

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – FCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
PPGCF**

**Desenvolvimento de extrato a partir da extração de compostos bioativos
de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) por solventes eutéticos
profundos naturais**

JOÃO VITOR SOUZA SOARES

MANAUS
2024

JOÃO VITOR SOUZA SOARES

**Desenvolvimento de extrato a partir da extração de compostos bioativos
de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) por solventes eutéticos
profundos naturais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Amazonas para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Coorientadora: Profa. Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra

MANAUS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676d Soares, João Vitor Souza
Desenvolvimento de extrato a partir da extração de compostos bioativos de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) por solventes eutéticos profundos naturais / João Vitor Souza Soares . 2024
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pedro Henrique Campelo Felix
Coorientadora: Jaqueline de Araújo Bezerra
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Ácido elágico. 2. Nutrientes. 3. Propriedade antioxidante. 4. Tecnologias emergentes. . 5. Digestibilidade. I. Felix, Pedro Henrique Campelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JOÃO VITOR SOUZA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE EXTRATO A PARTIR DA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS DE CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*
MCVAUGH) POR SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Banca Examinadora

JAYNE DE ABREU FIGUEIREDO

BRUNO NICOLAU PAULINO

PEDRO HENRIQUE CAMPELO FELIX

Manaus, 28 de outubro de 2024

“Desenvolvimento de extrato a partir da extração de compostos bioativos de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) por solventes eutéticos profundos naturais”

DISCENTE: JOÃO VITOR SOUZA SOARES

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 29/11/2024.



Documento assinado digitalmente

PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

Data: 04/12/2024 18:56:48-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Documento assinado digitalmente

PEDRO HENRIQUE CAMPELO FELIX

Data: 29/11/2024 13:17:22-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Orientador e Presidente da Banca



Documento assinado digitalmente

JAYNE DE ABREU FIGUEIREDO

Data: 29/11/2024 14:09:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jayne de Abreu Figueiredo
Membro Externo



Documento assinado digitalmente

BRUNO NICOLAU PAULINO

Data: 29/11/2024 13:21:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Nicolau Paulino
Membro Externo

Aos meus amigos e minha mãe,

Obrigado pelo incentivo constante,
apoio incondicional e amor inabalável.
Vocês foram a força por trás de cada passo
dado nesta jornada. Com todo meu carinho
e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação só foi possível graças ao apoio e colaboração de diversas pessoas e instituições, as quais dedico meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela minha VIDA, gratidão aos meus orientadores Pedro Campelo e Jaqueline de Araújo.

Sou imensamente grato aos professores pelas discussões esclarecedoras e pelo tempo dedicado à leitura e avaliação desta dissertação.

À Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF, por proporcionar um ambiente acadêmico estimulante e pelos recursos oferecidos durante minha pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Amazonas por ter possibilitado que essa pesquisa acontecesse.

Ao grupo de pesquisa NECTAM que em diversos momentos tornaram a jornada mais fácil e me auxiliaram com todo o apoio de uma família.

Aos meus amigos que mesmo sem saber me ajudam todos os dias na jornada, acreditando no meu potencial e me encorajando a ir mais longe.

A minha mãe pela paciência, compreensão e apoio incondicional durante todo esse período.

Por fim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.”

(Walters, Graham; Procurando Nemo, 2003.)

RESUMO

O camu-camu é uma fruta nativa da Amazônia, amplamente reconhecida pelo seu elevado teor de vitamina C e por sua rica composição de compostos bioativos, como flavonoides e antocianinas, que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, métodos convencionais de extração desses compostos muitas vezes envolvem o uso de solventes tóxicos, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde. Recentemente, os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) surgiram como uma alternativa mais segura e sustentável, destacando-se pela sua biodegradabilidade e capacidade de extrair compostos bioativos de maneira eficiente. Este estudo visou desenvolver extratos ricos em antioxidantes do camu-camu utilizando NADES e investigar seu potencial para aplicações em alimentos funcionais e nutracêuticos. Este trabalho teve como foco o desenvolvimento de extratos ricos em compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia*) utilizando solventes eutéticos profundos naturais (NADES), visando uma alternativa sustentável aos métodos de extração convencionais. O objetivo geral do estudo foi extrair compostos bioativos do camu-camu utilizando NADES, promovendo uma alternativa de extração sustentável. Além disso, os objetivos específicos incluíram: selecionar o solvente NADES mais eficiente para a extração de compostos bioativos; avaliar a influência da maturação do fruto no rendimento da extração; realizar análises físico-químicas, como espectrofotometria e ressonância magnética nuclear (RMN), para caracterizar os compostos obtidos e avaliar a estabilidade dos compostos antioxidantes após o processo de digestibilidade *in vitro*. Foram utilizados diferentes sistemas de NADES, combinando solventes como cloreto de colina, glicose e ácido málico. A extração foi realizada com auxílio de ultrassom, para maximizar a liberação de compostos bioativos, sendo as amostras submetidas a análises de potencial antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e FT), além de análises de pH, densidade e espectroscopia para identificação dos compostos presentes. A digestibilidade *in vitro* foi simulada para avaliar a estabilidade dos compostos após a digestão. Os resultados demonstraram que o uso de NADES proporcionou uma extração eficiente de compostos antioxidantes, com destaque para os sistemas contendo ácido málico e glicose, que resultaram em maiores concentrações de antocianinas. A digestibilidade *in vitro* indicou uma redução no potencial antioxidante das amostras, sugerindo que o processo digestivo afeta a estabilidade desses compostos. A análise de citotoxicidade revelou que as amostras tiveram uma atividade moderada contra células cancerígenas, com valores de CI_{50} na faixa de 21-200 $\mu\text{g/mL}$. Conclui-se que o uso de solventes eutéticos profundos naturais oferece uma alternativa ecológica e eficaz para a extração de compostos bioativos do camu-camu, com boas perspectivas para a aplicação em alimentos funcionais e nutracêuticos. No entanto, a digestibilidade reduz a capacidade antioxidante, o que ressalta a importância de mais estudos sobre a biodisponibilidade desses compostos no organismo humano. Este trabalho contribui para a valorização de recursos naturais da Amazônia, promovendo métodos de extração ecologicamente corretos e economicamente viáveis.

Palavras-chave: Ácido elágico. Nutrientes. Propriedade antioxidante. Tecnologias emergentes. Vitamina C. Digestibilidade.

ABSTRACT

Camu-camu is a fruit native to the Amazon, widely recognized for its high vitamin C content and its rich composition of bioactive compounds, such as flavonoids and anthocyanins, which have antioxidant and anti-inflammatory properties. However, conventional methods of extracting these compounds often involve the use of toxic solvents, which can be harmful to both the environment and health. Recently, natural deep eutectic solvents (NADES) have emerged as a safer and more sustainable alternative, standing out for their biodegradability and ability to efficiently extract bioactive compounds. This study aimed to develop antioxidant-rich extracts from camu-camu using NADES and to investigate their potential for This work focused on the development of bioactive compound-rich extracts from camu-camu (*Myrciaria dubia*) using natural deep eutectic solvents (NADES), aiming to provide a sustainable alternative to conventional extraction methods. The overall objective of the study was to extract bioactive compounds from camu-camu using NADES, promoting a sustainable extraction method. Additionally, the specific objectives included: selecting the most efficient NADES solvent for extracting bioactive compounds; evaluating the influence of fruit ripeness on extraction yield; conducting physicochemical analyses, such as spectrophotometry and nuclear magnetic resonance (NMR), to characterize the obtained compounds; and assessing the stability of the antioxidant. Different NADES systems were used, combining solvents such as choline chloride, glucose, and malic acid. The extraction was performed with ultrasound assistance to maximize the release of bioactive compounds, and the samples were subjected to antioxidant potential analyses (DPPH, ABTS, FRAP, and FT), as well as pH, density, and spectroscopy analyses to identify the compounds present. In vitro digestibility was simulated to assess the stability of the compounds after digestion. The results showed that the use of NADES enabled efficient extraction of antioxidant compounds, with particular emphasis on systems containing malic acid and glucose, which resulted in higher concentrations of anthocyanins. In vitro digestibility indicated a reduction in the antioxidant potential of the samples, suggesting that the digestive process affects the stability of these compounds. Cytotoxicity analysis revealed that the samples showed moderate activity against cancer cells, with IC_{50} values ranging from 21-200 $\mu\text{g/mL}$. It is concluded that the use of natural deep eutectic solvents offers an eco-friendly and effective alternative for extracting bioactive compounds from camu-camu, with promising prospects for application in functional foods and nutraceuticals. However, digestibility reduces the antioxidant capacity, highlighting the importance of further studies on the bioavailability of these compounds in the human body. This work contributes to the valorization of natural resources from the Amazon, promoting environmentally friendly and economically viable extraction methods.

Keywords: Ellagic acid. Nutrients. Antioxidant property. Emerging technologies. Vitamin C.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Frutos de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>) maduros (à esquerda) e verdes (à direita) | 32 |
| Figura 2 - Compostos bioativos presentes no camu-camu..... | 33 |
| Figura 3 – SPE (Extração em Fase Sólida)..... | 48 |
| Figura 4 - Estruturas dos compostos voláteis identificados pelo CG-EM | 54 |
| Figura 5 - Cromatograma CG-EM do óleo essencial do fruto camu-camu | 54 |
| Figura 6 - Resultado da análise estatística de comparação dos grupos eutéticos das frutas verdes e maduras para o ensaio de ABTS e DPPH | 63 |
| Figura 7 - Resultado da análise estatística de comparação dos grupos eutéticos das frutas verdes e maduras para o ensaio de FRAP e Fenólicos Totais | 64 |
| Figura 8 - Análise de FTIR, diferença entre o solvente e as amostras C e G.. | 70 |
| Figura 9 - Rendimento extratos eutéticos após SPE | 72 |
| Figura 10 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) das amostras AM, BM, CM e DM | 73 |
| Figura 11 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) das amostras EV, FV, GV e HV | 73 |
| Figura 12 - Melhores espectros de RMN de ^1H , amostras CM e GV | 74 |
| Figura 13 – Zoom nos espectros de RMN de ^1H , amostras CM e GV | 74 |
| Figura 14 - Mapa de correlações homonuclear COSY (500 MHz, MeOD) da amostra CM..... | 75 |
| Figura 15 - Mapa de correlações heteronuclear (HSQC) da amostra CM | 75 |
| Figura 16 - Mapa de correlações heteronuclear (HMBC) da amostra CM..... | 76 |
| Figura 17 - Mapa de correlações homonuclear COSY (500 MHz, MeOD) da amostra GV | 77 |
| Figura 18 - Mapa de correlações heteronuclear (HSQC) da amostra GV | 78 |
| Figura 19 - Mapa de correlações heteronuclear (HMBC) da amostra GV | 79 |
| Figura 20 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 0,09 -2,60 referentes as moléculas de 1 a 7..... | 82 |
| Figura 21 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 2,8 – 4,2 referentes as moléculas de 8 a 13..... | 83 |
| Figura 22 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 5,4 - 8,2 referentes as moléculas de 14 a 17..... | 83 |

| | |
|---|----|
| Figura 23 - Comparação de resultados de potencial antioxidante após digestibilidade da amostra BM | 86 |
| Figura 24 - Comparação de resultados de potencial antioxidante após digestibilidade da amostra FV | 87 |
| Figura 25 - Citotoxicidade de amostras de extrato de camu-camu em linhagens celulares A549, HCT8 e HUVEC | 90 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Estudos recentes com NADES | 28 |
| Tabela 2 - Delineamento experimental com as concentrações de solventes eutéticos utilizados para camu-camu | 43 |
| Tabela 3 - Compostos identificados no óleo essencial de camu-camu por CG-EM..... | 53 |
| Tabela 4 - Análise de pH e densidade dos eutéticos e extratos..... | 58 |
| Tabela 5 - Aparência dos solventes eutéticos | 58 |
| Tabela 6 -Concentração de antocianinas totais dos extratos de camu-camu utilizando solventes eutéticos..... | 59 |
| Tabela 7 - Concentração de carotenoides totais dos extratos de camu-camu utilizando solventes eutéticos..... | 59 |
| Tabela 8 - Avaliação da capacidade Antioxidante dos extratos eutéticos de camu-camu obtida pelos ensaios de Fenólicos Totais, DPPH, ABTS e FRAP | 60 |
| Tabela 9 - Metabólitos identificados nos experimentos de RMN de 1H após confirmação por meio dos experimentos 2D | 80 |
| Tabela 10 - Índice de seletividade de extratos de camu-camu..... | 91 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 17 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3.1 ESTILO DE VIDA SAUDÁVEL E OS SUPERALIMENTOS | 18 |
| 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS | 19 |
| 3.3 NUTRACEUTICOS | 19 |
| 3.4 MERCADO NUTRACÊUTICO | 21 |
| 3.5 MEIO AMBIENTE | 23 |
| 3.6 SOLVENTES EUTÉTICOS | 24 |
| 3.7 CAMU-CAMU | 30 |
| 3.7.1 Aspectos botânicos e geográficos do fruto | 30 |
| 3.7.2 Características do fruto | 31 |
| 3.7.3 Principais compostos bioativos | 33 |
| 4. METODOLOGIA | 42 |
| 4.1 MATERIAIS | 42 |
| 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS | 42 |
| 4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL | 42 |
| 4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas | 42 |
| 4.4 SECAGEM POR LIOFILIZAÇÃO | 43 |
| 4.5 PREPARAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDO NATURAIS (NADES) | 43 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS NADES | 44 |
| 4.6.1 pH | 44 |
| 4.6.2 Densidade | 44 |
| 4.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ALVO | 44 |
| 4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS | 45 |
| 4.8.1 Determinações espectrofotométricas (DPPH, ABTS, FRAP, FT, Carotenoides e Antocianinas) | 45 |
| 4.8.2 Parâmetros de cor | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.8.3 | Análise de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 47 |
| 4.9 | DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS ALVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 48 |
| 4.9.1 | PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE RMN POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) | 48 |
| 4.9.2 | ANÁLISE DA FRAÇÃO FENÓLICA POR RMN | 49 |
| 4.10 | ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE | 50 |
| 4.11 | EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS DE CAMU-CAMU 50 | |
| 4.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 52 |
| 5.1 | ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG-EM | 52 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO DOS EUTÉTICOS E EXTRATO | 56 |
| 5.2.1 | pH e densidade | 56 |
| 5.3 | CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS | 59 |
| 5.3.1 | Antocianinas e Carotenoides | 59 |
| 5.3.2 | Análise de cor | 65 |
| 5.3.3 | Análise de FTIR | 69 |
| 5.4 | DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS ALVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 71 |
| 5.4.1 | Rendimento SPE | 71 |
| 5.4.2 | Identificação dos compostos obtidos no extrato eutético | 73 |
| 5.5 | ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE | 86 |
| 5.6 | ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE CAMU-CAMU.. | 89 |
| 5.7 | SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS | 91 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 93 |
| | REFERÊNCIAS | 94 |

1. INTRODUÇÃO

O bom funcionamento do organismo é um dos fatores fundamentais para a qualidade de vida do ser humano, e para isso nossa alimentação deve ser rica em nutrientes essenciais como vitaminas e minerais. No entanto, existe um tipo de alimentação ideal para cada faixa etária. Nesse sentido, os cardápios podem e devem mudar de acordo com a idade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) faz recomendações sobre os tipos de alimentos que cada faixa etária necessita. No Brasil, a população de uma determinada região é dividida por faixa etária da seguinte forma: Jovem - do nascimento até 19 anos; Adulto - corresponde à população entre 20 e 59 anos; Idoso - pessoas com 60 anos ou mais (MARTA, 2019).

Sabe-se que as pessoas costumam fazer refeições desbalanceadas, seja por não ter tempo para uma refeição completa e saudável, seja pela praticidade do que está exposto nas gôndolas dos supermercados. Geralmente, minerais e vitaminas não estão sendo consumidos nas quantidades necessárias na alimentação moderna. Portanto, é necessário tomar suplementos para minimizar as deficiências desses nutrientes essenciais, pois a saúde e o bem-estar de um indivíduo são maximizados quando os nutrientes estão presentes em quantidades ideais (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012).

A partir desse ponto de vista, é imprescindível entender que para a elaboração desses suplementos alimentares é importante escolher a matéria-prima adequada para o desenvolvimento e extração dos compostos bioativos. Assim, a Amazônia se torna um potencial objeto de estudo para esse tipo de pesquisa. Estudar os compostos bioativos de frutos da Amazônia é essencial para aproveitar o potencial terapêutico e nutricional dessas espécies, desenvolver produtos inovadores, valorizar a biodiversidade local e promover o desenvolvimento sustentável. Ao fazê-lo, podemos desvendar os segredos da natureza e contribuir para a saúde e o bem-estar da humanidade, respeitando e preservando a preciosa Amazônia (MARTA, 2019).

Dentre os diversos frutos da região amazônica, o camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) se destaca pela sua rica composição de compostos bioativos especialmente vitamina C, antocianinas e flavonoides, que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que atuar em diversas reações

no metabolismo humano se utilizados de maneira correta. Esses compostos têm atraído interesse significativo devido aos seus potenciais benefícios à saúde, como fortalecimento do sistema imunológico, redução do estresse oxidativo e prevenção de doenças crônicas (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012; SANTOS *et al.*, 2022).

A extração desses compostos bioativos é um desafio importante na valorização do camu-camu. Métodos tradicionais de extração muitas vezes envolvem solventes orgânicos que podem ser tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, esses métodos podem não ser tão eficazes na extração de compostos termossensíveis e hidrofílicos presentes na fruta. Logo, a extração por meio de solventes verdes, como água ou solventes orgânicos de baixa toxicidade, contribui para a sustentabilidade ambiental e para a redução do impacto negativo no ecossistema. Ao escolher solventes verdes, evita-se o uso de substâncias químicas agressivas, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (CONCEIÇÃO, NATÁLIA *et al.*, 2019; GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012).

Recentemente, solventes eutéticos profundos naturais (NADES) têm emergido como uma alternativa promissora aos solventes tradicionais. Os NADES são misturas de dois ou mais componentes naturais, como ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares, que formam um líquido com propriedades solventes únicas quando combinados em proporções específicas. Eles são biodegradáveis, não tóxicos e podem ser ajustados para melhorar a solubilidade de uma ampla gama de compostos bioativos (BENVENUTTI *et al.*, 2020; BOSILJKOV *et al.*, 2017).

A utilização dos compostos bioativos extraídos do camu-camu na produção de suplementos alimentares tem o potencial de fornecer uma fonte natural e concentrada dessas substâncias para consumo humano. Os suplementos alimentares formulados com base nos compostos do camu-camu podem oferecer uma maneira conveniente e eficaz de suplementação dietética, contribuindo para a promoção da saúde e do bem-estar. Além disso, o camu-camu é uma fruta ainda pouco explorada comercialmente, o que abre oportunidades para a valorização de recursos naturais da região amazônica e para o desenvolvimento de cadeias produtivas sustentáveis. A exploração consciente do camu-camu, aliada a práticas sustentáveis de cultivo e extração,

pode impulsionar o desenvolvimento socioeconômico local, ao mesmo tempo em que preserva a biodiversidade e os ecossistemas naturais (RIBEIRO, 2012).

Dessa forma, o presente estudo tem o objetivo de desenvolver um extrato rico em antioxidantes utilizando métodos de extração sustentáveis e eficientes e avaliar diferentes formulações de NADES.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter um extrato de camu-camu rico em compostos antioxidantes utilizando um método verde de extração para posterior elaboração de nutracêutico para bem-estar humano Camu-camu.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair os compostos bioativos do camu-camu com combinações de solventes eutéticos profundos naturais;
- Selecionar o solvente com maior capacidade de extração de compostos bioativos;
- Avaliar a influência da maturação do fruto nos sistemas de extração;
- Realizar análises físico-químicas dos extratos obtidos através de análises de pH, colorimetria e densidade.
- Determinar a estrutura química dos compostos bioativos presentes no extrato eutético de camu-camu por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
- Analisar resultados de ensaio de digestibilidade, antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP e FT) e citotóxico (HUVEC, HCT8 E A549) dos extratos eutéticos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESTILO DE VIDA SAUDÁVEL E OS SUPERALIMENTOS

Nos últimos anos, vários eventos têm agravado os problemas e desafios prioritários que a humanidade já enfrenta, como conflitos armados, a pandemia de COVID-19, variabilidade e extremos climáticos, e desacelerações econômicas (FERNÁNDEZ-RÍOS *et al.*, 2023)

Lidar com essas questões e alcançar um setor alimentar resiliente não é uma tarefa simples. Isso requer uma evolução das políticas alimentares, diretrizes dietéticas e estratégias de segurança alimentar, adotando uma abordagem que leve em consideração a sustentabilidade em suas dimensões social, econômica e ambiental, indo além da perspectiva tradicional baseada apenas na nutrição e saúde (SERRA-MAJEM *et al.*, 2020). Durante essa transição, é necessário promover, aceitar e consumir novas fontes de nutrientes (ZARBÀ; CHINNICI; D'AMICO, 2020), além de redesenhar os sistemas alimentares de forma a preservar o meio ambiente (BATLLE-BAYER *et al.*, 2019), como parte da solução.

A busca por atualizar e reestruturar as dietas tem impulsionado o aumento da demanda por alimentos com múltiplos benefícios, incluindo os chamados "superalimentos", como uma abordagem mais inteligente para estabelecer padrões alimentares saudáveis (MAGRACH; SANZ, 2020).

Embora o termo "superalimento" seja usado como uma estratégia de *marketing* e não possua uma definição médica ou oficial, ele geralmente se refere a produtos agrícolas que contêm quantidades extraordinárias de nutrientes ou ingredientes bioativos, com propriedades biológicas específicas e efeitos positivos na saúde física e emocional (GUPTA; MISHRA, 2020). A crescente tendência de consumo desses alimentos é impulsionada principalmente por suas alegações de benefícios à saúde.

No entanto, o sucesso desses alimentos não deve ser avaliado apenas a partir de uma perspectiva socioeconômica e de saúde, mas sim buscando um equilíbrio sustentável que leve em consideração os aspectos ambientais frequentemente sub representados (HEBINCK *et al.*, 2021).

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS

Com inúmeros fatores que interferem na qualidade da vida moderna, é imprescindível que as pessoas se conscientizem da importância de alimentos que contenham ingredientes que ajudem a promover a saúde e melhorar o estado nutricional. A incidência de morte por acidentes cardiovasculares, câncer, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, doenças hepáticas etc. pode ser minimizada por meio de bons hábitos alimentares. As recomendações nutricionais indicam que cinco porções diárias (80 g cada) de frutas e vegetais são ideais e necessárias para uma dieta saudável (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012).

As plantas sintetizam dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários são responsáveis pela sobrevivência das plantas e desempenham um papel ativo na fotossíntese, respiração e absorção de nutrientes, enquanto os metabólitos secundários estão intimamente relacionados aos processos de defesa das plantas (PATRA *et al.*, 2023).

Cerca de 8.000 compostos fenólicos ou polifenóis já foram relatados, representando uma ampla classe de metabólitos secundários de plantas e a maior classe de fitoquímicos. São amplamente distribuídos no reino vegetal e se originam da via fenilpropanóide. As três principais classes de fenólicos dietéticos são flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, conhecidos por possuírem atividades biológicas promotoras da saúde, como antioxidantes, anti-inflamatórias, redutoras do colesterol e/ou atividades anticancerígenas. Dentre eles é possível citar os compostos polifenólicos como as catequinas no chá verde e no vinho, as antocianinas nas frutas vermelhas, os flavonóis proeminentes na cebola e nas folhas verdes e as isoflavonas na soja (SAURA-CALIXTO, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, depois da China e da Índia. A produção brasileira de frutas é de 58 milhões de toneladas. De 2002 a 2009, o valor das exportações de frutas, polpas e sucos brasileiros aumentou a uma taxa anual de 16,16% (EMBRAPA, 2022).

3.3 NUTRACEUTICOS

Os nutracêuticos são formulações especialmente desenvolvidas com o propósito de atender necessidades dietéticas específicas e/ou oferecer cuidados preventivos de saúde. Eles são compostos por nutrientes que

auxiliam na prevenção e tratamento de certas doenças, além de atuarem como suplementos alimentares. O termo "nutracêutico" foi cunhado pelo Dr. Stephen De Felice em 1989, combinando as palavras "nutrição" e "farmacêutico". Esses produtos são alimentos ou partes de alimentos que proporcionam diversos benefícios à saúde, incluindo o tratamento e/ou a prevenção de doenças. A ciência da nutrição tem se expandido cada vez mais, desde a identificação de deficiências nutricionais até o foco na promoção da saúde humana e na prevenção e tratamento de doenças crônicas. Os termos "nutracêuticos", "suplementos alimentares" e "suplementos dietéticos" evoluíram após o conceito ter sido introduzido pelo Dr. De Felice. Não há uma distinção clara entre suplementos alimentares e nutracêuticos estabelecida pelas autoridades regulatórias (SANTINI; NOVELLINO, 2018).

A literatura tem dado ênfase à redefinição do conceito de nutracêuticos, considerando a sua eficácia, segurança e toxicidade. Os produtos alimentícios consistem em substâncias nutritivas que são consumidas, ingeridas ou utilizadas de alguma forma para fornecer energia e promover o crescimento. Dessa maneira, é amplamente reconhecido e utilizado o processo de isolamento de nutrientes para a fabricação e desenvolvimento de produtos como os nutracêuticos. Assim, faz-se necessário o entendimento entre a diferença de alimentos/suplementos dietéticos e nutracêuticos, o ponto de partida é identificar um alvo epidemiológico, seguido por estudos de segurança e eficácia que compreendam o mecanismo de ação. Uma abordagem para diferenciar essas duas categorias de formulações é descrever os "suplementos alimentares" como agentes para suprir deficiências em micro ou macronutrientes. Além disso, o uso de um "nutracêutico" no tratamento de uma doença patológica deve ser baseado em sólidas evidências científicas (SANTINI; NOVELLINO, 2018).

Os suplementos nutricionais devem ser apoiados por evidências clínicas adequadas, apresentando um perfil de segurança sólido com poucos efeitos colaterais indesejáveis e uma melhor biodisponibilidade. Existe uma linha tênue de distinção entre esses dois tipos de formulações (nutracêutico e suplementos alimentares): os mesmos ingredientes podem funcionar como nutracêuticos ou suplementos alimentares, mas a diferenciação pode ser feita com base em alegações específicas. Os nutracêuticos englobam alimentos pró e pré-bióticos, além de alimentos para usos médicos especiais, enquanto os suplementos

alimentares incluem uma variedade de minerais, vitaminas, proteínas e alimentos funcionais. Ao incorporar nutracêuticos à dieta diária, é possível prolongar ou até mesmo eliminar a necessidade de medicamentos em indivíduos saudáveis, proporcionando uma abordagem não farmacológica alternativa para o tratamento de condições patológicas, auxiliando assim na prevenção de distúrbios patológicos (KESERVANI *et al.*, 2017).

Os nutracêuticos têm demonstrado uma ampla gama de benefícios, incluindo resultados promissores na prevenção e tratamento de doenças complexas. No entanto, é essencial que a administração e prescrição desses produtos sejam cuidadosamente regulamentadas, a fim de evitar seu uso indiscriminado e potenciais efeitos colaterais. É necessário um controle adequado para garantir a segurança e eficácia dos nutracêuticos, bem como para evitar práticas enganosas ou desinformação relacionadas a esses produtos. A regulamentação rigorosa é fundamental para assegurar que os nutracêuticos sejam utilizados de maneira responsável e orientada por evidências científicas, garantindo assim os melhores resultados para a saúde dos consumidores (PURI *et al.*, 2022).

Diversos pesquisadores têm estudado nutracêuticos baseados em compostos de fármacos, visando melhorar a eficácia e a biodisponibilidade desses produtos. Algumas estatinas, por exemplo, têm sido utilizadas com segurança e eficácia na prevenção de doenças cardiovasculares, inclusive em gestantes. Nutracêuticos com perfis de segurança eficazes e impacto bem estabelecido durante a gravidez podem representar uma opção terapêutica adequada para prevenir diabetes mellitus e distúrbios hipertensivos, ou podem atuar como adjuvantes à terapia com medicamentos convencionais. O cálcio, ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, vitamina D, ácido fólico, resveratrol, ácido alfa-lipóico, zinco, Inositol e suplementos probióticos são exemplos de potenciais nutracêuticos com propriedades comprovadas, que podem ser considerados para novos desenvolvimentos terapêuticos (PURI *et al.*, 2022).

3.4 MERCADO NUTRACÊUTICO

O mercado de nutracêuticos continua robusto e em constante crescimento, com uma demanda crescente por produtos como antioxidantes, ácidos graxos ômega-3 e diversas plantas, incluindo algas, *aloe vera*, algas marinhas e grama

de trigo, bem como chás e ervas como *ginseng* e Equinácea. Pesquisas recentes indicam que o mercado global de nutracêuticos está em expansão e prevê-se que possa atingir US\$ 340 bilhões até o ano de 2024. A taxa de crescimento anual composta (CAGR) para nutracêuticos é estimada em 7,2% no período de 2016 a 2024. Esse aumento no crescimento da indústria de nutracêuticos está relacionado a vários fatores, incluindo o aumento da demanda por esses produtos, uma maior conscientização sobre os benefícios da nutrição e uma crescente preocupação com a saúde observada na sociedade (ELKHALIFA *et al.*, 2021).

