtOH} (r=0,9977)$$

Onde:

*AE*=Concentração de ácido elágico

*PSL*=Proporção droga/solvente

*EtOH*=Graduação alcoólica



**Figura 19.** Superfícies de resposta da extração de ácido elágico do extrato obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Planejamento B) em função de PSL e Tempo (A); PSS e graduação alcoólica (B); graduação alcoólica e tempo (C); em função das três variáveis simultaneamente (D). PSL: Proporção sólido:líquido; EtOH: Graduação alcoólica.

#### 4.10 Planejamento 2<sup>3</sup> na obtenção do extrato seco

Após a obtenção do extrato líquido de origem vegetal, é comum realizar sua concentração e posterior secagem. Existem diversas vantagens nos extratos secos em relação aos líquidos, tais como a maior concentração de substâncias de interesse (marcadores), o menor custo no processo de estocagem, além de sua maior estabilidade físico-química (BENELLI; SOUZA; OLIVEIRA, 2013). Outra vantagem relevante da utilização de extratos na forma seca consiste na facilidade de administração e ajuste de dosagem mais precisa encontrada em formas farmacêuticas sólidas (GONNISSEN; REMON; VERVAET, 2007).

A secagem pode ser feita por diversos métodos já abordados no item 1 (página 2). Para a obtenção do extrato seco a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, foi utilizada a técnica de secagem por nebulização.

Da mesma forma que foram realizados planejamentos experimentais para determinação das condições ótimas do processo extrativo, foram realizados planejamentos para a obtenção do extrato seco.

É importante salientar que antes de realizar planejamentos experimentais em três níveis para investigar possíveis curvaturas existentes no modelo, é ideal que se faça planejamentos em dois níveis para a triagem dos fatores significativos e qual sua influência nas respostas avaliadas, para posteriormente realizar uma avaliação com modelos que possam indicar os pontos ótimos do sistema investigado (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Dessa forma foram avaliados 11 condições de secagem variando os seguintes parâmetros: Temperatura do ar de entrada, Fluxo de alimentação de extrato e Vazão do ar de secagem.

Os resultados obtidos pela secagem do extrato líquido concentrado obtido a partir das cascas dos frutos de *M. cauliflora* estão apresentados na Tabela 14.

A Tabela 15 mostra os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas analisadas, juntamente com suas significâncias.

**Tabela 14.** Planejamento fatorial  $2^3$  para o processo de secagem do extrato hidroalcolico obtido a partir de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* e o resultado das respostas analisadas.

Exp	Temp	Fluxo	Vazão	AE	FT	Rs	Fv	AAO	Aw
1	-1	-1	-1	0,0626	12,37	49,83	6,39	26,96	0,301
2	1	-1	-1	0,0520	11,65	15,6	5,47	32,59	0,226
3	-1	1	-1	0,0297	12,13	61,64	6,76	37,03	0,359
4	1	1	-1	0,0488	13,03	49,44	6,21	25,60	0,342
5	-1	-1	1	0,0503	13,34	12,45	6,81	20,99	0,173
6	1	-1	1	0,0347	13,13	58,45	7,26	24,91	0,174
7	-1	1	1	0,0546	12,51	49,76	5,96	26,62	0,180
8	1	1	1	0,0376	13,45	58,03	5,94	13,31	0,207
9	0	0	0	0,0534	12,80	61,47	5,53	32,76	0,161
10	0	0	0	0,0610	13,50	11,61	6,74	32,76	0,151
11	0	0	0	0,0584	14,10	62,35	5,96	34,81	0,146

AE: Teor em % de ácido elágico; FT: Teor em % de fenóis totais; Rs: Rendimento da secagem em %; Fv: Teor em % de flavonoides totais; AAO: Porcentagem de inibição do radical DPPH, Aw: Atividade de água. Temperatura:110°C; -1 =130°C; 1= 120°C;0; Fluxo de alimentação de extrato: -1 = 3 mL/min; 1= 5 mL/min; 4mL/min; Vazão do ar de secagem: -1 = 30 L/min; 1= 50 L/min; 0= 45L/min.

**Tabela 15.** Sumário dos efeitos de variáveis de secagem e suas significâncias ( $p$ ) sobre as propriedades do extrato seco resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização.

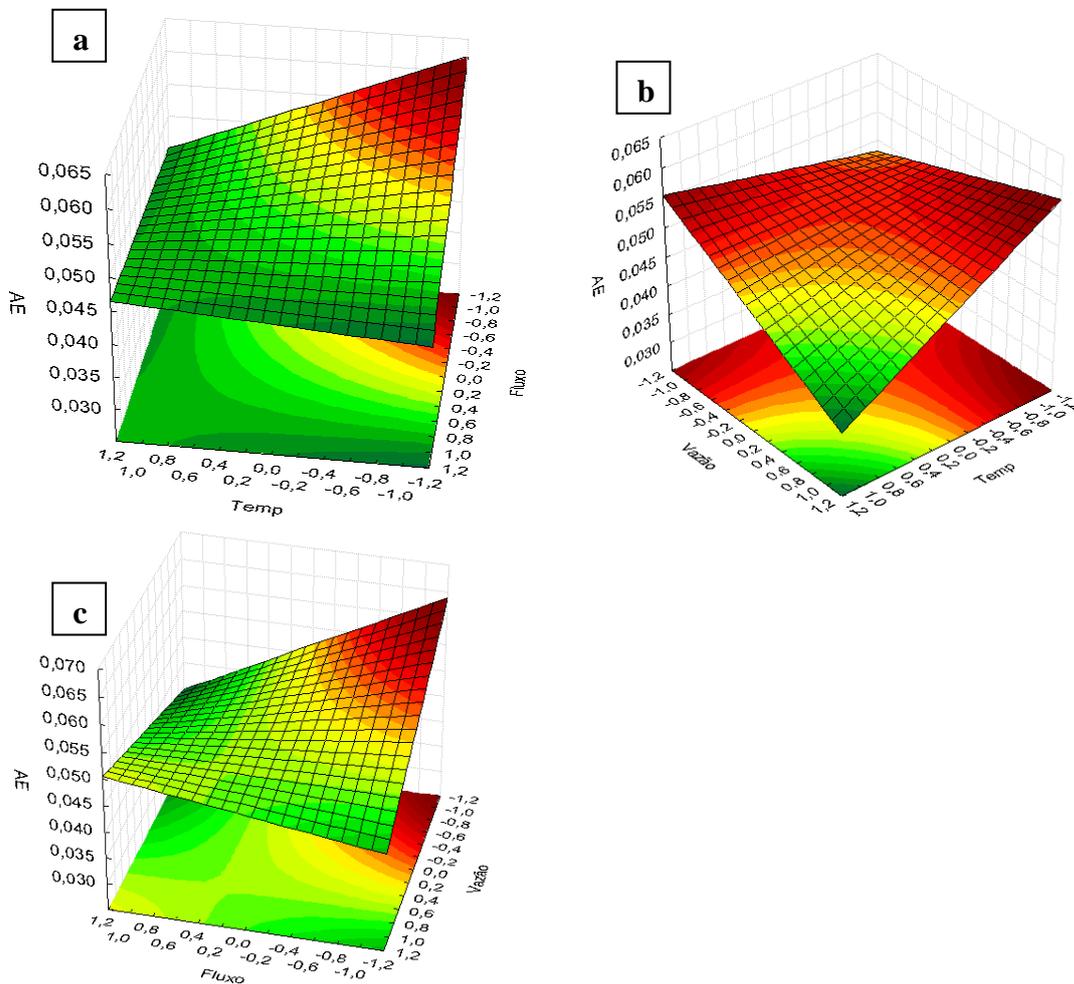
Fator	AE	FT	RS	Fv	AAO	Aw
$T_s$	Ns	ns	ns	ns	-3,7969 <sup>a</sup>	-0,0160 <sup>b</sup>
$F_E$	-0,0072 <sup>c</sup>	ns	ns	ns	ns	0,0535 <sup>a</sup>
$V_A$	ns	ns	ns	ns	-9,0870 <sup>a</sup>	-0,1235 <sup>a</sup>
$T_s \times F_E$	0,0071 <sup>c</sup>	ns	ns	ns	-8,5751 <sup>a</sup>	0,0210 <sup>b</sup>
$T_s \times V_A$	-0,0102 <sup>b</sup>	ns	ns	ns	ns	0,0300 <sup>a</sup>
$F_E \times V_A$	0,0109 <sup>a</sup>	ns	ns	-0,8197 <sup>b</sup>	-2,2611 <sup>c</sup>	-0,0335 <sup>a</sup>

Significante ao nível de :<sup>a</sup>5%, <sup>b</sup>10%, <sup>c</sup>15%;  $T_s$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem; AE: Teor de ácido elágico; FT: Teor de fenóis totais; Rs: Rendimento da secagem; Fv: Flavonoides totais; AAO: Porcentagem de inibição do radical DPPH, Aw: Atividade de água, ns: não significativa. Temperatura:110°C; -1 =130°C; 1= 120°C;0; Fluxo de alimentação de extrato: -1 = 3 mL/min; 1= 5 mL/min; 4mL/min; Vazão do ar de secagem: -1 = 30 L/min; 1= 50 L/min; 0=45L/min.

