

WALTER FABRI JUNIOR

**Aplicação de extratos da casca do fruto do caraguatá
(*Bromelia balansae* Mez) como antioxidantes em
sistema lipídico**

ASSIS

2023

WALTER FABRI JUNIOR

**Aplicação de extratos da casca do fruto do caraguatá
(*Bromelia balansae* Mez) como antioxidantes em
sistema lipídico**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientadora: Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer

ASSIS

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

F124a Fabri Junior, Walter
Aplicação de extratos da casca do fruto do caraguatá
(*Bromelia balansae* Mez) como antioxidantes em sistema
lipídico / Walter Fabri Junior. — Assis, 2023
76 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientadora: Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer

1. Antioxidantes. 2. Caraguatá (Planta).
3. Bromeliáceas (Planta). 4. Fenóis. 5. Biotecnologia
vegetal. I. Título.

CDD 631.52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Aplicação de extratos da casca do fruto do caraguatá (*Bromelia balansae* Mez) como antioxidantes em sistema lipídico

AUTOR: WALTER FABRI JÚNIOR

ORIENTADORA: CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências, área:
Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER (Participação Presencial)
Departamento de Biotecnologia / UNESP/FCL-Assis

Profa. Dra. MÔNICA ROSA BERTÃO (Participação Presencial)
Departamento de Biotecnologia / UNESP/FCL-Assis

Prof. Dr. VITÓRIO DOS SANTOS JUNIOR (Participação Virtual)
Eurofarma/Indústria Farmacêutica

Assis, 21 de março de 2023

Dedico aos meus avós paternos, Aparecida e Aurélio Fabri, e aos meus avós maternos, Laura e Celso de Brito, que de onde estiverem sintam-se abraçados por minha gratidão, por me presentearem com os melhores pais que eu poderia ter, os quais me deram a vida e uma família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Walter e Lucimar, por todo incentivo e companheirismo durante toda minha formação, sempre me norteando e mostrando o caminho da idoneidade. À minha irmã, Aline, que sempre tive como inspiração em minha vida acadêmica, por depositar confiança de que tudo daria certo. Ao meu sobrinho, Rafael, por trazer alegria à minha vida e fazer com que os fardos fossem mais leves e ao meu cunhado, Cláudio, pelas palavras de apoio durante este processo.

À minha orientadora, Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer, por ter aberto as portas da UNESP e do Laboratório de Química de Alimentos para mim e, mais que isso, por ter compartilhado, de forma tão generosa, toda sua bagagem acadêmica.

Aos meus primos, Edson e Daniel, por realizarem a primeira coleta de caraguatá, na Água das Antas em Assis, me permitindo iniciar as pesquisas.

Ao doutorando Winner, da USP de Ribeirão Preto, pela colaboração na execução da análise por espectrometria de massas, pela interpretação dos dados na análise metabolômica e pelos esclarecimentos sempre que necessários. Ao professor Dr. André da UNESP de Araraquara e ao professor Dr. Norberto da USP Ribeirão Preto, por também intermediarem a realização desta análise.

Ao colega de laboratório, Rafael, por compartilhar sua experiência com o caraguatá, e aos colegas Célia, Natalie, Aline, Camilla, Felipe, Nathália, Beatriz, Caio, Kayu, Fernanda, André e Gabriela, pelas trocas de informações.

A todos os colaboradores do programa de biociências da FCL UNESP Assis, em especial ao Allan, nos suportes com equipamentos, ao José Lino, nas questões administrativas e ao Sivaldo, na portaria, sempre com bom humor e hospitalidade.

Aos professores Dr. Vitorio, Dra. Mônica e Dra. Rosana, por aceitarem compor as bancas de qualificação e defesa, sempre com sugestões pertinentes e enriquecedoras. À professora Dra. Veridiana, por disponibilizar imagens dos frutos do caraguatá e por intermediar uma publicação na revista Aprendendo Ciência.

Para finalizar, a todos que contribuíram de alguma maneira na execução deste trabalho.

“Quem de manhã compreendeu os ensinamentos da sabedoria, à noite pode morrer contente.”

Confúcio (551- 479 a.C.)

FABRI JUNIOR, Walter. **Aplicação de extratos da casca do fruto do caraguatá (*Bromelia balansae* Mez) como antioxidantes em sistema lipídico**. 2023. 76 f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2023.

RESUMO

A *Bromelia balansae* Mez, popularmente conhecida como caraguatá, é uma espécie de Angiosperma, nativa da Mata Atlântica, que também está presente no Cerrado e em matas ciliares, podendo ser encontrada em blocos rochosos. Dentre as inúmeras utilidades do caraguatá está o tratamento de tosses e feridas, sendo usado na forma de xarope. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de extrair compostos antioxidantes, em especial compostos fenólicos, da casca do fruto do caraguatá de três localidades - Ribeirão das Antas (ERA), no município de Assis-SP, Tarumã-SP (ET) e no campus da Unesp Assis-SP nos estágios maduro (EUM) e imaturo (EUI) - e avaliar seus potenciais antioxidantes em emulsões O/A. Os parâmetros de extração definidos por otimização foram de 1:30 amostra:solvente (água) por 60 min a 35 °C em incubadora com agitação orbital. Os melhores resultados de compostos fenólicos totais (53,90 mg EAG.100mL⁻¹), flavonoides (8,93 mg EQ.100mL⁻¹), ácido ascórbico (3,33 mg.100mL⁻¹), carotenoides totais (112 µg.100mL⁻¹) e FRAP (373 mg ET.100mL⁻¹) foram encontrados no EUM, com exceção de taninos que teve maiores teores no EUI (3,13 mg AT.100mL⁻¹). Os teores mais elevados de carboidratos totais foram encontrados no ET (17,11 mg EG.mL⁻¹) e EUM (17 mg EG.mL⁻¹). A partir dos resultados de compostos bioativos e FRAP aplicou-se o extrato obtido de frutos maduros do campus da Unesp Assis-SP em uma emulsão O/A, para avaliar a formação de hidroperóxidos e índice de cremeação durante armazenamento em temperatura ambiente e a 40 °C. Em ambas as temperaturas os tratamentos demonstraram estabilidade física. Não houve cremeação na emulsão tratada com extrato, enquanto no tratamento com antioxidante sintético BHT (Butil Hidroxitolueno) e emulsão controle foi possível observar discreta cremeação. No índice de hidroperóxidos em temperatura ambiente, o controle e tratamento BHT não diferiram estatisticamente no período analisado, enquanto o tratamento com extrato evidenciou vulnerabilidade de tal emulsão, sugerindo que o extrato acelerou a oxidação, possivelmente por questões inerentes a sua interação com o sistema. No teste acelerado em estufa a 40 °C, foi possível concluir que o extrato, nas condições em que foi aplicado, de fato não foi capaz de retardar processos oxidativos na emulsão. Sob efeito de aquecimento, o tratamento com BHT teve seu efeito protetor evidenciado, diferindo significativamente do controle e do tratamento com extrato, ambos iguais estatisticamente.

Palavras-chave: Antioxidantes. Caraguatá. Bromeliáceas. Emulsões O/A.

FABRI JUNIOR, Walter. **Application of caraguatá fruit peel extracts (*Bromelia balansae* Mez) as antioxidants in the lipid system.** 2023. 76 f. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences). – São Paulo State University (UNESP), Faculty of Sciences and Letters, Assis, 2023.