Atualmente, os principais mercados nutracêuticos globais são a Europa, os Estados Unidos e o Japão, que respondem por mais de 90% do mercado total. Prevê-se que o mercado global de nutracêuticos atinja US\$ 336 bilhões até 2023, em comparação com US\$ 247 bilhões em 2019, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 8%. Com o amadurecimento desses mercados globais, as empresas do setor nutracêutico estão direcionando sua atenção para as economias em desenvolvimento, especialmente na região da Ásia-Pacífico, incluindo a Índia. Em 2017, o mercado indiano representava apenas 2% do mercado global de nutracêuticos, porém estima-se que chegue a US\$ 11 bilhões até 2023, com um CAGR de 21%. Espera-se que, até 2023, a Índia detenha pelo menos 3,5% de participação no mercado global de nutracêuticos (CHAUHAN *et al.*, 2013).

O vírus COVID-19 impactou indiretamente todos os setores, e as repercussões de longo prazo ainda são difíceis de prever. Em uma situação pós-pandemia, a economia global continua enfrentando dificuldades, e seu impacto no comércio global e no mercado de nutracêuticos está se intensificando devido à rápida deterioração no fornecimento de produtos, independentemente da alta demanda. A indústria nutracêutica não tem sido capaz de suprir a lacuna entre a alta demanda e a baixa oferta, uma vez que 75 a 80% da matéria-prima utilizada na produção de nutracêuticos é proveniente da China, que fornece para a América do Norte, Europa e Ásia-Pacífico (GALANAKIS, 2017).

Devido à paralisação da produção na China e às condições recessivas nas regiões de origem, houve uma redução na produção de nutracêuticos. Houve um aumento significativo na demanda por suplementos alimentares por parte dos consumidores, pois eles são vistos como uma maneira de fortalecer a função

imunológica e reduzir possíveis ameaças à saúde. No entanto, o fornecimento limitado tem dificultado a resposta a essa demanda crescente (CHAUHAN *et al.*, 2013).

Ainda não existe uma definição oficialmente compartilhada e amplamente aceita para nutracêuticos. Esses produtos também são conhecidos como “alimentos farmacêuticos” e podem ser considerados uma poderosa ferramenta que se situa entre a dieta e os medicamentos. Os nutracêuticos englobam diversas formulações que contêm macronutrientes (como ácidos graxos ômega-3, magnésio, potássio e cálcio), micronutrientes (como minerais e vitaminas) e fitoquímicos presentes nas fontes alimentares. Esses produtos podem ser encontrados em farmácias e são utilizados para complementar a dieta, fornecendo benefícios adicionais à saúde (PURI *et al.*, 2022).

3.5 MEIO AMBIENTE

Os compostos bioativos têm sido alvo de grande interesse devido às suas propriedades bioativas bem reconhecidas, como efeitos antibacterianos, anti-inflamatórios, antioxidantes e quimiopreventivos. Esses compostos são encontrados em abundância em fontes naturais como plantas aromáticas, frutas, vegetais, sementes, bebidas e temperos, bem como em subprodutos gerados durante o processamento industrial desses alimentos (PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

O aumento da conscientização sobre a importância da alimentação na saúde tem impulsionado a demanda por alimentos funcionais que contenham ingredientes bioativos naturais. Esses alimentos são projetados para fornecer benefícios além das necessidades nutricionais básicas, com o objetivo de promover a saúde e o bem-estar. A incorporação de ingredientes altamente valiosos em alimentos funcionais pode aumentar o conteúdo e a biodisponibilidade de compostos naturais promotores da saúde, proporcionando uma abordagem mais holística para a nutrição e contribuindo para uma melhor saúde geral (STUPAR *et al.*, 2021).

A indústria alimentícia está direcionando recursos significativos para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios funcionais e adoção de tecnologias modernas. A incorporação de alimentos funcionais na alimentação diária vai além da nutrição básica, contribuindo para melhores hábitos

alimentares que podem ter efeitos positivos na saúde, melhorando as condições gerais e reduzindo o risco de doenças (HUANG *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2017).

Essa tendência reflete o crescente interesse dos consumidores em adotar uma alimentação saudável e proativa em relação à saúde. Os consumidores estão buscando alimentos que ofereçam benefícios adicionais para além da nutrição básica, como fortalecimento do sistema imunológico, melhoria da saúde cardiovascular, aumento da energia e melhor função cognitiva. Como resultado, a indústria alimentícia está desenvolvendo produtos inovadores e utilizando ingredientes bioativos naturais para atender a essa demanda crescente por alimentos funcionais (WANG, T. *et al.*, 2017).

Ao mesmo tempo, há um aumento da conscientização ambiental e a promoção das metas da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. Essas metas incluem o uso eficiente dos recursos naturais e a gestão adequada dos produtos químicos e de todos os resíduos ao longo de seu ciclo de vida. Nesse contexto, a utilização de subprodutos vegetais ricos em compostos fenólicos também se encaixa nessa abordagem sustentável, permitindo o aproveitamento máximo dos recursos disponíveis e contribuindo para a redução do desperdício. Essa combinação de benefícios bioativos e sustentabilidade torna os compostos fenólicos uma área de grande interesse para pesquisadores e indústria, impulsionando o desenvolvimento de novas estratégias e tecnologias para sua extração, aproveitamento e aplicação em diversos setores (HUANG *et al.*, 2017).

3.6 SOLVENTES EUTÉTICOS

A relação entre alimentação e saúde humana está se tornando cada vez mais evidente, o que está influenciando as escolhas alimentares dos consumidores. Além disso, o desenvolvimento de sistemas alimentares sustentáveis continua sendo um desafio para a indústria, com a necessidade de reduzir o desperdício de alimentos e aproveitar melhor os recursos subutilizados. Como resultado, ingredientes ou aditivos alimentares naturais estão sendo considerados como substitutos para os sintéticos, devido aos seus efeitos nutricionais e benefícios para a saúde, além de suas propriedades tecnológicas.

Essa tendência reflete uma busca por opções mais saudáveis, seguras e sustentáveis na produção e consumo de alimentos (BENVENUTTI *et al.*, 2020).

Para esse fim, compostos bioativos derivados de plantas estão sendo amplamente estudados. Além dos materiais vegetais convencionais, subprodutos vegetais como cascas, sementes, talos, bagaços e outros também estão sendo considerados para estudos. Isso ocorre porque a maioria das biomassas contém uma alta concentração de compostos bioativos, tornando-os fontes acessíveis e econômicas desses compostos. Essa abordagem estimula os conceitos de biorrefinaria e economia circular, em que subprodutos vegetais anteriormente descartados são valorizados e aproveitados para a obtenção de compostos bioativos. Essa tendência promove a utilização sustentável de recursos naturais e contribui para a redução do desperdício e a criação de processos mais eficientes e ambientalmente amigáveis na indústria alimentícia e de produtos naturais (BENVENUTTI *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, as técnicas verdes têm ganhado mais atenção, especialmente no campo da Química Verde. O desenvolvimento de solventes verdes tem sido um dos aspectos mais importantes dessa abordagem. Uma classe de solventes que está recebendo destaque são os solventes eutéticos profundos naturais (NADES), compostos por metabólitos primários de células vivas (WEI *et al.*, 2015).

Os NADES são geralmente compostos por componentes que são abundantes em nossa alimentação diária, tornando-os uma opção barata, sustentável e segura. Eles representam uma excelente alternativa aos líquidos iônicos, que são caros, difíceis de preparar e não são ecologicamente corretos. Os NADES apresentam diversas vantagens como solventes, como baixo custo, inércia química em relação à água, viscosidade ajustável, facilidade de biodegradação, toxicidade farmacologicamente aceitável e sustentabilidade, entre outras (ALANÓN *et al.*, 2020).

Essas características tornam os Nades uma opção atrativa para substituir solventes convencionais em diversas aplicações, promovendo a redução do impacto ambiental e a utilização de recursos renováveis. A utilização de solventes verdes, como os NADES, contribui para uma abordagem mais sustentável na indústria química, reduzindo o consumo de recursos não

renováveis e minimizando a geração de resíduos químicos nocivos (BOSILJKOV *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2018; IVANOVIĆ *et al.*, 2021).

Os solventes eutéticos têm se mostrado uma opção promissora na extração de compostos bioativos de fontes naturais, como plantas e alimentos. Esses solventes oferecem vantagens significativas em relação aos solventes convencionais, pois apresentam propriedades físico-químicas específicas que os tornam altamente eficientes na extração seletiva de compostos desejados. Os solventes eutéticos consistem em misturas líquidas formadas pela combinação de dois ou mais componentes. A escolha dos componentes é crucial para obter um solvente eutético com características adequadas para a extração de compostos bioativos (BENVENUTTI *et al.*, 2020; PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; ZHUANG *et al.*, 2017).

A principal propriedade dos solventes eutéticos é o ponto de fusão depressivo, que é significativamente mais baixo do que os pontos de fusão dos componentes individuais. Esse ponto de fusão depressivo é obtido devido às interações moleculares específicas entre os componentes da mistura, como ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e forças de van der Waals. Quando aplicados na extração de compostos bioativos, os solventes eutéticos demonstram alta solubilidade para uma ampla gama de compostos, incluindo fenóis, flavonoides, terpenos, alcaloides e outros compostos de interesse. Além disso, sua capacidade de extração seletiva é um dos principais benefícios desses solventes (BARBIERI *et al.*, 2020; WANG, X. H.; WANG, 2019; WEI *et al.*, 2015).

Os solventes eutéticos são projetados para apresentar afinidade seletiva por determinados compostos, permitindo a extração preferencial dos compostos bioativos desejados, enquanto reduzem a extração de compostos indesejados. Isso ocorre porque as interações químicas entre os solventes e os compostos alvo pode ser ajustadas pela escolha dos componentes da mistura e pela proporção entre eles. Outra vantagem dos solventes eutéticos é a sua baixa volatilidade. Isso significa que eles têm uma menor taxa de evaporação em comparação com solventes convencionais, o que resulta em menor perda de compostos voláteis durante o processo de extração. Essa característica é particularmente valiosa quando se trabalha com compostos bioativos sensíveis ao calor (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Além disso, os solventes eutéticos são considerados mais seguros e ambientalmente amigáveis em comparação com alguns solventes orgânicos convencionais, como os clorados ou aromáticos, que podem ser tóxicos ou apresentar riscos para a saúde humana e o meio ambiente (AKLI *et al.*, 2022).

Tabela 1 - Estudos recentes com NADES

| Matéria-prima | Composto Alvo | Composição DES | RM^1 | TEMPO | Método de Extração | Quantificação/Determinação | Resultados | Referências |
|----------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|--|---------------------------|
| Bagaço de Jabuticaba | Antocianina e Pectina | Cloreto de Colina + Propilenoglicol | 1:2 | 21 min | Secagem em estufa do material; moída em moinho de facas; peneirada e uniformizada em malha 20 e 48. Maceradas a 323 K em solventes, após o procedimento foi realizada a centrifugação e retirado o sobrenadante para purificação. | Análise em Differential Scanning Calorimetry (DSC) | Melhor Antocianina : Cloreto de Colina + Propilenoglicol Pior Antocianina : Ácido Cítrico + Glicose + Água Melhor Pectina : Ácido Cítrico + Glicose + Água Pior Pectina : Cloreto de Colina + Propilenoglicol | L. Benvenuti et al, 2020. |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Cítrico | 1:1 | 6H | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Málico | 1:1 | 6H | | | | |
| | | Ácido Cítrico + Glicose + Água | 1:1:3 | 50 min | | | | |
| | | Ácido Cítrico + Propileno Glicol | 1:1 | 5 H | | | | |
| | Betaína + Ácido Cítrico | 3:1 | 7H | | | | | |
| Cravo-da-Índia | Ácido Elágico, Isoquercitrina, Luteolina, Eugenol e Miricetina | Cloreto de Colina + 1,4-butanodiol | 1:2 | Otimizado em 20, 30, 40, 50 ou 60 min. Melhor tempo: 30 min | Extração Assistida por Ultrassom | A separação foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (U3000, Thermo Scientific, EUA) equipado com detector UV para quantificação de ácido elágico, isoquercitrina, miricetina, luteolina e eugenol. A separação foi realizada em um Elite Supersil ODS2 (4,6 mm×250 mm, 5 µm) (Dalian, China). A fase móvel consistia em acetonitrila (fase móvel A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,2% (fase móvel B) na vazão de 1,0 mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0–20 min (84% B); 20–35 min (84-79% B); 35–40 min (79-75% B); 40–50 min (75-69% B); 50-63 min (69-45% B). | Melhor: 1,3-butanodiol + Ácido Levulínico (melhor proporção 1:3) Pior: Cloreto de Colina + DL-Málico | J. Dong et al. 2022 |
| | | Cloreto de Colina + 1,3-butanodiol | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Malônico | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + DL-Málico | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Levulínico | 1:2 | | | | | |
| | | 1,4-butanodiol + Ácido Levulínico | 1:2 | | | | | |
| | | 1,4-butanodiol + Ácido Malônico | 1:2 | | | | | |
| | 1,3-butanodiol + Ácido Levulínico | 1:2 | | | | | | |
| | 1,3-butanodiol + Ácido Malônico | 1:2 | | | | | | |
| HuangQin (raízes) | Flavonoides | Cloreto de Colina + 1,4-butanodiol | 1:2 | 12 min | Extração por Microondas (MAE) | Sistema de cromatografia líquida Agilent série 1200 (Agilent, San Jose, CA) equipado com uma bomba quaternária G1311A, um degaseificador G1322A, um detector UV 1365B MWD e um injetor manual G1328B. A separação cromatográfica de quatro flavonoides foi realizada em uma coluna de fase reversa Luna C18 (250×4,6 mm id, 5 m, Phenomenex, Guangzhou) protegido por uma coluna de proteção. A fase móvel consistiu em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila (B) usando o seguinte programa de eluição gradiente para separação: 0–8 min, 25–45% B; 8–10 min, 45% B; 10–15 min, 45–52% B; 15–20 min, 52–70% B. | Melhor: Cloreto de Colina + Ácido Láctico (proporção 1:3) | Z.-F. Wei et al, 2015. |
| | | Cloreto de Colina + Glicerol | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Etilenoglicol | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Cítrico | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Málico | 1:2 | | | | | |
| | | | Cloreto de Colina + Ácido Láctico | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|---|----------------------|--------|--|--|--|---------------------------|
| | | Cloreto de Colina + Glicose | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Sorbitol | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Sacarose | 1:2 | | | | | |
| | | Cloreto de Colina + Maltose | 1:2 | | | | | |
| | | Ácido Cítrico + Sacarose | 1:2 | | | | | |
| | | Ácido Cítrico + Glicose | 1:2 | | | | | |
| | | Ácido Lático + Sacarose | 1:2 | | | | | |
| Jaboticaba | Antocianinas | Cloreto de Colina + Propilenoglicol | 1:2 | 12 min | Extração Líquida Pressurizada (PLE) | Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas | Melhor: Cloreto de Colina + Ácido Málico | L. Benvenuti et al, 2022. |
| | | Cloreto de Colina + Ácido Málico | 1:1 | | | | | |
| | | Ácido Caprílico + Ácido Cáprico | 2:1; 3:1; 4:1; | | | | | |
| | | Ácido Caprílico + Ácido Laurico | 3:1 | | | | | |
| | | Ácido Pelargônico + Ácido Laurico | 3:1 | | | | | |
| Abóbora | β -caroteno | Ácido Cáprico + Ácido Laurico | 2:1 | 10 min | Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | HPLC: sistema de cromatografia com detector SPD-20AV UV-Vis (Shimadzu, Japão) foi usado. A cromatografia foi realizada em gradiente de solvente variando a proporção de solvente A (20% (v/v) água e 80% (v/v) metanol) e solvente B (50% (v/v) acetona e 50% (v/v) metanol) em vazões de 1 mL/min com o seguinte perfil de gradiente: 25% B 0–3 min; 75% B 3–6 min; 90% B 6–10 min; 100% B 10–18 min; 50% B 18–25 min; 25% B 25–32 min. | Melhor: Ácido Caprílico + Ácido Cáprico (proporção 3:1) Pior: DL-Mentol + Ácido Laurico | A. Stupar et al. 2021 |
| | | Ácido Pelargônico + Ácido Cáprico + Ácido Laurico | 3:1:1 | | | | | |
| | | DL-Mentol + Ácido Cáprico | 2:1 | | | | | |
| | | DL-Mentol + Ácido Caprílico | 1:1 | | | | | |
| | | DL-Mentol + Ácido Laurico | 2:1 | | | | | |
| Huang Qin | Flavonoides | Ácido Cítrico + β -alanina | 1:2 | 30 min | Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | Um sistema cromatográfico Agilent Technologies Series 1200 (Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi usado para análise HPLC. A análise foi realizada em um Luna C18 (2) (100 mmx4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex, Utrecht, Holanda) a coluna e as amostras foram eluídas com um gradiente de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B) como segue: 15% B (0–13 min), 15–75% B (13–14 min), 75–15% B (14–14,10 min), 15% (14,10–15,10 min) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. | Melhor: Ácido Cítrico + β -alanina + 50% água Ácido Cítrico + Prolina + 40% de água | Oomen, et al., 2020 |
| | | Ácido Cítrico + Prolina | 1:1 | | | | | |

3.7 CAMU-CAMU

O camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) é considerado uma fruta nativa da bacia Amazônica é cultivada no Brasil, Peru, Colômbia, Equador e Bolívia. O fruto é uma baga de 2-3 cm de diâmetro pertencente à família Myrtaceae e seu *habitat* varia desde os solos férteis das planícies peruanas, onde os Andes são diretamente influenciados, até os solos pobres das praias de areia branca do Peru. A planta consegue se adaptar de acordo com seu *habitat*; em solos férteis, as raízes são curtas e próximas ao caule principal; por outro lado, em solos pobres como areia branca, as raízes podem se estender até três vezes sua altura ou mais. Esse fato tem impacto direto na produção de frutas, com plantas bem nutridas frutificando todos os anos, enquanto plantas em solos pobres frutificam a cada dois ou três anos (SANTOS *et al.*, 2022).

A árvore frutifica entre novembro e março e é considerada a fruta com maior teor de vitamina C (1-3 g/100 g). No entanto, seu consumo no Brasil é limitado, exceto na região norte, onde a polpa e o suco são comercializados (CONCEIÇÃO, NATALIA *et al.*, 2020). Na região amazônica já existe tecnologia de produção. Materiais melhorados geneticamente com alto teor de ácido ascórbico e alta produtividade podem atingir 10 a 23 kg de fruto/planta/colheita, podendo ser reproduzidos assexuadamente pela tecnologia de clonagem (SANTOS *et al.*, 2022). O consumo dessa fruta já é popular no Peru, principalmente para a produção de sucos e sorvetes, e a demanda internacional pelo camu-camu é crescente no Japão, Europa e América do Norte (CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019).

Algumas frutas nativas brasileiras podem ser consideradas excelentes fontes de compostos bioativos. Dentre elas, o camu-camu se destaca por ser uma excelente fonte de vitamina C, rico em antocianinas, possui capacidade antioxidante *in vitro* cerca de 120 vezes maior que outras frutas, além de conter alto teor de ácido elágico (CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019; FIDELIS; DE OLIVEIRA; *et al.*, 2020).

3.7.1 Aspectos botânicos e geográficos do fruto

O camu-camu pode ser encontrado em quase toda a Amazônia brasileira (Amazônia, Roraima, Rondônia, Tocantins etc.), apresentando-se como um pequeno arbusto atingindo de 4 a 8 m de altura. É uma Angiosperma pertencente

à família Myrtaceae, espécie silvestre geralmente encontrada nas margens de rios e córregos, com a parte inferior do caule (cerca de 30% a 40% de sua altura) ainda submersa e possivelmente permanece de 4 a 6 meses embaixo da água. Os brotos se formam quando o nível do rio cai. Quando seus níveis aumentam, a floração e a frutificação começam. A temperatura média ideal para o desenvolvimento do camu-camu é em torno de 25 °C com umidade relativa de 70 a 95% (ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

O cultivo em solos sem alagamento (ambiente seco) tem sido cultivado no Brasil como uma alternativa para expandir a área plantada, já que está frutífera é pouco conhecida no país. Esta surge como uma alternativa para aumentar sua produção, espalhando a espécie para diferentes regiões do Brasil e assim tornando-a mais conhecida e acessível. O camu-camu é uma planta perene que frutifica entre novembro e março quando cultivada em ambientes alagados. Por outro lado, em ambientes secos podem ocorrer duas colheitas por ano, uma de novembro a março e outra em junho e julho (CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019; FIDELIS; DO CARMO; *et al.*, 2020; ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

3.7.2 Características do fruto

Os frutos do camu-camu são redondos, de 10 a 32 mm de diâmetro e pesam entre 8,5 e 10 g. Eles são de cor vermelha, tornando-se roxo escuro no final da maturidade. A polpa é aquosa e ácida e contém de 2 a 3 sementes. A cor do camu-camu se deve à presença de antocianinas, que se concentram principalmente no pericarpo (casca) e só são transferidas para a polpa durante o processamento industrial (ZANATTA; MERCADANTE, 2007). Portanto, é importante que o consumo e processamento do fruto ocorra junto com a casca, pois sua ausência faz com que o aproveitamento das antocianinas presentes no camu-camu seja baixo.

Figura 1 – Frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) maduros (à esquerda) e verdes (à direita)



Fonte: o autor, 2024

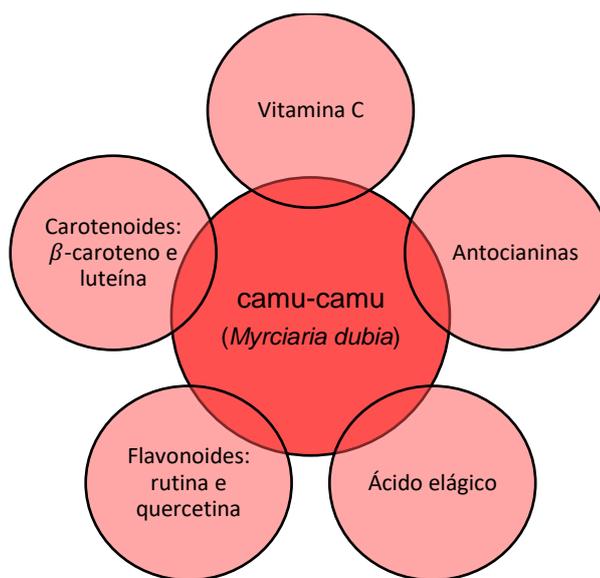
Devido a essa característica, devem ser colhidos no estágio ideal de maturação comestível (caracterizado por uma casca avermelhada), pois não amadurecerão totalmente após a colheita. Portanto, se colhidas nos estágios iniciais de desenvolvimento, ainda verdes, não podem ser consumidas posteriormente, pois seus componentes prejudicam o sabor da fruta. Devido à alta acidez e sabor muito ácidos, esta fruta raramente é consumida *in natura*. Por isso, é utilizado no preparo de diversos produtos como sucos de frutas, sorvetes, picolés, geleias e licores (DAS CHAGAS *et al.*, 2021). Dessa forma, o beneficiamento dos produtos derivados do camu-camu pode se tornar uma alternativa de renda para as comunidades da Amazônia brasileira, onde o fruto é obtido por meio do extrativismo dos arbustos que ocorrem naturalmente nas margens dos rios (SANTOS *et al.*, 2022).

O camu-camu é uma das árvores frutíferas que os moradores locais podem colher, pois os frutos amadurecem nos períodos de cheia, quando ribeirinhos e pescadores perdem seus empregos. Por outro lado, os derivados também podem impulsionar o desenvolvimento econômico dos produtores de frutas, uma vez que o consumo *in natura* não é a forma mais rentável. A maior produção de camu-camu está concentrada na Amazônia peruana, pois as condições climáticas favorecem o cultivo da fruta. Consequentemente, o Peru é o maior

exportador de camu-camu, respondendo por 72% das exportações da fruta em 2011, segundo a OTCA (Organização do Tratado de Cooperação Amazônica). As principais formas comercializadas no país são camu-camu em pó (76%), extrato (13,4%) e camu-camu desidratado (6,2%). O país de destino foram os EUA (56% das vendas), seguido do Canadá (19%), Reino Unido (5,3%), Japão (4,4%), França (2,9%), Austrália (2,8%) e Alemanha (2,7%) (OTCA, 2011) (CONCEIÇÃO, NATALIA *et al.*, 2020; CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2022; ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

O grande interesse pelo camu-camu está principalmente relacionado à sua composição diversificada, com significativa concentração de compostos bioativos (Figura 2), o que torna o fruto uma matéria-prima promissora para a elaboração de alimentos funcionais e/ou fitoterápicos.

Figura 2 - Compostos bioativos presentes no camu-camu



Fonte: o autor, 2024

3.7.3 Principais compostos bioativos

3.7.3.1 Carotenoides

Diferentes tipos de carotenoides são biosintetizados pela mesma via metabólica, onde modificações inerentes à formação de cada composto levam a diferentes estruturas que surgem nas plantas. O mevalonato é um precursor importante na via biossintética para a produção de carotenoides, uma vez que o isopentenil difosfato, o composto base de todos os isoprenoides, é derivado do

mevalonato. Este é convertido através de uma série de reações em fitoeno (o primeiro composto de 40 carbonos, mas ainda incolor), que é dessaturado em licopeno. O licopeno sofre ciclização para produzir β -caroteno, que é convertido em luteína após a hidroxilação (ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

Os vários tipos de carotenoides são geralmente divididos em dois grupos principais: caroteno, cuja composição química consiste em carbono e hidrogênio; e luteína, que são derivados contendo oxigênio. O caroteno, devido à sua estrutura, é apolar; enquanto a luteína é um pouco polar, dependendo da presença de grupos orgânicos contendo oxigênio (cetonas, álcoois e aldeídos) na estrutura. Assim, o caroteno é capaz de atuar dentro das membranas lipoprotéicas das células, protegendo-as da oxidação. Já a luteína é menos hidrofóbica e capaz de reagir com radicais livres presentes na região aquosa da superfície da membrana celular (ORDÓÑEZ-SANTOS; ESPARZA-ESTRADA; VANEGAS-MAHECHA, 2021).

Os carotenoides *in vivo* atuam principalmente como desativadores de oxigênio singleto ou como sequestradores de radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios. Como tal, podem ser capazes de reduzir a incidência de cancro, doenças cardíacas e doenças degenerativas, uma vez que estas patologias estão diretamente relacionadas com processos oxidativos. Um estudo correlacionando os níveis de luteína e caroteno no plasma de pacientes com doença cardiovascular (crônica e aguda) descobriu que luteína, α -caroteno e β -caroteno. O nível de eritromicina foi menor do que o grupo controle. Observações sugerem que esses compostos estão diretamente relacionados a essas doenças e podem interferir em seu desenvolvimento. Neste estudo, os autores demonstraram uma relação direta entre a luteína e a redução da espessura da placa aterosclerótica, levando a pensar que este carotenoide pode atuar como adjuvante na progressão da aterosclerose (ORDÓÑEZ-SANTOS; ESPARZA-ESTRADA; VANEGAS-MAHECHA, 2021).

O β -caroteno é um dos principais carotenoides da dieta devido à sua capacidade de ser convertido em vitamina A. Após a ingestão, pode ser absorvido em sua forma original ou hidrolisado a retinol, dependendo principalmente das propriedades da matriz alimentar e de fatores intrínsecos individuais, como o estado do trato gastrointestinal e o aporte de vitamina A no organismo, sendo esta última o mais relevante dos fatores. A interação dos

carotenoides com outros componentes dos alimentos e o tipo de processamento das matérias-primas são fatores que afetam a biodisponibilidade dos carotenoides (GARCÍA-CHACÓN; MARÍN-LOAIZA; OSORIO, 2023).

3.7.3.2 Vitamina C (Ácido ascórbico)

A vitamina C dietética é necessária porque os seres humanos, ao contrário das plantas, não podem sintetizar este composto devido à falta da enzima hepática L-gulonolactona oxidase, que catalisa a conversão de L-gulonolactona em ácido ascórbico. O alto teor de vitamina C, portanto, o camu-camu é um importante alimento dietético, pois é uma excelente fonte de nutrientes que não podem ser sintetizados pelo corpo humano (CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019).

A ingestão diária recomendada de vitamina C para adultos é de aproximadamente 60 mg. Como o camu-camu contém grandes quantidades dessa vitamina, geralmente consumir 6 g, ou um camu-camu, é suficiente para atender à ingestão recomendada. Vale ressaltar que, devido ao alto teor de vitamina C do camu-camu, o consumo exagerado dessa fruta pode desencadear náuseas ou diarreia. No entanto, por ser um composto solúvel em água, o excesso de vitamina C é rapidamente excretado pela urina e, a longo prazo, pode causar problemas renais e vesicais devido à grande quantidade de excreção produzida. Porém, devido à deposição de seu principal metabólito, o ácido oxálico, pode levar à formação de cálculos renais (SANTOS *et al.*, 2022).