O teste ANOVA mostrou que o fator  $F_E$  (fluxo de alimentação de extrato) influenciou negativamente no teor de ácido elágico (AE) em um nível de significância de 15%. O termo de interação  $T_s$  (temperatura do ar de secagem) x  $F_E$  teve

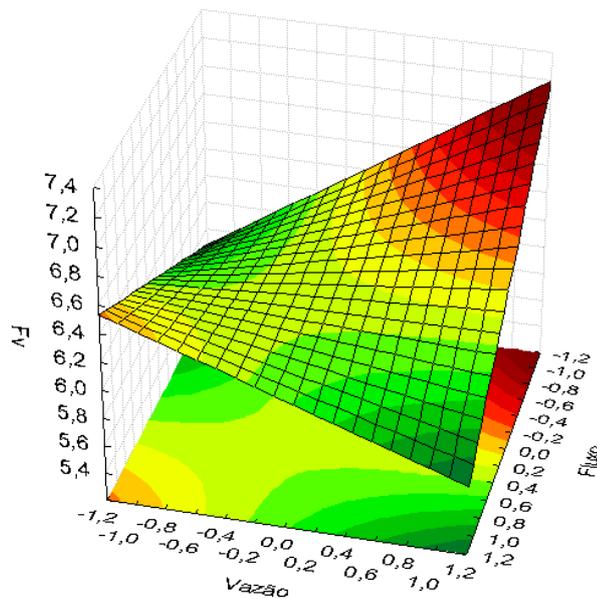
influência positiva sobre  $AE$ , e a superfície de resposta obtida é mostrada na Figura 20a, na qual, é possível observar que à medida que  $F_E$  e  $T_S$  são menores, maior o rendimento do teor de ácido elágico nos extratos secos de *M. cauliflora*.

O termo de interação  $T_S \times V_A$  (vazão do ar de secagem) exerceu efeito negativo sobre a resposta analisada e conforme mostrado na Figura 20b, maior aquecimento do ar de entrada aliado a uma menor vazão do ar de secagem proporcionou um aumento no teor de ácido elágico. Ainda, a interação  $F_E \times V_A$  influenciou positivamente o teor de ácido elágico, conforme o gráfico de superfície mostrado na Figura 20c, onde é possível observar que os menores níveis de  $F_E$  e  $V_A$  aliados proporcionam um maior rendimento da resposta.



**Figura 20.** Superfície de resposta do teor de ácido elágico no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função do  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

Quando foram analisadas como variáveis-resposta o teor de fenóis totais ( $FT$ ) e o rendimento do extrato seco ( $Rs$ ), não foram encontrados efeitos significativos. No entanto para o teor de flavonoides totais ( $Fv$ ), o termo de interação  $-0,8197$  foi significativo ao nível de 10%, conforme apresentado na Figura 21, em que os maiores teores são obtidos em menores níveis de fluxo de alimentação de extrato e maiores níveis de vazão do ar de secagem.

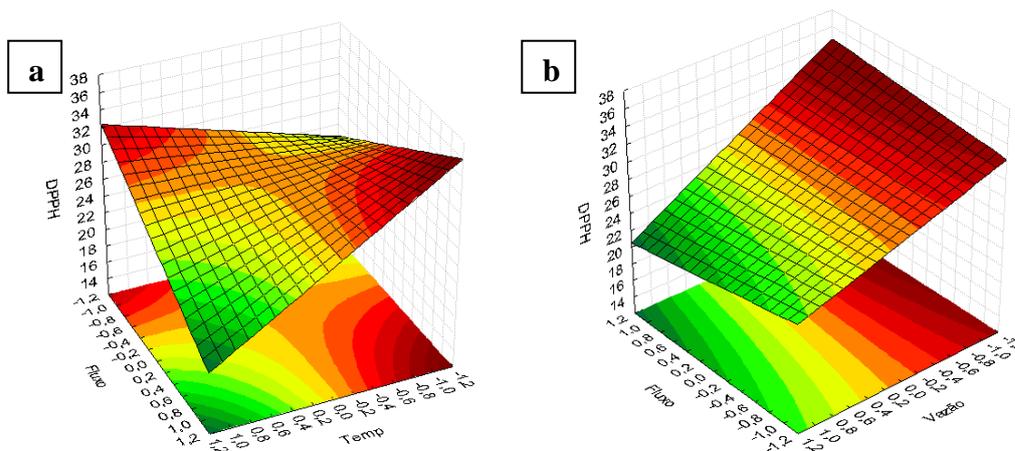


**Figura 21.** Superfície de resposta do teor de flavonoides totais no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função de  $F_E$  e  $V_A$ . Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

Quanto à atividade antioxidante, foi verificado, ao nível de significância de 5%, que a temperatura do ar de secagem ( $T_S$ ) exerceu efeito negativo sobre a capacidade de captura de radicais DPPH. Isso pode ser devido à inativação de outros compostos presentes no extrato, além do ácido elágico, que também apresentam capacidade de sequestrar radicais livres DPPH, (SHARIDI;NACZK, 1995; MALACRIDA;MOTTA, 2006).

A vazão do ar de secagem ( $V_A$ ) também foi capaz de influenciar negativamente a atividade antioxidante do extrato seco de *M. cauliflora*. Portanto maiores níveis de Vazão proporcionam extratos secos com menores atividades antioxidantes.

As interações  $T_S \times V_A$  e  $F_E \times V_A$  apresentaram sinal negativo conforme visualizadas na Tabela 15 (página 67). Níveis menores de temperatura e maiores de fluxo de alimentação de extrato proporcionam extratos com melhores propriedades quanto à atividade antioxidante (Figura 22a). Como mostrado na Figura 22b, maiores valores de fluxo de alimentação de extrato aliados a menores níveis de vazão do ar de secagem também resultam em extratos secos com maior atividade antioxidante.



**Figura 22.** Superfície de resposta da atividade antioxidante do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função do fluxo de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $F_E$  e  $V_A$  (b). Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ = Vazão do ar de secagem.

Um extrato seco pode conter água na forma livre ou ligada. A atividade de água ( $A_w$ ) equivale à quantidade de água livre disponível no meio capaz de proporcionar desenvolvimento microbológico. Produtos que apresentam baixa atividade de água não são adequados para o crescimento de microrganismos (WHO, 1998).

Nos extratos secos obtidos nos planejamentos propostos, todos os valores encontrados para a atividade de água ( $A_w$ ) variaram de 0,146 a 0,359.

O risco de contaminação microbológica pode ser classificado de 0 a 4. O nível 0 apresenta baixa atividade de água (0-0,16), portanto baixo risco de contaminação, enquanto o nível 4 apresenta alta atividade de água (> 0,5), com alto risco de contaminação microbológica. Os extratos secos gerados no planejamento

2<sup>3</sup> apresentaram valores de  $A_w$  menores que 0,5, estando dentro dos limites de qualidade aceitos quanto a este parâmetro (ORTH, 1993). Todos os efeitos relativos à atividade de água foram significativos aos níveis de 5% e 10%.

Embora os valores obtidos em todas as secagens tenham ficado dentro dos parâmetros de qualidade, a atividade de água é uma resposta que pode ser minimizada, proporcionando maior segurança aos produtos intermediários (insumos) obtidos. Um menor fluxo de extrato aliado a uma maior temperatura do ar de secagem proporciona menores valores para a atividade de água, conforme apresentado na Figura 23a. Elevados níveis de vazão do ar de secagem ( $V_A$ ) aliado a temperaturas maiores do ar de secagem ( $T_S$ ) resultam em menores valores de atividade de água, e esta interação pode ser observada na Figura 23b, enquanto que menores níveis de fluxo de alimentação de extrato ( $F_E$ ) proporcionaram menores valores de atividade de água para os extratos secos obtidos, como apresentado na Figura 23c.

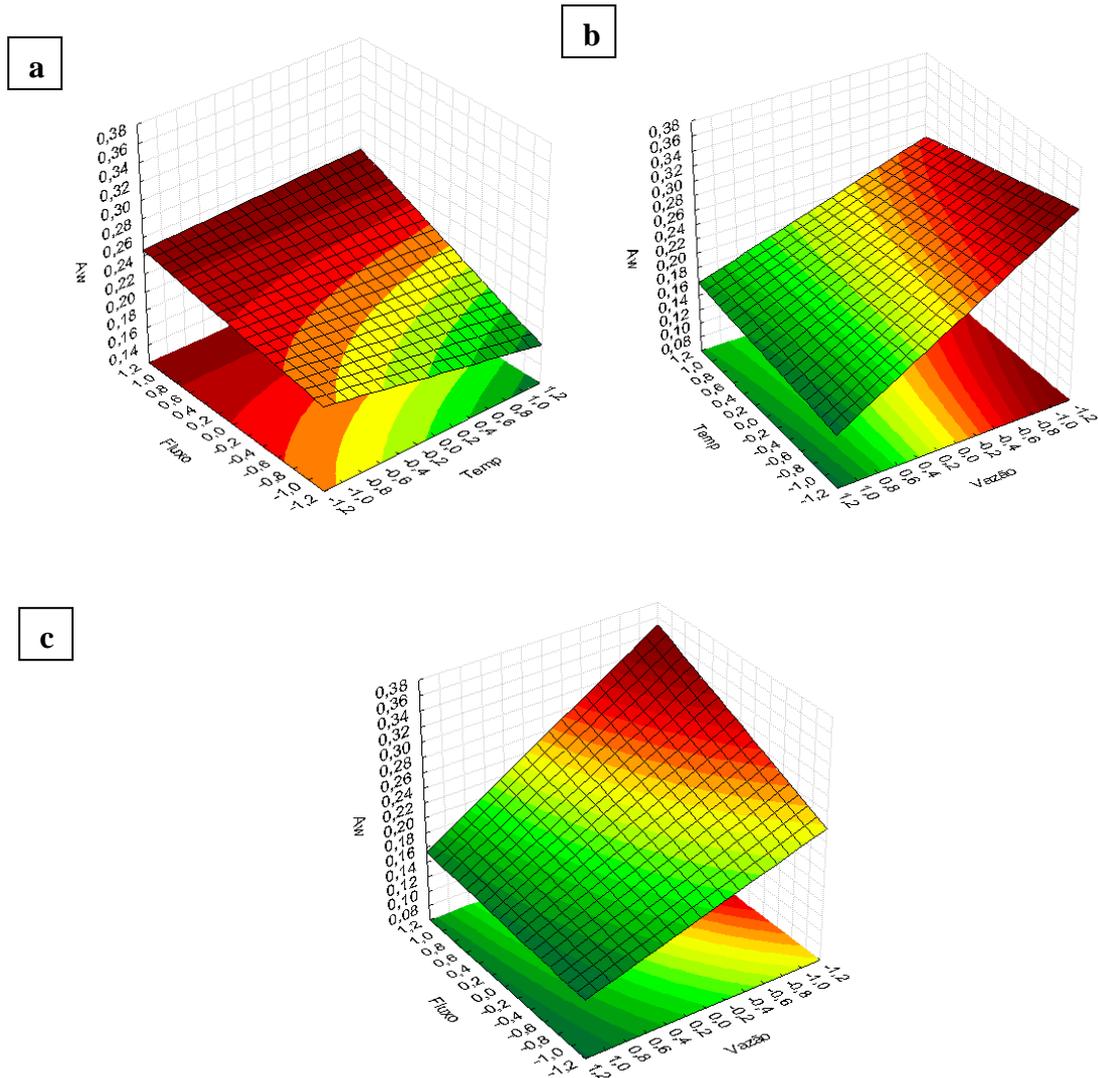
As equações ajustadas com os respectivos coeficientes de correlação estão descritas na Tabela 16.