ABSTRACT

Bromelia balansae Mez, popularly known as caraguatá, is a species of Angiosperm native to the Atlantic Forest, which is also present in the Cerrado and riparian forests, and it may be found in rocky blocks. Among the numerous uses of caraguatá, there is the treatments of coughs and wounds, being used in the way of syrup. The objective of this work was to evaluate the feasibility of extracting antioxidant compounds, especially phenolic compounds, from the caraguatá fruit peel from three locations - Ribeirão das Antas (ERA), in the municipality of Assis-SP, Tarumã-SP (ET) and in campus of Unesp Assis-SP increased us mature (EUM) and immature (EUI) - and evaluate their antioxidant potential in O/W emulsions. The parameters defined by optimization were 1:30 sample:solvent (water) for 60 min at 35 °C in an incubator with a permanent orbital. The best results for total phenolic compounds (53.90 mg EAG.100⁻¹), flavonoids (8.93 mg EQ.100mL⁻¹), ascorbic acid (3.33 mg.100mL⁻¹), total carotenoids (112 µg .100mL⁻¹) and FRAP (373 mg ET.100mL⁻¹) were found in the EUM, except for tannins that had higher levels in the EUI (3.13 mg AT.100mL⁻¹). The highest levels of total carbohydrates were found in ET (17.11 mg EG.mL⁻¹) and EUM (17 mg EG.mL⁻¹). From the results of bioactive compounds and FRAP, the extract of ripe fruits from the campus of Unesp Assis-SP was applied in an O/W emulsion, to evaluate the formation of hydroperoxides and creaming index during storage at room temperature and at 40 ° C. At both temperatures the treatments has shown physical stability. There was no creaming in the emulsion treated with extract, while in the treatment with synthetic antioxidant BHT (Butyl Hydroxytoluene) and control emulsion it was possible to observe some slight creaming. In the hydroperoxide index at room temperature, the control and BHT treatment did not differ statistically in the analyzed period, while the treatment with extract showed vulnerability of such emulsion, suggesting that the extract accelerated protection, possibly due to issues inherent to its interaction with the system. In the accelerated test in a lab oven at 40 °C, it was possible to conclude that the extract, under the conditions in which it was applied, was in fact not able to delay oxidative processes in the emulsion. Under the effect of heating, the treatment with BHT had its protective effect evidenced, differing significantly from the control and the treatment with extract, both statistically equal.

Keywords: Antioxidants. Caraguatá. Bromeliads. O/W emulsions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Indivíduos de caraguatá.....	18
Figura 2 – Frutos de caraguatá.....	19
Figura 3 – Estrutura química base de flavonoides.....	24
Figura 4 – Estrutura química de um tanino condensado.....	27
Figura 5 – Estrutura química de um tanino hidrolisável.....	27
Figura 6 – Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico e ácido L-desidroascórbico.....	28
Figura 7 – Estruturas de xantofilas à esquerda e de carotenos à direita.....	29
Figura 8 – Sistema de banho ultrassônico.....	32
Figura 9 – Espectrometria de massas de forma simplificada.....	34
Figura 10 – Esquema dos tipos de emulsões existentes.....	35
Figura 11 – Amostras de cascas secas e trituradas de caraguatá.....	37
Figura 12 – Homogeneização da emulsão por sonda ultrassônica.....	45
Figura 13 – Cluster de acordo com as similaridades químicas dos compostos.....	55
Figura 14 – Cluster dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados dos tratamentos em temperatura ambiente.....	62
Gráfico 2 – Resultados dos tratamentos a 40 °C.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subclasses e principais fontes de flavonoides.....	25
Tabela 2 – Coordenadas, altitude e classificação climática pelo método de Köppen das regiões de coleta das amostras.....	38
Tabela 3 – Tabela para consulta de volume e normalidade de padrão de iodo a ser adicionado na análise potenciométrica de índice de hidroperóxido.....	46
Tabela 4 – Otimização da extração de compostos fenólicos por extração convencional utilizando <i>shaker</i>	48
Tabela 5 – Comparação da extração de compostos fenólicos totais utilizando banho ultrassônico e <i>shaker</i>	49
Tabela 6 – Concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos totais, ácido ascórbico, carotenoides, carboidratos e atividade antioxidante (FRAP) no extrato aquoso da casca do caraguatá colhido em diferentes localidades e diferentes fases de maturação.....	51
Tabela 7 – Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos aquosos de caraguatá, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas.....	57
Tabela 8 – Estabilidade das emulsões em temperatura ambiente durante 8 dias de armazenamento.....	60
Tabela 9 – Estabilidade das emulsões a 40 °C durante 8 dias de armazenamento.....	60
Tabela 10 – Índice de hidroperóxidos de emulsões analisadas em temperatura ambiente durante 8 dias de armazenamento.....	62
Tabela 11 – Índice de hidroperóxidos de emulsões analisadas a 40 °C durante 8 dias de armazenamento.....	63

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
BHT	Butil Hidroxitolueno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCFI	2,6 Diclorofenol Indofenol
DDA	Aquisição dependente de dados
DIA	Aquisição independente de dados
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAT	Equivalente de ácido tânico
EE	Estabilidade da emulsão
ECC	Equivalente de epicatequina
EG	Equivalente de D-glucose
EM	Espectrometria de massas
EQ	Equivalente de quercetina
ERA	Extrato Ribeirão das Antas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETR	Equivalente de Trolóx
ET	Extrato Tarumã
EUM	Extrato Unesp Maduro
EUI	Extrato Unesp Imaturo
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
g	Grama
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
kHz	Quilohertz
L	Litro
LC-MS/MS	HPLC com espectrometria de massa
mg	Miligrama
mL	Mililitro
meq O₂/Kg	Miliequivalente de oxigênio ativo por quilograma

m:v	Massa:volume
m/z	Massa-carga
O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
OH[·]	Radical hidroxila
RPM	Rotação por minuto
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
TBHQ	Terc-Butil-Hidroquinona
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Volume
W	Watt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Família Bromeliaceae.....	17
2.2. Caraguatá.....	17
2.3. Influências ambientais nos vegetais.....	20
2.4. Compostos bioativos.....	21
2.4.1. Compostos fenólicos.....	22
2.4.2. Flavonoides.....	23
2.4.3. Taninos.....	25
2.4.4. Ácido ascórbico.....	27
2.4.5. Carotenoides.....	28
2.4.6. Carboidratos.....	29
2.5. Atividade antioxidante.....	30
2.6. Extração de compostos bioativos.....	31
2.7. Redes moleculares em espectrometria de massas.....	33
2.8. Sistemas emulsionados.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Geral.....	36
3.2. Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Locais de coleta dos frutos.....	36

4.4.1. Compostos fenólicos totais.....	39
4.4.2. Flavonoides totais.....	40
4.4.3. Taninos totais.....	40
4.4.4. Ácido ascórbico.....	41
4.4.5. Carotenoides.....	41
4.4.6. Carboidratos totais.....	42
4.4.7. Poder de redução do ferro (FRAP).....	42
4.4.8. Análises LC-MS e MS/MS.....	43
4.4.8.1. Processamento dos dados e construção das redes moleculares.....	43
4.4.9. Formulações das emulsões.....	44
4.4.9.1. Análise de estabilidade das emulsões durante armazenamento.....	45
4.4.9.2. Índice de cremeação.....	45
4.4.9.3. Índice de hidroperóxidos.....	45
4.5. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Otimização da extração de compostos fenólicos.....	47
5.2. Caracterização dos extratos.....	49
5.3. Análises LC-MS e MS-MS.....	54
5.4. Estabilidade física das emulsões.....	59
5.4.1. Índice de cremeação em diferentes tempos de armazenamento....	59
5.4.2. Estabilidade oxidativa das emulsões.....	61
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

O termo biodiversidade ou diversidade biológica, designa a quantidade e a variabilidade de espécies catalogadas em determinada área. De forma mais detalhada, determina a diversidade genética encontrada dentro das espécies, assim como, a variação registrada em proporções maiores, como é o caso dos ecossistemas. A partir desse delineamento, a biodiversidade pode ser compreendida como sendo a forma hermética de organização da vida na Terra, começando desde o núcleo celular, até às diversas informações que formam uma espécie por completo. Em suma, toda variação de vida, de genes e características inerentes às espécies e ecossistemas, denomina-se biodiversidade (FAITH, 2021).

Ao analisar a diversidade de plantas terrestres por biomas brasileiros, a Mata Atlântica se destaca como o bioma com maior variedade de briófitas, samambaias/licófitas e Angiospermas, enquanto a Amazônia abriga a maior diversidade de Gimnospermas. O Cerrado é o segundo bioma com maior diversidade de Angiospermas e Gimnospermas, enquanto a Amazônia é o segundo bioma com maior diversidade de briófitas e de samambaias mais licófitas (NARVÁEZ-GOMES *et al.*, 2021).

A *Bromelia balansae* Mez, popularmente conhecida como caraguatá, é uma espécie de Angiosperma, nativa da Mata Atlântica, que também está presente no Cerrado e em matas ciliares, podendo ser encontrada em blocos rochosos. A alta umidade dos solos em áreas florestais, de vegetação secundária e restinga promove um ambiente ideal para o seu desenvolvimento (REITZ, 1983).