Por ser uma substância solúvel em água, a vitamina C é a primeira linha de defesa contra os radicais livres em meio aquoso. Atua contra a peroxidação lipídica de duas formas: no plasma sanguíneo, ao neutralizar os radicais livres, minimizando o risco de oxidação das lipoproteínas, principalmente a LDL (lipoproteína de baixa densidade); ou na regeneração de antioxidantes lipofílicos, que atuam sinergicamente com a vitamina E, após sua oxidação doando átomos de hidrogênio para regenerá-la (DO CARMO *et al.*, 2020; GARCÍA-CHACÓN; MARÍN-LOAIZA; OSORIO, 2023).

A vitamina C também é importante em outras vias metabólicas, como formação de colágeno, fortalecimento do sistema imunológico e biossíntese de aminoácidos. Durante a formação do colágeno, além do ferro e do oxigênio, é necessária a formação de hidroxiprolina e hidroxilisina, dois aminoácidos que fazem parte da composição do colágeno. Portanto, a ingestão do fruto do camu-

camu pode favorecer o processo de cicatrização, e o alto teor de vitamina C contido no fruto pode favorecer a produção de colágeno, promovendo assim a reconstrução da pele. Ao mesmo tempo, o camu-camu também tem potencial para ser utilizado na preparação de produtos fitoterápicos para uso direto no tratamento de lesões cutâneas (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012).

No sistema imunológico, a vitamina C estimula a produção de interferons e imunoglobulinas A e M, responsáveis por proteger o organismo de agentes externos como vírus, bactérias e células tumorais. Devido a este e outros fatores, foi estabelecida uma relação direta entre a vitamina C e o câncer, pois um sistema imunológico fortalecido promove o aumento da produção de células imunológicas que destroem células pré-cancerosas e cancerígenas que o corpo reconhece como células invasoras. Outro fator que liga a vitamina C ao câncer é seu efeito antioxidante, que previne a formação de células cancerígenas, neutralizando os radicais livres e reduzindo a ocorrência de mutações irreversíveis no DNA celular (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012; RIBEIRO, 2012).

Também apresenta grande importância na prevenção da anemia, pois atua como fator promotor da absorção de ferro não heme (inorgânico) presente nos alimentos de origem vegetal. O ácido ascórbico promove a redução do Fe^{3+} (pouco solúvel no intestino) a Fe^{2+} , para que seja absorvido; facilita a liberação do ferro da transferrina (proteína que transporta o ferro no sangue) e da ferritina (principal proteína de armazenamento do ferro); e participa de modo importante da síntese de ferritina e, portanto, do depósito de ferro (RIBEIRO, 2012).

3.7.3.3 Compostos Fenólicos

A produção de compostos fenólicos nas plantas serve como mecanismo de defesa contra doenças causadas por patógenos, radiação UV, temperaturas extremas e danos mecânicos. A fenilalanina é o principal precursor desses compostos, que (entre eles taninos, flavonoides e antocianinas) são formados pelas vias do chiquimato e/ou malonato. A fenilalanina-amonialiasa (PAL) atua como um catalisador para a reação biossintética que converte a fenilalanina em ácido cinâmico, a partir do qual são produzidos os compostos fenólicos (ALVES *et al.*, 2023).

O camu-camu contém altos níveis de polifenóis (fruta média de 1.000 mg•100 g⁻¹), maiores do que muitas frutas consideradas fontes desses compostos, como acerola, jaborcaba e açaí. Assim, a contribuição polifenólica do camu-camu, além de reduzir o risco das patologias acima mencionadas, também pode inspirar uma valorização das frutas e hortaliças endêmicas da região amazônica, bem como a produção de produtos derivados, sejam eles funcionais alimentos e/ou produtos fitoterápicos (CONCEIÇÃO, NATALIA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2022).

Além disso, o camu-camu também contém altos níveis de vitamina C, além de seus altos níveis de polifenóis, compostos que são os principais responsáveis pelo poderoso potencial antioxidante da fruta. Portanto, a utilização da fruta como nutracêutico é bastante viável e economicamente vantajosa, uma vez que os teores de polifenóis totais e vitamina C são geralmente equivalentes a mais de 1% do peso da fruta. Os principais compostos fenólicos presentes no camu-camu são o ácido elágico, os flavonoides (principalmente quercetina e rutina) e as antocianinas (principalmente antocianinas e delphinidin-3-glicosídeo). Nas seções subsequentes, esses compostos foram descritos e discutidos com mais detalhes (SANTOS *et al.*, 2022).

3.7.3.4 Ácido elágico

O ácido elágico é um composto fenólico pertencente à classe dos taninos hidrolisáveis, formado pela hidrólise ácida ou alcalina dos elagitaninos. Pode existir na forma livre, glicosilada ou ligada (elagitaninos). Os elagitaninos são ésteres de glicose e ácido hexahidroxidibenzóico, que após hidrólise sofrem lactonização espontânea para formar o ácido elágico (RIBEIRO, 2012).

A eficácia do ácido elágico como composto antioxidante depende principalmente de sua estrutura química. A presença de múltiplos grupos hidroxila leva a uma forte capacidade de doar átomos de hidrogênio, e a eficiência antioxidante desses compostos está diretamente relacionada ao grau de sua hidroxilação, que diminui conforme o grau de glicosilação. O teor de ácido elágico livre em vegetais varia em função da matriz alimentar e do tipo de processamento aplicado. No entanto, sabe-se que tais níveis costumam ser baixos e estão presentes principalmente em alimentos como elagitaninos

(COSTA, A. G. V. *et al.*, 2013; GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012; RIBEIRO, 2012).

O teor de ácido elágico total do camu-camu é em média 48 mg·100 g⁻¹/peso fresco, dos quais apenas 1,6 mg·100 g⁻¹/peso fresco correspondeu ao composto livre. Frutas consideradas fontes clássicas de ácido elágico, como morangos e framboesas, contêm cerca de 3 e 5 mg·100 g⁻¹/peso fresco do composto livre, respectivamente, e cerca de 20 – 50 e 200 – 300 mg·100 g⁻¹/ peso fresco de ácido elágico total, respectivamente (COSTA, A. G. V. *et al.*, 2013; GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012). Essas diferenças ajudam a confirmar que a quantidade de ácido elágico livre varia entre as matrizes alimentares, enquanto no camu-camu a maior parte do composto está na forma conjugada, o que pode ser um problema em termos de biodisponibilidade do produto.

O metabolismo do ácido elágico não foi totalmente elucidado. Em muitos estudos, o ácido elágico não foi detectado no sangue após a ingestão de alimentos contendo esse composto. Portanto, defende-se a hipótese de que esse composto seja metabolizado pela microbiota intestinal, produzindo o metabólito de interesse. Portanto, a atividade fisiológica atribuída ao ácido elágico estaria mais precisamente relacionada aos metabólitos produzidos pela microbiota do que ao próprio composto original. No entanto, não está claro se a hidrólise dos elagitaninos se deve ao pH fisiológico do intestino ou ao efeito da microbiota intestinal. Independente do processo, porém, ambos os casos acabam tendo o mesmo propósito de converter o composto em algo mais facilmente absorvido pelo organismo (RIBEIRO, 2012).

3.7.3.5 Flavonoides

Dentre os compostos bioativos obtidos de fontes vegetais, os flavonoides são muito importantes, pois atuam eliminando os radicais livres e, graças ao seu potencial redutor, protegem o organismo contra possíveis reações de oxidação. Os flavonoides com maior proporção no camu-camu foram a quercetina (24 mg·100 g⁻¹/peso fresco) e a rutina (13 mg·100 g⁻¹/peso fresco) (FIDELIS; DO CARMO; *et al.*, 2020)

Devido à natureza lipofílica dos flavonoides, um dos fatores que promovem a atividade antioxidante dos flavonoides é sua capacidade de interagir com membranas biológicas. Isso geralmente acontece com as agliconas porque a

presença de açúcar na cadeia do flavonoide a torna mais polar, dificultando a interação com as membranas celulares. Assim, os flavonoides absorvidos por membrana atuam como reguladores da mobilidade, limitando sua mobilidade, o que cria uma barreira física à difusão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, reduzindo assim a cinética das respostas ao estresse oxidativo (GARCÍA-CHACÓN; MARÍN-LOAIZA; OSORIO, 2023; GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012; RIBEIRO, 2012).

Os flavonoides têm sido associados a um risco reduzido de desenvolvimento de câncer, pois essa patologia está fortemente associada ao estresse oxidativo. Os radicais livres desempenham um papel importante na carcinogênese, pois a atividade metabólica dos carcinógenos é uma reação que depende desses compostos, que danificam o DNA das células e promovem mutações. Se em algum momento estes não forem reparados por sistemas enzimáticos endógenos, danos permanentes são induzidos (SANTOS *et al.*, 2022)

Em um estudo, os pesquisadores avaliaram os efeitos inibitórios da quercetina e da rutina no estresse oxidativo induzido por radicais peroxila e hidroxila em células HepG2 hepáticas humanas. Os autores concluíram que a quercetina se difunde através das membranas celulares mais prontamente do que a rutina, promovendo assim uma maior inibição do estresse oxidativo induzido pelos referidos radicais livres. Os autores mostraram que para a rutina ser tão eficiente quanto a quercetina na neutralização dos referidos radicais livres, ela deve estar desglicosilada, ou seja, deve estar presente na forma de sua aglicona quercetina. Esse é um fator importante para o camu-camu, pois o fruto é frequentemente consumido na forma de produtos industrializados, como suco e polpa. Em geral, os tratamentos para fins de preservação (pH e calor) podem induzir a hidrólise de flavonoides como a rutina, aumentando assim o teor de quercetina do produto e, da mesma forma, potencializando seus efeitos endógenos (KIM; KWON; JANG, 2011).

A quercetina também pode estar associada a reduções no colesterol total e fracionário e triglicérides. Um estudo realizado com o camu-camu avaliou seu efeito na hipercolesterolemia, em comparação com a quercetina pura. Nesse estudo, avaliaram o potencial hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos hipercolesterolêmicos. Neste estudo, grupos de animais receberam 0,1, 1 e 2 mL

de suco de camu-camu por dia durante 14 dias. Paralelamente, o grupo padrão foi tratado com a mesma concentração de quercetina ($400 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) determinada no suco de camu-camu. A ingestão de 2 mL de suco de frutas promoveu redução dos triglicérides (83%), mas foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) à da quercetina (86%). Em relação ao colesterol total, a maior redução foi observada no grupo que consumiu 0,1 mL de suco de frutas (21%), também estatisticamente promovida pelo mesmo efeito da quercetina (29%) ($p > 0,05$). A redução do LDL-colesterol ocorreu apenas nos grupos que ingeriram 0,1 e 1 mL de suco de camu-camu (14 e 6%, respectivamente), enquanto a quercetina pura não apresentou efeito redutor desse parâmetro. O suco de camu-camu modula os perfis lipídicos em ratos hipercolesterolêmicos de forma semelhante à quercetina pura. A partir dessa observação, podemos inferir que a quercetina, seja na forma pura ou em sinergia com outros compostos da alimentação, atua na dislipidemia (RIBEIRO, 2012).

3.7.3.6 Antocianina

As antocianinas são polifenóis pertencentes ao grupo dos flavonoides, constituídos por duas ou três partes: uma aglicona (antocianina), uma porção glicosídica e ácidos orgânicos de determinadas frequências. As antocianinas livres, que são raras nas plantas, geralmente são glicosiladas para estabilizar a molécula; os açúcares podem estar ligados em diferentes posições na molécula. As principais antocianinas presentes no camu-camu são a cianidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo (48 e $2,75 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ /peso fresco, respectivamente) (SANTOS *et al.*, 2022).

Vários estudos têm mostrado que as antocianinas têm grande potencial contra doenças cardiovasculares. Devido ao seu potencial antioxidante, esses compostos podem inibir a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade), reduzindo o risco de aterosclerose, uma vez que a LDL oxidada danifica o endotélio e inicia o processo aterosclerótico. A LDL oxidada é prontamente captada pelos macrófagos, formando células esponjosas que, ao crescerem, criam placas ateroscleróticas que obstruem os vasos sanguíneos, impedindo o fluxo sanguíneo para os tecidos (CHEN *et al.*, 2016).

Alguns estudos também demonstraram o papel das antocianinas no tratamento dos lipídios do sangue, auxiliando na redução do colesterol

sanguíneo (colesterol total e LDL) e triglicerídeos. ZAWISTOWSKI et al. (2009) avaliaram o efeito do extrato de arroz preto rico em antocianinas ($300 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) sobre os lipídios plasmáticos (colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de alta densidade e ésteres de triglicerídeos) e encontraram reduções no colesterol total, LDL, e triglicerídeos em frações de triglicerídeos de 13, 23 e 37%, respectivamente. Também foi confirmado que o acúmulo de colesterol no fígado de animais ingeridos com extrato de arroz preto foi bem menor. Outro estudo avaliou o efeito da suplementação da dieta com polpa de açaí sobre os lipídeos sanguíneos de ratos e encontrou redução de 33% no colesterol total e redução de 35% na fração LDL sem alteração nos triglicerídeos (ZAWISTOWSKI; KOPEC; KITTS, 2009).

Vários mecanismos de ação dos compostos fenólicos podem explicar seus efeitos no metabolismo lipídico e sua capacidade de reduzir a hipercolesterolemia. Uma delas envolve seu efeito no aumento da excreção de sais biliares nas fezes, a outra envolve a redução da absorção intestinal de colesterol e aumento da atividade da lipase pancreática (enzima associada à degradação de triglicerídeos). O mecanismo de redução do colesterol dos compostos fenólicos pode ser ainda a ação sobre enzimas, como a colesterol esterase, responsável pela hidrólise do éster de colesterol no lúmen intestinal, colesterol-7- α -hidrolase, responsável pela degradação do colesterol e síntese de ácidos biliares; ACAT, responsável pela esterificação do colesterol e armazenamento intracelular e HMG-CoA redutase, enzima de restrição para a síntese endógena do colesterol (GONÇALVES, A. E. DE S. S., 2012; RIBEIRO, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Uma amostragem de *Myrciaria dubia* (fruto de camu-camu) de 10 kg foi adquirida na feira da Manaus Moderna (Manaus, AM, Brasil). Glicose anidra, água, ácido málico e Cloreto de hidroxietiltrimetilamônio (cloreto de colina – ChCl) N 98% obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O fruto (camu-camu) foi separado manualmente em duas frações: sementes (CS) e casca contendo o restante da polpa (CPC). Após a separação, apenas CPC foi utilizado para o presente trabalho de pesquisa. Além disso, para todos os experimentos a seguir foram avaliados os frutos maduros separadamente dos frutos verdes (Figura 1) para verificar a influência do estado de maturação dos frutos no processo de extração e rendimento dos compostos alvo.

4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Parte dos frutos maduros coletados foram separados para a obtenção do óleo essencial. Inicialmente os frutos foram higienizados e separados para serem submetidos à hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger, durante um período de 3 horas. Foram pesados em uma balança analítica, 260 g para a obtenção do óleo essencial. O óleo essencial foi coletado pela técnica extração com hexano a partir do hidrolato obtido, posteriormente a amostra solubilizada foi encaminhada para análise química.

4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

A análise química do óleo essencial foi realizada em equipamento de Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas – GC-MS (Nexis GC2030, GCMS- QP2020 NX, Shimadzu) instalado na Central Analítica do IFAM-CMC. A análise cromatográfica foi realizada utilizando o CG-EM equipado com coluna capilar de sílica fundida SH-RTx-5Sil-MS (30 m x 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm espessura). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 260 °C, respectivamente; Hélio como gás de arraste

(1,0 mL/min); corrida com temperatura de 60 °C a 180 °C com taxa de 3 °C/min. Proporção de divisão 1:50 e 1,000 µL de solução de hexano.

A identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais foi realizada baseada na comparação do índice aritmético, calculado a partir da série de n-alcenos (C7-C30), com os dados das bibliotecas WILEY 275 e National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0) e Adams.

4.4 SECAGEM POR LIOFILIZAÇÃO

A liofilização foi realizada em liofilizador SL-404 (Solab, SP, Brasil) usando o mesmo perfil de aquecimento da amostra. A seguir as condições do processo foram variadas: pressão da câmara, -700 mTorr; e taxa de congelamento -40°C. A liofilização foi realizada por um período de 72 horas. Após a secagem por liofilização, cada amostra foi moído em pó (RAMÍREZ; GIRALDO; ORREGO, 2015).

4.5 PREPARAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDO NATURAIS (NADES)

Quatro tipos de NADES foram preparados usando os compostos cloreto de colina, glicose e ácido málico de acordo com a Tabela 2. Todas as combinações foram agitadas e aquecidas a 353 K em banho termostático (SPLabor, SP, Brasil) até a formação de um líquido homogêneo. Foi adicionada água para a melhor diluição dos solventes eutéticos na proporção molar indicada na Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento experimental com as concentrações de solventes eutéticos utilizados para camu-camu

| Tratamento | Cloreto de Colina | Glicose | Ácido Málico | Água Ultrapura |
|------------|-------------------|---------|--------------|----------------|
| CC | 1 | | | 6 |
| CC:G | 1 | 1 | | 6 |
| CC:AM | 1 | | 1 | 6 |
| CC:G:AM | 1 | 1 | 1 | 9 |

*CC: Cloreto de Colina; G: Glicose Anidra; AM: Ácido Málico.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS NADES

4.6.1 pH

Os valores de pH do NADES foram medidos em triplicata de acordo com AOAC (BENVENUTTI *et al.*, 2020), por leitura direta em pHmetro de bancada (KASVI, modelo K39- 2014B, PR, Brasil) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0.

4.6.2 Densidade

A densidade foi determinada medindo-se a massa da amostra em uma balança de precisão analítica (Shimadzu, Unibloc ATY224), enquanto o volume foi obtido usando uma pipeta de 1 mL. Em seguida, a densidade foi calculada pela fórmula:

$$Densidade = \frac{Massa}{Volume}$$

O resultado foi expresso em g/mL.

4.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ALVO

Inicialmente foram pesados 200 mg de CPC em pó liofilizado e posteriormente foi adicionado a 15 mL de cada sistema Eutético. Foram utilizados para realizar as extrações os frutos maduros e verdes como variáveis além dos quatro sistemas eutéticos, totalizando 8 amostras. Os compostos alvos foram extraídos de CPC pelo método de ultrassom. Para a extração dos compostos, o processo foi realizado a 297 K, submetidos a tratamento com amplitude de potência de 20% (correspondendo ao nível de densidade de energia ultrassônica de $0,9 \text{ kJ} \cdot \text{cm}^{-3}$), ou seja, 150 W. A duração do tratamento foi de 10 minutos e conduzido em banho de gelo para evitar potencial superaquecimento da amostra. Após o período de extração, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm/min por 15 min (Quimis, Modelo Q222T, SP, Brasil). O extrato aquoso sobrenadante foi separado por meio de filtração do resíduo sólido (BENVENUTTI *et al.*, 2020).

Os extratos foram nomeados da seguinte maneira: AM - Cloreto de Colina, Glicose, Acido Málico (Fruta Madura); BM - Cloreto de Colina e Glicose (Fruta Madura); CM - Cloreto de Colina e Acido Málico (Fruta Madura); DM - Cloreto de Colina (Fruta Madura); EV - Cloreto de Colina, Glicose, Acido Malico (Fruta

Verde); FV - Cloreto de Colina e Glicose (Fruta Verde); GV - Cloreto de Colina e Acido Málico (Fruta Verde) e HV - Cloreto de Colina (Fruta Verde).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS

Todas as caracterizações deste item foram realizadas tanto para o extrato eutético quanto para o sistema eutético puro, a fim de determinar e subtrair possíveis potenciais antioxidantes nos sistemas eutéticos puros.

4.8.1 Determinações espectrofotométricas (DPPH, ABTS, FRAP, FT, Carotenoides e Antocianinas)

4.8.1.1 DPPH - Ensaio de Atividade Antioxidante

A avaliação da capacidade de eliminação de radicais resultantes do processo de extração eutética de *M. dubia* foi realizada empregando o método com radical DPPH•. Uma solução metanólica de DPPH 100 µM foi preparada. Posteriormente, a amostra foi preparada a 1 mg/mL e misturada com 190 µL da solução de DPPH. Para comparação, o Trolox foi utilizado como controle positivo (variando de 100 a 2000 µM). A mistura foi então mantida no escuro à temperatura ambiente por 30 min. As leituras de absorbância foram feitas a 515 nm usando um Microplate Reader (Epoch 2, BioTek, Winooski, VT, EUA). A capacidade antioxidante foi quantificada em equivalentes Trolox. O ensaio foi conduzido em triplicado. A relação foi determinado como $y = -0,0004x + 0,7264$, com um R^2 valor de 0,9944, e os resultados foram expressos em termos de micro molar de equivalentes de Trolox (µM Trolox/mL) (MAR *et al.*, 2021, 2023).

4.8.1.2 ABTS^{•+} - Ensaio de Atividade Antioxidante

O ensaio de eliminação do ABTS^{•+} envolve a medição da descoloração do radical na presença de extratos antioxidantes. Após um tempo de reação de 6 min da amostra com o radical na proporção de 1:10, as absorbâncias foram medidas a 750 nm usando um leitor de microplacas. A curva padrão foi gerada usando Trolox ($y = -0,0003x + 0,7349$, $R^2 = 0,9989$), e os resultados foram expressos em micromolar de equivalentes de Trolox (µM Trolox/mL) (MAR *et al.*, 2021, 2023).

4.8.1.3 Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

O ensaio de poder antioxidante de redução férrica (FRAP) envolve a avaliação da capacidade do extrato de reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um complexo férrico tripiridiltriazina. Após uma interação de 30 min entre a amostra e o reagente FRAP a 37°C , a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV a 593 nm. Uma curva padrão foi construída usando FeSO_4 (com a relação $y = 0,0009x + 0,1332$ e um R^2 de 0,997). Os resultados foram apresentados em termos de micromolar de equivalentes de Fe (II) ($\mu\text{M Fe(II)/mL}$) por grama da amostra (MAR *et al.*, 2021, 2023).

4.8.1.4 Composição de Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A reação entre a amostra e o reagente foi incubada por 5 min, e após isso, bicarbonato de sódio (6%) foi adicionado e incubado por mais 90 min. Posteriormente, a interpretação dos dados foi realizada utilizando um leitor de microplacas a 750 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão ($y = 0,0029x + 0,2008$, $R^2 = 0,9915$). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de suco (mg GAE/g) (MAR *et al.*, 2021, 2023).

4.8.1.5 Carotenoides

A quantificação do conteúdo de carotenoides foi conduzida pelo método espectrofotométrico. Em um resumo conciso, 1 mL de extrato eutético de *M. dubia* foi combinado com 6 mL de água destilada e 5 mL de hexano, seguido por agitação vigorosa por 1 min. O sobrenadante resultante (fase hexano), que continha a fração lipídica, foi analisado a 452 nm usando um leitor de microplacas (BioTek, Elx800) com hexano como referência. Os resultados foram apresentados em termos de conteúdo de carotenoides, determinados por referência a uma curva de calibração ($y = 0,0015x - 0,0637$, $R^2 = 0,9927$) (MAR *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

4.8.1.6 Antocianinas

O método empregado para determinar o teor total de antocianinas nas espécies de *M. dubia* baseado na abordagem espectrofotométrica de pH específico. Este método quantifica o conteúdo total de antocianinas expresso em

miligramas de antocianinas por 100 g de amostra. O Coeficiente de Extinção seguiu a metodologia de adotar um valor de 982 para o pH único (pH 2,0). As absorvâncias para este método foram avaliadas usando um leitor de microplacas (BioTek, Elx800), com leituras feitas em um comprimento de onda de 535 nm (MAR, CORRÊA, *et al.*, 2023, OLIVEIRA, MAR, *et al.*, 2018).

4.8.2 Parâmetros de cor

A cor dos extratos eutéticos de *M. dubia* foi avaliada utilizando Colorímetro Delta VistaG (Software i7 Gold). Para esta análise, as coordenadas L^* , a^* , b^* , Δh^* e ΔE foram obtidas. A análise de cor foi realizada em duas datas, após 168 horas do preparo. Para esta análise, cada um dos sistemas eutéticos foi utilizada como padrão de referência em comparação aos extratos eutéticos após o processo extrativo de CPC em estágio verde e madura. Com esse sistema de cores é possível fornecer coordenadas colorimétricas (L^* , a^* e b^*) universais, sob iluminantes e observadores padronizados. Os espaços de cores comuns utilizados para definição das cores são CIE XYZ; CIE $L^* a^* b^*$; CIE LCH, Hunter $L a b$ e RGB (Red, Green and Blue – Vermelho, Verde e Azul), entre outros. A diferença nestes sistemas está relacionada à simetria da distribuição da cor e no sistema de coordenadas utilizado para definir os pontos dentro desta distribuição. As coordenadas L^* , a^* , b^* significam, respectivamente, luminosidade, tonalidade de verde/vermelho, tonalidade de azul/amarelo (ORDÓÑEZ-SANTOS; MARTÍNEZ-GIRÓN; ARIAS-JARAMILLO, 2017).

4.8.3 Análise de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

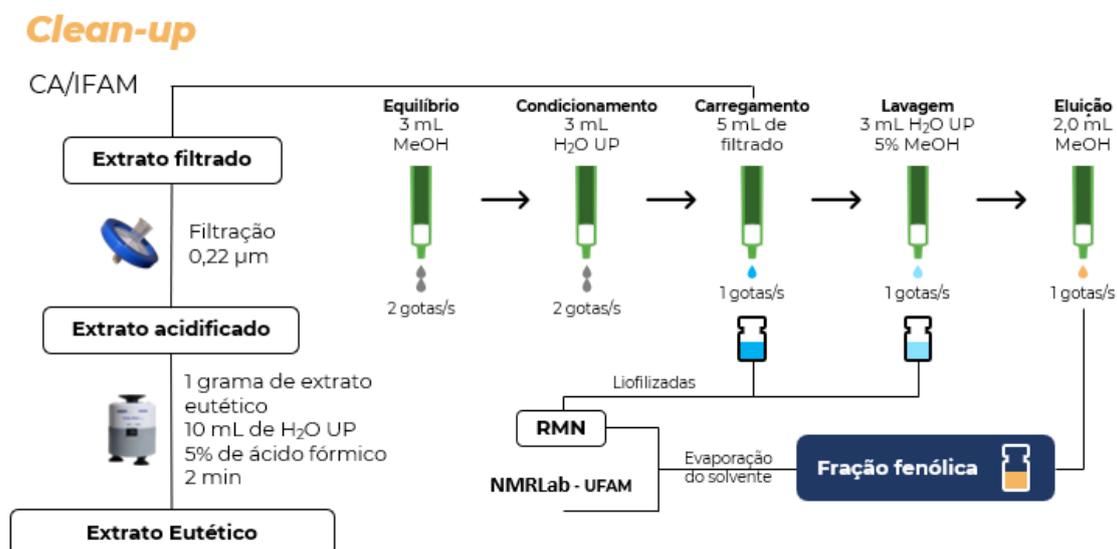
As medidas foram realizadas no Laboratório Yvonne Mascarenhas (LabYM) da Universidade Federal do Amazonas (DFMAT/UFAM), utilizando um Espectroscópio na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier Cary 630 (Agilent Technologies, EUA). A varredura acontecerá na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , através da Refletância Total Atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Para a realização da análise foi necessário que todos os extratos eutéticos passassem por liofilização para a eliminação da água dos sistemas. Os parâmetros utilizados foram os mesmos citados anteriormente no item 4.2.1.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS ALVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.9.1 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE RMN POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A metodologia de purificação ("*Clean-up*") do extrato eutético foi iniciada acidificado com 10 mL de água ultrapura (H₂O UP), onde foram adicionados 5 mL de H₂O UP contendo 5% de ácido fórmico acidificando o meio, e a solução foi agitada por 2 minutos. Em seguida, foi realizada a filtração do extrato através de um filtro de 0,22 µm, para remover partículas maiores. Após a preparação do extrato, foi realizado o equilíbrio de uma coluna com a adição de 3 mL de metanol (MeOH), gotejados lentamente a uma vazão de 2 gotas por segundo. A coluna foi então condicionada com 3 mL de H₂O ultrapura (H₂O UP), mantendo a vazão. Em seguida, o filtrado (10 mL) foi carregado na coluna, com uma vazão de 1 gota por segundo. A etapa seguinte envolveu a lavagem da coluna, realizada com 3 mL de H₂O UP contendo 5% de MeOH, também gotejado a 1 gota por segundo. Por fim, a eluição foi realizada com 2 mL de MeOH puro, mantendo a vazão de 1 gota por segundo. As frações obtidas foram posteriormente liofilizadas e submetidas à análise nos laboratórios do NMRLab, utilizando a técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Após a evaporação do solvente, obteve-se a fração fenólica, que foi analisada nas etapas subsequentes (Figura 3).