**Tabela 16.** Equações ajustadas e coeficientes de correlação ( $r$ ) dos resultados experimentais de obtenção de extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização,.

Equações	$r$
$EA=0,049-0,004F_E + 0,004T_S \times F_E -0,005T_S \times V_A +0,005F_E \times V_A$	0,7980
$Fv=6,28- 0,41 V_A \times F_E$	0,8302
$DPPH=28,03-1,9T_S-4,54 V_A-4,29T_A \times F_E -1,13F_E \times V_A$	0,8608
$Aw=0,22-0,008 T_S+0,03F_E-0,06 V_A+0,01 T_S \times F_E +0,02 T_S \times V_A -$ $0,02F_E \times V_A$	0,8291

$T_S$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem;  $AE$ : Teor de ácido elágico;  $FT$ : Teor de fenóis totais;  $Rs$ : Rendimento da secagem;  $Fv$ : Flavonoides totais;  $AAO$ : Porcentagem de inibição do radical DPPH,  $A_w$ : Atividade de água

A partir deste conjunto de efeitos é possível elaborar um planejamento em três níveis para uma descrição mais detalhada do processo de secagem do extrato das cascas dos frutos de *M. cauliflora*.



**Figura 23.** Superfície de resposta da atividade água no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização, em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $T_S$  e  $V_A$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

#### 4.11 Planejamento Box-Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco

Com base no Planejamento de 2 níveis para a obtenção do extrato seco a partir do extrato concentrado dos resíduos das cascas dos frutos de *M. cauliflora*, as variáveis temperatura (T), fluxo de alimentação do extrato (Fluxo) e vazão do ar de secagem (Vazão) foram investigadas de forma mais detalhada utilizando o método de superfície de resposta associado ao Planejamento experimental Box-Behnken. Assim, foram avaliadas 17 condições experimentais.

Os níveis escolhidos e as respostas obtidas estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Planejamento fatorial Box-Behnken ( $3^3$ ) e o resultado das respostas analisadas.

Exp.	Temp	Fluxo	Vazão	AE(%)	Aw	Fv	FT	DPPH
1	-1	-1	0	0,0567	0,316	4,4826	15,5386	42,5844
2	1	-1	0	0,0819	0,229	4,9817	16,0557	67,9883
3	-1	1	0	0,0813	0,281	4,7113	20,1486	34,2144
4	1	1	0	0,0813	0,266	4,7157	16,0055	43,7592
5	-1	0	-1	0,0847	0,286	3,933	15,1082	44,7871
6	1	0	-1	0,0871	0,262	4,3282	7,1705	44,9339
7	-1	0	1	0,0822	0,222	4,397	16,5804	48,0176
8	1	0	1	0,0824	0,176	4,8329	15,6494	49,9266
9	0	-1	-1	0,091	0,236	5,6421	16,6222	51,5419
10	0	1	-1	0,0851	0,258	4,3719	16,4655	50,9545
11	0	-1	1	0,089	0,175	4,9003	16,0721	38,4728
12	0	1	1	0,0836	0,171	5,1571	15,8642	38,1791
13	0	0	0	0,083	0,246	4,8052	16,2545	38,326
14	0	0	0	0,0858	0,228	4,3084	15,7887	40,8223
15	0	0	0	0,0888	0,251	6,3649	15,526	34,5081
16	0	0	0	0,0865	0,307	4,5887	15,0436	43,6123
17	0	0	0	0,0929	0,299	4,5927	15,3707	35,2423

AE: Teor em % de ácido elágico; FT: Teor em % de fenóis totais; Rs: Rendimento da secagemem %; Fv: Teor em % de flavonoides totais; AAO: Porcentagem de inibição do radical DPPH, Aw: Atividade de água. Temperatura:100°C; -1 =120°C; 1= 110°C;0; Fluxo de alimentação de extrato: -1 = 3 mL/min; 1= 5 mL/min; 4mL/min; Vazão do ar de secagem: -1 = 40 L/min; 1= 50 L/min; 0=45L/min.

O Planejamento realizado em 3 níveis para a obtenção do extrato seco mostrou que o teor de ácido elágico (AE) foi influenciado ao nível de significância de 5% apenas pelo efeito quadrático da Temperatura ( $Ts^2$ )e pelo efeito de interação entre Temperatura do ar de secagem e Fluxo de alimentação de extrato ( $Ts \times F_E$ ). A superfície que representa a interação entre esses dois fatores por ser visualizada na Figura 24. O efeito linear da Temperatura ( $Ts$ ) e os efeito quadrático do Fluxo de

alimentação de extrato ( $F_E^2$ ) e da Vazão do ar de secagem ( $V_A^2$ ) também foram significativos ao nível 10% (Tabela 18). As superfícies que representam a influência dos parâmetros  $F_E$  e  $V_A$  estão representadas na Figura 24c.

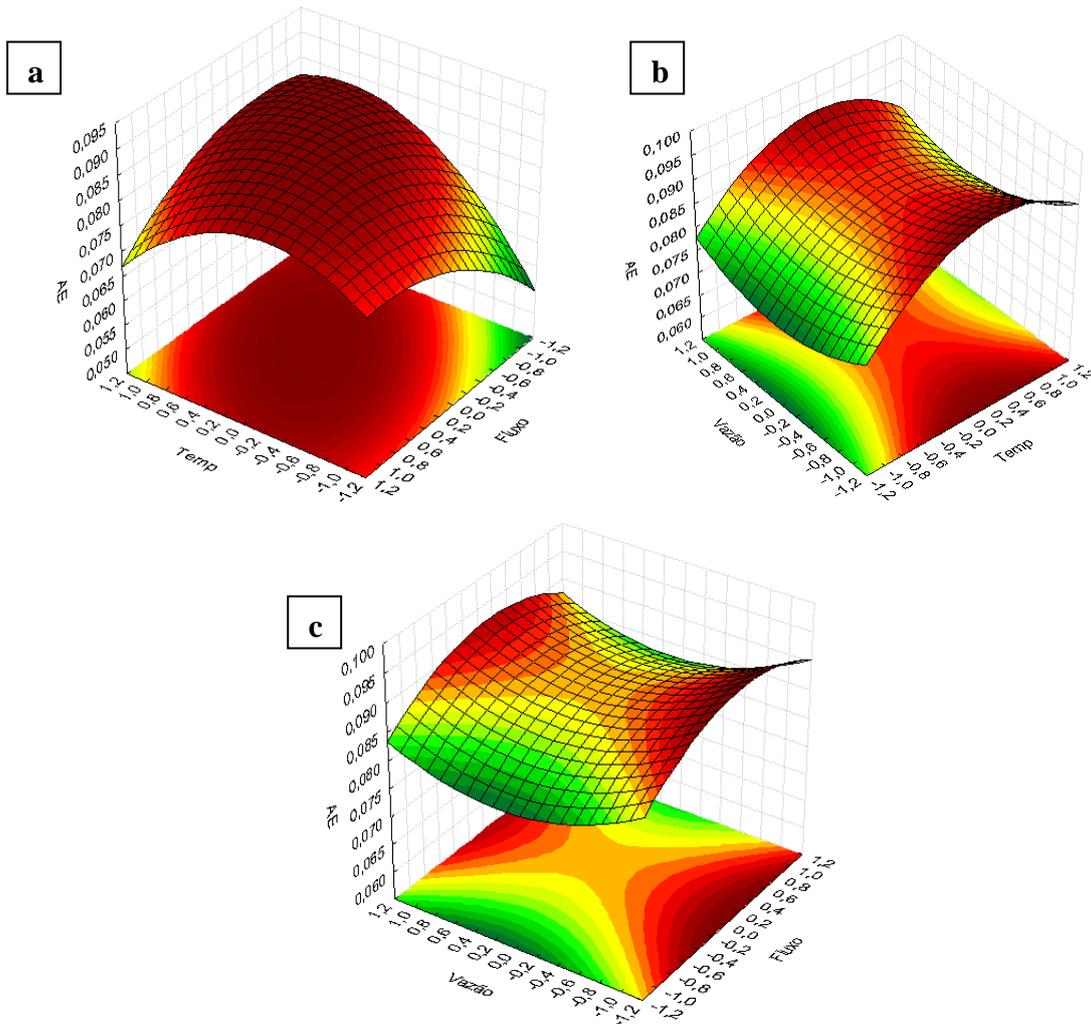
**Tabela 18.** Sumário dos efeitos de variáveis de secagem e suas significâncias ( $p$ ) sobre as propriedades do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização empregando o Planejamento Box-Behnken.