Mesmo sendo muito difundido pela medicina popular, o caraguatá ainda carece de aprofundamento e embasamento científico, sobretudo no que diz respeito ao seu uso seguro, determinando concentrações terapêuticas ou tóxicas para o organismo. Ainda assim, é conhecido como um fruto rico em compostos fenólicos e antioxidantes. Na indústria de alimentos e farmacêutica, especialmente cosméticos, esses compostos podem ser empregados como antioxidantes naturais. Tais preparações são atualmente empregadas para produzir muitos alimentos em que antioxidantes naturais podem substituir produtos químicos potencialmente cancerígenos ou, de outra forma, prejudiciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae abriga 3.620 espécies, 76 gêneros (GOUDA; BUTCHER; GOUDA, 2020) e é dividida em oito subfamílias: Bromelioideae, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH *et al.*, 2007; 2011).

É encontrada principalmente em climas neotropicais, preferencialmente na costa leste do Brasil, nas regiões da Mata Atlântica, no Escudo das Guianas, regiões áridas como Caatinga e regiões altas como a Cordilheira dos Andes. Levantamentos apontam que 40% de todas as espécies de Bromeliaceae são encontradas no Brasil, o que torna o país com maior diversidade desta família. São plantas perenes que apresentam inúmeras formas, colorações e estaturas. Sabe-se que não são plantas parasitas, são terrestres podendo ser ocasionais, rupícolas e epífitas (COFFANI-NUNES, 2002; LEME, 1997).

Pertencente ao grupo das Angiospermas, as Bromeliáceas constituem uma das famílias que têm mais dados científicos disponíveis. Entretanto, analisando pela óptica da composição florística, esses dados levantados ainda carecem de aprofundamento, em especial em regiões que estão dentro do raio de seu habitat e que ainda não foram exploradas e/ou mapeadas (MARTINELLI *et al.*, 2008).

Integram a ordem Poales, com inúmeras formas e com fortes características relacionadas a sua floração, representam cerca de um terço das monocotiledôneas, numa gama estimada de 20.000 espécies (SCHUTZZ; ARAÚJO; SÁ, 2012).

2.2. Caraguatá

A espécie *Bromelia balansae* Mez, conhecida como caraguatá (Figura 1), é uma planta terrestre, com hábito de crescimento rasteiro (WANDERLEY & MARTINS, 2007). Sua floração anual inicia em dezembro e se estende até final de janeiro e início de fevereiro, enquanto a frutificação inicia por volta de fevereiro e vai até junho (REITZ, 1983). Possui folhas eretas que podem chegar a mais de um metro de altura, com espinhos em suas laterais (SMITH; DOWNS, 1979), dos quais os da base são voltados para baixo e os da parte central até a ponta são voltados para cima (REITZ, 1983). Descrições detalhadas de indivíduos de caraguatá estão disponíveis em Parte

Terrestre, 0,5 - 2 m. Folhas verdes, as centrais avermelhadas, 0,7 - 2,4 m; bainha 6 - 8 cm larg., margem serrilhada; lâmina 1,3 - 2,5 cm larg., linear-triangular, ápice pungente, margem com espinhos castanho-escuros, 4 - 7 mm, retrorsos na base e antrorsos para o ápice. Escapo 20 - 40 cm; brácteas foliáceas, verde-esbranquiçadas na base, avermelhadas para o ápice; bainha oblongo-oval, papirácea, margem espinescente; lâmina linear-triangular, ápice pungente, margem espinescente. Inflorescência 14 - 25 cm; ramos com 4 - 10 flores; brácteas primárias inferiores semelhantes às do escapo, avermelhadas, excedendo os ramos, as superiores alvas a verde-claras, papiráceas, menores que os ramos, ovais, ápice agudo, mucronado, margem inteira ou serrilhada. Brácteas Forais alvas, subcoriáceas, (20-) 25 - 32 × 5 - 8 mm, ultrapassando o ovário, oblongas ou oblongo-ovais, ápice geralmente emarginado ou agudo, margem serrilhada, raramente inteira, fortemente carenadas. Flores 3,3 - 4,5 cm; sépalas alvas, 1,7 - 2,3 cm, livres, triangulares, ápice agudo, carenadas; pétalas vináceas com margem alva, 2 - 2,5 × 0,5 - 0,7 cm, ápice obtuso, tubo dos Filetes ca. 7mm; tubo epígino conspicuo (WANDERLEY & MARTINS, 2007, p. 39-162).

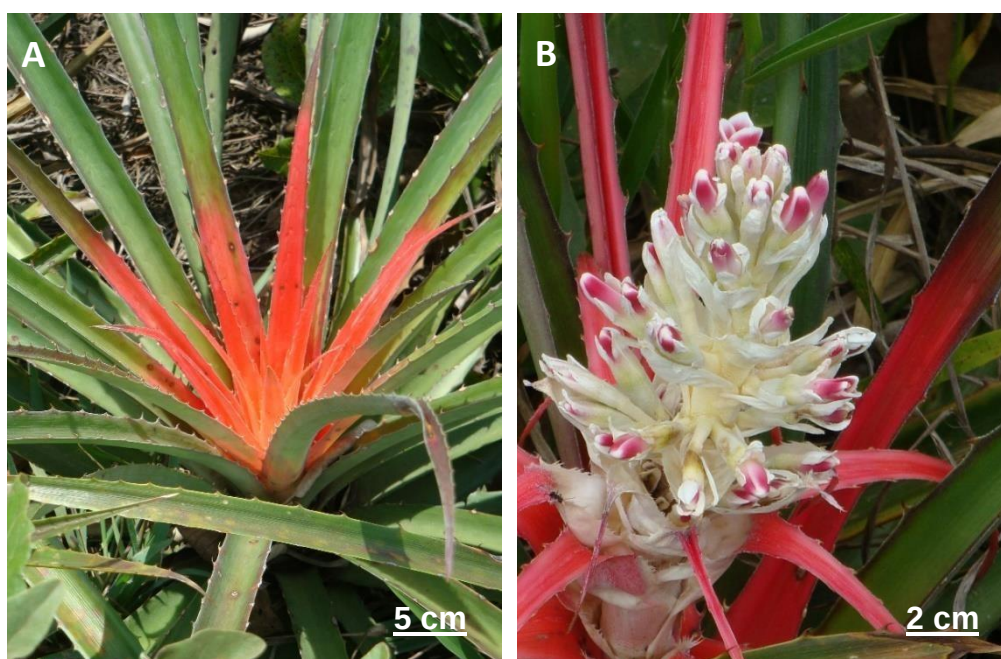


Figura 1. Indivíduos de caraguatá: A. brácteas avermelhadas que antecedem a inflorescência; B. inflorescência. Fonte: Fotos de Weiser, V. L., 2022.

A *Bromelia balansae* Mez, pertencente à subfamília Bromelioideae, possui fruto do tipo baga ovoide com cerca de 5 cm de comprimento, com casca e polpa em tons

amarelados, rica em fibras e aroma característico, contendo sementes de pequeno porte e globulosas (Figura 2) (HIANE *et al.*, 1992). Tais medidas podem apresentar diferenças importantes quando são realizadas comparações de frutos colhidos em localidades diversas, sobretudo, quando se trata de outras espécies de caraguatá, como é o caso da *Bromelia antiacantha* Bertol. Cariolatto (2019) ao analisar a fenologia do gênero *Bromelia*, constatou diferenças em indivíduos de *Bromelia balansae* Mez, presentes em localidades distintas, em especial nas características físicas, como o tamanho do fruto, quantidade de frutos por cacho e taxa de sólidos solúveis.