Figura 3 – SPE (Extração em Fase Sólida)



Fonte: o autor, 2024

4.9.1.1 Rendimento da fração fenólica após SPE

O rendimento da Extração em Fase Sólida (SPE) foi realizado após a evaporação do solvente de eluição na fase final do processo. A massa do extrato eutético foi pesada, foi realizado o cálculo de densidade dos sistemas eutéticos antes e após a extração, utilizando uma balança analítica (Shimadzu, Unibloc ATY224). A massa final do composto, após a evaporação do solvente de eluição, foi comparada à massa inicial da amostra (extrato eutético), e o rendimento foi calculado pela fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{Massa final})}{(\text{Massa Inicial})} \times 100$$

4.9.2 ANÁLISE DA FRAÇÃO FENÓLICA POR RMN

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro do tipo Bruker Avance IIIHD, operando a 500,13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o núcleo de carbono ^{13}C , equipado com uma sonda BBFO Plus SmartProbe. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em triplicatas ($n = 3$), através da sequência de pulsos ZGPR (nomenclatura Bruker), com o sinal do metanol residual (δ 4,87) sendo suprimido.

O tempo de relaxação (D1) foi definido como 1 segundo; número de pontos durante a aquisição (TD) igual a 65 K; tamanho da janela espectral (SW) igual a 8 kHz (19,0 ppm); número de transientes (NS) igual a 16 e o tempo de aquisição (AQ) igual 3,88 segundos, com a temperatura da máquina estabelecida a 25° C. Para manter-se a padronização, o valor do ganho do receptor (RG) foi definido em 144 e o pulso calibrado (P1) para cada amostra.

Os espectros foram processados com o software TOPSPIN (versão 3.5, Bruker BioSpin Inc.), utilizando uma multiplicação exponencial nos FIDs por um fator de 0,3 Hz. As fases e as linhas de base foram corrigidos automaticamente. Os sinais dos espectros foram referenciados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS-d4) (0,00 ppm). Os valores dos deslocamentos químicos adquiridos foram expressos em ppm e os valores das constantes de acoplamento (J) expressas em Hz. Experimentos de RMN bidimensionais

(COSY, HSQC e HMBC) foram realizados para fundamentar a identidade dos compostos, juntamente com as comparações dos dados obtidos com os bancos de dados online e artigos da literatura.

4.10 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE

A avaliação do impacto da extração eutética na bioacessibilidade do composto bioativo de *M. dubia* foi realizada por meio de uma simulação de digestibilidade *in vitro* de acordo com o Protocolo INFOGEST. A concentração de antioxidantes foi analisada após a etapa final de digestão (ROSALES *et al.*, 2023).

4.11 EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS DE CAMU-CAMU

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas para avaliar o efeito citotóxico dos extratos de camu-camu: células de câncer de pulmão humano (A549), células de carcinoma de cólon humano (HCT-8) e HUVEC (célula endotelial da veia umbilical humana normal). As linhagens celulares foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. Todas as células foram cultivadas em meio Ham-F12, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 100 µg/mL de penicilina. Para avaliar a citotoxicidade celular das amostras de extratos de camu-camu, frutos maduros (AM, BM, CM, DM) e frutos verdes (AV, BV, CV, DV), utilizou-se o 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilte-trazólio brometo (MTT), conforme descrito por Carmo *et al.*, 2019. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 (A549), 1×10^4 células/poço (HCT8) e 6×10^3 (HUVEC), 100 µL/poço. Após a adesão, as células foram tratadas por 48 h com concentrações seriadas de 10, 50, 75, 100 e 150 µg/mL de extrato. Após o tratamento, MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado por 4 horas a 37 °C. O MTT é reduzido a cristais azuis de formazan por células metabolicamente ativas (GEIRNAERT *et al.*, 2017). Numa sequência, os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO e a absorbância foi medida a 540 nm. A metodologia utilizada por Escher *et al.*, 2020 foi aplicada para calcular os parâmetros CI_{50} é a concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, $(T/C) \times 100 = 50$, onde T é o número de células no tempo t tratamento, e C são as células de controle no tempo t de tratamento.

Além disso, o índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão CI_{50} (linhagem celular normal)/ CI_{50} (linhagem celular cancerígena).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram obtidos em triplicata e avaliados usando Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey foi aplicado com um nível de confiança de 95%. A versão Minitab® Statistical Software 22 foi utilizada para realização da análise.

Além disso, para os ensaios antioxidantes foi realizado um teste de comparação múltipla LSD com método de Bonferroni, análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey HSD após a ANOVA para identificar quais grupos específicos têm diferenças significativas entre si.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG-EM

A análise de CG-EM foi realizada após a obtenção do extrato, a amostra C apresentou aroma semelhante ao da amostra de camu-camu liofilizado. Sendo assim foi realizado um estudo dos compostos voláteis da fruta para posterior comparação dos compostos voláteis que restaram no extrato. Entretanto, não foi possível realizar o estudo com o extrato obtido a partir do solvente eutético devido a necessidade de uma tecnologia de SPME para a detecção desses compostos presentes no extrato.

Os principais compostos identificados no óleo essencial do fruto do camu-camu pertencem ao grupo químico dos terpenos (Tabela 1; Figura 3), são eles, os compostos α -pineno (29,71%), limoneno (47,42%) e γ -terpineol (6,18%). Os terpenos são compostos orgânicos naturais derivados de unidades de isopreno (C_5H_8), que podem ser classificados em monoterpenos (compostos de duas unidades de isopreno, como o α -pineno e o limoneno) e sesquiterpenos (compostos de três unidades de isopreno, como o γ -terpineol). Eles são amplamente encontrados em plantas e possuem diversas funções biológicas e aplicações industriais, especialmente na produção de fragrâncias, aromas e medicamentos (DA COSTA, J. S. *et al.*, 2022; SILVA, R. C. E *et al.*, 2021).

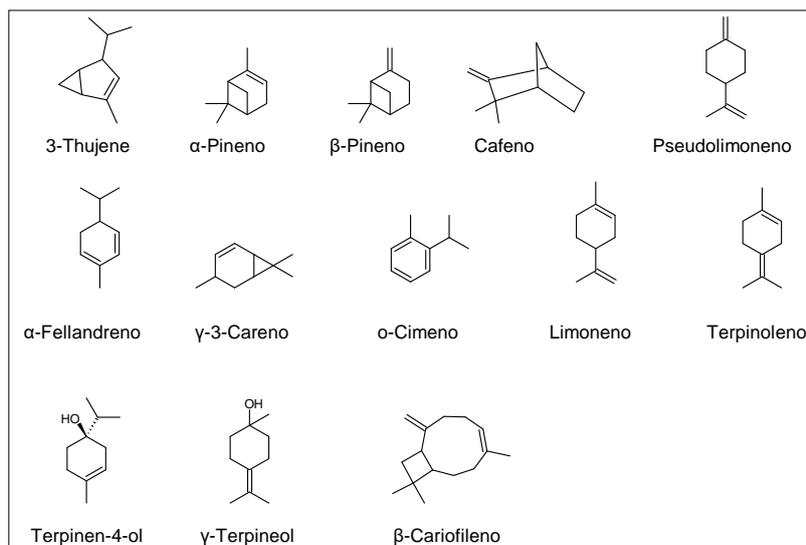
Em seu estudo, da Costa *et al.* (2022), identificou os hidrocarbonetos monoterpênicos como predominantes no óleo essencial de folhas de *M. dubia* (60,2–74,5%). Além disso, também foram estudadas outras espécies do gênero *Myrciaria* cujo os principais compostos identificados nos óleos essenciais foram o monoterpeno hidrocarbonetos com pinano (α -pineno, 0–67,2%) e esqueletos de mentano (terpinoleno, 0–23,1%; α -felandreno, 0–17,7%; γ -terpineno, 0–8,7%; p-cimeno, 0–7,2%; e β -felandreno, 0–6,6%), seguido pelos sesquiterpenos com cariofilano (E-cariofileno, 0,3–43,2%; óxido de cariofileno, 0,4–41,1%; e α -humuleno, 0–5,3%) e esqueletos de cadinano (γ -cadineno, 0–17,5%).

Tabela 3 - Compostos identificados no óleo essencial de camu-camu por CG-EM

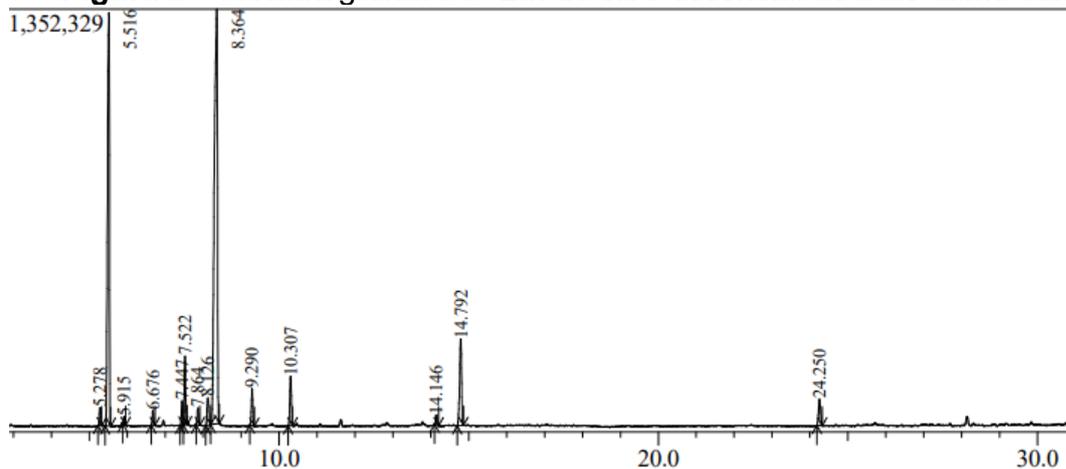
| Tempo | Composto | IA | Teor (%) |
|---------------|--------------------------------------|-------------|-----------------|
| 5.278 | 3-Tujene | 900 | 0,77 |
| 5.516 | α-pineno | 935 | 29,71 |
| 5.915 | β -pineno | 980 | 0,67 |
| 6.676 | Canfeno | 951 | 0,31 |
| 7.447 | Pseudolimoneno | 1007 | 1,29 |
| 7.522 | α -Felandreno | 1009 | 3,5 |
| 7.864 | δ -3-Careno | 1018 | 0,87 |
| 8.126 | o-Cimeno | 1026 | 1,92 |
| 8.364 | Limoneno | 1032 | 47,42 |
| 10.307 | Terpinoleno | 1087 | 2,87 |
| 14.146 | Terpinen-4-ol | 1182 | 0,55 |
| 14.792 | γ-Terpineol | 1197 | 6,18 |
| 24.250 | β -cariofileno | 1419 | 1,96 |
| TOTAL | | | 98,02 |

*Representação do espectro visto na Figura 5
 Fonte: dados da pesquisa, 2024

A Figura 4 ilustra as estruturas moleculares dos compostos identificados através da análise de cromatografia em fase gasosa que estão dispostas na Tabela 3. A Figura 5 representa o cromatograma CG-EM do óleo essencial do fruto do camu-camu.

Figura 4 - Estruturas dos compostos voláteis identificados pelo CG-EM

Fonte: o autor, 2024

Figura 5 - Cromatograma CG-EM do óleo essencial do fruto camu-camu

5.278: 3-Tujene; 5.516: α-pineno; 5.915: β-pineno; 6.676: Canfeno; 7.447 : Pseudolimoneno; 7.522: α-Fellandreno; 7.864: δ-3-Careno; 8.126: o-Cimeno; 8.364: Limoneno; 10.307: Terpinoleno; 14.146: Terpinen-4-ol; 14.792: γ-Terpineol; 24.250: β-cariofileno. Fonte: o autor, 2024

O uso de óleos essenciais em cultura de tecidos é apontado por Hamdeni et al. (2022) e Mokbel, Khalil e El-Shazly (2017) como uma estratégia importante no controle de contaminantes, demonstrando eficiência no controle de fungos, bactérias e vírus. No entanto, para observar essa bioatividade dos óleos essenciais sobre os microrganismos, é necessário uma análise prévia das espécies vegetais com esse potencial inibitório, fornecendo alternativas para a inibição de microrganismos endofíticos (ENNOURI *et al.*, 2020; JASIM; SALIH; ATI, 2021; MEZIANI *et al.*, 2019).

Andrade (2017) em seu estudo investigou a atividade antifúngica dos enantiômeros (+)-α-pineno e (-)-β-pineno contra *Candida* spp. através do método

de microdiluição. A hipótese de que esses compostos têm ação antifúngica foi sustentada pelo conhecimento de que os terpenos, especialmente os monoterpenos, possuem forte atividade antimicrobiana, incluindo contra fungos.

Outros efeitos biológicos de terpenos foram observados em diferentes contextos, como atividade antioxidante e anti-inflamatória. A complexidade química e as condições experimentais variáveis podem influenciar os resultados de estudos com óleos essenciais, destacando a necessidade de padronização metodológica para comparar e reproduzir os achados. Os resultados indicam o potencial dos enantiômeros para tratamento de infecções por *Candida*, embora sejam necessários mais estudos, incluindo avaliações toxicológicas, pré-clínicas e clínicas (BARROS *et al.*, 2022; BHATTI *et al.*, 2014; CLÁUDIA; ANDRADE, 2017; GOEL; MITTAL; CHAUDHARY, 2016).

O limoneno é um monoterpeno cíclico encontrado em diversas espécies de plantas e utilizado principalmente na indústria de fragrâncias (ALI *et al.*, 2011). Óleos essenciais contendo limoneno como componente principal têm mostrado atividade antibacteriana contra cepas resistentes de *S. aureus* e algumas cepas de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*, conforme demonstrado no estudo de Settanni *et al.* (2012). Em geral, a parede celular de bactérias Gram-positivas é mais simples do que a de bactérias Gram-negativas, o que as torna mais susceptíveis à ação de óleos essenciais. Assim, devido às suas características lipofílicas, é possível que o limoneno atravesse a parede celular, alterando a permeabilidade da membrana celular bacteriana (ADRIANA ESTRELLA *et al.*, 2021; JUSTINO DE ARAÚJO *et al.*, 2020).

Em seu estudo, de Castro *et al.* (2016), sugeriu que o sinergismo entre os constituintes químicos de um óleo essencial (OE) é responsável pelo efeito tóxico sobre insetos, melhorando a eficácia e permitindo a utilização de doses menores. Os monoterpenos são reconhecidos por serem tóxicos para algumas espécies, apresentando atividades acaricida e larvicida, por exemplo. Os constituintes α -pineno, β -pineno, terpineol, α -terpineol, γ -terpineol e limoneno mostraram atividade larvicida ou inseticida contra *Aedes aegypti* e *Musca domestica* (AMARAL *et al.*, 2017; MANCARZ *et al.*, 2019).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EUTÉTICOS E EXTRATO

5.2.1 pH e densidade

A consideração do pH de um solvente durante o processo de seleção é fundamental, pois ele desempenha um papel crucial na determinação da reatividade química e da estabilidade da solução. Ao lidar com diferentes espécies e reações químicas, o pH do meio se torna um fator essencial para prevenir reações colaterais indesejadas e garantir o sucesso do produto químico desejado. O pH também influencia a escolha do material metálico em diversas aplicações industriais, especialmente ao se considerar a corrosão, além de determinar o nível de toxicidade para organismos vivos.

No campo dos solventes ecologicamente corretos, os NADES (solventes eutéticos naturais) têm atraído significativa atenção devido às suas propriedades sustentáveis e suas aplicações em diversas áreas. No entanto, para atender ao critério de serem ambientalmente amigáveis, é essencial que os NADES apresentem um pH que varie de neutro a ligeiramente ácido. Essa faixa de pH não só contribui para a segurança desses solventes, mas também facilita a eliminação adequada, minimizando seu impacto ambiental (HAYYAN, A. *et al.*, 2012, 2013).

A variação de pH e densidade entre as amostras de eutéticos e extratos sugere que a composição dos solventes tem um impacto direto nessas propriedades. O pH das amostras de extrato varia amplamente, com valores mais baixos indicando maior acidez. Essa acidez é favorável para a extração de compostos como as antocianinas, que são estáveis em ambientes ácidos.

Embora os NADES ecológicos normalmente possuam baixa acidez para manuseio e descarte seguros, há um aspecto intrigante nos NADES de alta acidez. Estes demonstram notáveis propriedades antimicrobianas, tornando-os candidatos promissores para um conjunto completamente distinto de aplicações. Ao criar um ambiente de pH mais baixo, esses NADES tornam-se inóspitos para bactérias e vírus, resultando em sua eliminação (RACHMANIAH *et al.*, 2020). Esses efeitos antimicrobianos oferecem grande potencial em várias aplicações médicas e industriais, onde o controle e a prevenção do crescimento microbiano são de extrema importância.

O pH da mistura eutética depende muito do tipo de HBD utilizado na formação do NADES. É importante destacar que o ChCl é classificado como

um ácido fraco, apresentando uma faixa de pH variando normalmente entre 4 e 6. Os HBD utilizados na formação do NADES foram Glicose e Ácido Málico que exibiram pH ácido. Esta acidez foi atribuída à presença do ChCl na mistura eutética e a acidez forte do ácido málico. De todos os testes NADES, aqueles que compreendem Glicose e apenas cloreto de colina devido o caráter mais básico da água, emergiram como particularmente candidatos promissores, distinguidos pelo seu pH mais próximo do neutro (KOH *et al.*, 2024).

A densidade dos NADES é um parâmetro fundamental no planejamento de processos químicos e na formulação de equações matemáticas relacionadas à transferência de massa. Embora a escolha de NADES com alta densidade possa não ser a mais adequada para fins de mistura, ela se revela vantajosa para processos de extração, pois a diferença de densidade substancial é necessária para uma separação de fases eficiente (KOH *et al.*, 2024).

A densidade também varia, indicando diferenças na concentração dos compostos extraídos (Tabela 4). Essas variações de densidade indicam que a escolha da proporção dos componentes do solvente eutético pode ser otimizada para diferentes tipos de extrações, dependendo do composto-alvo.

De acordo com a revisão realizada por Koh *et al.* (2023), os autores determinaram que a densidade dos NADES que incorporam açúcar como componente inicial varia entre 1,200–1,460 g/mL. No caso do ChCl:Glu (1:1), a densidade observada foi de 1,36065 g/mL, situando-se entre as densidades de ChCl puro (1,1856 g/cm³) e Glu puro (1,5345 g/cm³) à temperatura ambiente. Essa correspondência com os dados de Hayyan *et al.* (2013) e KOH *et al.* (2024) indicou consistência, pois a densidade da mesma composição de NADES com uma relação molar de 1:1 atingiu um máximo de 1,2978 g/cm³ à temperatura ambiente, resultados semelhantes com os obtidos nesse estudo.

Tabela 4 - Análise de pH e densidade dos eutéticos e extratos

| COD AMOSTRA | PROPORÇÃO MOLAR | pH | Densidade |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| CC:AM:G:W | 1:1:1:9 | 0,35 ± 0,01 | 1,19 ± 0,01 |
| CC:G:W | 1:1:6 | 3,58 ± 0,01 | 1,21 ± 0,01 |
| CC:AM:W | 1:1:6 | 0,22 ± 0,03 | 1,22 ± 0,01 |
| CC:W | 1:1:6 | 6,01 ± 0,01 | 1,05 ± 0,05 |
| AM | - | 0,45 ± 0,01 | 0,75 ± 0,05 |
| BM | - | 2,85 ± 0,01 | 1,15 ± 0,21 |
| CM | - | 0,36 ± 0,02 | 1,07 ± 0,03 |
| DM | - | 4,01 ± 0,02 | 1,01 ± 0,01 |
| EV | - | 0,43 ± 0,03 | 0,86 ± 0,03 |
| FV | - | 2,88 ± 0,01 | 0,78 ± 0,03 |
| GV | - | 0,41 ± 0,01 | 0,93 ± 0,06 |
| HV | - | 3,15 ± 0,04 | 0,96 ± 0,02 |

*CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água. AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde.

Na Tabela 5, está descrita a mudança de aspectos visuais encontrados nos Nades após 7 dias do preparo. Os componentes do HBA e HBD foram aquecidos e agitados a 80°C até a obtenção de líquidos claros e homogêneos. A etapa de aquecimento foi essencial para a formação dos NADES, pois facilitou a dissolução dos sólidos, reduzindo suas forças coesivas e promovendo a interação entre o ChCl e o HBD, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio. Esse processo suprimiu o ponto de fusão, permitindo que o NADES permanecesse na forma líquida (JURIĆ *et al.*, 2021; SEKHARAN *et al.*, 2021). Após o aquecimento, as misturas de NADES apresentaram um aspecto de gel viscoso e branco translúcido nos estágios iniciais e as que possuíam ácido málico em sua composição apresentaram uma coloração levemente amarelada.

Tabela 5 - Aparência dos solventes eutéticos

| SOLVENTE EUTÉTICO | APARÊNCIA | APARÊNCIA APÓS 7 DIAS |
|-------------------|--|---|
| CC:AM:G:W | Líquido de viscosidade média levemente amarelado | Líquido viscoso levemente amarelado com cristais sólidos formados |
| CC:G:W | Líquido viscoso transparente | Cristais sólidos formados |
| CC:AM:W | Líquido viscoso levemente amarelado | Líquido viscoso levemente amarelado |
| CC:W | Líquido de viscosidade baixa transparente | Líquido de viscosidade baixa transparente |

*CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EUTÉTICOS

5.3.1 Antocianinas e Carotenoides

As amostras que contêm ácido málico (amostras A e C) mostraram maior eficiência na extração de antocianinas. Isso sugere que o ácido málico, devido à sua acidez, pode estar facilitando a extração dessas substâncias, que são conhecidas por suas propriedades antioxidantes. A maior quantidade de antocianinas nas amostras A e C indica que essas combinações de solventes podem ser as mais eficazes para a extração desses compostos específicos (Tabela 6).

Tabela 6 -Concentração de antocianinas totais dos extratos de camu-camu utilizando solventes eutéticos

| Amostra | mg/mL ± DP |
|---------------|---------------------------|
| A (CC:AM:G:W) | 4,81 ± 0,08 ^c |
| B (CC:G:W) | 2,82 ± 0,08 ^e |
| C (CC:AM:W) | 6,43 ± 0,03 ^a |
| D (CC:W) | 5,18 ± 0,23 ^b |
| E (CC:AM:G:W) | 2,10 ± 0,04 ^{fg} |
| F (CC:G:W) | 2,33 ± 0,08 ^f |
| G (CC:AM:W) | 3,41 ± 0,02 ^d |
| H (CC:W) | 1,94 ± 0,06 ^g |

* Resultados (médias ± desvio padrão). Médias que não compartilham das letras possuem diferença estatisticamente significativa para o teste de Tukey (p -valor > 0,05). CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água. AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde.

Tabela 7 - Concentração de carotenoides totais dos extratos de camu-camu utilizando solventes eutéticos

| AMOSTRA | TEOR DE CAROTENOIDES (mg/mL ± DP) |
|---------|--------------------------------------|
| AM | ND |
| BM | ND |
| CM | ND |
| DM | ND |
| EV | 1,87 ± 0,47 |
| FV | ND |
| GV | ND |
| HV | ND |

*ND: Não Detectado. Resultados (médias ± desvio padrão). CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água. AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV:

eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde.

Na Tabela 7, os resultados mostraram que apenas na amostra E (Cloreto de Colina, Glicose e Ácido Málico da fruta verde) foi possível detectar o teor de carotenoides, destacando a importância da combinação de glicose e ácido málico no processo de extração. Os carotenoides são compostos lipossolúveis, e o ambiente criado por esses solventes parece ser ideal para sua extração, especialmente nas frutas verdes.

Em seu estudo Fernández *et al.* (2019), relatou que o camu-camu tem altas concentrações de vitamina C, mas baixas concentrações de carotenoides, o que explica o fato de que, para o teste realizado, na maioria dos extratos eutéticos não foi possível detectar os níveis baixos de carotenoides devido a sensibilidade do ensaio.

Antioxidantes naturais, presentes em frutas e vegetais, são usados para prevenir a interferência e o ranço dos alimentos causados pela auto oxidação. Os frutos do camu-camu são reconhecidos mundialmente por sua elevada capacidade antioxidante, atribuída principalmente aos altos níveis de compostos fenólicos e ácido ascórbico (DE ABREU FIGUEIREDO *et al.*, 2020).

A Tabela 8 apresenta os resultados de análises de potencial antioxidante de diferentes amostras e combinações de compostos, utilizando quatro metodologias: FT, DPPH, ABTS e FRAP.

Tabela 8 - Avaliação da capacidade Antioxidante dos extratos eutéticos de camu-camu obtida pelos ensaios de Fenólicos Totais, DPPH, ABTS e FRAP

| AMOSTRAS | FT | DPPH | ABTS | FRAP |
|-----------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| AM | 850,96±5,19 ^a | 1430,83±89,32 ^b | 605,48±3,33 ^a | 605,48±13,89 ^{bcd} |
| BM | 857,02±2,19 ^a | 1240,00±15,61 ^{cd} | 624,74±3,33 ^a | 624,74±7,22 ^{abc} |
| CM | 803,88±17,57 ^{ab} | 1212,50±17,32 ^{cde} | 569,37±18,35 ^a | 569,37±36,43 ^d |
| DM | 834,89±40,60 ^a | 1109,17±29,82 ^e | 639,93±1,92 ^a | 639,93±10,50 ^{ab} |
| EV | 737,52±14,29 ^c | 1203,33±80,86 ^{cde} | 611,04±35,32 ^a | 611,04±8,34 ^{bcd} |
| FV | 792,67±88,91 ^a | 1360,00±2,50 ^b | 668,44±13,33 ^a | 668,44±46,12 ^a |
| GV | 761,86±41,09 ^{bc} | 1317,50±52,50 ^{bc} | 582,89±16,77 ^a | 582,89±2,22 ^{cd} |
| HV | 824,29±30,65 ^{ab} | 1561,67±2,88 ^a | 641,04±5,77 ^a | 641,04±4,62 ^{ab} |
| CC:AM:G:W | 301,06±0,60 ^e | 1318,33±6,29 ^{bc} | 41,41±94,59 ^{ab} | 41,41±2,79 ^f |
| CC:W | 261,67±1,32 ^e | 1140,83±7,63 ^{de} | 120,30±32,37 ^b | 120,30±3,39 ^e |
| CC:G:W | 500,56±0,87 ^d | 462,50±6,61 ^f | 30,30±3,57 ^c | 30,30±3,57 ^f |
| CC:AM:W | 288,13±0,63 ^e | 573,33±7,63 ^f | 4,74±4,20 ^d | 4,74±1,11 ^f |

*Os resultados (médias \pm desvio padrão) que não compartilham das letras possuem diferença estatisticamente significativa para o teste de Tukey (p -valor $> 0,05$). *DPPH e ABTS expresso em μM Trolox/mL. Frap expresso em μM Fe(II)/mL e FT expresso em mg GAE/g. CC: Cloreto de colina; AM: Capacidade Antioxidante dos extratos de *E. moraviana* e *E. blasthantha* obtida pelos ensaios ORAC, FRAP, ABTS, DPPH e Compostos Fenólicos Totais Ácido málico; G: Glicose; W: água. AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde.

O composto fenólico total e a concentração total de antocianina mostraram tendência semelhante ao potencial antioxidante encontrado nas demais análises. Os resultados deste estudo podem induzir uma correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Conseqüentemente, o impacto do solvente usado em extrair os compostos fenólicos foi um fator que afetou os resultados da atividade antioxidante (SABATINI *et al.*, 2020). Em seus resultados, KORAQI *et al.* (2024) comprova que a extração de compostos fenólicos de frutas está diretamente ligada com a capacidade antioxidante desses extratos. Apresentando, assim, uma correlação direta entre valores de potencial antioxidante e quantidade de fenólicos totais nos extratos.

Nos resultados do método FT, a amostra BM destacou-se com o maior valor ($857,0 \pm 2,2$ mg GAE/g), seguida de perto por AM ($851,0 \pm 5,2$), ambas com alto potencial antioxidante. Por outro lado, as combinações CC:AM ($288,1 \pm 0,6$ mg GAE/g) e CC:G ($500,5 \pm 0,9$ mg GAE/g) apresentaram os menores valores, sugerindo menor capacidade de inibição da oxidação, resultados que foram satisfatórios, uma vez que se esperava que os solventes eutéticos puros apresentassem baixo ou nenhum potencial de oxirredução.

O ensaio DPPH é uma ferramenta valiosa para examinar as capacidades antioxidantes de hidrofílicos e lipofílicos antioxidantes (SACHADYN-KRÓL; BUDZIAK-WIECZOREK; JACKOWSKA, 2023). Os elementos cruciais no ensaio DPPH são a estrutura conformação de componentes antioxidantes e sua capacidade de liberar hidrogênio (GULCIN; ALWASEL, 2023). A variação dos componentes eutéticos afetou significativamente os resultados de DPPH. No teste de DPPH, a amostra H demonstrou a maior capacidade de eliminação de radicais livres ($1561,7 \pm 82,8$ μM Trolox/mL), seguida por GV ($1317,5 \pm 52,1$ μM Trolox/mL) e F ($1360,0 \pm 50,5$ μM Trolox/mL).