Fator	AE	FT	RS	Fv	AAO	Aw
$T_s$	0,0070 <sup>b</sup>	-3,1237 <sup>a</sup>	ns	ns	9,2511 <sup>a</sup>	-0,0430 <sup>a</sup>
$T_s^2$	0,0076 <sup>a</sup>	0,6442 <sup>a</sup>	ns	ns	-5,3818 <sup>a</sup>	ns
$F_E$	ns	1,0489 <sup>a</sup>	ns	ns	-8,3700 <sup>a</sup>	ns
$F_E^2$	0,0045 <sup>b</sup>	-1,9847 <sup>a</sup>	ns	ns	ns	ns
$V_A$	ns	2,1999 <sup>a</sup>	ns	ns	ns	-0,0745 <sup>a</sup>
$V_A^2$	0,0043 <sup>b</sup>	1,3253 <sup>a</sup>	ns	ns	ns	0,0463 <sup>a</sup>
$T_s \times F_E$	-0,0126 <sup>a</sup>	-2,3301 <sup>a</sup>	ns	ns	-7,9295 <sup>b</sup>	ns
$T_s \times V_A$	ns	3,5034 <sup>a</sup>	ns	ns	ns	ns
$F_E \times V_A$	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Significante ao nível de :<sup>a</sup>5%, <sup>b</sup>10%, <sup>c</sup>15%;  $T_s$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem; AE: Teor de ácido elágico; FT: Teor de fenóis totais; Rs: Rendimento da secagem; Fv: flavonoides totais; AAO: Porcentagem de inibição do radical DPPH, Aw: Atividade de água, ns: não significante.

Nesse planejamento, os valores de ácido elágico livre encontrados nos extratos secos variaram de 0,0567 a 0,0929 % e esses teores encontram-se na faixa observada em diversos frutos consumidos no Brasil, que variam em média de 0,00028 a 0,0085%, conforme estudo realizado por ABE; LAJOLO;GENOVESE (2011). Os autores relataram que o teor de ácido elágico encontrado nas cascas dos frutos de jaboticaba foi equivalente a 0,006 % $\pm$ 0,003 (ABE; LAJOLO;GENOVESE, 2011), o que revela que os teores desse marcador livre encontrado nos extratos secos de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtidos por nebulização são consideráveis em relação à quantidade presente nos frutos, com teores até 15 vezes maiores nos extratos secos quando comparado com o valor presente nas cascas dos frutos de jaboticaba.

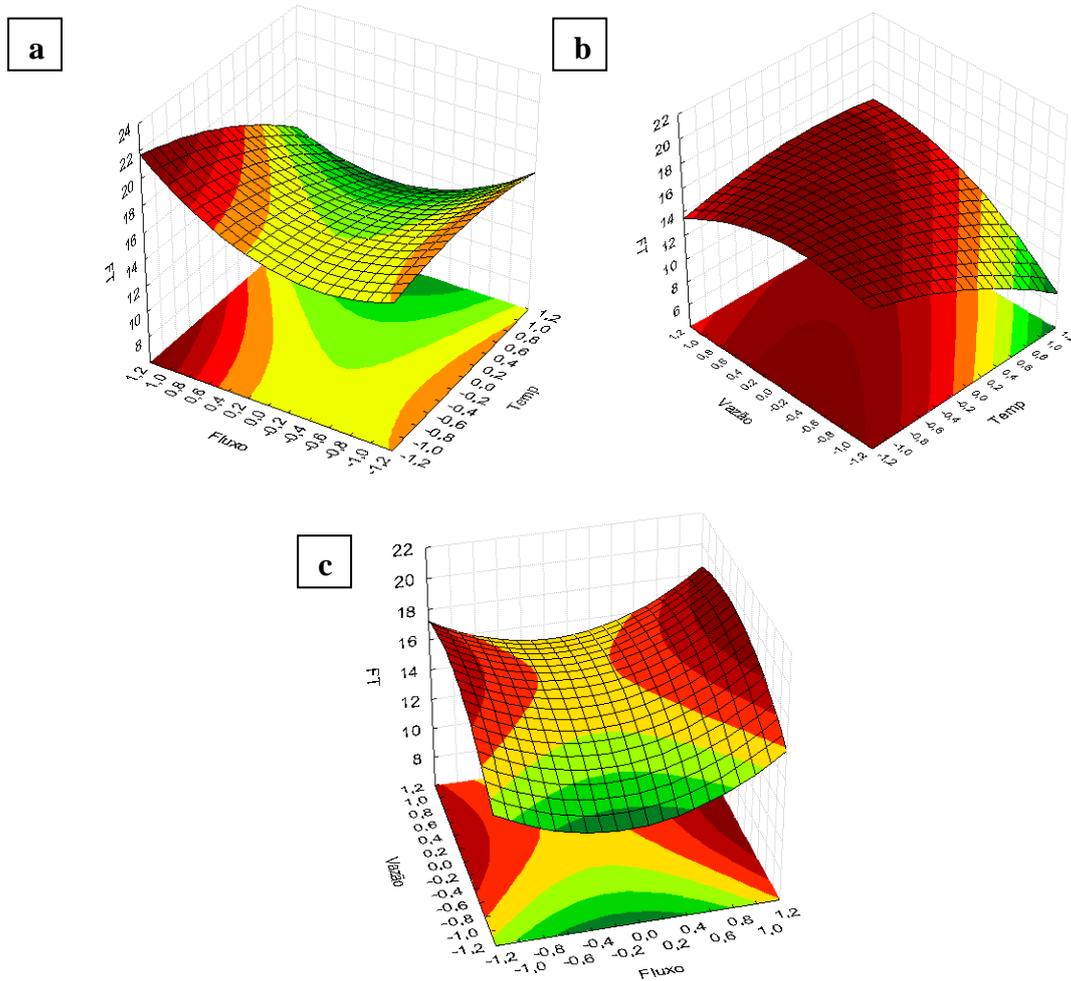
Para fenóis totais, no Planejamento em três níveis de secagem, foi observado que um modelo quadrático é capaz de explicar o comportamento dos teores em função de todos os parâmetros que foram submetidos à variação (Figura 25). Valores maiores para o Fluxo de alimentação de extrato associado a menores valores da Temperatura do ar de secagem promoveram um aumento na quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos secos obtidos.



**Figura 24.** Superfície de resposta do teor de ácido elágico presente no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

Maiores níveis para a Vazão do ar de secagem também favoreceram o teor de fenóis totais, o que pode ser explicado pela maior taxa de evaporação do líquido,

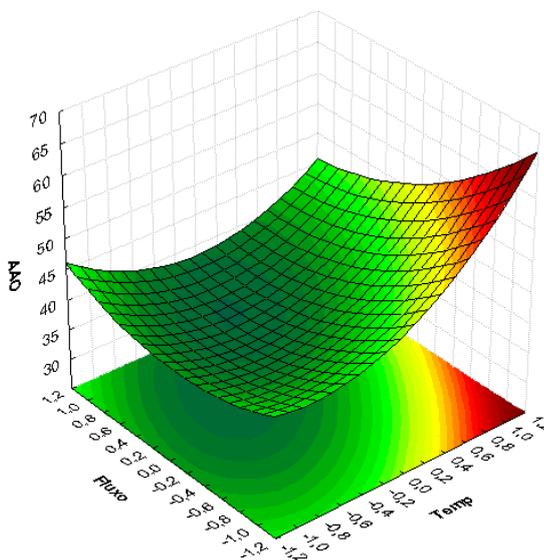
impedindo que os compostos presentes no extrato fiquem por um longo período em uma atmosfera úmida, facilitando sua degradação (MULINACCI *et al.*, 2011; OLIVEIRA, G. A. R., 2013).



**Figura 25.** Superfície de resposta do teor de fenóis totais do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização em  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c). Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

Para a avaliação da atividade antioxidante utilizando como modelo a capacidade de captura dos radicais livres DPPH, os efeitos linear ( $T_S$ ) e quadrático da Temperatura do ar de secagem ( $T_S^2$ ) e efeito linear do Fluxo de alimentação de extrato ( $F_E$ ) foram significativos ao nível de 5%, com apenas  $T_S$  exercendo uma influência negativa sobre essa resposta analisada. O efeito de interação  $T_S \times F_E$  também foi negativo ao nível de significância de 10%. A partir da superfície de

resposta mostrada na Figura 26, pode ser analisado o comportamento da atividade antioxidante frente a esses dois parâmetros discutidos anteriormente.



**Figura 26.** Superfície de resposta da atividade antioxidante do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização, em função de  $F_E$  e  $T_S$ . Onde:  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

Com o objetivo de conhecer melhor qual a relação entre as respostas estudadas, uma análise de correlação de Pearson foi realizada entre a capacidade de captura de radicais DPPH e os demais fatores analisados como resposta, no entanto nenhum dos coeficientes encontrados foi significativo.