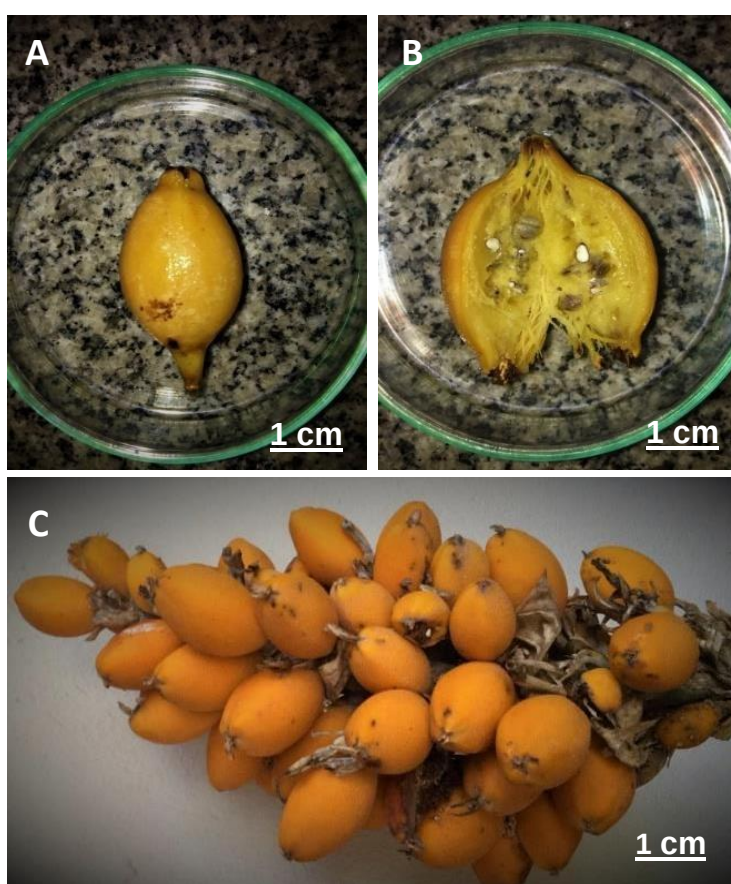


Figura 2. Fruto do caraguatá: A. fruto baga formato oval; B. casca, polpa e sementes do fruto e C. frutos dispostos em forma de racemo. Fonte: Fotos de Fabri Junior, W. 2023.

A alta umidade de solos de áreas florestais, de vegetação secundária e restingas promove um ambiente ideal para o desenvolvimento de indivíduos de caraguatá, o que permite a formação de complexos da própria espécie em questão, porém de forma não regular nos entornos e nos diversos ambientes em que comumente é encontrada (REITZ, 1983).

Dentre as inúmeras utilidades do caraguatá está o tratamento de tosses e feridas, sendo usado na forma de xarope. A composição enzimática do fruto desperta grande interesse por parte do setor industrial farmacêutico e alimentício, visto que já foram isoladas e caracterizadas algumas de suas enzimas proteolíticas (BALIN *et al.*, 2018). A enzima endopeptidase foi isolada dos frutos imaturos. As bromeliáceas têm considerável capacidade de produzir proteinases, e é do interesse de indústrias alimentícias e cosméticas isolar novas enzimas deste grupo (PARDO *et al.* 2000, 2001).

A bromelina é um exemplo destas enzimas, a qual é um concentrado de enzimas proteolíticas rico em cisteína endopeptidases, com potenciais anti-helmínticos, anti-inflamatórios e anticancerígenos. Tais proteases são empregadas no setor alimentício para fabricar queijos, cervejas, para amaciar carnes e produzir emulsificantes. Do óleo essencial extraído do fruto, já foram identificados 35 compostos, com 94,6% de sesquiterpenos, compostos eficazes para o tratamento de doenças cardiovasculares e neoplásicas (CARDOSO; RE-POPPI; COELHO, 2010). Já foi identificado, por meio de um extrato metanólico, quatro flavonóis glicosídeos, que são importantes polifenóis para o organismo humano, em função de sua atividade antioxidante, de controle glicêmico e em processos inflamatórios (COELHO *et al.*, 2010). Por outro lado, sua toxicidade e efeitos terapêuticos ainda carecem de mais informações (BALIN *et al.*, 2018).

2.3. Influências ambientais nos vegetais

As características dos solos e os impactos que neles ocorrem, muitas vezes levam plantas ao chamado estresse e, diante desse fenômeno, alteram seu metabolismo como forma de se defender, consequentemente levando à síntese de metabólitos secundários. A condição de estresse em vegetais pode acarretar a formação de radicais livres, os quais poderão ser combatidos por antioxidantes, dessa forma sendo estabilizados ou desativados (ATOUI *et al.*, 2005). A concentração dos compostos antioxidantes presentes em plantas está ligada a fatores genéticos e ambientais, e isso influi diretamente na inibição oxidativa (ALVES *et al.*, 2017).

Da mesma maneira, fatores como as mudanças climáticas, com consequente elevação da temperatura, aumento da estiagem, elevação do CO₂ atmosférico, alterações de fluência e irradiância luminosa impactam significativamente os rendimentos das culturas (SILVA *et al.*, 2020).

O Caraguatá é uma herbácea amplamente distribuída pela América do Sul, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia e Paraguai (BALIN *et al.*, 2018). No Brasil está presente no norte do Pantanal, no Cerrado e em todo litoral da Mata Atlântica (ARRIVETTI *et al.*, 2008).

O bioma Pantanal, situado na bacia hidrográfica do Alto Paraguai, apresenta baixos valores hipsométricos com pequenas variações no gradiente topográfico e por uma considerável região de planícies que alagam nos períodos mais chuvosos. Entretanto, é comum a formação de cordões arenosos que conseguem resistir às inundações mais intensas. É comum o registro de feições geomorfológicas de erosão em tais planícies alagáveis, caracterizando a paisagem pantaneira. Os índices pluviométricos no pantanal são marcados por um período de chuvas constantes durante outubro e março e outra seca, que vai de abril a setembro (PEREIRA; CHÁVEZ; SILVA, 2012).

O Cerrado se estende por 21% do território nacional, sendo o segundo maior bioma brasileiro, superado em área apenas pela Amazônia. É designado como a última fronteira agrícola do planeta e pode ser subdividido em outros grupos de ecossistemas, como savanas, matas, campos e matas de galeria presentes no Brasil Central. Este bioma apresenta clima estacional, com regime de chuva que dura de outubro a março, sucedido por período seco, de abril a setembro. Os índices pluviométricos médios anuais são de 1.500 mm, com temperaturas predominantemente amenas no decorrer do ano, entre 22 °C e 27 °C em média. Espécies oriundas do Cerrado, desenvolveram-se a partir de solos muito antigos, que sofreram grandes impactos do tempo, ficando com pH ácido, pobres em nutrientes, porém com concentrações altas de alumínio (KLINK; MACHADO, 2005).

A Mata Atlântica é um bioma marcado por uma vasta geodiversidade, a qual determina a sua heterogeneidade interna, concedendo-lhe um notório valor estético (ARAUJO *et al.*, 2022). Compõe um mosaico de ecossistemas, com uma flora diferenciada, decorrente de tipos de solo, relevo e clima. Ocupa a posição de segundo maior bioma tropical americano, se estendendo no Brasil por 17 estados, com formações de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional e ecossistemas associados como manguezais, campos de altitude e restingas (CEPF, 2011).

2.4. Compostos bioativos

Compostos bioativos são fitoquímicos extranutricionais disponíveis em quantidades discretas nos alimentos. São estruturas moleculares com grande responsabilidade nos diversos efeitos em sistemas biológicos. O advento dos alimentos funcionais foi inspirado por estudos acerca destes biocompostos, com a preocupação de incorporar, além dos nutrientes comuns dos alimentos, componentes que atuem de forma sinérgica, trazendo benefícios metabólicos e fisiológicos ao organismo (NORNBERG *et al.*, 2022).

A inclusão de frutas em dietas alimentares, pode prevenir inúmeras doenças que acometem o organismo humano. Doenças como diabetes, Alzheimer, doenças cardiovasculares e neoplásicas podem ser prevenidas ofertando ao organismo compostos com poder antioxidante, como vitaminas e compostos fenólicos, tais como, os flavonoides (SOUZA; FASSINA; SARAIVA, 2018), combatendo os radicais livres e o estresse oxidativo (ASADI *et al.*, 2010).

A bioatividade funcional de um extrato vegetal, em geral, depende da presença de compostos como polifenóis, carotenoides e clorofila (HOSSAIN; RAHMAN, 2011). A natureza química de tais compostos possui variações significativas em se tratando de polaridade. Nos vegetais há uma grande variedade de biocompostos, em diferentes concentrações (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos), havendo ainda a possibilidade de complexação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Tais complexos, assim como determinados compostos fenólicos de alto peso molecular, possuem baixa solubilidade em água, todavia, a presença de substâncias fenólicas em extratos, contém misturas de classes distintas, permitindo que uma parcela seja solubilizada no solvente do sistema escolhido (ANDREO; JORGE, 2006).

2.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nos vegetais se destacam por serem os responsáveis pela maior parcela da atividade antioxidante, seguidos por outros componentes com atividade inferior. Tal atividade é relacionada ao potencial de oxirredução, ação responsável pelo combate de radicais livres através de adsorção ou neutralização (BASILE *et al.*, 2005).