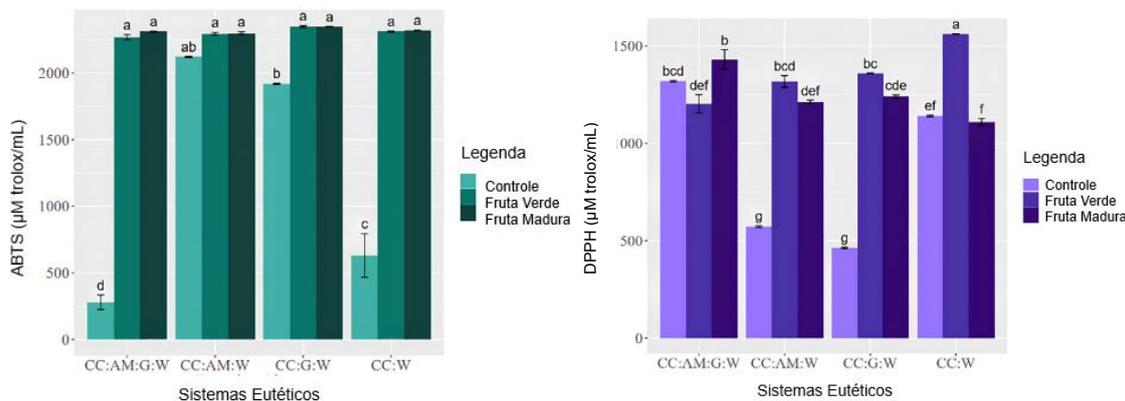
As combinações CC:G ($462,5 \pm 6,6$ μM Trolox/mL) e CC:AM ($573,3 \pm 7,6$ μM Trolox/mL) obtiveram os menores valores, indicando uma baixa eficácia na

extração de componentes com potencial antioxidantes desse fruto. Estudos de Chirinos, *et al.*, 2010, Neves, *et al.* 2015 e Silva, Mourão, 2022, indicam que o alto poder redutor do ácido ascórbico influencia significativamente os valores observados para a atividade antioxidante de extratos, variando conforme as diferentes concentrações presentes ao longo dos estágios de maturação do camu-camu. A flutuação observada na capacidade de eliminação de DPPH da fruta pode ser atribuída a compostos fenólicos, que dissolve-se de diferentes maneiras de acordo com a polaridade dos solventes utilizados (GULCIN; ALWASEL, 2023; MUZOLF-PANEK; STUPER-SZABLEWSKA, 2021; SABATINI *et al.*, 2020).

No teste ABTS, a amostra BM mais uma vez apresentou o maior valor ($624,7 \pm 3,3 \mu\text{M Trolox/mL}$), o que sugere uma elevada capacidade antioxidante. Por outro lado, as combinações CC:AM ($4,7 \pm 4,2 \mu\text{M Trolox/mL}$) e CC:G ($30,3 \pm 3,6 \mu\text{M Trolox/mL}$) tiveram os menores resultados, indicando baixa capacidade de neutralização de radicais. No método FRAP, a amostra BM voltou a se destacar com o maior valor ($624,741 \pm 3,333 \mu\text{M Fe(II)/mL}$), confirmando sua elevada capacidade de reduzir íons férricos, enquanto CC:AM ($4,741 \pm 1,111 \mu\text{M Fe(II)/mL}$) e CC:G ($30,296 \pm 3,572 \mu\text{M Fe(II)/mL}$) ficaram entre as que apresentaram menor poder redutor.

De forma geral, as amostras BM, HV e GV apresentaram os maiores potenciais antioxidantes em todos os testes, o que indica uma maior eficácia na inibição da oxidação, eliminação de radicais livres e neutralização de radicais. Em contrapartida, as combinações como CC:AM, CC:G e CC:W tiveram os menores resultados em praticamente todos os testes, sugerindo uma menor atividade antioxidante. Esses resultados, reforçados pela análise estatística do teste de Tukey, mostram que as amostras, especialmente BM e HV, têm um potencial antioxidante superior, enquanto as combinações de solventes eutéticos apresentam uma redução significativa nesse potencial.

Figura 6 - Resultado da análise estatística de comparação dos grupos eutéticos das frutas verdes e maduras para o ensaio de ABTS e DPPH



*CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água.

Na Figura 6 os gráficos referentes aos ensaios de ABTS e DPPH, que medem a capacidade antioxidante, observam-se diferenças nos valores médios entre os grupos de frutas verdes e maduras. De acordo com as indicações de letras, as colunas com letras iguais não diferem significativamente, enquanto letras distintas indicam diferença estatística. Essa configuração sugere que, dependendo do estágio de maturação, a atividade antioxidante pode apresentar variações importantes. A maior atividade antioxidante em frutas maduras, indicada pelas letras distintas, aponta para a acumulação de compostos antioxidantes ao longo do processo de amadurecimento. Esse aumento é consistente com a literatura, onde os compostos fenólicos e outras substâncias antioxidantes se tornam mais abundantes e efetivos contra radicais livres conforme as frutas se desenvolvem.

O ensaio DPPH é altamente sensível à capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e outros antioxidantes lipofílicos, sendo especialmente eficaz em detectar mudanças em antioxidantes hidrofóbicos. Se os antioxidantes das frutas estudadas incluírem compostos de natureza lipofílica ou se a estrutura fenólica muda significativamente com a maturação, o DPPH será mais responsivo a essas variações, o que pode justificar as diferenças significativas observadas em todos os grupos (GONÇALVES, A. C. *et al.*, 2024; LAKSHMI BALASUBRAMANIAM; TAJVIDI; SKONBERG, 2024; YAMAUCHI *et al.*, 2024).

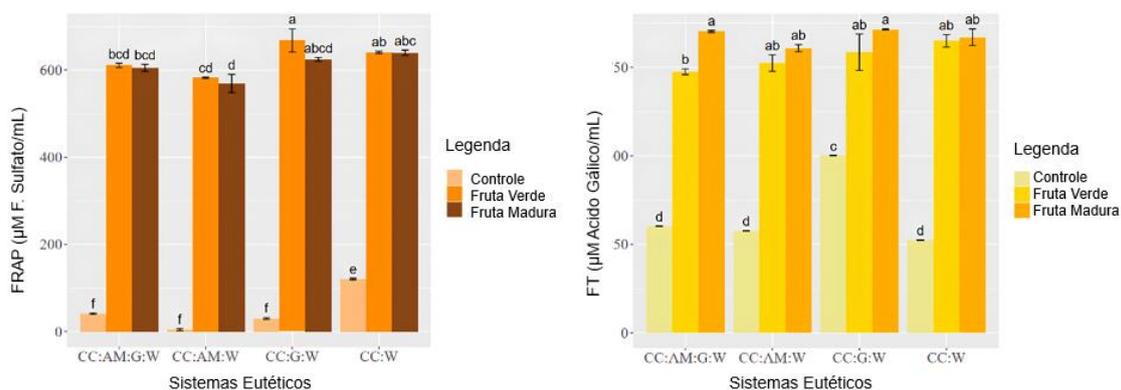
O ensaio ABTS, por outro lado, é mais versátil e reage com uma gama mais ampla de antioxidantes, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos. No entanto, ele pode ser menos sensível a pequenas mudanças nas concentrações de antioxidantes

específicos. Isso significa que o ABTS pode não captar com a mesma precisão as variações na capacidade antioxidante que o DPPH consegue detectar, resultando em menos diferenças significativas entre os grupos de frutas verdes e maduras (YAN *et al.*, 2024).

Durante o amadurecimento, há um aumento em compostos fenólicos e flavonoides que podem influenciar diferentemente cada método de avaliação antioxidante. O DPPH, com sua alta sensibilidade a alterações estruturais e concentração de antioxidantes específicos, consegue distinguir essas variações de maneira mais clara. Já o ABTS pode não captar diferenças tão sutis, especialmente se a atividade antioxidante total não variar significativamente entre os estágios de maturação (CRUZ-CHAMORRO *et al.*, 2024; HWANG; KIM; SHIN, 2019; MADUWANTHI; MARAPANA, 2021).

Em alguns casos, a sinergia entre diferentes compostos antioxidantes pode afetar os resultados, especialmente no ensaio ABTS, que capta a atividade antioxidante geral. No caso das frutas maduras, se a composição total de antioxidantes não variou muito em relação às frutas verdes, o ABTS pode não mostrar diferenças significativas, enquanto o DPPH ainda consegue distinguir variações em antioxidantes específicos (PLATZER *et al.*, 2021; WOŁOSIAK *et al.*, 2021).

Figura 7 - Resultado da análise estatística de comparação dos grupos eutéticos das frutas verdes e maduras para o ensaio de FRAP e Fenólicos Totais



*CC: Cloreto de colina; AM: Ácido málico; G: Glicose; W: água.

Os dados da Figura 7 de FRAP e Fenólicos Totais também revelam diferenças significativas entre os grupos, evidenciadas pelas letras distintas.

Esses resultados indicam que o estágio de maturação influencia significativamente a capacidade de redução férrica (FRAP) e o conteúdo total de compostos fenólicos, que são componentes essenciais para o poder antioxidante (DA COSTA, C. A. R. *et al.*, 2023). As frutas maduras apresentam um aumento nesses parâmetros, o que pode ser explicado pelo maior acúmulo de fenóis e outros antioxidantes no decorrer da maturação. Esse aumento é relevante, pois os compostos fenólicos são amplamente associados à proteção contra processos oxidativos, e sua abundância torna os frutos maduros mais propícios para aplicações antioxidantes (F. GOMES-ROCHETTE *et al.*, 2016).

A análise comparativa dos grupos de frutas verdes e maduras para os parâmetros ABTS, DPPH, FRAP e Fenólicos Totais revela um padrão onde o estágio de maturação contribui para uma maior concentração e eficácia dos compostos bioativos. As letras distintas nos topos dos grupos de colunas demonstram que o processo de maturação não só altera a quantidade desses compostos, mas também a capacidade antioxidante geral das frutas, um achado que apoia a utilização de frutas maduras em contextos que buscam otimizar o teor antioxidante. Dessa forma, os resultados ressaltam a importância do estágio de maturação para o desenvolvimento de produtos ricos em antioxidantes e em compostos fenólicos.

5.3.2 Análise de cor

A cor é um indicativo importante de qualidade em extratos, especialmente em indústrias alimentícias e cosméticas, onde a aparência visual do produto é essencial. A Tabela 9 apresenta uma análise de cor das diferentes amostras, comparando-as com seus respectivos padrões de referência. Os parâmetros analisados incluem L^* (luminosidade), a^* (componente de cor vermelho-verde), b^* (componente de cor amarelo-azul), C^* (croma), h^* (ângulo de tonalidade), ΔL^* (diferença de luminosidade) e ΔE (diferença total de cor em relação ao padrão).

O padrão CC:AM:W apresenta $L^* = 53,78$, indicando uma luminosidade moderada, e suas amostras comparadas, como AM e EV, mostram diferenças de cor significativas, com ΔE de 45,73 e 28,09, respectivamente, o que evidencia uma mudança visual perceptível.

Para o padrão CC:W, que tem $L^* = 54,55$, a amostra H mostra uma grande diferença de cor ($\Delta E = 35,89$), principalmente devido à tonalidade ($h^* = 82,9$),

enquanto a amostra D apresenta uma diferença de $\Delta E = 24,03$, também mostrando variação de tonalidade ($h^* = 80,49$).

Já no padrão CC:AM:W, a maior diferença foi observada na amostra C, com $\Delta E = 45,32$, sugerindo mudanças substanciais tanto na luminosidade ($\Delta L^* = -21,59$) quanto na tonalidade ($h^* = 39,6$). A amostra GV também apresentou uma diferença perceptível ($\Delta E = 27,22$), mas menos pronunciada em relação à amostra CM. No padrão CC:G:W, a amostra BM teve $\Delta E = 24,76$, com mudanças notáveis nas componentes de cor a^* e b^* , e a amostra F apresentou $\Delta E = 24,47$, com variações significativas na luminosidade ($\Delta L^* = -11,35$) e na tonalidade ($h^* = 85,62$).

Tabela 9 – Perfil de coloração dos extratos eutéticos em comparação com os solventes padrões

| AMOSTRAS | Ilum./Obs | L* | a* | b* | C* | h* | ΔL^* | ΔE |
|--------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|------------|
| Padrão – CC:AM:G:W | D65/10° | 53,78 | 1,72 | 6,06 | 6,3 | 74,14 | 0 | 0 |
| Amostra A | D65/10° | 29,93 | 34,27 | 28,11 | 44,32 | 39,36 | -21,1 | 45,73 |
| Amostra E | D65/10° | 37,69 | 8,81 | 29,37 | 30,66 | 73,3 | -14,23 | 28,02 |
| AMOSTRAS | Ilum./Obs | L* | a* | b* | C* | h* | ΔL^* | ΔE |
| Padrão – CC:W | D65/10° | 54,55 | 2,02 | 2,06 | 2,88 | 45,59 | 0 | 0 |
| Amostra H | D65/10° | 45,16 | 1,97 | 15,8 | 15,92 | 82,9 | -8,25 | 18,95 |
| Amostra D | D65/10° | 43,32 | 3,31 | 19,73 | 20,01 | 80,49 | -9,86 | 24,03 |
| AMOSTRAS | Ilum./Obs | L* | a* | b* | C* | h* | ΔL^* | ΔE |
| Padrão – CC:AM:W | D65/10° | 53,68 | 1,76 | 7,25 | 7,46 | 76,32 | 0 | 0 |
| Amostra C | D65/10° | 29,29 | 35,19 | 29,11 | 45,66 | 39,6 | -21,59 | 45,32 |
| Amostra G | D65/10° | 36,73 | 14,28 | 27,57 | 31,05 | 62,62 | -15,01 | 27,22 |
| AMOSTRAS | Ilum./Obs | L* | a* | b* | C* | h* | ΔL^* | ΔE |
| Padrão – CC:G:W | D65/10° | 54,29 | 1,78 | 2,45 | 3,03 | 54,09 | 0 | 0 |
| Amostra B | D65/10° | 45,01 | 5,17 | 21,32 | 21,94 | 76,38 | -8,17 | 24,76 |
| Amostra F | D65/10° | 41,4 | 1,54 | 20,14 | 20,2 | 85,62 | -11,35 | 24,47 |

Fonte: o autor, 2024

Levando em consideração parâmetros como luminosidade (L^*), componentes de cor (a^* e b^*), saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*). A amostra AM apresentou uma cor laranja escuro, puxado para o vermelho, devido

aos seus valores de $L^* = 29,93$, $a^* = 34,27$ e $b^* = 28,11$, com uma alta saturação ($C^* = 44,32$) e um ângulo de tonalidade de $39,36^\circ$, próximo ao laranja. Já a amostra EV adquiriu uma tonalidade amarela clara, com $L^* = 37,69$, $a^* = 8,81$ e $b^* = 29,37$, o que indica uma cor mais suave e menos saturada.

A amostra HV, comparada com o padrão CC:W, apresentou uma cor pêssego suave, com $L^* = 45,32$, $a^* = 15,97$ e $b^* = 7,92$, evidenciando uma mistura de vermelho e amarelo, enquanto a amostra DM mostrou uma cor amarelo médio com $L^* = 43,32$, $a^* = 3,11$ e $b^* = 19,73$. A amostra CM revelou uma cor laranja escuro, similar à amostra AM, com $L^* = 29,29$, $a^* = 35,19$ e $b^* = 29,11$, destacando-se pela alta saturação ($C^* = 45,66$) e uma tonalidade laranja ($h^* = 39,6^\circ$).

A amostra GV apresentou uma tonalidade amarelo-laranja, com $L^* = 36,73$, $a^* = 14,28$ e $b^* = 27,57$, mostrando uma cor moderadamente saturada. Por sua vez, a amostra BM adquiriu um tom amarelo pálido, com $L^* = 41,05$, $a^* = 5,17$ e $b^* = 21,32$, refletindo uma cor mais suave e menos saturada. A amostra FV revelou um amarelo-claro quase neutro, com $L^* = 41,4$, $a^* = 1,54$ e $b^* = 20,14$, tendo uma tonalidade moderadamente saturada e puxada para o amarelo.

De forma geral, todas as amostras demonstraram diferenças perceptíveis de cor em relação aos seus padrões, com as amostras CM e HV se destacando como as que apresentaram as maiores discrepâncias em termos de luminosidade, croma e tonalidade. As amostras variam principalmente entre tons de vermelho, laranja e amarelo, com intensidades de cor que vão de claras a moderadamente escuras.

A forma glicosilada das antocianinas, as antocianidinas (agliconas) apresentam cromóforo longo com oito ligações duplas conjugadas com cargas positivas que conferem colorido intenso em condições ácidas. As agliconas mais comumente conhecidas são cianidina, peonidina, pelargonidina, malvidina, delphinidina e petunidina, que diferem pela posição dos grupos hidroxila e metoxila (BENVENUTTI *et al.*, 2020). Dessa forma, essas características podem justificar as amostras como AM e CM adquirem um tom mais avermelhado, enquanto outras, como EV e HV, tendem a ser mais amareladas. A intensidade e a saturação da cor também variam, com algumas amostras sendo mais vivas (como AM e CM), enquanto outras são mais suaves (como EV e BV).

Os resultados da análise de cor das amostras extraídas do fruto camu-camu revelam variações de tonalidade que podem ser associadas à composição bioativa e aos processos de extração utilizados. O camu-camu, conhecido por sua alta concentração de vitamina C e compostos fenólicos, como antocianinas e flavonoides, possui uma coloração natural que varia de vermelho a púrpura, especialmente quando o fruto está maduro. Esses compostos, especialmente as antocianinas, são responsáveis por essa coloração característica e são sensíveis a fatores como pH, temperatura e método de extração (FIDELIS, DO CARMO, *et al.*, 2020, GONÇALVES, 2012, SANTOS, MIRANDA, *et al.*, 2022).

A análise das amostras revelou que as amostras AM, CM e GV apresentaram tons de laranja escuro ou avermelhado, sugerindo que o processo de extração preservou bem os pigmentos fenólicos presentes no fruto, especialmente as antocianinas, que em meios ácidos tendem a assumir coloração vermelha. A alta saturação dessas amostras indica que elas mantiveram uma maior concentração de compostos bioativos, responsáveis por essa coloração mais intensa (COSTA; SOUSA; FARIA, 2018).

Por outro lado, as amostras EV, HV, DM e BM exibiram cores mais amareladas, o que pode indicar uma possível degradação parcial das antocianinas ou a predominância de outros compostos menos suscetíveis a mudanças de pH. A degradação das antocianinas pode ocorrer devido à exposição ao calor, oxidação ou variações no método de extração, transformando os tons de vermelho e púrpura em amarelo. As amostras HV e BM, que apresentaram cores mais suaves e claras, provavelmente resultam de extratos menos concentrados ou de um processo de extração que favoreceu a degradação dos compostos coloridos, levando a uma coloração menos saturada.

As diferenças de cor entre as amostras podem ser atribuídas aos diferentes métodos de extração utilizados. Solventes mais polares, por exemplo, podem ter extraído uma maior quantidade de compostos hidrossolúveis, como a vitamina C e alguns flavonoides, que também influenciam a cor final do extrato (COSTA; SOUSA; FARIA, 2018). Amostras como AM, CM e HV, que apresentaram maiores variações de ΔE , sugerem que os métodos de extração tiveram um impacto significativo na estabilidade dos pigmentos presentes no camu-camu.

Em resumo, as cores observadas nas amostras extraídas do camu-camu variam de tons avermelhados a amarelados, refletindo a presença e a

estabilidade dos compostos bioativos durante o processo de extração. As amostras mais avermelhadas ou alaranjadas indicam uma maior preservação dos pigmentos naturais, enquanto as amostras amareladas sugerem alterações nos compostos devido a fatores como o pH, a temperatura ou o tipo de solvente utilizado no processo de extração.

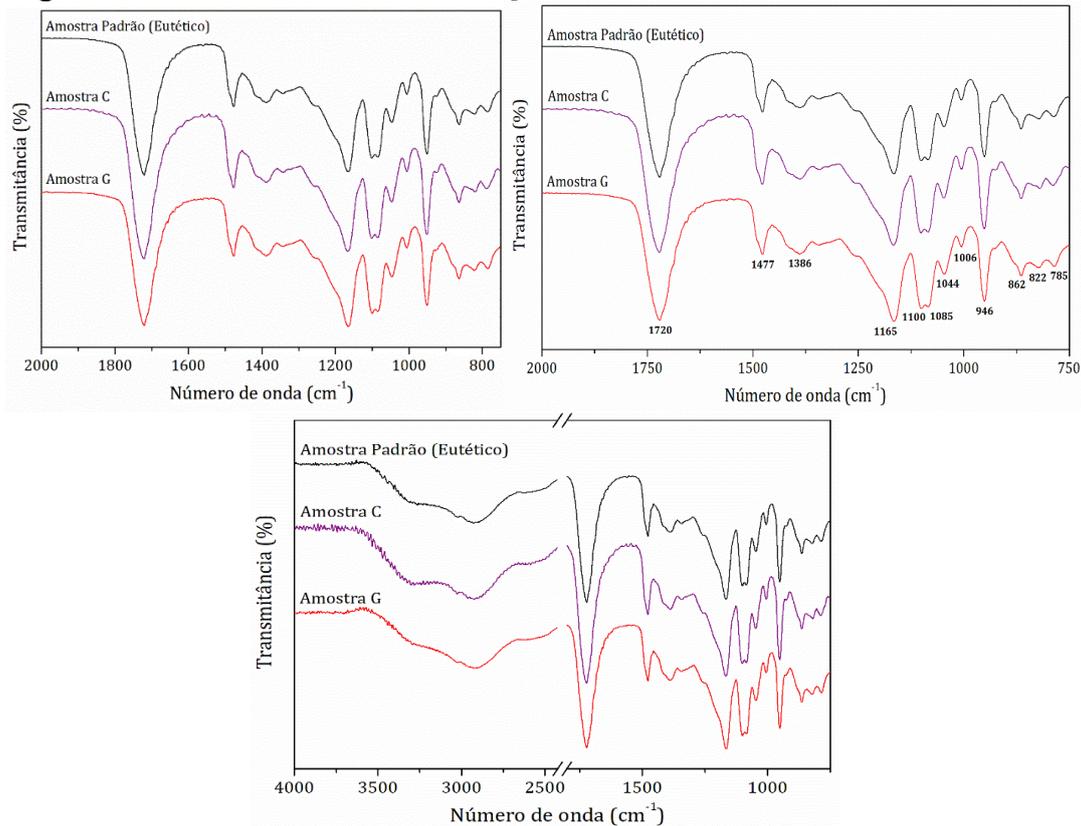
5.3.3 Análise de FTIR

A análise de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) apresentada na Figura 8 compara os espectros de transmitância entre uma amostra padrão (eutético) e as amostras CM e GV. O FTIR é utilizado para identificar grupos funcionais, analisando as vibrações moleculares em diferentes faixas de número de onda (cm^{-1}) (SINGH; SINGH, 2022).

Na região de 4000 a 500 cm^{-1} , que inclui vibrações de estiramento de grupos como O-H, N-H e C-H, a amostra padrão exibe picos mais definidos, sugerindo uma estrutura molecular mais organizada em comparação com as amostras C e G. A amostra C apresenta uma ligeira diminuição na intensidade dos picos, o que pode indicar a presença de diferentes compostos ou uma menor quantidade de grupos funcionais. Já a amostra G mostra uma atenuação ainda maior, sugerindo alterações mais significativas em sua composição.

Na faixa entre 1720 e 750 cm^{-1} , observam-se picos importantes, como o da região de 1720 cm^{-1} , que é característico de carbonilas (C=O). Esse pico está presente em todas as amostras, mas com intensidades diferentes. As amostras C e G exibem padrões distintos, com picos em 1477 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} e 1165 cm^{-1} , possivelmente associados a estiramentos de C-H e C-O, que são comuns em compostos fenólicos ou ácidos carboxílicos, como os presentes no camu-camu.

Figura 8 - Análise de FTIR, diferença entre o solvente e as amostras C e G



Fonte: o autor, 2024

Na região entre 2000 e 750 cm^{-1} , a amostra padrão novamente se destaca com picos mais nítidos, enquanto as amostras CM e GV apresentam transmitâncias diferentes. A amostra CM, embora tenha picos menos intensos que a amostra padrão, mantém um perfil semelhante. Já a amostra GV mostra uma redução ainda maior na intensidade dos picos, indicando uma alteração mais pronunciada em sua composição química.

No espectro de FTIR para o extrato eutético de camu-camu, podem ser observados sinais típicos da estrutura das antocianinas referentes às bandas de absorção em 950, 1085 e 3000 cm^{-1} , em concordância, respectivamente, com a vibração de flexão dos grupos $-\text{CH}_2$, COC e $-\text{OH}$ (KRYSA; SZYMAŃSKA-CHARGOT; ZDUNEK, 2022). Vannuchi Ramos *et al.* (2024), encontrou resultados semelhantes com bandas de absorção em 950, 1072 e 3300 cm^{-1} .

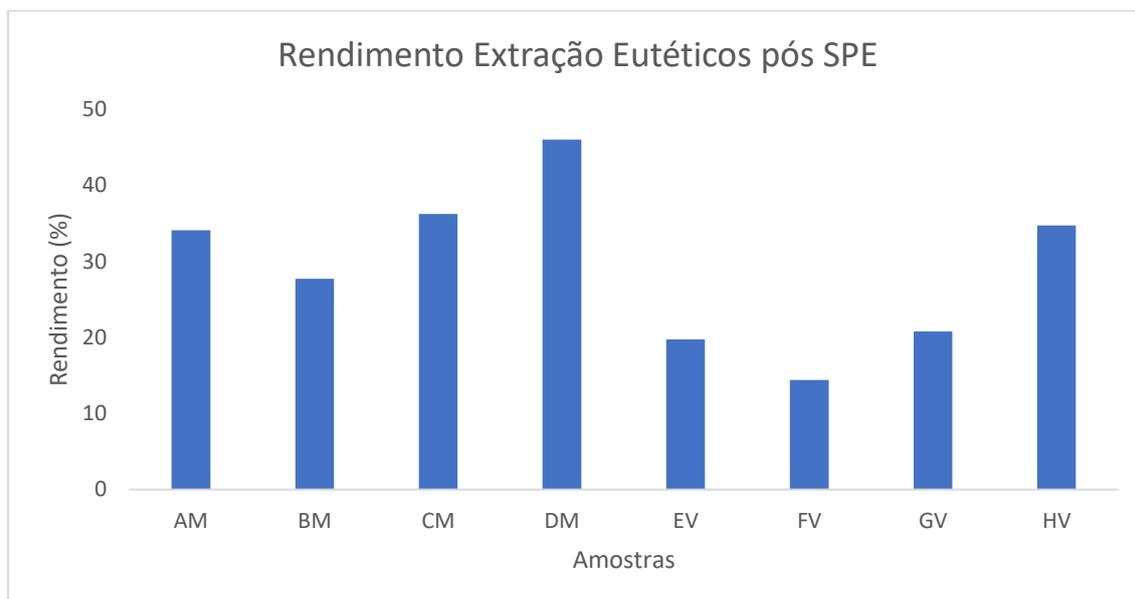
Bandas relacionadas aos anéis fenólicos (1200 e 1500 cm^{-1}) e grupos $=\text{COC}$ dos flavonoides (1085 cm^{-1}) podem ser detectadas. Nas regiões de 1600 a 900 cm^{-1} podem ser observadas bandas características das antocianinas (anéis fenólicos e grupos COC) (VANNUCHI *et al.*, 2024).

Os espectros de FTIR demonstram que as amostras CM e GV passaram por mudanças em suas composições químicas em relação à amostra padrão, provavelmente devido ao processo de extração ou à variação na concentração de compostos bioativos do camu-camu. A amostra CM parece ter sofrido alterações moderadas, enquanto a amostra GV apresenta mudanças mais acentuadas, sugerindo que pode conter uma quantidade menor ou uma estrutura diferente de grupos funcionais em comparação às demais.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS ALVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

5.4.1 Rendimento SPE

A Figura 9 ilustra os rendimentos percentuais dos extratos eutéticos obtidos das amostras A a H, com as barras de erro de queda a variação associada. Observe-se que há diferenças significativas nos rendimentos entre as amostras, o que pode estar relacionado à composição e às interações dos compostos em cada amostra com os solventes utilizados. A amostra D apresentou o maior rendimento, com 46,05%, destacando-se dos demais. Esse alto rendimento pode indicar uma melhor interação entre o solvente eutético e os compostos presentes na amostra, promovendo uma proteção mais eficiente. As amostras A, B, C e H tiveram rendimentos moderados, variando de 27,74% a 36,24%. Esses resultados sugerem que, embora a eficiência da deficiência seja satisfatória, existem fatores que podem estar limitando uma proteção mais eficaz. Por outro lado, as amostras E, F e G registaram os menores rendimentos, especialmente F (14,63%) e E (19,76%). Esses valores baixos podem ser consequência de uma menor solubilidade dos compostos nessas condições ou de uma menor camada do solvente com os compostos extraídos.