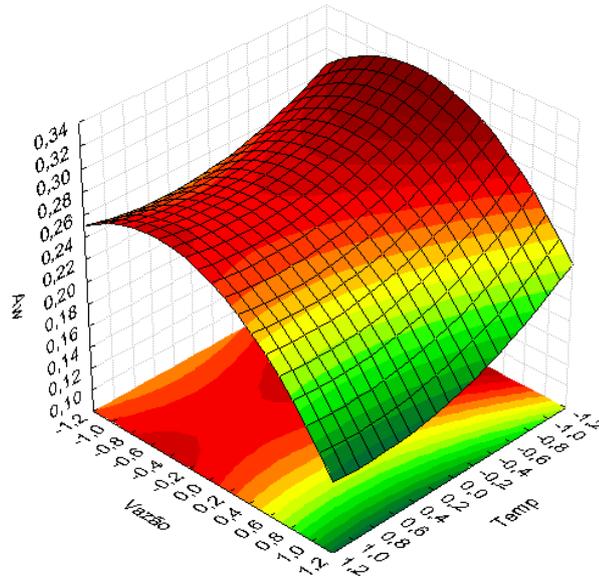
A ausência de correlação entre a atividade antioxidante e os teores do marcador analisado (ácido elágico), sugere que outras substâncias presentes nos resíduos (compostos não analisados), também estão envolvidas com a atividade antioxidante encontrada nos secos obtidos (CAVALCANTI; VEGGI; MEIRELES, 2011; VEGGI; SANTOS; MEIRELES, 2011; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

A ausência de correlação entre atividade antioxidante e outros marcadores analisados para extratos secos obtidos por *spray-drying* também foi encontrado em estudo de COUTO *et al.* (2012) para a espécie *Rosmarinus officinalis*, revelando a grande complexidade de compostos existente em extratos obtidos de fontes naturais

(IBARRA *et al.*, 2010). Assim, é necessário considerar a ocorrência de sinergismo entre os compostos presentes no extrato, o que torna as propriedades biológicas dependentes das heterogêneas estruturas químicas e da interação entre essas substâncias, além da concentração de cada uma delas. Ou seja, a atividade antioxidante dos extratos obtidos é resultado de uma interação de uma grande variedade de compostos (sinergismo) e não apenas do ácido elágico e demais classes de compostos analisadas neste trabalho (GEORGETTI *et al.*, 2008; WAGNER, 2011; COUTO *et al.*, 2012).

A atividade de água é um importante parâmetro, porque é uma medida da atividade química da água sobre o material analisado, isto é, quanto menor a atividade de água, menor o potencial desse componente em desencadear reações de hidrólise. Além disso, a umidade é um fator intimamente relacionado com o potencial de crescimento de microrganismos. Portanto, a atividade de água e a sua manutenção em níveis baixos em produtos secos é um aspecto crucial dentro da tecnologia de alimentos e farmacêutica e tem sido objeto de intensa pesquisa nos últimos anos.

Nos experimentos realizados, todos os valores de atividade de água obtidos no planejamento de secagem encontrados foram menores que 0,5 (Tabela 17, página 73), o que mostra que esse parâmetro está adequado, colaborando para a estabilidade química e microbiológica do produto obtido (KAREL;LUND, 2003; COUTO *et al.*, 2011).



**Figura 27.** Superfície de resposta da atividade água no extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização, em função de  $T_S$  e  $V_A$ . Onde:  $T_S$ =Temperatura do ar de entrada;  $V_A$ =Vazão do ar de secagem.

A partir da observação do gráfico de superfície apresentado na Figura 27, é possível observar que temperaturas maiores do ar de entrada favorecem menores valores para atividade de água, o que está provavelmente associado à maior evaporação de água em níveis de calor maiores, o que colabora para a maior estabilidade do produto resultante.

As equações ajustadas com os respectivos valores de  $r$  (coeficiente de correlação) estão apresentadas na Tabela 19.

**Tabela 19.** Equações ajustadas e coeficientes de correlação dos resultados experimentais para o Planejamento Box-Behnken da secagem por nebulização, do extrato de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*

Equações	r
$AE=0,087+0,0034T_S-0,0076T_S^2-0,0045F_E^2+0,0042V_A^2-0,0063T_S \times F_E$ $FT=15,5967-1,5618T_S-$ $0,6442T_S^2+0,5244F_E+1,9846F_E^2+1,0997V_A+1,32V_A^2-1,1650T_S \times F_E+1,75$ $T_S \times V_A$	0,8454
$AAO=38,50-4,62T_S+5,38T_S^2-4,18F_E-3,96T_S \times F_E$	0,8741
$Aw=0,2662-0,0215T_S-0,0372V_A-0,0463V_A^2$	0,7615
	0,9182

$T_S$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem;  $AE$ : Teor de ácido elágico;  $FT$ : Teor de fenóis totais;  $AAO$ : Porcentagem de inibição do radical DPPH,  $Aw$ : Atividade de água.

Para otimizar um conjunto de respostas simultaneamente, funções de desejabilidade podem ser empregadas, onde essas respostas individuais são transformadas para uma escala adimensional. Esses valores individuais são posteriormente utilizados para o cálculo da Desejabilidade global por meio da média aritmética dos valores das desejabilidades individuais. Portanto, o parâmetro da Desejabilidade global pode ser interpretado como uma resposta capaz de representar todas as respostas individuais analisadas (DERRINGER;SUICH, 1980).

A função de Desejabilidade, associada à metodologia de superfície de resposta, tem se mostrado uma ferramenta bastante útil para solucionar problemas com muitas variáveis e otimizar múltiplas respostas simultaneamente (DERRINGER;SUICH, 1980; MYERS;MONTGOMERY, 2002).

A otimização do processo de secagem foi realizada através da Desejabilidade global, uma função dependente da atividade de água, teor de ácido elágico, teor de fenóis totais e atividade antioxidante. Apenas a atividade de água foi minimizada na função e as demais respostas foram maximizadas. Dessa forma, por meio da função de Desejabilidade global foi encontrada uma série de condições nas quais essas respostas seriam simultaneamente as melhores, de acordo com o objetivo da otimização. O teor de flavonoides totais não foi incluído na Desejabilidade global, pois não apresentou efeitos significantes quando foi realizada sua análise individual (Tabela 18, página 74).

A partir da combinação (média geométrica) das desejabilidades individuais, foram obtidas soluções para a Desejabilidade global e condições ótimas para as respostas analisadas. As dez soluções obtidas foram maiores que 0,8014 ( $D > 0,8014$ ), conforme mostrado na Tabela 20.

**Tabela 20.** Valores preditos para as respostas analisadas na otimização do processo de obtenção do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*, obtido por nebulização.

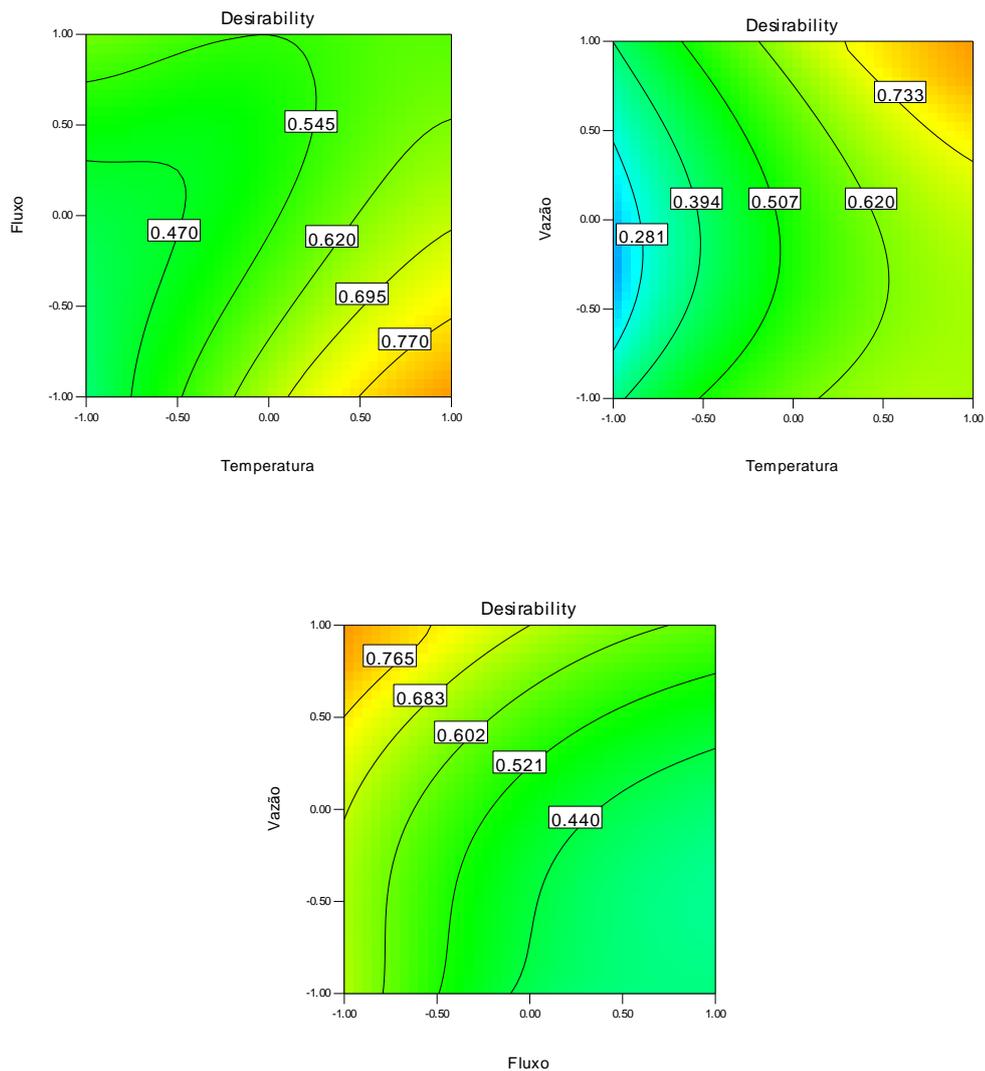
Solução	$T_S$	$F_E$	$V_A$	$A_w$	$AE$	$FT$	$AAO$	$D$
1	1	-1	1	0,1484	0,0858	17,5550	61,1078	0,8456
2	1	-1	0,99	0,1500	0,0857	17,5521	61,0550	0,8446
3	1	-0,99	1	0,1488	0,0858	17,5144	60,9761	0,8440
4	0,98	-1	1	0,1486	0,0859	17,5535	60,7223	0,8434
5	1	-0,97	1	0,1493	0,0859	17,4343	60,7253	0,8410
6	0,95	-1	1	0,1491	0,0860	17,5505	60,2153	0,8402
7	1	-1	0,9	0,1609	0,0852	17,5201	60,7135	0,8373
8	0,91	-1	1	0,1495	0,0862	17,5445	59,4407	0,8353
9	0,98	-1	0,77	0,1756	0,0846	17,4447	59,8620	0,8185
10	0,68	-1	1	0,1539	0,0869	17,4665	55,2800	0,8014

$T_S$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : vazão do ar de secagem;  $A_w$ : Atividade de água;  $AE$ : Teor de ácido elágico;  $FT$ : Teor de fenóis totais;  $AAO$ : Atividade antioxidante por captura de DPPH;  $D$ : Desejabilidade global.