A ação antioxidante promovida pelos compostos presentes em frutos, assim como os compostos fenólicos, se dá por meio de uma reação de oxirredução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), atenuando, ou mesmo impedindo, essa reação que produz peróxidos a partir de lipídios e oxidação de outras substâncias, o que evidencia os benefícios do consumo de alimentos ricos em biocompostos (SOUZA; FASSINA; SARAIVA, 2018).

Nas plantas, os compostos fenólicos desempenham um importante papel no crescimento, no sistema reprodutor e no combate a patógenos. A formação dos compostos fenólicos se dá em situações peculiares, como em condições de estresse da planta, especialmente com a radiação UV, infecções, lesões e déficit hídrico (JORGE; ANGELO, 2007).

Compostos fenólicos compõem um amplo grupo de metabólitos secundários formados a partir da fenilalanina e tirosina. Podem ser fenóis simples, ácidos fenólicos (benzólicos, cinâmicos e derivados), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas. Podem desempenhar a função de fitoalexinas, por atrair insetos responsáveis pela polinização, além de contribuir em processos de pigmentação da planta e na proteção contra raios UV (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para a adstringência, amargor, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (JORGE; ANGELO, 2007; SHAHIDI; NACZK, 2004). Além disso, a capacidade de proteger a saúde de algumas propriedades antinutricionais de outros fenólicos é de grande importância aos produtores, processadores e consumidores (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Há uma grande variedade de fórmulas estruturais em se tratando de compostos fenólicos e isso se dá em função de arranjos que ocorrem na natureza, classificando-os em estruturas simples ou compostas. Dentre os simples estão os ácidos fenólicos e dentre as estruturas complexas, pode-se mencionar os taninos hidrolisáveis (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999).

2.4.2 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias que possuem em sua estrutura molecular, um núcleo, onde há a presença de três anéis fenólicos (TAPA; SAKARKAR; KAKDE, 2008). Um desses anéis, o benzeno, é condensado através do sexto carbono do segundo anel, o qual se liga através do carbono 2, a um terceiro grupo fenil, denominado substituinte (Figura 3), responsável pela diversidade de flavonoides encontrada na natureza (SANDHAR *et al.*, 2011).

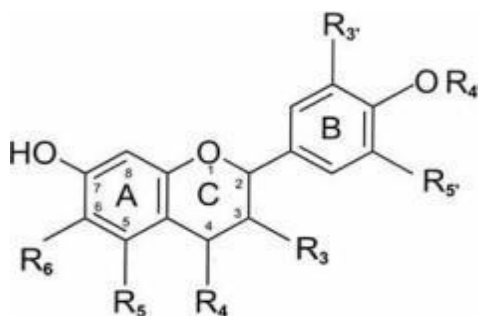


Figura 3. Estrutura química base de flavonoides. Fonte: BEECHER, 2003.

Os flavonoides (Tabela 1) funcionam como potentes antioxidantes em vários níveis, podendo proteger os lipídios de membrana da oxidação. Presentes principalmente como pigmentos corantes em plantas, tem como importante representante a antocianina, a qual confere cor com tons avermelhados, púrpura e violeta em frutos (SOUZA; FASSINA; SARAIVA, 2018).

O potencial antioxidante desempenhado por flavonoides está relacionado ao seu eficiente sequestro de radicais livres, onde o hidrogênio da hidroxila fenólica doa um átomo para estabilizar o radical produzido (BOOKER; BURKEY; JONES, 2012).

Nas plantas, os flavonoides são encontrados principalmente em vacúolos, tendo a estrutura de glicosídeos ou glutathione conjugados. Ademais, tais compostos fenólicos quando no apoplasto, têm a capacidade de intervir como doadores de elétrons, fazendo a quebra do ozônio (O_3), formando assim radical hidroxila ($OH^\cdot$) e oxigênio (O_2) (SANDRE *et al.*, 2014).

Tabela 1. Subclasses e principais fontes de flavonoides.

Subclasses de Flavonoides	Exemplos	Presença nos alimentos
Flavonóis	Quercetina, Mircetina, Rutina, Campferol	Vegetais, maioria dos frutos.
Flavonas	Luteolina, Apigenina	Especiarias, cereais, frutos.
Flavanonas	Hesperidina, Naringenina	Frutos cítricos.
Flavanas	Catequina, Epicatequina, Teaflavina	Chás, uvas, e vinho tinto.
Isoflavonoides	Daidzeína, Genisteína	Maioria dos legumes, principalmente soja.
Antocianinas	Cianidina, Delphinidina, Peonidina	Frutos Vermelhos

Fonte: Adaptado de Beecher, 2003.

2.4.3 Taninos

Taninos são metabólitos secundários de alto peso molecular, oriundos do metabolismo de plantas. Sua presença em plantas está relacionada a mecanismos de defesa a ataques de insetos. Estão presentes em quantidades consideráveis nos vacúolos das células das plantas, como também em depósitos na epiderme das folhas. Este grupo de polifenóis pode ser subdividido de acordo com suas fórmulas estruturais e propriedades químicas, em dois grupos, sendo estes os taninos condensados e hidrolisáveis (COSTA *et al.*, 2008).

Os taninos condensados são uma classe dos polifenóis, cuja estrutura básica é composta de um flavan-3-ol (Figura 4), que dispõe de duas formas de arranjos do grupo hidroxila substituinte (2,3-trans e 2,3-cis), dando origem a dois monômeros

principais, a (+) - catequina e a (-) - epicatequina, que formam misturas de oligômeros com polímeros, após a etapa de polimerização (YANG *et al.*, 2021).

As proantocianidinas, que integram o grupo de taninos condensados, têm a capacidade de se complexar com metais e proteínas de forma estável, resultando na adstringência comum de alguns frutos (VÁZQUEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2011). Frutos conhecidamente adstringentes dispõem de taninos solúveis em altas concentrações até o estágio de maturação. Quando maduros, prevalece o sabor adocicado, ao passo que os taninos caem a baixos níveis (LI; DU; MA, 2011).

Dentre as principais atividades biológicas dos taninos, estão a ação contra bactérias, protozoários e regeneração tecidual. Para tanto, a dose, o tipo ingerido e o período de ingestão são determinantes. A ação antibacteriana se dá por complexação com íons metálicos; pelo eficiente combate a radicais livres e pela capacidade de formar complexos com outras moléculas, como proteínas e polissacarídeos. Na regeneração tecidual, formam um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo sobre a região que sofreu a injúria, viabilizando a recuperação do tecido de forma natural (MELLO & SANTOS, 2001).

Os taninos que são quebrados em carboidratos e ácido fenólico após hidrólise são denominados hidrolisáveis. A estrutura base deste grupo de taninos é um poliol, geralmente a D-glucose, juntamente com grupos hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico ou pelo ácido hexadiidroxifênico, mediante ligações éster-carboxila (Figura 5) e que são facilmente hidrolisáveis em meio ácido ou básico. É possível caracterizar os taninos hidrolisáveis, levando em conta seu produto de hidrólise, sendo os galotaninos, os que produzem ácido gálico, e os elagitaninos, que resultam em ácido elágico. Ao compará-los com os taninos condensados, verifica-se menor incidência deste polifenol em madeiras. As fontes com maiores concentrações de taninos hidrolisáveis são folhas, frutos e vagens de dicotiledôneas (COSTA *et al.*, 2008).

Em se tratando da síntese e a diversidade de taninos em plantas, alguns fatores como o manejo, o tecido, espécie vegetal e condições ambientais, influem diretamente. É comum uma maior disponibilidade de taninos em espécies que se desenvolvem bem em solos pobres, que dispõem de pouco cálcio e magnésio, típicos de regiões tropicais e subtropicais (HEIL *et al.*, 2002).

Avaliando questões ambientais, as porções da planta que têm mais exposição à luz solar são as que mais produzem este biocomposto, indicando que a síntese de taninos está diretamente relacionada com processos fotossintéticos (COSTA *et al.*, 2008).

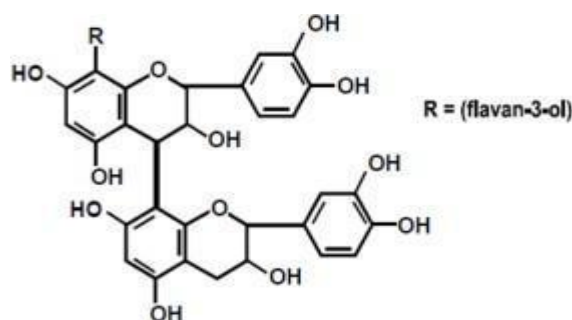


Figura 4. Estrutura química de um tanino condensado. Fonte: LEKHA & LONSANE, 1997.