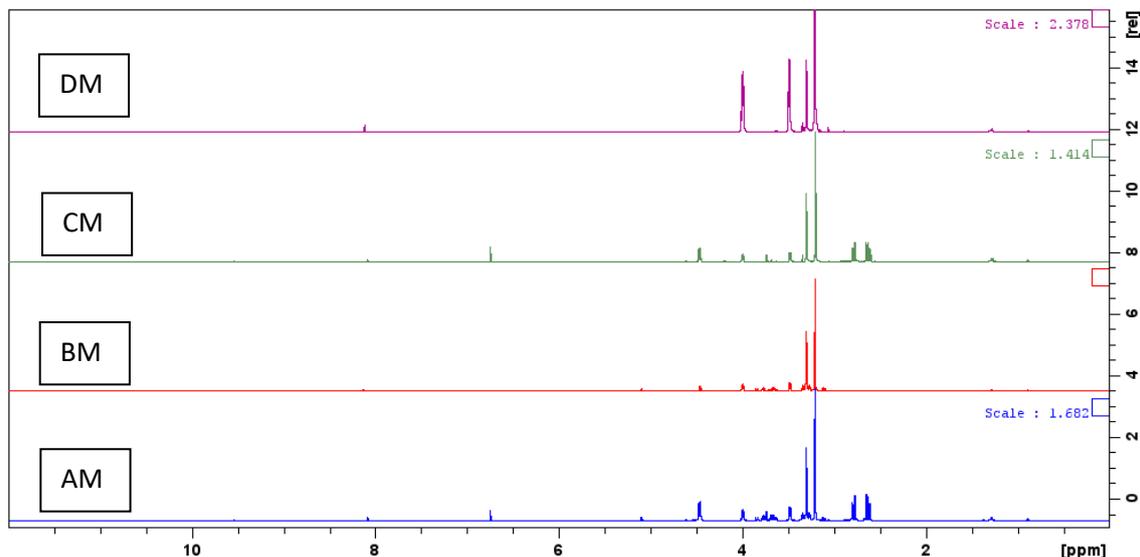
Figura 9 - Rendimento extratos eutéticos após SPE

*AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde. Fonte: o autor, 2024

Em seu estudo Silva e Mourão (2022) obteve resultados de rendimento semelhantes em seus extratos glicólicos (58% e 34%) e o rendimento de 70% em seu extrato hidroalcolico. A variação nos rendimentos pode ser explicada por fatores como a composição química das amostras, a interação entre os componentes e os solventes eutéticos, além de possíveis diferenças no ponto eutético das misturas. As barras de erro sugerem que há uma variação específica em algumas amostras, especialmente em DM e HV, diminuindo a necessidade de otimização das condições experimentais.

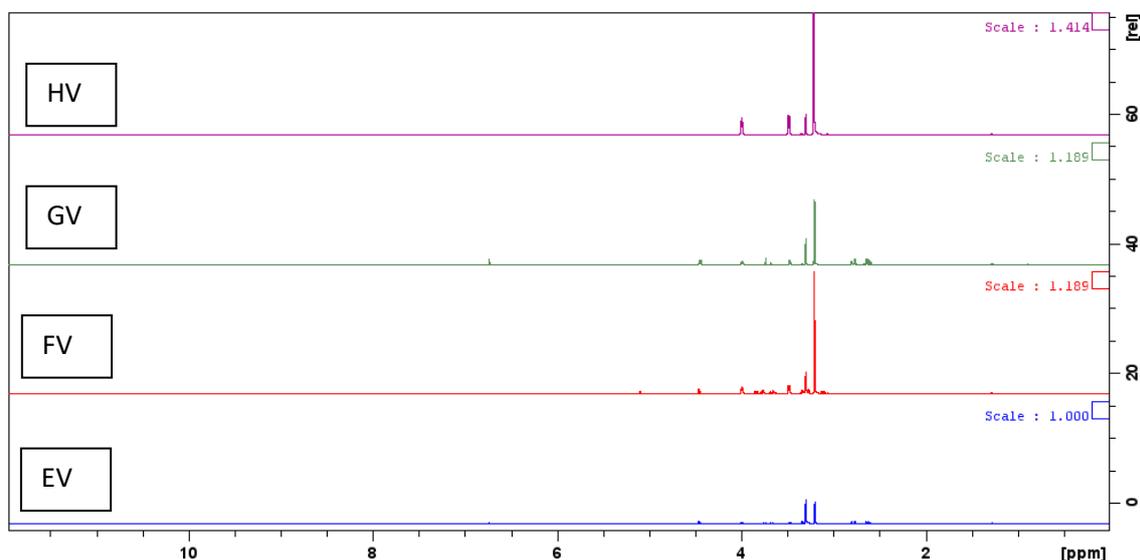
5.4.2 Identificação dos compostos obtidos no extrato eutético

Figura 10 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) das amostras AM, BM, CM e DM



Fonte: o autor, 2024

Figura 11 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) das amostras EV, FV, GV e HV

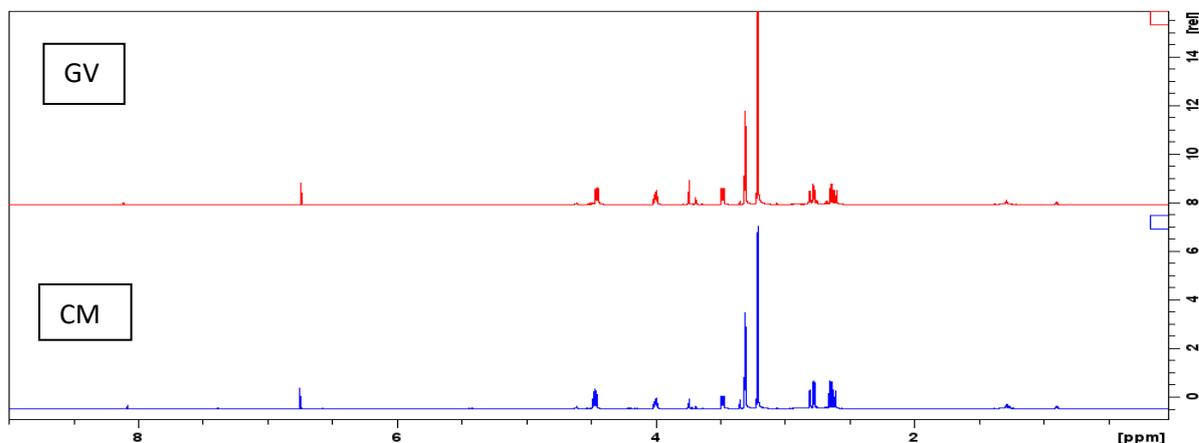


Fonte: o autor, 2024

Após a análise do RMN ^1H , foram escolhidas duas amostras para a aplicação de experimentos de RMN bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), foram realizados para fundamentar a identidade dos compostos, juntamente com as comparações dos dados obtidos com os bancos de dados online e artigos da literatura. As amostras escolhidas foram as amostras CM e GV (Figuras 10 e 11),

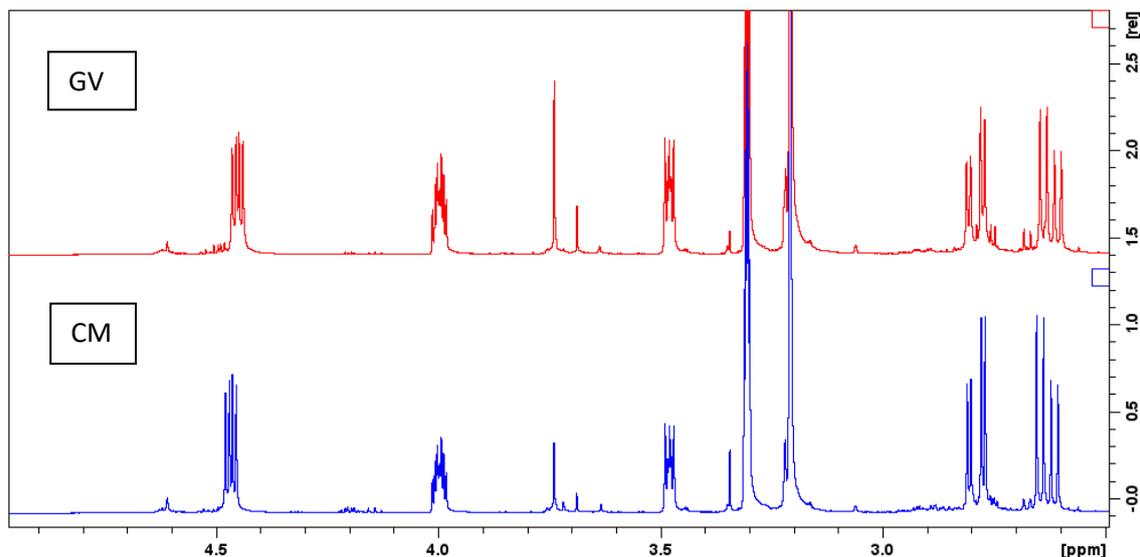
pois apresentaram os sinais de maiores intensidades. As Figuras 12 e 13 são as representações das amostras a serem analisadas através da ampliação dos espectros. Para a determinação das estruturas químicas dos compostos extraídos foram levadas em consideração as análises contidas nas Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Para cada uma das amostras foram analisados o mapa de correlações homonuclear COSY (500 MHz, MeOD), o mapa de correlações heteronuclear (HSQC) e o mapa de correlações heteronuclear (HMBC).

Figura 12 - Melhores espectros de RMN de ^1H , amostras CM e GV



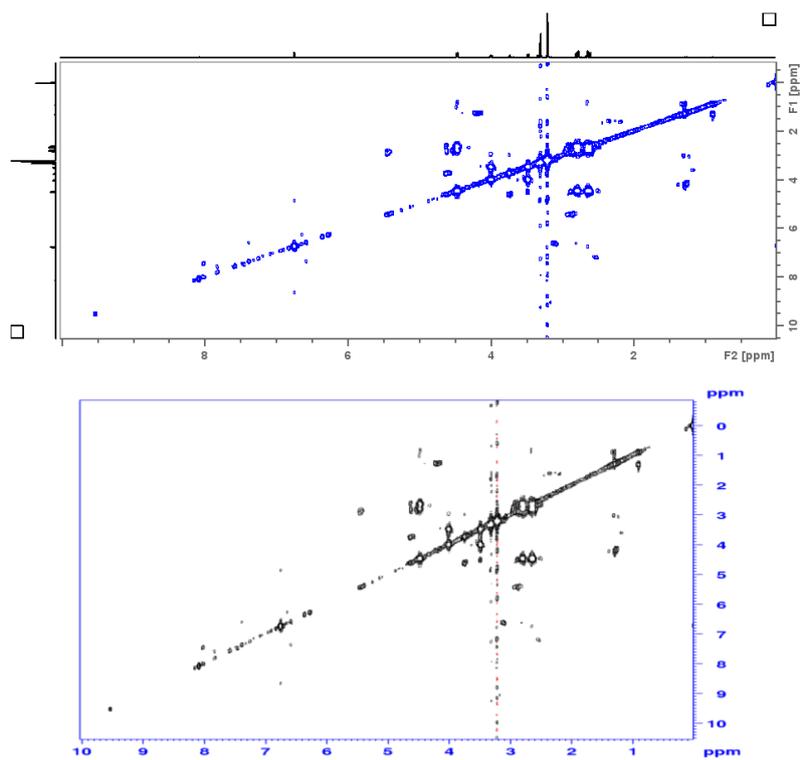
Fonte: o autor, 2024

Figura 13 – Zoom nos espectros de RMN de ^1H , amostras CM e GV



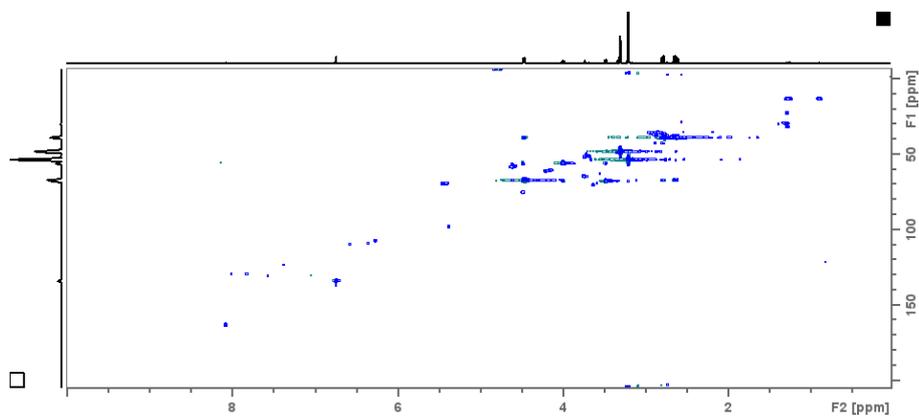
Fonte: o autor, 2024

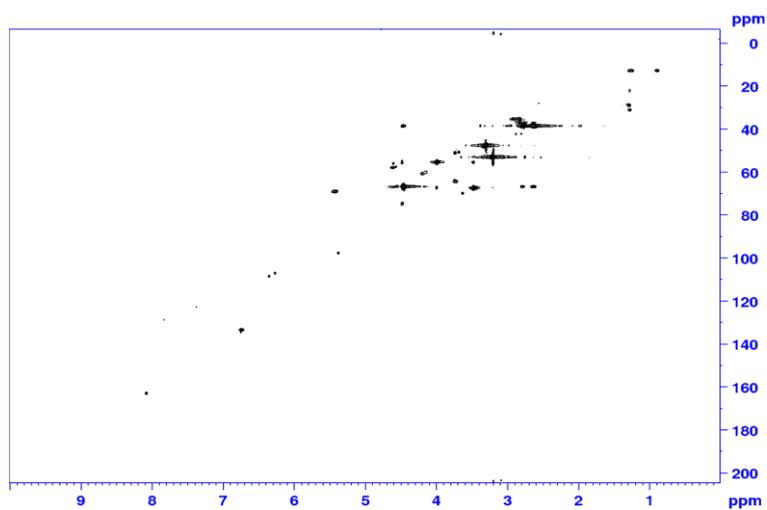
Figura 14 - Mapa de correlações homonuclear COSY (500 MHz, MeOD) da amostra CM



Fonte: o autor, 2024

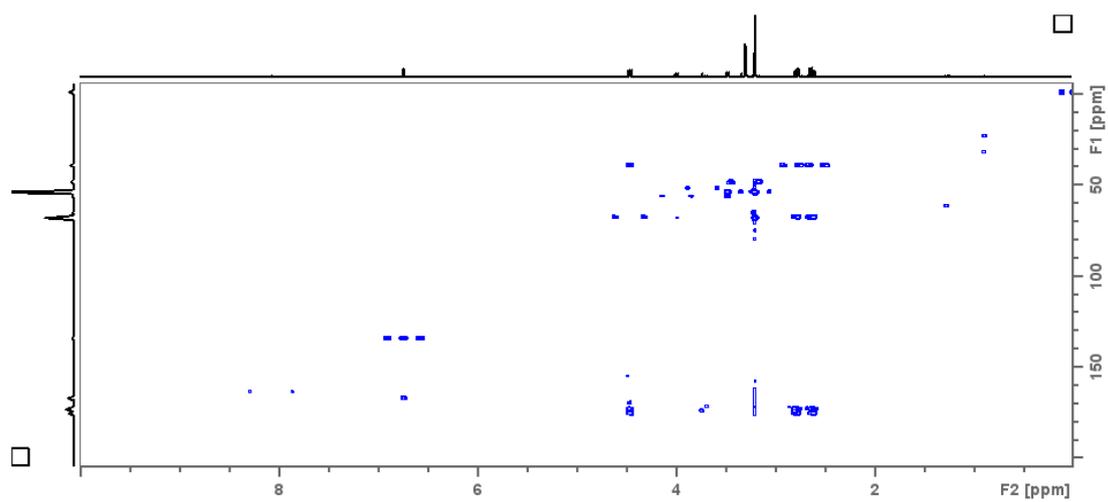
Figura 15 - Mapa de correlações heteronuclear (HSQC) da amostra CM

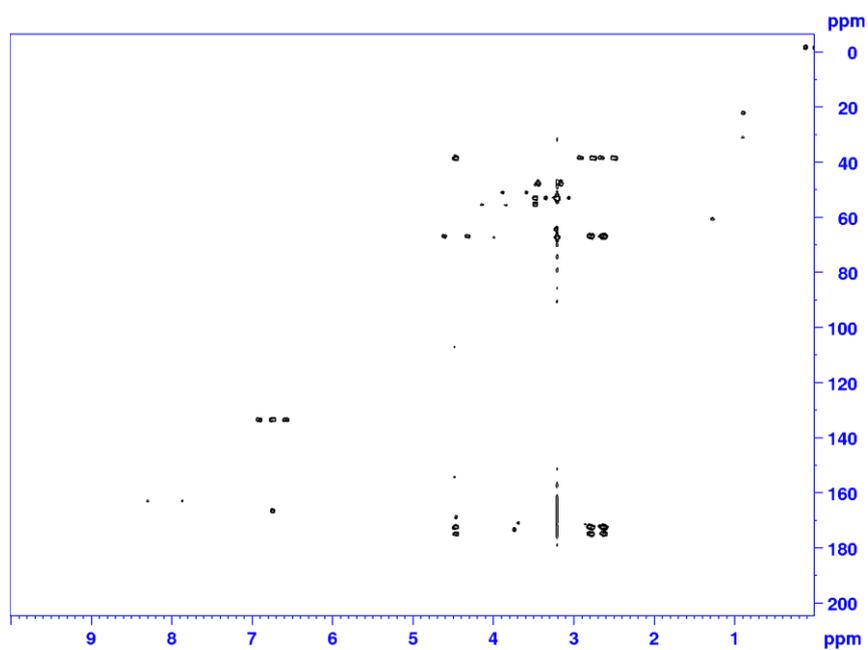




Fonte: o autor, 2024

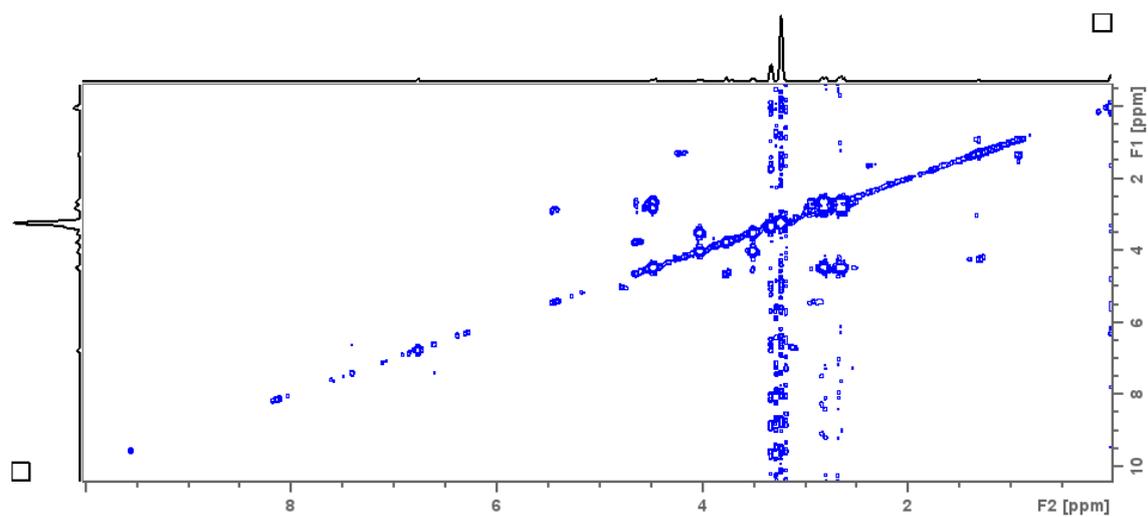
Figura 16 - Mapa de correlações heteronuclear (HMBC) da amostra CM

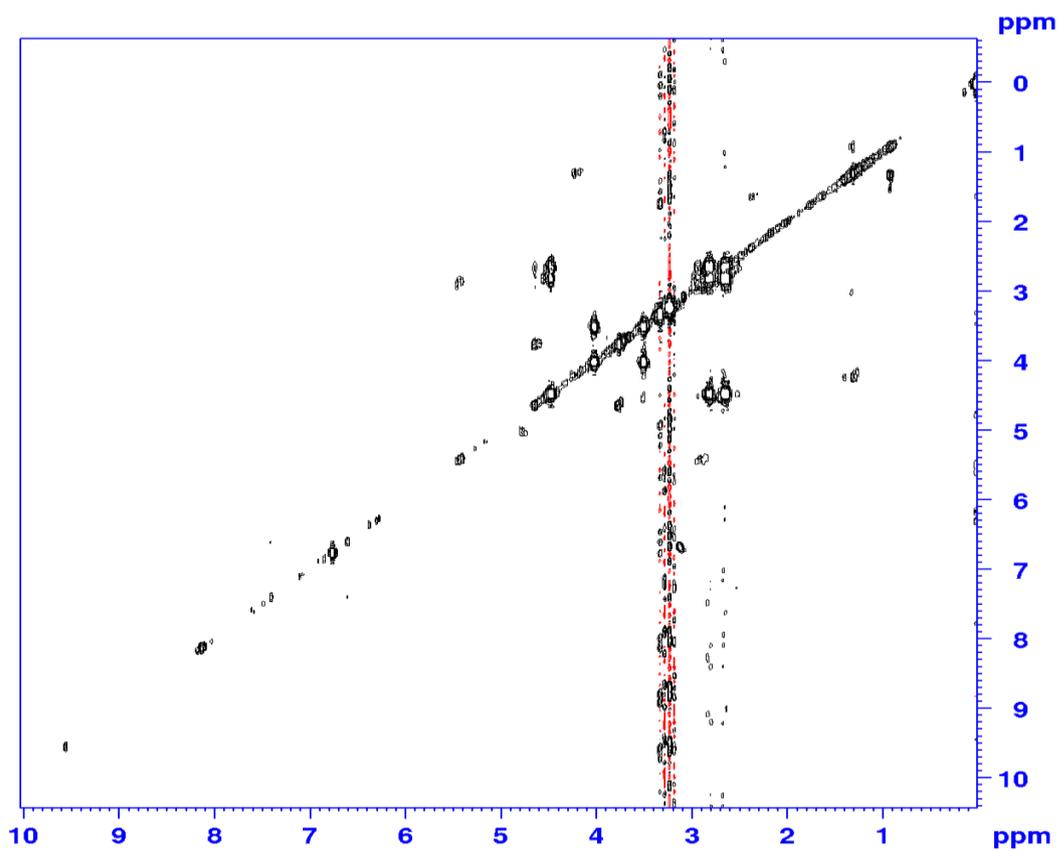




Fonte: o autor, 2024

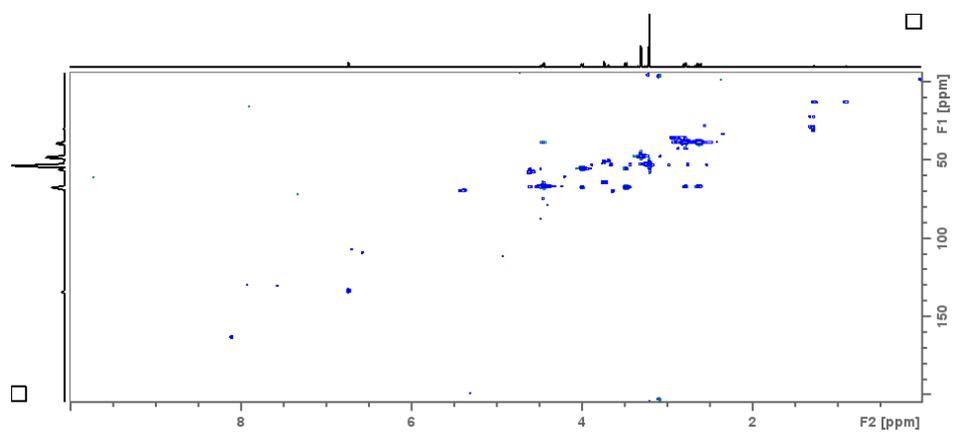
Figura 17 - Mapa de correlações homonuclear COSY (500 MHz, MeOD) da amostra GV

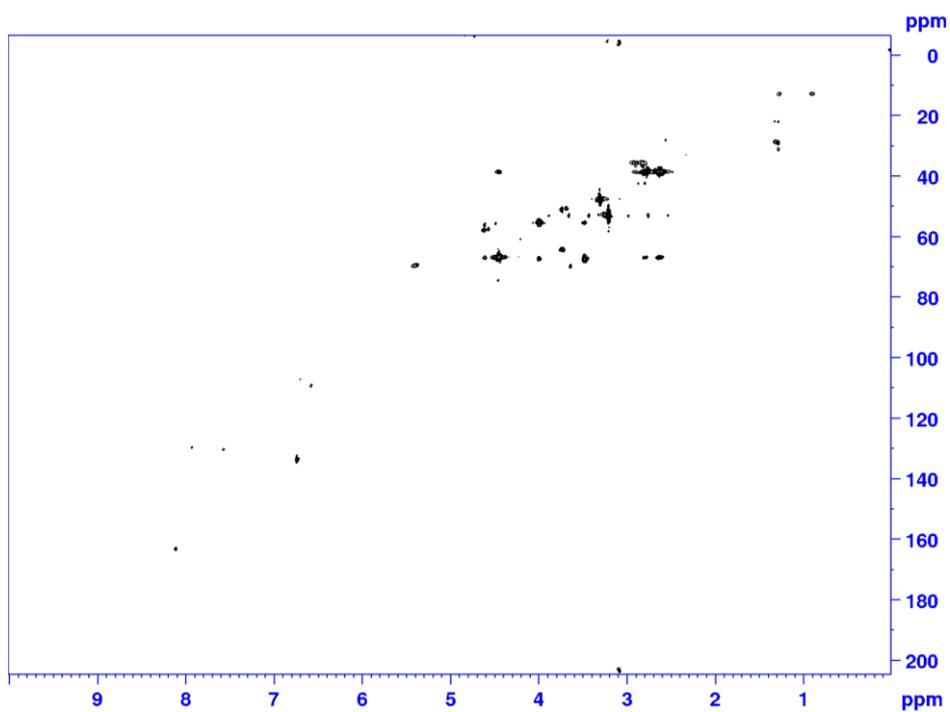




Fonte: o autor, 2024

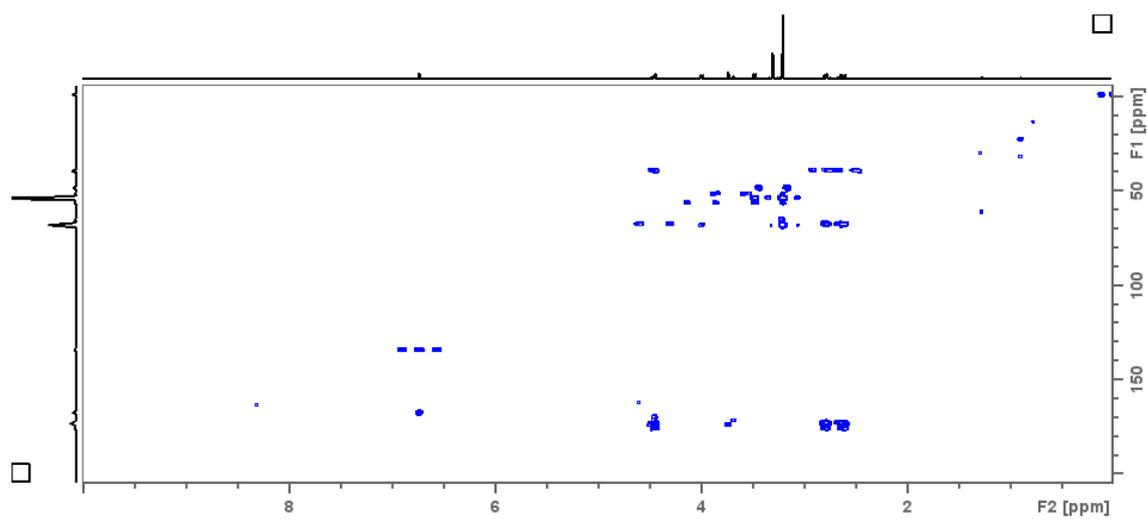
Figura 18 - Mapa de correlações heteronuclear (HSQC) da amostra GV

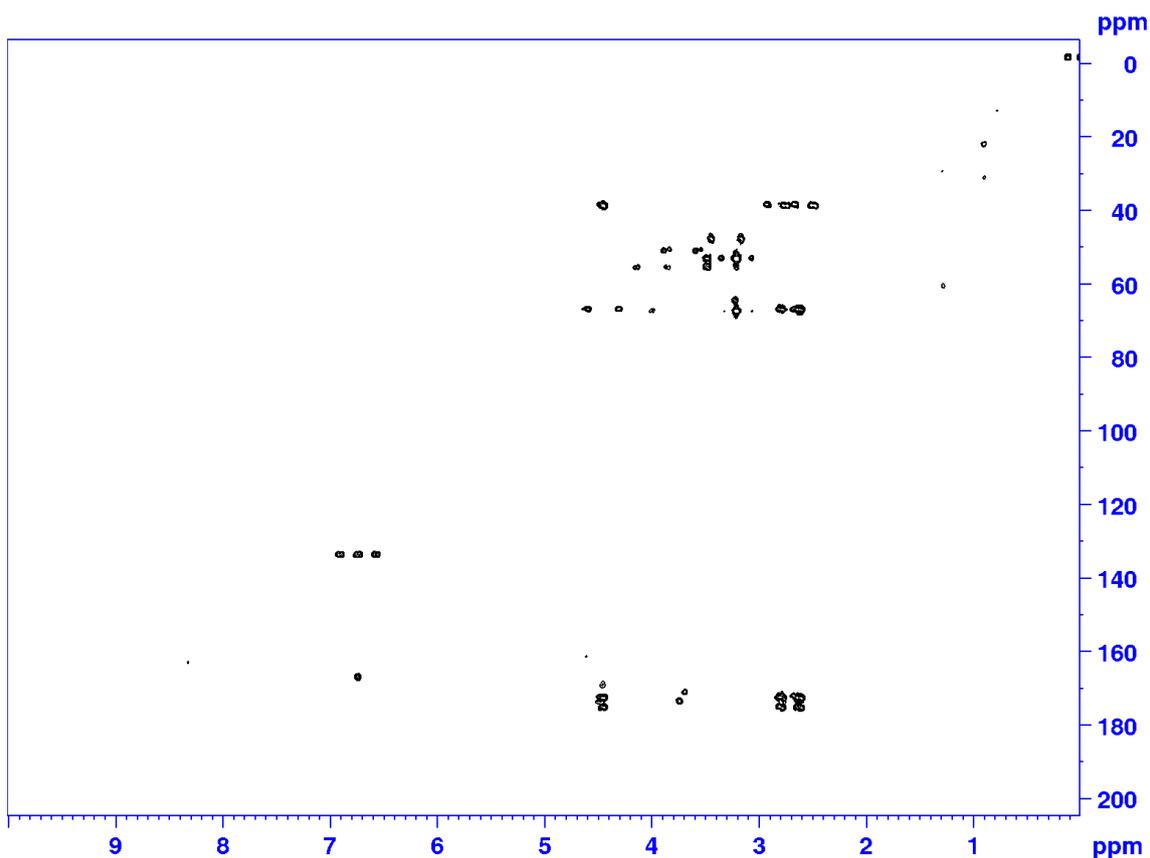




Fonte: o autor, 2024

Figura 19 - Mapa de correlações heteronuclear (HMBC) da amostra GV





Fonte: o autor, 2024

Ambos os espectros analisados nos experimentos de RMN 2D apresentaram as o mesmo perfil químico, entretanto, foi possível identificar que a amostra C possuía maior intensidade nos sinais. Portanto, a análise de metabólitos foi realizada com base nos espectros obtidos a partir da amostra C. Dessa maneira, demonstrando ser a melhor amostras dentre as demais após a extração, devido a intensidade desses metabólitos.