Os resultados indicaram que os níveis codificados para as soluções com os maiores valores para a função de Desejabilidade global foram de 0,68 até 1 para Temperatura do ar de secagem (116,8 até 120 °C), -1 até -0,97 para o Fluxo de alimentação do extrato (3 até 3,03 mL/min) e 0,77 até 1 para Vazão do ar de secagem (48,85 até 50 L/min).

Os gráficos de contorno mostrados na Figura 28 revelaram que os extratos secos com as melhores propriedades possíveis dentre aquelas analisadas estão localizados em regiões com maiores valores de temperatura do ar de secagem ( $T_S$ ), menores níveis de fluxo de alimentação de extrato ( $F_E$ ) e maiores valores de vazão do ar de secagem ( $V_A$ ).

Quando necessária a avaliação simultânea de várias propriedades de um mesmo sistema, a função de Desejabilidade se mostra uma valiosa ferramenta para a obtenção de produtos com várias respostas otimizadas. Existem vários trabalhos no campo dos produtos naturais que empregam essa ferramenta estatística com o objetivo de melhorar as propriedades em vários produtos e também métodos extrativos (OLIVEIRA, G. A. R., 2013).



**Figura 28.** Gráfico de contorno representando a Desejabilidade global relativa as seguintes respostas:  $A_w$ ,  $AE$ ,  $FT$  e  $AAO$  em função de  $F_E$  e  $T_S$  (a);  $V_A$  e  $T_S$  (b);  $F_E$  e  $V_A$  (c), no processo de obtenção do extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização.  $T_S$ : Temperatura do ar de secagem;  $F_E$ : Fluxo de alimentação de extrato;  $V_A$ : Vazão do ar de secagem;  $A_w$ : Atividade de água;  $AE$ : Teor de ácido elágico;  $FT$ : Teor de fenóis totais;  $AAO$ : Porcentagem de inibição do radical DPPH.

A condição ótima de secagem com o maior valor de Desejabilidade global (Tabela 20, página 81; Solução 1), com  $D=0,8456$ , foi testada em triplicata por meio de um experimento comprobatório e os resultados foram  $0,0844 \pm 0,0013\%$  para o teor de ácido elágico,  $16,27 \pm 0,63 \%$  para o teor de compostos fenólicos totais,  $0,176 \pm 0,02$  para a atividade de água e  $56 \pm 1,3 \%$  para a atividade antioxidante. Os valores obtidos a partir do ensaio de verificação se assemelham aos preditos, o que confirma que o modelo empregado foi adequado.

Dessa forma, a partir dos experimentos realizados, as condições ótimas para a obtenção de extrato seco de resíduos agroindustriais de cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* obtido por nebulização são as seguintes: Temperatura do ar de secagem de 116,8 até 120 °C, Fluxo de alimentação do extrato de 3 até 3,03 mL/min e Vazão do ar de secagem de 48,85 até 50 L/min.

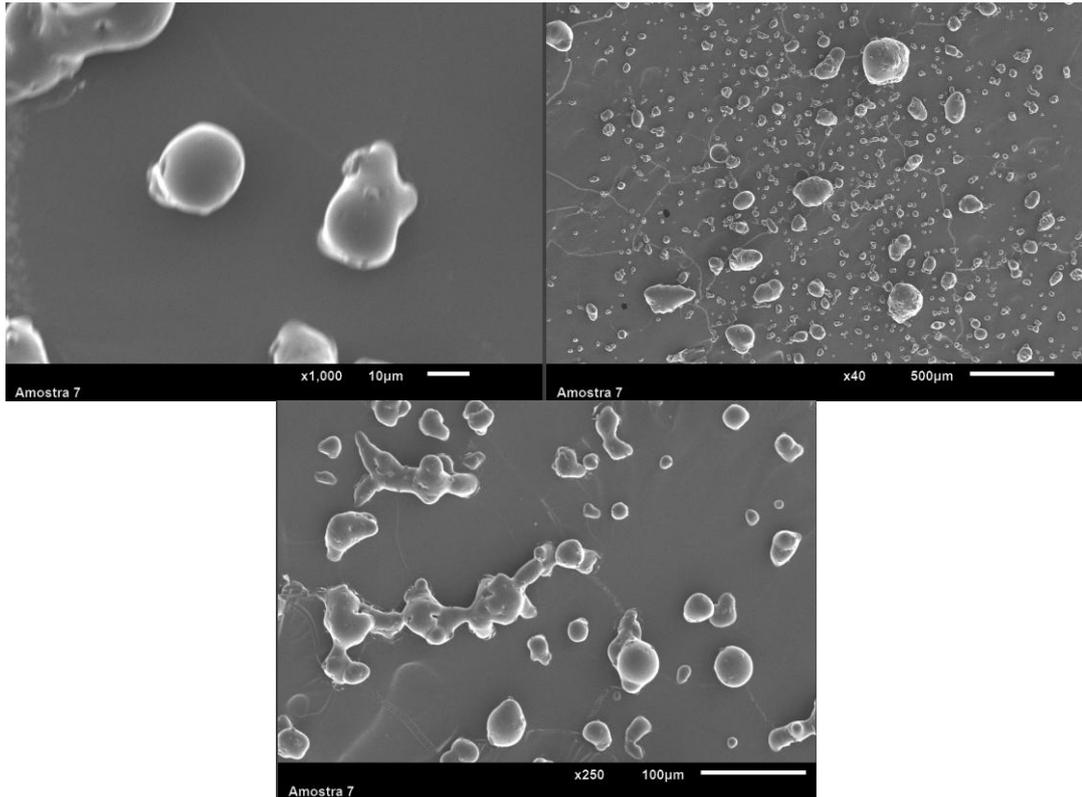
#### **4.12 Caracterização microscópica dos extratos secos**

A morfologia dos grânulos de um extrato seco é importante por constituir em mais um parâmetro que pode ser utilizado para a padronização do extrato obtido, ou seja, consiste em um dos fatores utilizados para a avaliação da reprodutibilidade do processo (MARTINS, 2012).

As eletromicrografias revelaram que os extratos secos obtidos pelas diferentes condições estabelecidas pelo Planejamento em três níveis discutido no item 4.11, páginas 72 a 83, apresentaram morfologia semelhante, como partículas predominantemente com formato esférico e com dimensões próximas a 10  $\mu\text{m}$ , conforme apresentado na Figura 29.

Embora as duas primeiras imagens mostrem a presença de grumos, o que poderia representar um fator negativo para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas, os extratos secos apresentaram-se macroscopicamente com aspecto de pó fino sem grumos (MARTINS, 2012).

A formação de grumos pode estar relacionada com o formato do bico de aspersão, temperatura do ar de secagem e vazão do ar de secagem, taxa de alimentação de extrato ou fusão das partículas menores no frasco coletor (MARTINS, 2012).

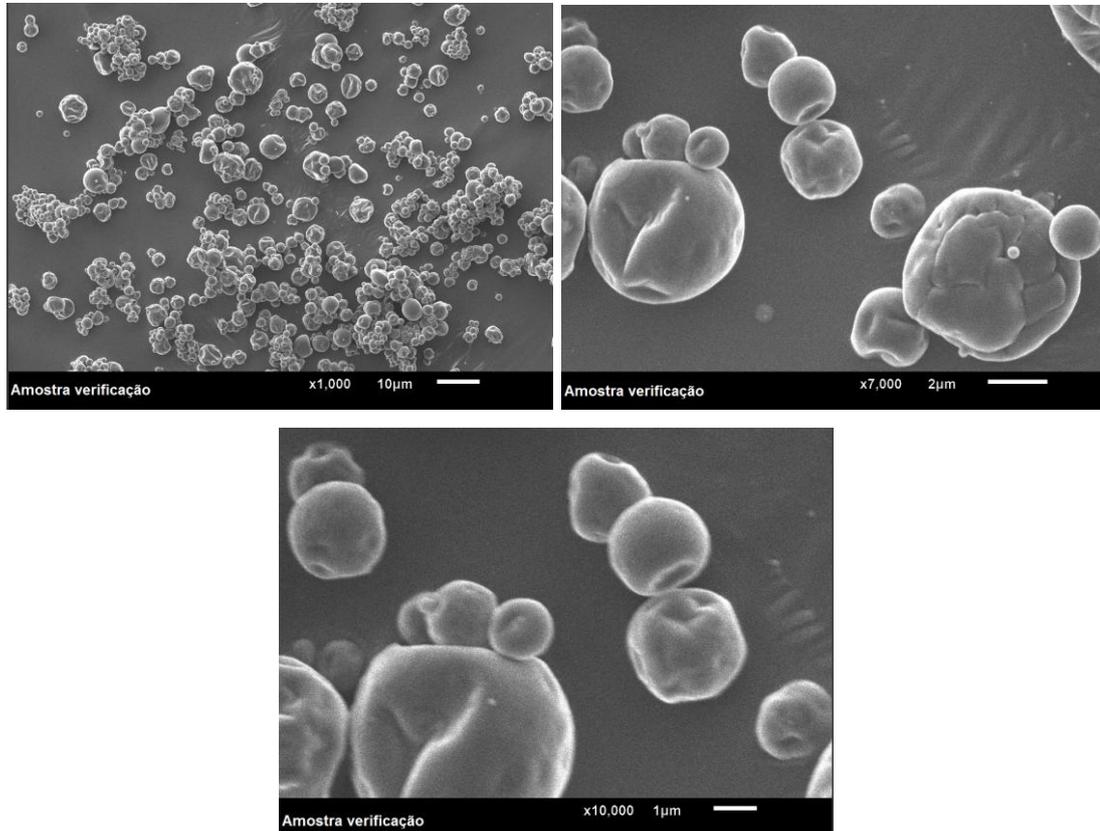


**Figura 29.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos extrato seco obtido dos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* por nebulização (Amostra 7).