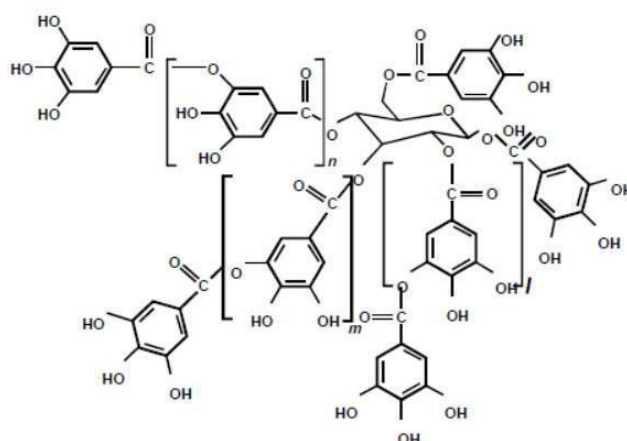


Figura 5. Estrutura química de um tanino hidrolisável. Fonte: NAKAMURA *et al.*, 2003.

2.4.4 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também denominado vitamina C, é um biocomposto suprido através da alimentação pelo organismo humano, que é incapaz de sintetizá-lo por mecanismos endógenos. São compostos orgânicos de baixo peso molecular e valor energético e, mesmo agindo em pequenas doses, têm o importante papel de auxiliar no crescimento, manutenção da vida e da reprodução dos animais superiores e de seres humanos (ARANHA *et al.*, 2000).

Atua na regeneração dos tecidos musculares, epidérmico, dentário e ósseo, na síntese de colágeno, equilíbrio da temperatura do corpo, síntese de hormônios e no metabolismo. Deficiências desse biocomposto podem culminar em graves doenças, como o escorbuto, enquanto a superdosagem pode desencadear diarreia, desconforto abdominal e cálculo renal, sobretudo em indivíduos com predisposição genética. A necessidade diária de vitamina C varia conforme idade e condições de saúde (ANDRADE *et al.*, 2002). De acordo com a Anvisa, a recomendação diária para

adultos é de 45 mg/dia (ANVISA, 2005). As frutas frescas, em especial as cítricas, estão entre as principais fontes de vitamina C (ANDRADE *et al.*, 2002).

Grande parte dos compostos antioxidantes encontrados em frutas cítricas é constituída por ácido ascórbico e compostos fenólicos, como os flavonoides. A proteção oferecida pelo ácido ascórbico se dá controlando a oxidação no meio aquoso da célula, em função de sua elevada capacidade redutora. Enquanto polifenóis têm a habilidade de neutralizar moléculas reativas como os radicais livres (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

O ácido ascórbico tem aspecto cristalino, com sabor acidificado. A solubilidade em água se dá na proporção de 1 g para 3 mL, enquanto é insolúvel em inúmeros solventes orgânicos. Sua oxidação pode ser antecipada quando exposto à altas temperaturas, ao ar e a meio alcalino, sobretudo se houver contato com o cobre, o ferro ou enzimas oxidativas, em se tratando de alimentos. No organismo humano, age nas duas vertentes da reação de oxirredução, ora adicionando, ora subtraindo átomos de hidrogênio de uma molécula. Ao oxidar-se, é convertido em ácido desidroascórbico (Figura 6), ação desencadeada por agentes oxidantes, que retiram dois de seus átomos de hidrogênio. Da mesma forma, quando por redução, ganha novamente os dois átomos de hidrogênios perdidos e volta à forma de ácido ascórbico (ARANHA *et al.*, 2000).

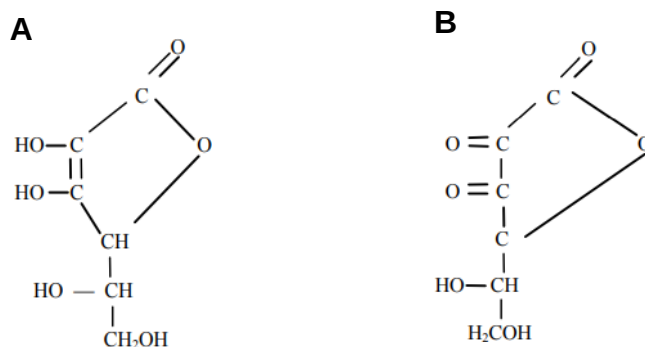


Figura 6. Fórmula estrutural do Ácido ascórbico. A. ácido L-ascórbico; B. ácido L-desidroascórbico. Fonte: BOBBIO; BOBBIO, 1992.

2.4.5 Carotenoides

Nas plantas, os carotenoides são tetraterpenoides (C₄₀) (Figura 7) sintetizados como metabólitos secundários, subdivididos em carotenos (hidrocarbonetos) e xantofilas (moléculas que possuem ao menos uma função oxigênio). Estão presentes nos cloroplastos de todo vegetal verde, na forma de α e β -carotenos, β -criptoxantina,

luteína, zeaxantina, violaxantina e noexantina, ligados de forma não-covalente à proteínas. Têm a função de absorção de luz e fotoproteção contra oxidação no processo fotossintético de plantas, como também podem ser transferidos das plantas para o reino animal, tanto em quantidades expressivas como na gema de ovo ou de forma mais discreta, modificando a cor do leite, derivados lácteos e da gordura corpórea (NORNBERG *et al.*, 2022).

Os carotenoides são biocompostos conhecidos principalmente por sua função de corante natural em alimentos (SENTAMIN; RODRIGUEZ AMAYA, 2007). Fazem parte de um grupo de pigmentos que dão cores a determinados alimentos como gema de ovo, vegetais, determinados peixes e frutos do mar, nas tonalidades amarelas, laranja e vermelho, trazendo maior aceitabilidade para os consumidores (MALDONADE; SCAMPARIN; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Carotenoides apresentam benefícios a nível metabólico, como atividade pró-vitamínica A, imunomodulação, prevenção de doenças degenerativas e cardiovasculares. E tais benefícios estão correlacionados a sua atividade antioxidante, onde moléculas de carotenoides realizam o sequestro do oxigênio singlete, realizando o combate de radicais livres (SENTANIN; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

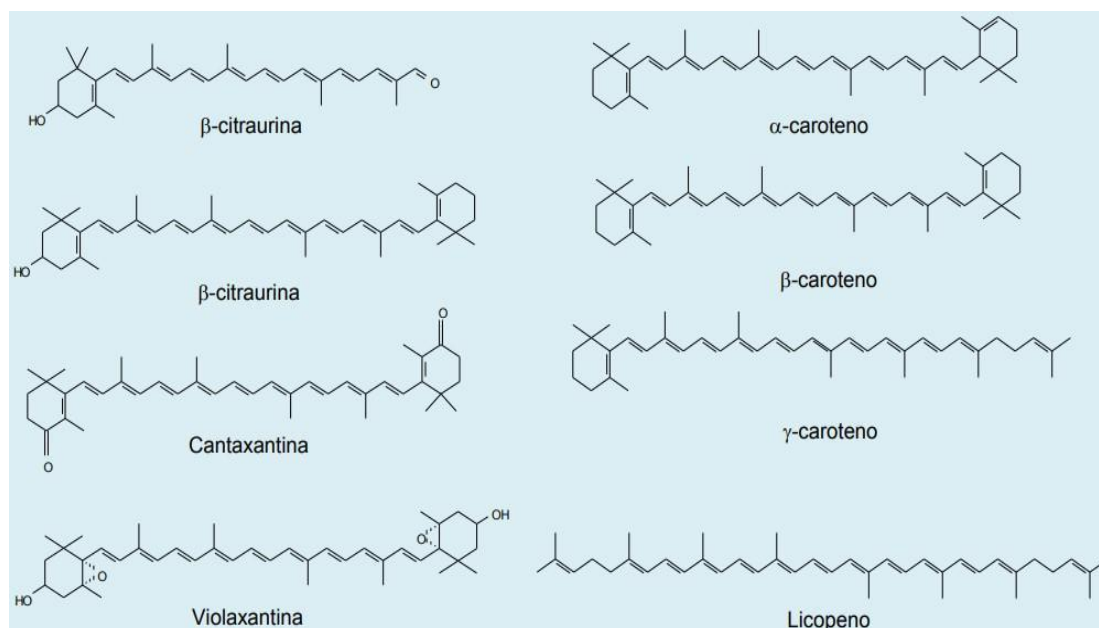


Figura 7. Estruturas de xantofilas à esquerda e de carotenos à direita. Fonte: MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017.