Tabela 9 - Metabólitos identificados nos experimentos de RMN de ^1H após confirmação por meio dos experimentos 2D

| N | ppm | multiplicidade | J(Hz) | Substância |
|---|------|----------------|---------|---------------------------------|
| 1 | 0,9 | (t) | 7 Hz | Isoleucina |
| 2 | 1,17 | (t) | 7.18 Hz | Etanol |
| 3 | 1,27 | (s) | - | Valina |
| 4 | 1,28 | (d) | 7 Hz | Isoleucina |
| 5 | 1,98 | (s) | N/D | Ácido acético |
| 5 | 2,16 | (s) | - | Ácido piruvico |
| 6 | 2,34 | (t) | 7.4 Hz | Gaba (Ácido gama-aminobutírico) |
| 7 | 2,56 | (s) | - | Ácido succínico |
| 8 | 2,61 | (d) | 8.0 Hz | Ácido málico |
| 8 | 2,64 | (d) | 8.0 Hz | |

| | | | | |
|----|------|------|-------------|------------------------|
| 8 | 2,77 | (d) | 4.5 Hz | |
| 8 | 2,8 | (d) | 4.5 Hz | |
| 9 | 2,88 | (d) | 5.7 Hz | Asparagina |
| 9 | 2,92 | (t) | 3.8 Hz | Asparagina |
| 10 | 3,2 | (s) | N/D | Cloreto de colina |
| 10 | 3,48 | (t) | 5.0 Hz | Cloreto de colina |
| 11 | 3,68 | (s) | N/D | Ácido metil elágico |
| 10 | 3,99 | (m) | N/D | Cloreto de colina |
| 12 | 4,15 | (d) | 7.0 Hz | Frutose |
| 13 | 4,2 | (dd) | 2.90/4.0 Hz | Ácido dehidroascorbico |
| 8 | 4,46 | (q) | N/D | Ácido málico |
| 12 | 5,43 | (m) | N/D | Frutose |
| 14 | 6,27 | (d) | 3.5 Hz | Miricetina |
| 14 | 6,35 | (d) | 3.25 Hz | Miricetina |
| 15 | 6,74 | (s) | N/D | Ácido gálico |
| 16 | 7,25 | (dd) | N/D | Quercetina |
| 17 | 7,38 | (d) | 4 Hz | Delfinidina |
| 17 | 7,58 | (s) | - | Delfinidina |

Fonte: o autor, 2024

Os metabólitos identificados nos experimentos de RMN de ^1H , confirmados por meio de experimentos bidimensionais (2D), destacando a diversidade e a natureza das substâncias encontradas no extrato obtido a partir do solvente eutético.

Os compostos identificados incluem aminoácidos (como isoleucina e asparagina), ácidos orgânicos (como ácido acético, succínico, málico e gálico), bem como outros metabólitos importantes como ácido metil elágico e flavonoides como miricetina e quercetina (Tabela 10).

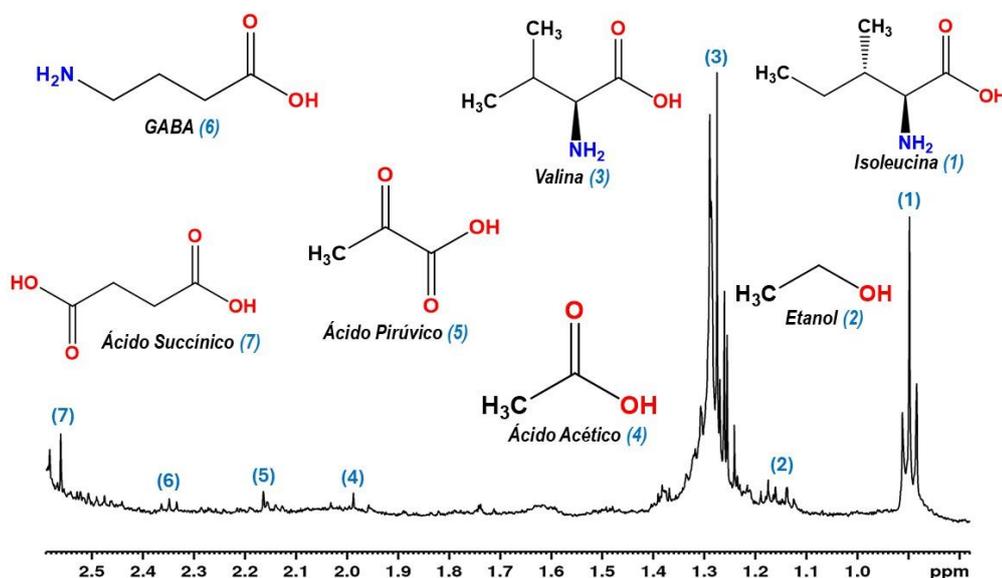
Esses resultados sugerem que o solvente eutético utilizado no estudo foi eficaz na extração de uma ampla gama de compostos bioativos, cada um com potenciais propriedades biológicas e químicas distintas. A presença de ácidos, em particular o ácido málico, em várias formas isoméricas, pode indicar a capacidade do solvente de preservar diferentes conformações moleculares. A identificação de flavonoides como a miricetina e a quercetina também aponta para o potencial antioxidante dos extratos, algo que poderia ser correlacionado com os resultados das análises antioxidantes realizadas no estudo (MORAES *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2007).

Além disso, a presença de compostos como a delfinidina, que é uma antocianina, reforça a possível atividade antioxidante e os benefícios à saúde associados ao consumo de extratos obtidos a partir de solventes eutéticos. Assim, a diversidade de metabólitos identificados não só sublinha a eficácia do

solvente eutético na extração de compostos variados, mas também abre caminho para futuras investigações sobre as propriedades específicas de cada composto e seus potenciais aplicações industriais e farmacêuticas (PIRES *et al.*, 2023; SILVA, N. M. DA *et al.*, 2022; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

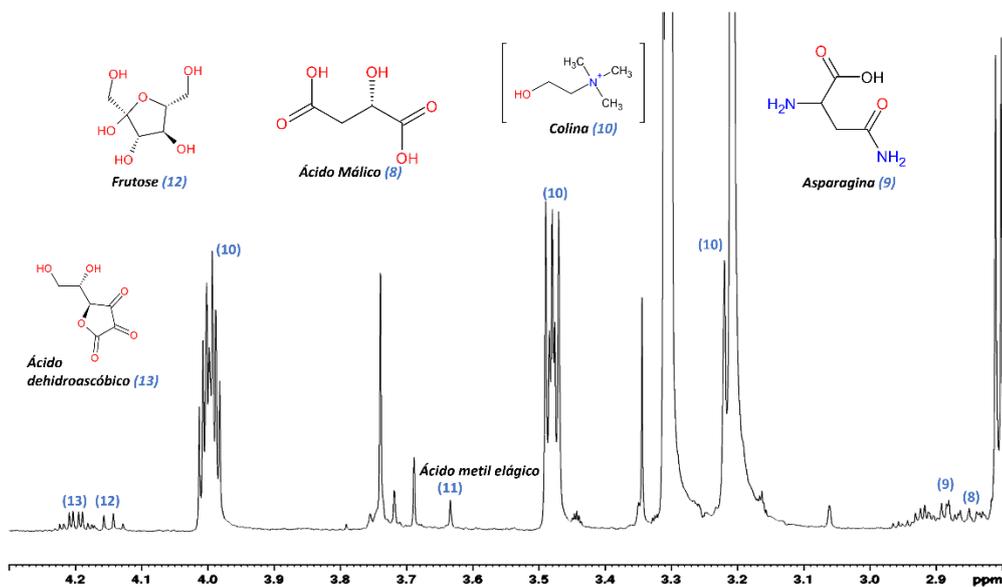
Esse conjunto de dados pode ser particularmente útil em aplicações que vão desde a formulação de suplementos alimentares até o desenvolvimento de produtos cosméticos e farmacêuticos, onde a atividade biológica dos compostos é um fator crucial.

Figura 20 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 0,09 -2,60 referentes as moléculas de 1 a 7



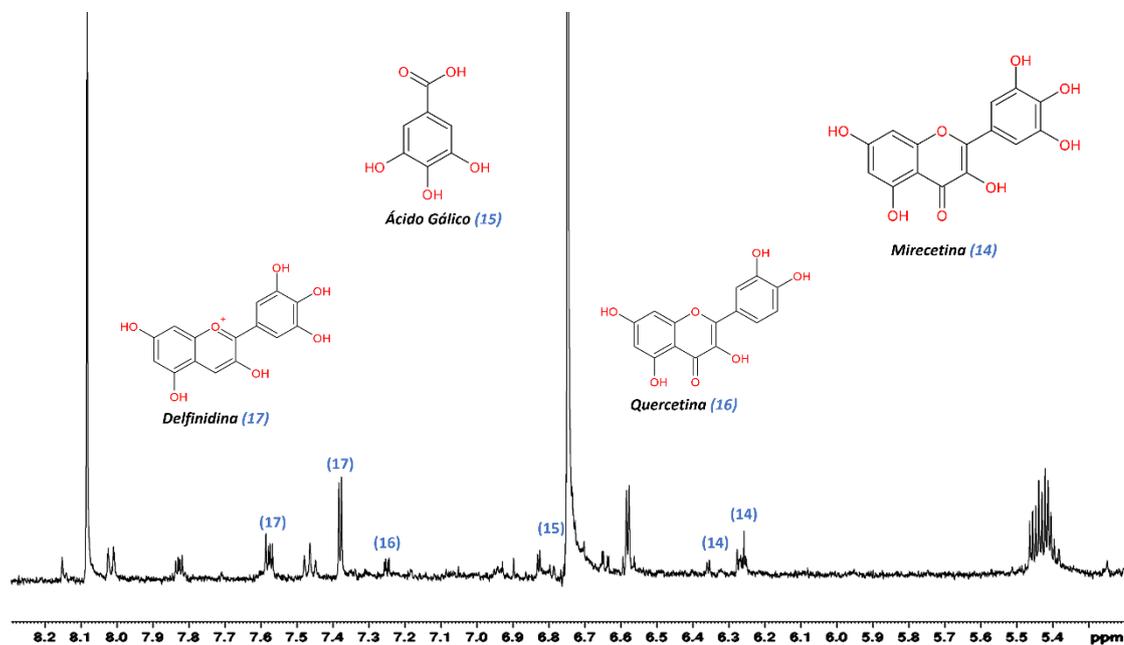
Fonte: o autor, 2024

Figura 21 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 2,8 – 4,2 referentes as moléculas de 8 a 13



Fonte: o autor, 2024

Figura 22 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD da região δ 5,4 - 8,2 referentes as moléculas de 14 a 17



Fonte: o autor, 2024

As duas figuras apresentam espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de prótons (^1H), obtidos em 500 MHz com MeOD (metanol deuterado) como solvente, ampliando regiões específicas de carcaça química (δ). A Figura

20 foca na região entre δ 0,09 e 2,60 ppm, onde são identificados contatos simples com sinais de grupos específicos, principalmente alquilas (CH_3 , CH_2), carbonilas e aminas. Os produtos apresentados incluem o etanol (com sinais em torno de δ 1,1 ppm para o grupo CH_3), a isoleucina (com sinais na faixa de δ 0,9 a 1,6 ppm), a valina (com grupos metil em δ 0,9 e δ 2,0 ppm), o ácido acético (pico em δ 2,1 ppm para o grupo CH_3), o ácido pirúvico (δ 2,2 a 2,3 ppm), o GABA (ácido gama-aminobutírico) com sinais espalhados entre δ 1,9 e 2,2 ppm, e o ácido succínico (em torno de δ 2,4 ppm). Esses tipos são característicos de ambientes simples, com hidrogênios próximos a grupos funcionais como carbonilas e aminas.

A Figura 21 amplia a região de δ 2,8 a 4,2 ppm, onde se observam moléculas com grupos funcionais mais complexos. Nessa faixa, identificam-se o ácido málico, com sinais em δ 3,2 a 3,4 ppm, a asparagina (com sinais na faixa de δ 2,8 a 3,0 ppm), a colina (com um triplo em δ 3,2 ppm), o ácido metilmalônico (em δ 3,5 a 3,6 ppm), a frutose (com vários sinais entre δ 3,5 e 4,0 ppm), e o ácido dihidroxialdípico, com sinais em δ 4,0 ppm. Essas composições apresentam proteínas ligadas a átomos mais eletronegativos, como oxigênio, resultando em substituições químicas maiores e evidenciando uma maior complexidade estrutural, incluindo açúcares e ácidos orgânicos.

A Figura 22 apresenta a ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em MeOD, focando na região de deslocamento químico entre δ 5,4 e 8,2 ppm, uma área onde normalmente são observados sinais de hidrogênios aromáticos e vinílicos. Neste intervalo, são destacadas quatro moléculas principais: miricetina (14), quercetina (16), ácido gálico (15) e delphinidina (17), alguns sinais específicos estão marcados no espectro. A miricetina (14) apresenta picos entre δ 6,2 e 6,4 ppm, atribuídos à prótons de duplas ligações conjugadas e ao anel aromático. A quercetina (16), por sua vez, tem sinais localizados ao redor de δ 6,8 a 7,0 ppm, devido aos prótons aromáticos e enólicos presentes em sua estrutura de flavonóide. O ácido gálico (15) apresenta picos entre δ 7,0 e 7,2 ppm, consistentes com os prótons aromáticos típicos de compostos fenólicos. Já a delphinidina (17), uma antocianina, apresenta seus sinais entre δ 7,4 e 7,6 ppm, relacionados aos prótons do anel aromático e aos hidrogênios vinílicos.

A análise dessa região é importante porque esses compostos são conhecidos por suas atividades biológicas, como antioxidantes e anti-

inflamatórias, o que destaca a relevância da caracterização dessas moléculas. As integrações e os padrões de observação no espectro confirmam a presença de prótons aromáticos e vinílicos bem resolvidos, facilitando a identificação estrutural.

As antocianinas podem interromper as reações em cadeia oxidativas ao neutralizar radicais livres, ajudando a diminuir o estresse oxidativo. Esses compostos naturais são reconhecidos por sua forte ação antioxidante, em grande parte devido à sua estrutura química única, que permite aceitar elétrons desemparelhados, como as espécies das reativas de oxigênio e toxicidade, e assim mitigar o estresse oxidativo (WANG, J.; XIE; SUN, 2021; XIE *et al.*, 2018).

Assim como outras “superfrutas”, a jaboticaba demonstra uma potente capacidade antioxidante *in vitro*, conforme os métodos DPPH e ABTS. Em um estudo que investigou o efeito da ingestão de extrato liofilizado das cascas de *Myrciaria jaboticaba* na atividade antioxidante plasmática de ratos, os resultados mostraram um aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma, com um incremento de 1,7 vezes pelo método TEAC e 1,3 vezes pelo método ORAC. Antocianinas como cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo parecem ser as principais responsáveis por esse efeito (WU; LONG; KENNELLY, 2013).

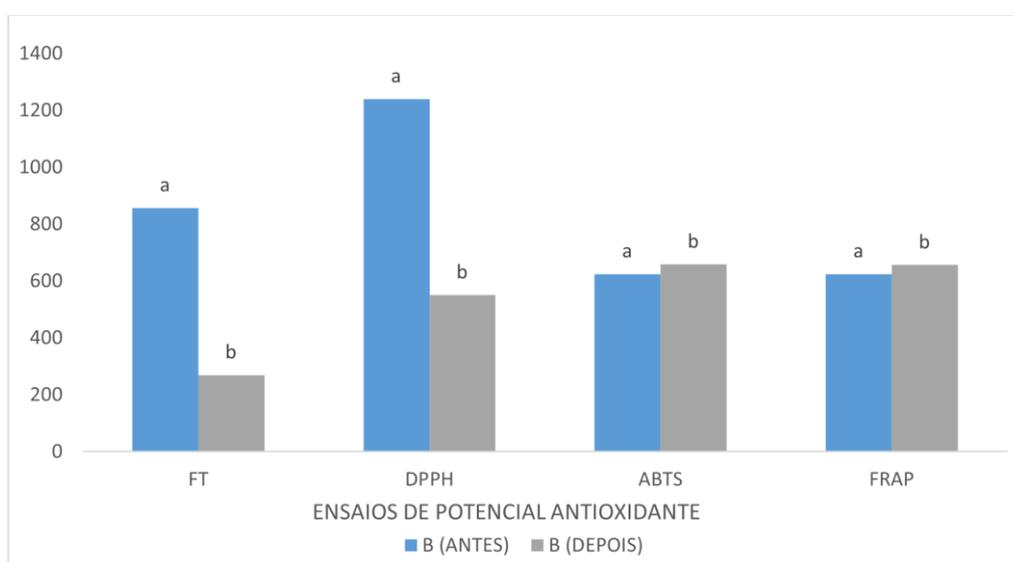
O potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plinia trunciflora* foi avaliado utilizando os métodos FRAP e DPPH. Os resultados demonstraram uma elevada atividade antioxidante, atribuída principalmente à presença de cianidina e cianidina-3-O-glicosídeo (SACCHET *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos são comumente encontrados associados à parede celular, ligados a componentes como pectina, celulose, hemicelulose e lignina. O processamento por ultrassom (US) pode aumentar as taxas de transferência de massa e gerar microcavidades que rompem a parede celular, liberando o conteúdo antioxidante. Além disso, o aumento da potência durante o processo de cavitação intensifica a degradação da parede celular, resultando na geração de radicais hidroxila. Esses radicais desempenham um papel crucial na hidroxilação do anel aromático dos compostos fenólicos nas posições *orto*, *meta* e *para* (DA PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013; ORDÓÑEZ-SANTOS; MARTÍNEZ-GIRÓN; ARIAS-JARAMILLO, 2017).

O uso de MeOD como solvente é protetor, pois dissolve compostos orgânicos polares e evita interferências no espectro, já que picos de prótons trocáveis, como os das hidroxilas, são suprimidos. Dessa forma, o RMN mostra uma técnica eficaz para a caracterização de compostos fenólicos e flavonoides, fornecendo informações estruturais projetadas sobre as moléculas presentes na amostra.

5.5 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE

Figura 23 - Comparação de resultados de potencial antioxidante após digestibilidade da amostra BM



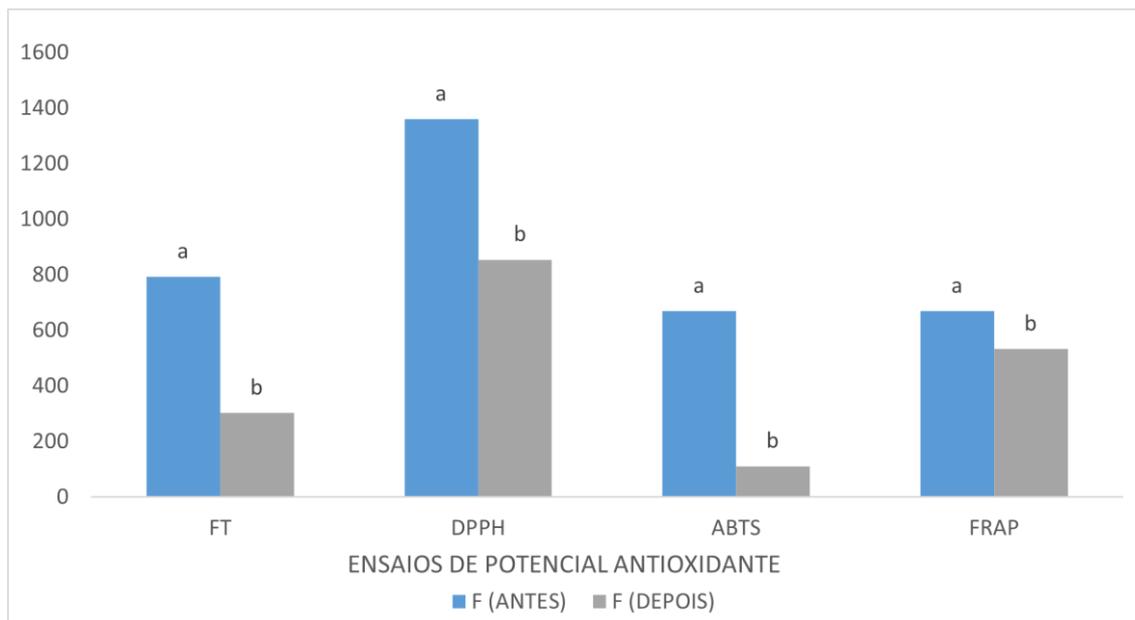
*Médias com a mesma letra no mesmo teste não são significativamente diferentes de acordo com o Teste de Tukey (valor de $p > 0,05$). Fonte: o autor, 2024.

A redução no potencial antioxidante após a digestão (Figura 23), observada nos métodos FT e DPPH, pode estar relacionada à quebra ou modificação de compostos antioxidantes durante o processo de digestão, o que diminui sua capacidade de neutralizar radicais livres ou reduzir íons. No entanto, os ensaios ABTS e FRAP apresentam uma menor variação, o que pode sugerir que alguns antioxidantes presentes na amostra BM são mais estáveis em condições digestivas.

Além disso, a indicação de médias com a mesma letra não sendo significativamente diferentes de acordo com o Teste de Tukey ($p > 0,05$) reforça que algumas dessas variações podem não ser estatisticamente significativas, especialmente entre os ensaios de ABTS e FRAP.

Esses resultados mostram a importância de avaliar a estabilidade dos compostos antioxidantes durante o processo digestivo, pois sua eficácia pode ser comprometida após a ingestão (MOSELE *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2023; SESSA *et al.*, 2011).

Figura 24 - Comparação de resultados de potencial antioxidante após digestibilidade da amostra FV



*Médias com a mesma letra no mesmo teste não são significativamente diferentes de acordo com o Teste de Tukey (valor de $p > 0,05$). Fonte: o autor, 2024.

O gráfico apresentado na Figura 24 compara os resultados de quatro ensaios de potencial antioxidante (FT, DPPH, ABTS e FRAP) da amostra F antes e depois do processo de digestibilidade. O ensaio FT (fenóis totais) mostra que o potencial antioxidante da amostra F antes da digestão é maior do que após, com uma diferença significativa, como indicado pelas letras "a" e "b". No ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), observa-se o maior valor antioxidante entre os quatro testes antes da digestibilidade, seguido de uma grande redução após o processo, também com diferença estatisticamente relevante.

O ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)) segue uma tendência semelhante, apresentando um maior potencial antioxidante antes da digestão e uma diminuição posterior. Já no ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), os resultados mostram que, assim como nos outros testes,

o valor do potencial antioxidante é maior antes do processo digestivo, com uma diferença significativa em relação ao valor após a digestibilidade.

As letras "a" e "b" indicam que os valores para cada ensaio, antes e depois do processo digestivo, são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey, que utiliza um valor de $p > 0,05$ para determinar essa diferença. Assim, é possível evidenciar uma diminuição consistente do potencial antioxidante da amostra F após o processo de digestibilidade em todos os ensaios realizados.

A diminuição do potencial antioxidante da amostra F após a digestibilidade, como observado no gráfico, indica que o processo digestivo afeta a capacidade antioxidante do composto. Os antioxidantes são substâncias que ajudam a neutralizar os radicais livres, moléculas instáveis que podem causar danos celulares e estão associadas ao envelhecimento e a várias doenças, como câncer e problemas cardiovasculares (RODRIGUES; SANTOS, 2018).

Esse resultado pode significar que, embora a amostra F tenha um alto potencial antioxidante "*in vitro*" (antes da digestão), sua eficácia antioxidante pode ser reduzida quando submetida às condições do trato digestivo humano. Em outras palavras, os compostos antioxidantes presentes na amostra podem ser degradados ou alterados durante a digestão, o que reduz sua capacidade de combater os radicais livres depois que os nutrientes são absorvidos pelo organismo (NOVAES *et al.*, 2013).

Esse tipo de análise é importante porque, ao avaliar o potencial antioxidante de alimentos ou suplementos, é fundamental considerar como esses compostos se comportam após a ingestão e a digestão. Mesmo que um alimento ou substância tenha uma alta capacidade antioxidante em laboratório, sua eficácia real no corpo humano pode ser menor se os compostos antioxidantes forem degradados ou não absorvidos de forma eficiente.

Assim, os resultados sugerem que o impacto do processo digestivo precisa ser levado em conta ao avaliar os benefícios antioxidantes da amostra F, e indicam que a biodisponibilidade e a estabilidade dos compostos antioxidantes em condições fisiológicas reais podem ser limitados.