Nota: Extrato seco obtido conforme o experimento 7 do Planejamento em 3 níveis, portanto nas seguintes condições: Temperatura do ar de secagem de 100 °C, Fluxo de alimentação de extrato de 4mL/min e Vazão do ar de secagem de 50 L/min.

Dependendo também das características de elasticidade e permeabilidade do material a ser seco, podem ser produzidos diferentes materiais secos como esferas intactas, sólidas ou ocas ou materiais com a predominância de partículas com a superfície imperfeita ou até mesmo fragmentada (RANKELL; LIEBERMAN; SCHIFFMAN, 2001; OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, 2010). Quando são analisados os parâmetros de processo, um dos fatores de maior importância é a Temperatura do ar de entrada, afetando diretamente a qualidade do produto obtido. O aumento da Temperatura do ar de secagem geralmente resulta em redução da tensão superficial e viscosidade do extrato, o que facilita a formação de gotículas. Possivelmente devido a menor temperatura do ar de entrada para a Amostra 7 (Figura 29), ocorreu uma maior formação de grumos (MARTINS, 2012). A contração e deformação das partículas secas são mais pronunciadas também quando os valores de temperatura do ar de secagem são mais baixos, devido à menor difusão

da água, ocorrendo um aumento no tempo de secagem o que favorece a deformação e rompimento das estruturas (OAKLEY, 1997; ALAMILLA-BELTRÁN *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2014).



**Figura 30.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos extrato seco obtido dos resíduos dos frutos de *M. cauliflora* por nebulização (Amostra referente ao experimento de verificação).

Nota: Extrato seco obtido conforme o experimento de verificação, portanto nas seguintes condições: Temperatura do ar de secagem de 120 °C, Fluxo de alimentação de extrato de 3 mL/min e Vazão do ar de secagem de 50 L/min.

No produto obtido, a superfície das partículas mostrou-se lisa e isso pode ser atribuído à utilização de maltodextrina como adjuvante de secagem, o que também foi observado no processo de obtenção do extrato seco de *Ocimum gratissimum* L., no qual diferentes adjuvantes de secagem foram testados e seus efeitos sobre a qualidade dos extratos secos foram avaliados (MORAES, C. S. S., 2012). A utilização de maltodextrina como adjuvante de secagem apresenta algumas vantagens como efeito protetor contra degradação de compostos fenólicos durante o processo de secagem, além de ser um dos adjuvantes que proporcionam menor

higroscopia ao extrato seco obtido (TONON, R. V.; BRABET;HUMBINGER, 2009; AHMED *et al.*, 2010; FANG;BHANDARI, 2011; LIM; MA;DOLAN, 2011). A utilização de outros adjuvantes de secagem como Aerosil<sup>®</sup> 200 (Dióxido de silício coloidal) normalmente resultam em partículas com superfície irregular e rugosas (MARTINS, 2012).

Após o estabelecimento das melhores condições de secagem utilizando a função de desejabilidade global, a amostra com o maior valor de  $D$  foi reproduzida experimentalmente e além das respostas preditas serem verificadas, essa amostra foi submetida à Microscopia eletrônica de varredura (Figura 30). Assim como na primeira análise microscópica realizada (Figura 29), as partículas formaram grumos, no entanto em menor quantidade que a Amostra 7. Tal fato ocorreu, provavelmente, porque a condição da desejabilidade foi obtida com maior temperatura do ar de entrada e também maior vazão do ar de secagem.

## **CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

Até onde vai nosso conhecimento, é a primeira vez que resíduos agroindustriais de jabuticaba submetida a fermentação são processados no sentido de obter um produto de maior valor agregado.

O produto obtido (extrato seco de cascas de *Myrciaria cauliflora* padronizado em ácido elágico) mostrou ter características desejáveis para insumos ativos úteis nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Muitas das etapas do desenvolvimento desse produto foram descritas pela primeira vez. Os ensaios utilizados caracterização do material vegetal permitiram o estabelecimento de parâmetros para a avaliação de características úteis para o seu controle de qualidade. O método analítico desenvolvido em CLAE foi adequado para a identificação e quantificação do ácido elágico em resíduos agroindustriais dos frutos de *M. cauliflora*, sendo que o tempo de retenção para o mesmo foi de 7,7 min, colaborando para que método seja simples e rápido.

Quanto à obtenção e caracterização do extrato líquido, os estudos de otimização do método extrativo, revelaram que dentre todos os fatores estudados, o principal fator envolvido no rendimento de ácido elágico extraído assim como na atividade antioxidante total por DPPH foi a graduação alcoólica, sendo que o melhor líquido extrator é a solução hidroalcoólica 45%, valor escolhido para o processo de percolação.

A associação entre o planejamento fatorial e a secagem por nebulização possibilitou concluir que as variáveis envolvidas no processo exerceram influência sobre as respostas analisadas, com exceção de fenóis totais e o rendimento de secagem. O planejamento em dois níveis foi capaz de dar subsídios para a construção de um planejamento em três níveis capaz de direcionar uma condição ótima para a obtenção de extratos secos das cascas dos frutos de *M. cauliflora* apresentando melhores propriedades.

A aplicação da função de Desejabilidade global (*Desirability function*) possibilitou realizar a otimização da secagem por nebulização levando-se em consideração várias respostas simultaneamente, o que proporciona a obtenção de extratos secos com propriedades melhores em relação a vários parâmetros, como o teor do marcador ácido elágico, compostos fenólicos totais e flavonoides totais, além

da atividade de água que constitui importante fator no controle de qualidade para extratos secos.

Essa abordagem estatística permitiu estabelecer um conjunto de condições ótimas para a realização da secagem dos extratos hidroalcoólicos obtidos dos resíduos das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora*. Essas condições encontradas foram: Temperatura do ar de secagem de 116,8 até 120 °C, Fluxo de alimentação do extrato de 3 até 3,03 mL/min e Vazão do ar de secagem de 48,85 até 50 L/min.

Dessa forma, utilizando os experimentos desenvolvidos durante esse trabalho, foi possível, obter um produto de alto valor agregado, com utilização potencial nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentação humana e animal, a partir de resíduos (descarte) agroindustriais de uma planta nativa

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, Jun 2011.
- AHMED, M.; AKTER, M. S.; LEE, J.-C.; EUN, J.-B. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1307-1312, 2010.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n., p. 487–491, 2001.
- ALAMILLA-BELTRÁN, L.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. R.; GUTIÉRREZ-LOPÉZ, G. F. Description of morphological changes of particles along spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n., p. 179-184, 2005.
- ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; SANTOS, T. O.; PAULA, J. R.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F. Microencapsulation of Essential Oil from Fruits of *Pterodon emarginatus* Using Gum Arabic and Maltodextrin as Wall Materials: Composition and Stability. **Drying Technology**, v. 32, n., p. 96–105, 2014.
- ANDERSEN, O. **As frutas silvestres brasileiras**. São Paulo: Globo. 1989
- ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. M.; CANDIDO, M. A. Aguardente de jaboticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jaboticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 896-904, 2009.

- AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; DREHER, M.; REDDY, M. K.; FERREIRA, D.; ROSENBLAT, M. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n., p. 1148-1157, 2008.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. In: (Ed.). **Alimentos e Nutrição**, v.16, 2005. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos, p.89-97.
- BANU, K.; YILMAZER, M. S.; BALKIR, P.; ERTEKIN, F. K. Spray Drying of Yogurt: Optimization of Process Conditions for Improving Viability and Other Quality Attributes. **Drying Technology**, v. 28, n., p. 495-507, 2010.
- BARATA, L. E. S. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, p. 4–5, 2005.
- BARROS, J. A. C.; CAMPOS, R. M. M.; MOREIRA, A. V. B. Atividade antioxidante em vinhos de jaboticaba e de uva. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 38, n., p. 73-83, 2010.
- BARROS, R. S.; FINGER, F. L.; MAGALHAES, M. M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, n. 3-4, p. 209-215, Oct 1996.
- BENELLI, L.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Spouted bed performance on drying of an aromatic plant extract. **Powder Technology**, v. 239, n., p. 59-71, 2013.
- BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 172-183, 2005.

- BERNI, A.; GROSSI, M. R.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MUTHUKUMAR, S.; PAPESCHI, C.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. **Mutation Research**, v. 746, n., p. 60-65, 2012.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, n., p. 224–233, 2014.
- BORGES, L. L.; LUCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n., p. 01-20, 2011.
- BORGO, J.; XAVIER, C. A. G.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SUYENAGA, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. New York: John Wiley & Sons. 1978
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n., p. 25-30, 1995.
- BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde: 136 p. 2006.
- \_\_\_\_\_. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos: 136 p. 2009.

- \_\_\_\_\_. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v.1. 2010
- \_\_\_\_\_. **Resolução RE nº 27, de 27 de maio de 2012**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2012.
- BRENNAN, J. G. **Food Processing Handbook**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006. 602 p.
- BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) cv 'sabará'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378-383, 2004.
- CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* Betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n., p. 179–189, 2000.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n., p. 314–319, 2008.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2 ed. 2004
- CAVALCANTI, R. N.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. **Procedia Food Science**, v. 1, n., p. 1672-1678, 2011.