2.4.6. Carboidratos

Os carboidratos são substâncias orgânicas com estruturas químicas que apresentam carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), considerados essenciais aos seres vivos. O termo *carboidrato* designa hidratos de carbono, tendo como fórmula geral $(CH_2O)_n$, onde n é o número de carbonos de sua estrutura molecular. A depender do tamanho de suas estruturas, dividem-se em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Nas membranas plasmáticas das células desempenham função estrutural, atuando como receptores e sinalizadores ao interagirem com moléculas e outras células. Dessa maneira, são encontrados na forma de glicolipídios, ao ligar-se com lipídios, também na forma de glicoproteínas, quando ligados à proteínas ou como proteoglicanos, nos casos de cadeias de glicosaminoglicanos ligadas a uma proteína (DOMINGUES *et al.*, 2022).

As estruturas dos monossacarídeos são denominadas açúcares simples, pelo fato de não poderem ser quebradas em outras menores, motivo pelo qual têm fácil digestão. Os mais comuns são a glicose, a galactose e a frutose. Em se tratando de oligossacarídeos, tais estruturas são compostas por 3 a 10 unidades de monossacarídeos, unidas por ligações glicosídicas, incluindo nesse grupo os dissacarídeos, que apresentam dois monossacarídeos, como a sacarose, maltose e lactose. Por fim, os polissacarídeos, como o amido, a celulose e o glicogênio, cientificamente denominados glicanos, compõem uma cadeia extensa de mais de 10 monossacarídeos, com ou sem ramificações. Devido a sua complexidade estrutural, são lentamente metabolizados no organismo (DOMINGUES *et al.*, 2022).

2.5. Atividade antioxidante

As substâncias antioxidantes têm a capacidade, mesmo que em pequenas concentrações, de interferir no desencadeamento de reações em cadeia de oxidação, onde tem-se a formação de subprodutos tóxicos, a exemplo das cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos e álcoois, desse modo atenuando ou até evitando processos oxidativos (CANNIATTI BRAZACA; ROCHA; SILVA, 2009).

Os antioxidantes subdividem-se em primários e secundários. Há os que apresentam mais de um mecanismo de ação e são denominados antioxidantes de múltipla ação. Os chamados primários ou inibidores, agem basicamente sequestrando radicais livres. Estes, são aceptores de radicais livres, o que os permitem retardar ou mesmo evitar a reação de oxidação. Dentre os antioxidantes naturais presentes em alimentos, estão os tocoferóis e os carotenoides. Ambos são adicionados em

alimentos com finalidades antioxidantes, porém agem por mecanismos distintos (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Os antioxidantes secundários, também chamados preventivos, apresentam mecanismos diversos, entretanto, não têm a capacidade de estabilizar os radicais livres. Agem quelando metais indutores de oxidação, desativando-os; podem restituir hidrogênio para antioxidantes primários; degradar hidroperóxidos a subprodutos não radicais; inativar o oxigênio eletronicamente excitado; absorver a radiação UV ou realizar sequestro de oxigênio. Por auxiliarem na atividade dos antioxidantes primários, são denominados sinergistas e como exemplos destes, pode-se elencar o ácido cítrico, a vitamina C e o ácido tartárico (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Existem metodologias empregadas para avaliar o potencial antioxidante *in vitro*, como forma de selecionar compostos promissores para aplicações diversas, seja em alimentos, fármacos ou cosméticos. O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), baseia-se em reações de transferência de elétrons. O método surgiu como alternativa para avaliar fluidos biológicos e misturas aquosas de compostos puros, podendo ser equiparado a outras metodologias igualmente eficientes (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Na reação por FRAP, ocorre uma complexação de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com Fe (III), de tons amarelados. Em contato com compostos antioxidantes, ocorre a redução do ferro presente, originando o $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de tons azulados a roxo escuro. A análise é realizada em pH de 3,6 e lida em absorbância máxima de 593 nm. A importância do ajuste de pH, tem papel fundamental nos resultados finais, sendo que em meio ácido pode haver a supressão da redução da capacidade, em função da protonação com antioxidantes, ao passo que em meio alcalino, haverá dissociação de prótons de compostos fenólicos, podendo potencializar a capacidade de reduzir uma amostra (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

2.6. Extração de compostos bioativos

A eficiência de uma extração está diretamente ligada a solubilidade da amostra, logo a escolha do solvente tem importante papel neste processo. Não há uma metodologia universal capaz de extrair todos os compostos fenólicos em uma amostra, dessa forma, uma eficaz ferramenta para ajustar esses pontos é a otimização da extração, através da interpolação de solventes ou metodologias

(NACZK; SHAHIDI, 2004). O banho ultrassônico é um grande aliado na diminuição dos solventes orgânicos utilizados, na redução do tempo e consumo de energia, além da otimização na recuperação dos compostos de interesse (ESCLAPEZ *et al.*, 2011).

O banho ultrassônico desencadeia um fenômeno físico, denominado cavitação, que possibilita o aumento e a implosão de cavidades de vapor e gases, facilitando reações químicas e, dessa forma, a extração de compostos. A cavitação se dá a partir de uma série de compressão e expansão, continuamente, que resulta em um ciclo de pressões distintas, com formação de microbolhas, que ao implodirem, promovem pontos de alta temperatura e pressão, facilitando a extração. Logo, equipamentos com maior frequência produzem maior cavitação de bolhas (SUSLICK, 1989).

A energia desse sistema é emitida de forma vertical através de ondas sonoras que partem das paredes da base do banho e vão ao encontro do frasco com amostra e solvente (Figura 8). Tem a vantagem de melhor distribuir a energia através das paredes do vaso de reação, além de não haver necessidade de adaptação específica para o frasco reacional. Entretanto, tem as desvantagens de dificultar a quantificação de energia fornecida para o frasco reacional, considerando o tamanho do banho, o material, espessura e posição do frasco reacional; também o controle limitado da temperatura do sistema, tendo em vista que o equipamento quando usado por tempo estendido, tende a elevar sua temperatura; a temperatura do meio (frasco reacional) é superior a do líquido no banho; e por fim não operam sempre na mesma frequência, pelo fato de cada marca de equipamento produzir frequências já programadas (LINDLEY; MASON, 1987).

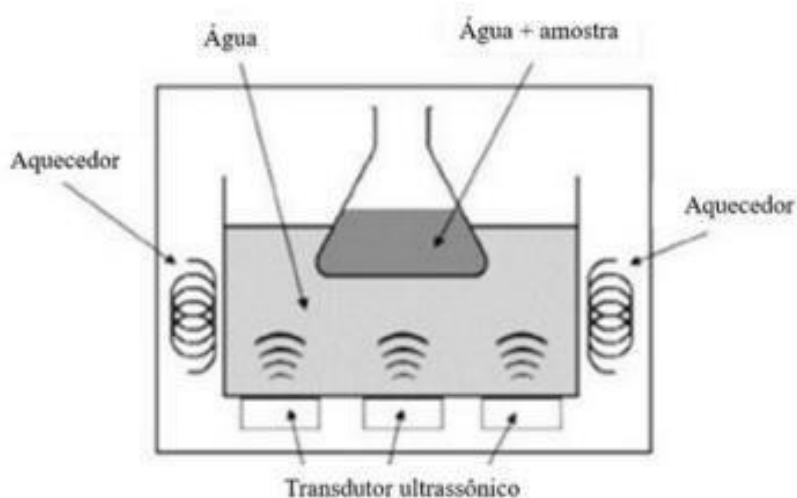


Figura 8. Sistema de banho ultrassônico. Fonte: CHEMAT; ZILLE-HUMA; KHAN, 2011.