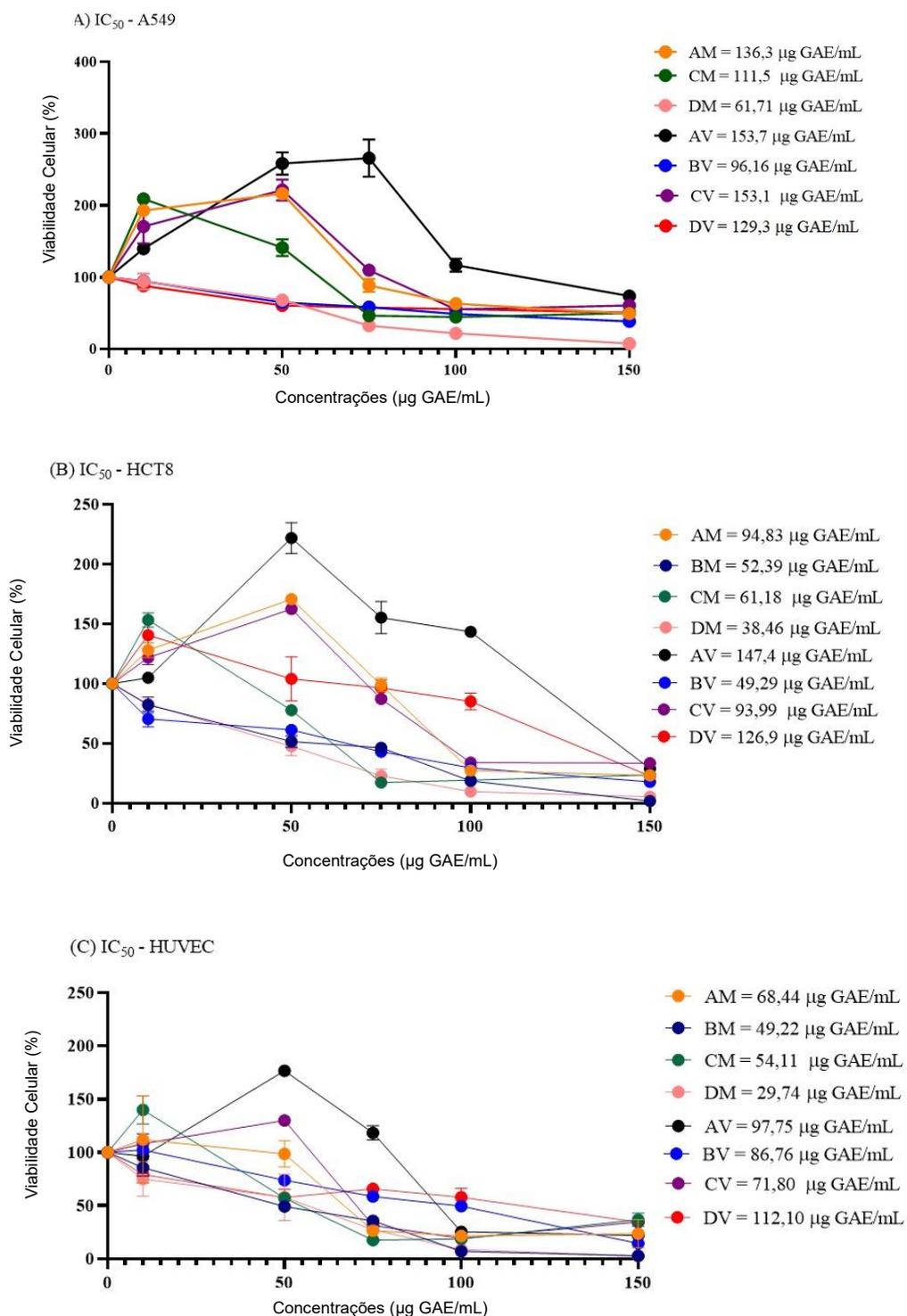
5.6 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO EUTÉTICOS DE CAMU-CAMU

O National Cancer Institute (NCI) categorizou os compostos citotóxicos da seguinte forma (Geran, 1972): altamente ativos quando $CI_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, moderadamente ativos quando CI_{50} varia de 21 a 200 $\mu\text{g/mL}$, fracamente ativos quando IC_{50} está entre 201 e 500 $\mu\text{g/mL}$, e inativo quando IC_{50} excede 501 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, com os dados de IC_{50} analisados das três linhagens celulares utilizadas, concluímos que todas as amostras são classificadas como moderadas, pois os resultados variaram entre 21-200 $\mu\text{g/mL}$.

Além disso, foi calculado o valor SI, que indica a seletividade da amostra para as linhagens celulares testadas. Quando a amostra apresenta valor de SI superior a 3, considera-se que possui alta seletividade, sugerindo que a substância é mais eficaz contra células cancerígenas, com menos efeitos adversos nas células saudáveis. De acordo com a Tabela 11, os extratos de camu-camu apresentaram índice de seletividade inferior a 3 em suas linhagens celulares cancerígenas (A549 e HCT8). Portanto, os extratos não apresentaram alta seletividade.

Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) compostos de cloreto de colina, glicose e ácido málico demonstram baixa citotoxicidade, tornando-os praticamente inofensivos e seguros para diversas aplicações. Ao contrário dos NADES que contêm ácidos orgânicos mais fortes, como o ácido malônico, que tendem a apresentar maior citotoxicidade, a combinação de glicose e ácido málico nos NADES resulta em um perfil mais seguro. Além disso, esses NADES não apenas preservam sua atividade antioxidante, mas também são ideais para usos que requerem solventes de baixa toxicidade e eficácia na extração verde de compostos bioativos. Esse perfil de segurança e funcionalidade amplia suas aplicações em setores que exigem soluções sustentáveis e não tóxicas, como a indústria de alimentos e cosméticos (HAYYAN, M. *et al.*, 2016; KOH *et al.*, 2023; PANIĆ *et al.*, 2019; WIKENE *et al.*, 2017).

Figura 25 - Citotoxicidade de amostras de extrato de camu-camu em linhagens celulares A549, HCT8 e HUVEC



* AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde. Fonte: o autor, 2024

Tabela 10 - Índice de seletividade de extratos de camu-camu

| AMOSTRA | A549 | HCT8 |
|---------|------|------|
| AM | 0,50 | 0,72 |
| BM | - | 0,94 |
| CM | 0,49 | 0,88 |
| DM | 0,48 | 0,77 |
| AV | 0,64 | 0,66 |
| BV | 0,90 | 1,76 |
| CV | 0,47 | 0,76 |
| DV | 0,87 | 0,88 |

AM: eutético (CC:AM:G:W) fruta madura; BM: eutético (CC:G:W) fruta madura; CM: eutético (CC:AM:W) fruta madura; DM: eutético (CC:W) fruta madura; EV: eutético (CC:AM:G:W) fruta verde; FV: eutético (CC:G:W) fruta verde; GV: eutético (CC:AM:W) fruta verde; HV: eutético (CC:W) fruta verde. Fonte: o autor, 2024

5.7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Os resultados deste trabalho abrem caminho para uma série de estudos futuros que podem aprofundar a compreensão e a aplicação dos extratos de camu-camu obtidos por meio de solventes eutéticos profundos naturais (NADES). Entre as direções a serem exploradas, destacam-se as questões econômicas, a análise da composição volátil dos extratos e a otimização dos métodos de extração.

Uma área importante para o futuro da pesquisa é a análise econômica da produção de extratos de camu-camu. Estudar a viabilidade econômica da implementação de NADES na indústria de extratos naturais pode revelar oportunidades para o desenvolvimento sustentável da região amazônica. Isso inclui avaliar o custo-benefício da utilização de NADES em comparação com métodos tradicionais, que frequentemente dependem de solventes tóxicos e podem gerar resíduos químicos. Além disso, considerar o impacto econômico que a valorização do camu-camu pode ter nas comunidades locais, promovendo cadeias produtivas sustentáveis e aumentando a renda dos pequenos produtores, é essencial para o desenvolvimento socioeconômico da região.

Outro aspecto que merece atenção é a análise das frações voláteis do extrato de camu-camu, especialmente considerando que o extrato obtido

apresentou um aroma característico. Estudos de microextração em fase sólida (SPME) podem ser aplicados para identificar e caracterizar os compostos aromáticos presentes no extrato, permitindo uma melhor compreensão de suas propriedades sensoriais. Essa análise pode abrir possibilidades para a utilização do extrato em indústrias de alimentos e cosméticos, onde o aroma é um fator crucial na aceitação do produto. Além disso, a identificação de compostos aromáticos pode levar à exploração do camu-camu em aplicações de saborizantes naturais e ingredientes funcionais em produtos alimentícios.

Por fim, a otimização dos métodos de extração utilizando NADES é uma área promissora para pesquisa futura. A investigação de diferentes proporções e combinações de solventes, bem como a adaptação das condições de extração, como temperatura e tempo, pode resultar em uma maior eficiência na recuperação de compostos bioativos. Estudos que busquem aprimorar os parâmetros de extração poderão maximizar o rendimento e a atividade antioxidante dos extratos, potencializando suas aplicações em nutracêuticos e alimentos funcionais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de NADES representa uma alternativa promissora e sustentável para a extração de compostos bioativos do camu-camu. Os extratos obtidos apresentaram propriedades antioxidantes significativas, com potencial aplicação na indústria de alimentos e nutracêuticos. No entanto, a digestibilidade afeta a estabilidade de alguns antioxidantes, o que destaca a importância de mais estudos para entender melhor a biodisponibilidade desses compostos no corpo humano. Além disso, este trabalho contribui para a valorização de recursos naturais da Amazônia, promovendo métodos de extração ecologicamente corretos e economicamente viáveis.

REFERÊNCIAS

- ADRIANA ESTRELLA, G.-R. *et al.* Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 280, p. 114462, nov. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874121006917>>.
- AKLI, H. *et al.* Extraction of Polyphenols from Olive Leaves Employing Deep Eutectic Solvents: The Application of Chemometrics to a Quantitative Study on Antioxidant Compounds. *Applied Sciences (Switzerland)*, v. 12, n. 2, 2022.
- ALAÑÓN, M. E. *et al.* A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. *Food Research International*, v. 137, n. October 2019, p. 109646, 2020.
- ALI, M. *et al.* Knowledge-Based Constrained Function Optimization Using Cultural Algorithms with an Enhanced Social Influence Metaphor. [S.l: s.n.], 2011. p. 103–119. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20206-3_7>.
- ALVES, L. *et al.* Modeling the extraction of bioactive compounds of green and red camu-camu peel and identification using UPLC-MS / MS. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 196, p. 1–12, 2023.
- AMARAL, A. C. F. *et al.* Acaricidal activity of *Derris floribunda* essential oil and its main constituent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 9, p. 791–796, set. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169117308432>>.
- BARBIERI, J. B. *et al.* Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, v. 144, n. August 2019, p. 112049, 2020.
- BARROS, D. B. DE *et al.* Efeito antifúngico de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. e58711427748, 27 mar. 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27748>>.
- BATLLE-BAYER, L. *et al.* Toward sustainable dietary patterns under a water–energy–food nexus life cycle thinking approach. v. 10, n. 5, p. 441–452, 2019.
- BENVENUTTI, L. *et al.* NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin

extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. *Journal of Molecular Liquids*, v. 315, p. 113761, 2020.

BHATTI, H. N. *et al.* Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytomedicine*, v. 21, n. 12, p. 1597–1626, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711314002931>>.

BOSILJKOV, T. *et al.* Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, v. 102, p. 195–203, 2017.

CHAUHAN, B. *et al.* Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, v. 4, n. 1, p. 4–8, 2013.

CHEN, Y. F. *et al.* Purple rice anthocyanin extract protects cardiac function in STZ-induced diabetes rat hearts by inhibiting cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 31, p. 98–105, 2016.

CHIRINOS, R. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p. 1019–1024, jun. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460901351X>>.

CLÁUDIA, A.; ANDRADE, M. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO (+)- α -pineno E (+)- β -pineno ISOLADOS E ASSOCIADOS SOBRE *Candida* spp. DE INTERESSE CLÍNICO PARA CAVIDADE BUCAL. 2017.

CONCEIÇÃO, NATALIA *et al.* By-Products of Camu-Camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] as Promising Sources of Bioactive High Added-Value Food Ingredients: Functionalization of Yogurts. *Molecules*, p. 1–17, 2020.

CONCEIÇÃO, NATÁLIA *et al.* By-Products of Camu-Camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] as Promising Sources of Bioactive High Added-Value Food Ingredients: Functionalization of Yogurts. *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 70, 24 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/70>>.

COSTA, A. G. V. *et al.* Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, v. 5, n. 2, p. 539–549, 2013.

COSTA, W. J. P.; SOUSA, E. M. P.; FARIA, L. J. G. DEGRADAÇÃO LUMINOSA DO EXTRATO ANTOCIÂNICO DA POLPA DE CARÁ-ROXO (*Dioscorea trifida* L.). set. 2018, São Paulo: Editora Blucher, set. 2018. p. 2897–2900. Disponível

em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/29124>>.

CRUZ-CHAMORRO, I. *et al.* Evaluation of the Impact of the Ripening Stage on the Composition and Antioxidant Properties of Fruits from Organically Grown Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Spanish Varieties. *Foods*, v. 13, n. 15, p. 2337, 25 jul. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/13/15/2337>>.

CUI, Q. *et al.* Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, v. 184, p. 826–835, 2018.

CUNHA-SANTOS, E. C. E. *et al.* Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. *Food Research International*, v. 115, p. 160–166, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918306379>>.

DA COSTA, C. A. R. *et al.* Phenolic compounds profile and antioxidant activity of purple passion fruit's pulp, peel and seed at different maturation stages. *Scientia Horticulturae*, v. 321, p. 112244, nov. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423823004156>>.

DA COSTA, J. S. *et al.* Chemical Composition and Variability of the Volatile Components of *Myrciaria* Species Growing in the Amazon Region. *Molecules*, v. 27, n. 7, p. 2234, 30 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2234>>.

DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, n. 4, p. 1076–1080, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>>.

DAS CHAGAS, E. G. L. *et al.* Enrichment of antioxidants compounds in cookies produced with camu-camu (*Myrciaria dubia*) coproducts powders. *LWT*, v. 137, p. 110472, fev. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820314602>>.

DE ABREU FIGUEIREDO, J. *et al.* Encapsulation of camu-camu extracts using prebiotic biopolymers: Controlled release of bioactive compounds and effect on their physicochemical and thermal properties. *Food Research International*, v. 137, p. 109563, nov. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920305883>>.

DE CASTRO, D. S. B. *et al.* Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*. *Experimental Parasitology*, v. 171, p. 84–90, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489416302363>>.

DO CARMO, M. A. V. *et al.* Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomal properties. *Food Research International*, v. 136, n. February, p. 109334, 2020.

ELKHALIFA, A. E. O. *et al.* Okra (*Abelmoschus esculentus*) as a potential dietary medicine with nutraceutical importance for sustainable health applications. *Molecules*, v. 26, n. 3, p. 1–21, 2021.

ENNOURI, A. *et al.* Chemical composition of essential oils and their antifungal activity in controlling ascochyta rabiei. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 22, n. 5, p. 1371–1381, 2020.

ESCHER, G. B. *et al.* Clitoria ternatea L. petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit α -amylase and α -glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation. *Food Research International*, v. 128, p. 108763, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919306490>>.

F. GOMES-ROCHETTE, N. *et al.* Fruit as Potent Natural Antioxidants and Their Biological Effects. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 17, n. 11, p. 986–993, 2 set. 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=17&issue=11&spage=986>>.

FERNÁNDEZ-RÍOS, A. *et al.* Superfoods: A super impact on health and the environment? *Current Opinion in Environmental Science and Health*, v. 31, p. 100410, 2023.

FERNÁNDEZ, I. M. *et al.* Characterization of Bioactive Compounds in Northern Amazon Fruits. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, n. 9, p. 134, 30 jun. 2019. Disponível em: <<http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/0/39742>>.

FIDELIS, M.; DO CARMO, M. A. V.; *et al.* Camu-camu seed (*Myrciaria dubia*) – From side stream to an antioxidant, antihyperglycemic, antiproliferative,

antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient. *Food Chemistry*, v. 310, n. November 2019, p. 125909, 2020.

FIDELIS, M.; DE OLIVEIRA, S. M.; *et al.* From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 2, p. 1131–1140, fev. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030219310367>>.

GALANAKIS, C. M. The Food Systems in the Era of the Coronavirus (COVID-19). *Annual Review of Sociology*, v. 43, p. 445–472, 2017.

GARCÍA-CHACÓN, J. M.; MARÍN-LOAIZA, J. C.; OSORIO, C. Camu Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh): An Amazonian Fruit with Biofunctional Properties-A Review. *ACS Omega*, v. 8, n. 6, p. 5169–5183, 2023.

GEIRNAERT, A. *et al.* Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 11450, 13 set. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-11734-8>>.

GOEL, S.; MITTAL, S.; CHAUDHARY, U. Role of Non Albicans Candida Spp. and Biofilm in Neonatal ICU. *Infectious Disorders - Drug Targets*, v. 16, n. 3, p. 192–198, 14 out. 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5265&volume=16&issue=3&spage=192>>.

GONÇALVES, A. C. *et al.* Antioxidant activity of the main phenolics found in red fruits: An in vitro and in silico study. *Food Chemistry*, v. 452, p. 139459, set. 2024. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814624011099>>.

GONÇALVES, A. E. DE S. S. Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica. p. 114, 2012.

GONZÁLEZ, C. G. *et al.* Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 33, n. 1, p. 91–96, 2018.

GULCIN, İ.; ALWASEL, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, v. 11, n. 8, p. 2248, 26 jul. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9717/11/8/2248>>.

GUPTA, E.; MISHRA, P. Functional Food with Some Health Benefits, So Called

Superfood: A Review. *Current Nutrition & Food Science*, v. 17, n. 2, p. 144–166, 2020.

HAMDENI, I. *et al.* Rosemary essential oil enhances culture establishment and inhibits contamination and enzymatic browning: Applications for in vitro propagation of Aloe vera L. *South African Journal of Botany*, v. 147, p. 1199–1205, jul. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629921002246>>.

HAYYAN, A. *et al.* Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochimica Acta*, v. 541, p. 70–75, ago. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603112002055>>.

HAYYAN, A. *et al.* Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *Journal of Molecular Liquids*, v. 178, p. 137–141, fev. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732212004382>>.

HAYYAN, M. *et al.* Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, p. 913, 29 dez. 2016. Disponível em: <<http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2575-9>>.

HEBINCK, A. *et al.* A Sustainability Compass for policy navigation to sustainable food systems. *Global Food Security*, v. 29, n. December 2020, 2021.

HUANG, Y. *et al.* Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1400–1405, 2017.

HWANG, H.; KIM, Y.-J.; SHIN, Y. Influence of ripening stage and cultivar on physicochemical properties, sugar and organic acid profiles, and antioxidant compositions of strawberries. *Food Science and Biotechnology*, v. 28, n. 6, p. 1659–1667, 27 dez. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10068-019-00610-y>>.

IVANOVIĆ, M. *et al.* Sustainable ultrasound-assisted extraction of valuable phenolics from inflorescences of *Helichrysum arenarium* L. using natural deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, v. 160, n. November 2020, 2021.

JASIM, N. S.; SALIH, A. M.; ATI, M. A. Evaluating the efficiency of plants essential oils against common fungal contamination affecting tissue culture of date palms (*Phoenix dactylifera* L.) by in vitro culture. *Research Journal of Chemistry and Environment*, v. 25, n. 6, p. 40–45, 2021.

JURIĆ, T. *et al.* Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, v. 343, p. 116968, dez. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732221016925>>.

JUSTINO DE ARAÚJO, A. C. *et al.* GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the Mikania cordifolia essential oil and limonene against MDR strains. *Food and Chemical Toxicology*, v. 136, p. 111023, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519308130>>.

KESERVANI, R. K. *et al.* Nutraceutical Formulations and Challenges. *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, n. June 2019, p. 161–177, 2017.

KIM, G. N.; KWON, Y. I.; JANG, H. D. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 1, p. 138–144, 2011.

KOH, Q. Q. *et al.* Formulation and characterization of natural deep eutectic solvents (NADES) for simultaneous phenolics and carotenes extraction from fresh oil palm leaf. *Food and Bioproducts Processing*, v. 147, p. 459–473, set. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308524001482>>.

KOH, Q. Q. *et al.* Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): Physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 35, p. 101218, out. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352554123002528>>.

KORAQI, H. *et al.* Optimization of extraction condition to improve blackthorn (*Prunus spinosa* L.) polyphenols, anthocyanins and antioxidant activity by natural deep eutectic solvent (NADES) using the simplex lattice mixture design method. *Microchemical Journal*, v. 200, p. 110497, maio 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X2400609X>>.

KRYSA, M.; SZYMAŃSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, v. 393, p. 133430, nov. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622013929>>.

LAKSHMI BALASUBRAMANIAM, S.; TAJVIDI, M.; SKONBERG, D. Hydrophobic

corn zein-modified cellulose nanofibril (CNF) films with antioxidant properties. *Food Chemistry*, v. 458, p. 140220, nov. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814624018703>>.

MADUWANTHI, S. D. T.; MARAPANA, R. A. U. J. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of banana (*Musa acuminata*, AAB) as affected by induced ripening agents. *Food Chemistry*, v. 339, p. 127909, mar. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620317714>>.

MAGRACH, A.; SANZ, M. J. Environmental and social consequences of the increase in the demand for 'superfoods' world-wide. *People and Nature*, v. 2, n. 2, p. 267–278, 2020.

MANCARZ, G. F. F. *et al.* Chemical composition and biological activity of Liquidambar styraciflua L. leaf essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 138, p. 111446, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019304492>>.

MAR, J. M. *et al.* Edible flowers from *Theobroma speciosum*: Aqueous extract rich in antioxidant compounds. *Food Chemistry*, v. 356, p. 129723, set. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621007299>>.

MAR, J. M. *et al.* Enhancing Bioactive Compound Bioaccessibility in Tapirira guianensis Juices through Ultrasound-Assisted Applications. *Processes*, v. 11, n. 9, p. 2718, 12 set. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9717/11/9/2718>>.

MARTA, A. M. Desenvolvimento de suplemento alimentar multivitamínico. 2019.

MEZIANI, R. *et al.* Towards a new approach of controlling endophytic bacteria associated with date palm explants using essential oils, aqueous and methanolic extracts from medicinal and aromatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 137, n. 2, p. 285–295, 2 maio 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11240-019-01570-1>>.

MOKBEL, S. A.; KHALIL, A. A.; EL-SHAZLY, M. A. Efficiency of eugenol oil nanoemulsion against Banana bunchy top virus and contamination with fungi in plant tissue culture. *Mokbel et al. Arab J. Biotech*, v. 20, n. 1, p. 33–50, 2017.

MORAES, G. V. *et al.* Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 14, p.

e238111436225, 25 out. 2022. Disponível em:
<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/36225>>.

MOSELE, J. I. *et al.* Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*, v. 201, p. 120–130, jun. 2016. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616300760>>.

MUZOLF-PANEK, M.; STUPER-SZABLEWSKA, K. Comprehensive study on the antioxidant capacity and phenolic profiles of black seed and other spices and herbs: effect of solvent and time of extraction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 15, n. 5, p. 4561–4574, 26 out. 2021. Disponível em:
<<https://link.springer.com/10.1007/s11694-021-01028-z>>.

NEVES, L. C. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. *Scientia Horticulturae*, v. 186, p. 223–229, abr. 2015. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423815001041>>.

NOVAES, G. M. *et al.* COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NOS ORGANISMOS. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 11, n. 2, p. 535–539, dez. 2013. Disponível em:
<<http://revistas.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/1150>>.

OLIVEIRA, A. F. A. *et al.* Non-thermal combined treatments in the processing of açai (*Euterpe oleracea*) juice. *Food Chemistry*, v. 265, p. 57–63, nov. 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618308938>>.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; ESPARZA-ESTRADA, J.; VANEGAS-MAHECHA, P. Ultrasound-assisted extraction of total carotenoids from mandarin epicarp and application as natural colorant in bakery products. *LWT*, v. 139, n. September 2020, 2021.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; MARTÍNEZ-GIRÓN, J.; ARIAS-JARAMILLO, M. E. Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*, v. 233, p. 96–100, out. 2017. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617306957>>.

PALOS-HERNÁNDEZ, A. *et al.* Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic

solvents. Opportunities and challenges. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 29, n. February, 2022.

PANIĆ, M. *et al.* Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical & biochemical engineering quarterly*, v. 33, n. 1, p. 1–18, 16 abr. 2019. Disponível em: <<http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/past-issues/article/1639>>.

PATRA, M. *et al.* A comprehensive review on functional beverages from cereal grains-characterization of nutraceutical potential, processing technologies and product types. *Heliyon*, v. 9, n. 6, p. e16804, 2023.

PIRES, E. V. *et al.* Atividade antioxidante e identificação de compostos fenólicos por CLAE/UV de seis espécies de Plantas. *Revista Perspectiva*, v. 47, n. 179, p. 7–18, 14 nov. 2023. Disponível em: <<http://ojs.uricer.edu.br/ojs/index.php/perspectiva/article/view/316>>.

PLATZER, M. *et al.* Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules*, v. 26, n. 5, p. 1244, 25 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/5/1244>>.

PURI, V. *et al.* A Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients*, v. 14, n. 21, 2022.

QI, Y. *et al.* Stability and antioxidant activity of 10 isoflavones and anthocyanidins during in vitro digestion. *Food Bioscience*, v. 56, p. 103189, dez. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429223008404>>.

RACHMANIAH, O. *et al.* Antimicrobial effect of dissolved curcuminoid in natural deep eutectic solvents (NADES) to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: A promising candidate for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, v. 16, n. 5, p. 514–518, 2020.

RAMÍREZ, M. J.; GIRALDO, G. I.; ORREGO, C. E. Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technology*, v. 277, p. 89–96, 2015.

RIBEIRO, P. F. D. A. TECNOLOGIA DE ALIMENTOS NA MODALIDADE A DISTÂNCIA Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos , para obtenção do título de Doctor Scientiae . VIÇOSA MINAS. 2012.

RODRIGUES, C. Z.; SANTOS, L. F. DOS. Substâncias antioxidantes

- cosméticas. *Revista Científica da FHO|Uniararas*, v. 6, n. 1, p. 28–36, 30 jun. 2018. Disponível em: <<https://ojs.fho.edu.br:8481/revfho/article/view/51>>.
- ROSALES, T. K. O. *et al.* Nanoencapsulated anthocyanins: A new technological approach to increase physical-chemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, v. 139, p. 108516, maio 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X23000620>>.
- SABATINI, L. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *Journal of Functional Foods*, v. 67, p. 103885, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464620301092>>.
- SACCHET, C. *et al.* Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/601503/>>.
- SACHADYN-KRÓL, M.; BUDZIAK-WIECZOREK, I.; JACKOWSKA, I. The Visibility of Changes in the Antioxidant Compound Profiles of Strawberry and Raspberry Fruits Subjected to Different Storage Conditions Using ATR-FTIR and Chemometrics. *Antioxidants*, v. 12, n. 9, p. 1719, 5 set. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/12/9/1719>>.
- SANTINI, A.; NOVELLINO, E. Nutraceuticals - shedding light on the grey area between pharmaceuticals and food. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 11, n. 6, p. 545–547, 2018.
- SANTOS, I. L. *et al.* Camu-camu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: A review of properties and proposals of products for integral valorization of raw material. *Food Chemistry*, v. 372, p. 131290, mar. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621022962>>.
- SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 1, p. 43–49, 2011.
- SEKHARAN, T. R. *et al.* pH, Viscosity of Hydrophobic Based Natural Deep Eutectic Solvents and the Effect of Curcumin Solubility in it. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, v. 11, n. 6, p. 14620–14633, 25 mar. 2021. Disponível em: <<https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2021/03/20695837116.1462014633.pdf>>.

SERRA-MAJEM, L. *et al.* Updating the mediterranean diet pyramid towards sustainability: Focus on environmental concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 23, p. 1–20, 2020.

SESSA, M. *et al.* Evaluation of the Stability and Antioxidant Activity of Nanoencapsulated Resveratrol during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 23, p. 12352–12360, 14 dez. 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf2031346>>.

SETTANNI, L. *et al.* Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, v. 26, n. 2, p. 326–330, ago. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351200059X>>.

SILVA, C. S. M. DA; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante de extratos de *Myrciaria dubia* (camu-camu) Myrtaceae. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 2, p. e5811225130, 18 jan. 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25130>>.

SILVA, N. M. DA *et al.* Avaliação de diferentes solventes combinados a técnica de alta pressão para extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Research, Society and Development*, v. 11, n. 6, p. e43211629163, 2 maio 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/29163>>.

SILVA, R. C. E *et al.* Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 965, 12 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/965>>.

SINGH, M. K.; SINGH, A. Fourier transform infrared (FTIR) analysis. *Characterization of Polymers and Fibres*. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 295–320. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128239865000142>>.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. *Applied Sciences*, v. 11, n. 11, p. 4897, 26 maio 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/11/11/4897>>.

SOUZA, J. N. S. *et al.* Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 6, p. 1276–1280, 2007. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532007000600025&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

STUPAR, A. *et al.* Recovery of β -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 76, n. April, 2021.

VANNUCHI, N. *et al.* Natural deep eutectic solvents (NADES)-Extracted Anthocyanins: Bioaccessibility in electrospun PEO microfibers. *Food Research International*, v. 177, p. 113898, fev. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996923014461>>.

WANG, J.; XIE, B.; SUN, Z. Quality parameters and bioactive compound bioaccessibility changes in probiotics fermented mango juice using ultraviolet-assisted ultrasonic pre-treatment during cold storage. *LWT*, v. 137, p. 110438, fev. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820314262>>.

WANG, T. *et al.* Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 145, p. 339–345, 2017.

WANG, X. H.; WANG, J. P. Effective extraction with deep eutectic solvents and enrichment by macroporous adsorption resin of flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 176, p. 112804, 2019.

WEI, Z. *et al.* Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 149, p. 237–244, 2015.

WIKENE, K. O. *et al.* Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 171, p. 27–33, jun. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417302865>>.

WOŁOSIAK, R. *et al.* Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach. *Molecules*, v. 27, n. 1, p. 50, 22 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/1/50>>.

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, nov. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913003487>>.
- XIE, L. *et al.* Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, v. 72, p. 13–24, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441730626X>>.
- YAMAUCHI, M. *et al.* DPPH Measurements and Structure—Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols. *Antioxidants*, v. 13, n. 3, p. 309, 1 mar. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/13/3/309>>.
- YAN, M. *et al.* Hydroxyl group-induced enhancement of antioxidant activity of resveratrol over pterostilbene by binding to lactoferrin. *Food Chemistry*, v. 441, p. 138356, maio 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814624000049>>.
- ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1526–1532, 2007.
- ZARBÀ, C.; CHINNICI, G.; D'AMICO, M. Novel food: The impact of innovation on the paths of the traditional food chain. *Sustainability (Switzerland)*, v. 12, n. 2, 2020.
- ZAWISTOWSKI, J.; KOPEC, A.; KITTS, D. D. Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. indica) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 1, p. 50–56, 2009.
- ZHUANG, B. *et al.* Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 134, p. 214–219, 2017.