- CERDÁ, B.; LLORACH, R.; CERÓN, J. J.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin and antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n., p. 18-28, 2003.
- CHAVES, J. S. **Obtenção e caracterização de um fitoterápico a partir de *Tanacetum parthenium* Shultz-Bip (Asteraceae): caracterização química e física do pó das partes aéreas de *T. parthenium* e obtenção e caracterização química, física e físico-química dos extratos hidroalcoólico e seco e de comprimidos de dissolução entérica.** p. - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. Development of Enteric Coated Tablets from Spray Dried Extract of Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 1525–1531, 2007.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n., p. 0-1, 2010.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3. 2001
- COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. A. M.; FREITAS, L. A. P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product. **Drying Technology**, v. 29, n., p. 709-718, 2011.
- COUTO, R. O.; CONCEIÇÃO, E. C.; CHAUL, L. T.; OLIVEIRA, E. M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 131, n., p. 99-105, 2012.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEA-GONZÁLEZ, F. J.; CASTRO-CANO, M. L.; FRENICH, A. G.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n., p. 281-301, 2003.

DANIEL, E. M.; KRUPNICK, A. S.; HEUR, Y.-H.; BLINZLER, J. A.; NIMS, R. W.; STONER, G. D. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, n., p. 338–349, 1989.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n., p. 214–219, 1980.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FDA. **Guidance for Industry, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**: UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 2001.

\_\_\_\_\_. **Drug Safety and Availability**: US Food and Drug Administration 2010.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed. 2006

FRASER, R. P.; DOMBROWSKI, N.; ROUTLEY, J. H. The atomization of a liquid sheet by an impinging air stream. **Chemical Engineering Science**, v. 18, n., p. 339-353, 1963.

GEÔCZE, A. C. **Influência da preparação do licor de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Vell. Breg.) no teor de compostos fenólicos**. p. - Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 41, n., p. 1521-1527, 2008.

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**, 13 ed. São Paulo: Nobel. 2007

GONNISSEN, Y.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Development of directly compressible powders via co-spray drying. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 220-226, 2007.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n., p. 809-812, 1978.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, n., p. 33-50, 1996.

HARRINGTON, E. C. The Desirability Function. **Ind Qual Control**, v. 21, n., p. 494-498, 1965.

HODZIC, Z.; PASALIC, H.; MEMISEVIC, A.; SRABOVIC, M.; SALETOVIC, M.; POLJAKOVIC, M. The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. **European Journal of Scientific Research**, v. 28, n. 3, p. 471-477, 2009.

IBARRA, A.; CASES, J.; BILY, A.; HE, K.; BAI, N.; ROLLER, M.; COUSSAERT, A.; RIPOLL, C. Importance of extract standardization and in vitro/ex vivo assay selection for the evaluation of antioxidant activity of botanicals: a case study

on three *Rosmarinus officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Foods**, v. 13, n. 5, p. 1–9, 2010.

INDUSTRYARC. Global Functional Food and Nutraceuticals Market (2013 – 2018) – By Types (Whole Food, Fortified Food, Dietary Supplements); Products (Energy Drinks, Healthy Snacks, Fortified Dairy Products, Enhanced Cereals & Grains); Components (Vitamins, Minerals, Fibers, Antioxidants, Herbs). . Industry ARC - Analytics, Research, Consulting. <http://industryarc.com/Report/99/functional-food-market.html>. 2013

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. . DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial 2010.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n., p. 536-541, 2007.

KAREL, M.; LUND, D. B. **Physical Principles of Food Preservation**. 2 ed. New York: Taylor and Francis. 2003. 603 p.

KUMAR, P. P.; KUMARAVEL, S.; LALITHA, C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 7, p. 191-195, 2010.

LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n., p. 1390-1393, 1997.

- LARROSA, M.; GARCIA-CONESA, M. T.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 513-539, Dec 2010.
- LARROSA, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n., p. 611-625, 2006.
- LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M.; MAROSTICA, M. R. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277-2283, Mar 23 2011.
- LENQUISTE, S. A.; BATISTA, Â. G.; MARINELI, R. D. S.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153-160, 2012.
- LIM, K.; MA, M.; DOLAN, K. D. Effects of spray drying on antioxidant capacity and anthocyanidin content of blueberry by-products. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. 156-164, 2011.
- LIN, C.-C.; HSU, Y.-F.; LIN, T.-C.; HSU, H.-Y. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 206-212, 2001.
- LIST, P. H.; SCHMIDT, T. **Phytopharmaceutical Technology**. Florida, USA: CRC Press. 2000
- MACEDO-COSTA, M. R.; DINIZ, D. N.; CARVALHO, C. N.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora*

- (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 2B, p. 565-571, 2009.
- MAJID, S.; KHANDUJA, K.; GANDHI, R. K.; KAPUR, S.; SHARMA, R. R. Influence of ellagic acid on antioxidant defense system and lipid peroxidation in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1441-1445, 1991.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **B. CEPPA**, v. 24, n. 4, p. 59-82, 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and Bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n., p. 727–747, 2004.
- MARÍN, M.; GINER, R. M.; RÍOS, J.; RECIO, M. C. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 925-934, 2013.
- MARTINS, S. F. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)**. 97 p. - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC. 1988
- MATOS, F. M. D.; MATOS, E. M. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC. 1989
- MATTIJS, N.; PERRIN, C.; MAFTOUH, M.; MASSART, D. I.; VANDER-HEYDEN, Y. Definition of system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal – or reversed – phase liquid chromatography using polysaccharide – based stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n., p. 119-133, 2004.

- MORAES, C. S. S. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Ocimum gratissimum* L.** 91 p. - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; BELLUMORI, M.; GIACCHERINI, C.; MARTINI, V.; MICHELOZZI, M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 167-176, 2011.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments.** 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 2002
- NBJ. NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report [http://newhope360.com/site-files/newhope360.com/files/uploads/2012/02/TOC\\_Global\\_final.pdf](http://newhope360.com/site-files/newhope360.com/files/uploads/2012/02/TOC_Global_final.pdf)). [www.nutritionbusinessjournal.com](http://www.nutritionbusinessjournal.com). 2012
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos : Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2001. 401 p.
- OAKLEY, D. E. Produce uniform particles by spray drying. **Chemical Engineering Progress**, v. 10, n., p. 48–54, 1997.
- OLIVEIRA, A. L.; BRUNINI, M. A.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Caracterização tecnológica de jabuticabas Sabará provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 397-400, 2003.

- OLIVEIRA, G. A. R. **Otimização dos processos de obtenção e secagem do extrato de alecrim**. 67 p. - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2013.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n., p. 641-650, 2010.
- ORTH, D. S. **Handbook of cosmetic microbiology**. New York: Marcel Dekker. 1993. 591 p.
- OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLERBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MOLARES, A. N. Microencapsulation by spray drying of Antocyanin pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n., p. 6977-6985, 2010.
- POEJO, P. L. P. **Avaliação da actividade antioxidante em diferentes tipos de bebidas: vinho e cerveja**. 106 p. - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa,, Lisboa, 2009.
- PRIYADARSINI, K. I.; KHOPDE, S. M.; KUMAR, S. S.; MOHAN, H. Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n., p. 2200-2206, 2002.
- RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; MARTINS, P. M. Secagem de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n., p. 79-82, 2002.
- RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F. Secagem. In: (Ed.). **Teoria e prática na indústria farmacêutica** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. Secagem, p.83-112
- RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

- REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, n., p. 25-35, 2005.
- REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, Aug 25 2006.
- REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug 15 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n., p. 771-780, 2004.
- ROLIM, A.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; VELASCO, M. V. R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**, v. 88, n., p. 1015-1019, 2005.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico online EMBRAPA**, v., n., p. 1-4, 2007.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n., p. 270-276, 1998.

- SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; SANTOS, E. V. M.; ALMEIDA, J. M. L. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos, 1ed.** Santa Fé de Bogotá, D. C.: Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnologia para el Desarrollo. 2000. 247 p.
- SHARIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications.** Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA): Lancaster, Pa.: Technomic. 1995. 331p p.
- SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica.** 1. Rio de Janeiro: Scriptorio. 2003
- SILVA, M. C.; SOUZA, V. B. D.; THOMAZINI, M.; DA SILVA, E. R.; SMANIOTTO, T.; CARVALHO, R. A. D.; GENOVESE, M. I.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Use of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 203-209, 2014.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Polissacarídeos. In: C. M. O. SIMÕES (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. Polissacarídeos, p.498-517
- SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.
- SOUZA, T. M. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae).** 171 p. - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

- SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n., p. 221-226, 2007.
- TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. p. - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n., p. 337-348, 1999.
- TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n., p. 411-418, 2008.
- TONON, R. V.; BRABET, C.; HUMBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico – químicas do suco de açai em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n., p. 444-450, 2009.
- VEGGI, P. C.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science**, v. 1, n., p. 1725-1731, 2011.
- VIEITES, R. L.; DAIUTO, É. R.; MORAES, M. R.; NEVES, L. C.; CARVALHO, L. R. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 362-375, 2011.
- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia*

*glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

WAGNER, H. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-37, Jan 2011.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, n., p. 137-147, 1987.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: World Health Organization. 1998

\_\_\_\_\_. **Quality control methods for herbal materials**. World Health Organization. 2011. 173 p. (Geneve)

\_\_\_\_\_. **Traditional medicine strategy: 2014-2023**. Geneve: World Health Organization. 2013

WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148-159, 2013.

WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, Jul 18 2012.

YU, Y. M.; CHANG, W. C.; WU, C. H.; CHIANG, S. Y. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 16, n., p. 675–681, 2005.