2.7. Redes moleculares em espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem sido empregada em diversas áreas nos últimos anos, tal como na área de alimentos. Dentre as vantagens do método destaca-se a alta sensibilidade na detecção de compostos, com reduzida quantidade de amostra, permitindo associar os resultados obtidos com outras técnicas de separação. O método em si, se utiliza de separação por massa e carga para determinar moléculas presentes em amostras. Para tal, as moléculas passam por um processo de ionização, aceleração e, por vezes, através de um considerável campo eletromagnético, sofrem desvio, chegando a um detector em momentos distintos, baseado em sua massa e carga. Ao detectar determinada molécula, ocorre um registro na forma de um pico, do qual se obtém informações químicas da molécula em análise, sendo esse processo chamado de impressão digital em massa de moléculas. O espectrômetro de massas desencadeia a separação dos íons, passando por cinco etapas: sistema de introdução de amostras; fonte de íons; interface; sistema analisador e sistema de detecção de íons (RAMOS *et al.*, 2021).

O conceito de redes moleculares dispõe de uma ferramenta computacional com a finalidade central de facilitar a visualização e interpolação de dados oriundos de espectros complexos. Tais dados são correlacionados por meio de similaridades espectrais, possibilitando a criação de redes moleculares e, por conseguinte, podem auxiliar na identificação de grupos de metabólitos, compostos orgânicos, propriedades químicas e biológicas. Em análises que dispõem de extensos conjuntos de dados, em especial íon fragmento, em espectrometria de massas, a plataforma GNPS é uma eficiente ferramenta. A geração dos dados em questão pode se dar por aquisição dependente de dados (DDA), com a análise de EM^n sendo conduzida pelo isolamento prévio de íons ou, pela aquisição independente de dados (DIA), onde os espectros de EM^n não provém de isolamento preliminar dos íons. A coleção de algoritmos do GNPS rearranja cada espectro relacionado, seja por CLAE-EM (cromatografia líquida de alta eficiência) ou mesmo por EM^n , e os ordena através de um valor similaridade, cujo cálculo se dá pelo valor de cosseno entre espectros obtidos nas amostras e os espectros registrados nos bancos de dados. Logo, criam-se agrupamentos de espectros baseados em um valor predeterminado de cosseno (que varia de 0 a 1, onde 1 indica 100% similaridade ou identidade e 0, totalmente diferentes) (PILON *et al.*, 2021).

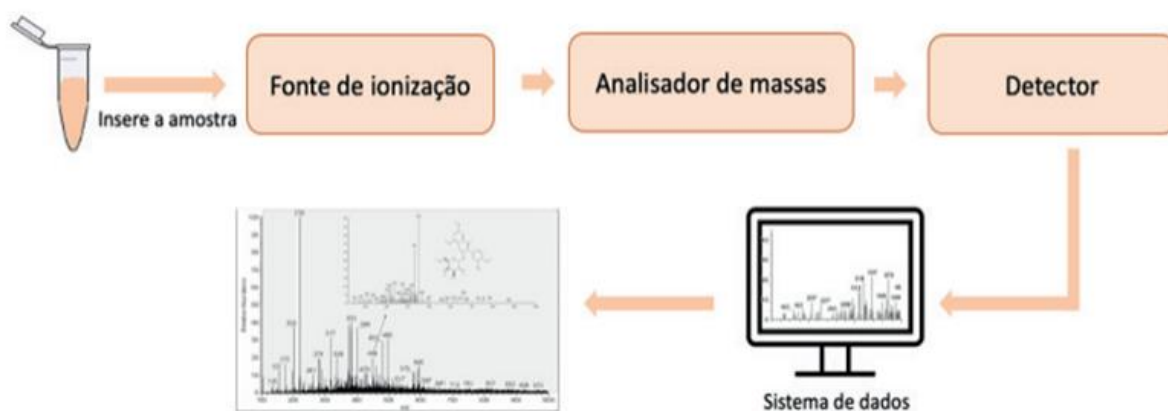


Figura 9. Espectrometria de massas de forma simplificada. Fonte: Ramos *et al.*, 2021.

2.8. Sistemas emulsionados

As emulsões são dispersões coloidais caracterizadas pela presença de mais de uma fase em sua formulação (Figura 9). Essas fases formam um sistema heterogêneo constituído por líquidos imiscíveis, onde se tem uma fase dispersa, interna ou descontínua e uma fase dispersante, externa ou contínua. Para estabilizar esse sistema é imprescindível a presença de emulsificantes, tendo em vista sua instabilidade térmica (ROSÁRIO *et al.*, 2021).

Sistemas emulsionados possuem a fase aquosa, sendo essa a parte polar, e a fase oleosa com menor polaridade. O arranjo dessas fases nas diversas formulações emulsionadas é o responsável por definir modelos diferentes de emulsões. As emulsões óleo em água (O/A) são assim denominadas quando a fase oleosa está dispersa na fase aquosa, entretanto quando a fase aquosa é dispersa na fase oleosa, a emulsão é descrita como sendo do tipo água em óleo (A/O) (ROSÁRIO *et al.*, 2021).

A técnica de homogeneização utilizando sonda ultrassônica é um método inovador, em que se utiliza sondas ultrassônicas para produzir emulsões com tamanhos de gotículas reduzidas, mais finas e estáveis. Além de ser uma técnica limpa, não poluidora e de elevado rendimento energético (SILVA; ROSA; MEIRELES, 2015). No setor alimentício, a sonda ultrassônica é utilizada para aperfeiçoar propriedades organolépticas, assim como a capacidade de retenção de água, o perfil de textura e a estabilidade de géis de leite fermentados (POTOROKO *et al.*, 2018). O emprego de ultrassom de alta intensidade como alternativa à homogeneização, é capaz de diminuir o tamanho de glóbulos de gordura e melhorar a reologia de iogurtes (SFAKIANAKIS; TOPAKAS; TZIA, 2015).

Exemplos de emulsões alimentícias O/A são bastante presentes no cotidiano, como o leite, iogurte, maionese, molho para salada e sorvete, assim como emulsões A/O como a margarina e a manteiga (ROSÁRIO *et al.*, 2021). Além das múltiplas emulsões, podendo ser óleo em água em óleo (O/A/O) ou água em óleo em água (A/O/A) (SCHRAMM, 2005). Ainda existem as emulsões duplas, onde se tem dois tipos diferentes de fase dispersa, sendo as mesmas de natureza igual, porém formando gotas de tamanhos distintos ou as de natureza diferentes, que independe do tamanho de suas gotas (SALAGER, 2000).

A indústria de alimentos possui um grande desafio relacionado à perda de alimentos. Isso se deve, em grande parte, à rancificação ocasionada pela oxidação lipídica que, além de desperdício de produtos, traz prejuízos financeiros. Os prejuízos também podem chegar à saúde humana, já que a oxidação lipídica muitas vezes produz subprodutos tóxicos. A suscetibilidade de emulsões para sofrer oxidação está diretamente relacionada à presença de ácidos graxos poli-insaturados em óleos, e a taxa de oxidação de lipídios é diretamente proporcional ao grau de insaturação (HYATT; ZHANG; AKOH, 2021).

O conhecimento da estabilidade físico-química das emulsões é um fator primordial para que as mesmas possam ser utilizadas nos mais variados segmentos do mercado, como o setor farmacêutico, químico e alimentício, inclusive é necessário determinar para cada aplicação, um período definido para essa estabilidade em questão. A estabilidade de emulsões pode sofrer influência, tanto de fatores internos de reatividade dos ingredientes ativos, excipientes e materiais de embalagem, quanto de fatores externos como calor e umidade, luz, pH (ROSÁRIO *et al.*, 2021).

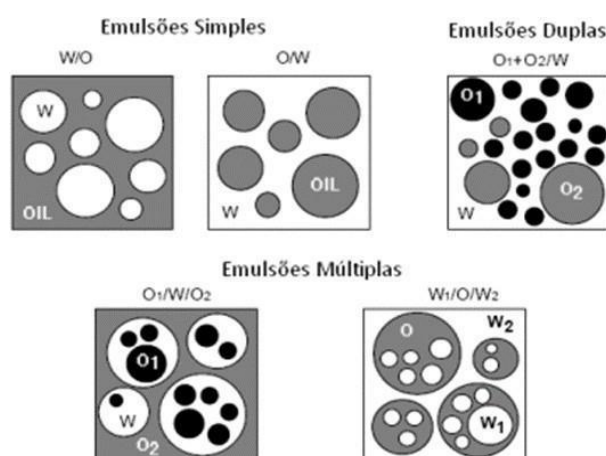


Figura 10. Esquema dos tipos de emulsões existentes. Onde w = água. Fonte: SALAGER, 2000.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste estudo foi extrair compostos antioxidantes, em especial compostos fenólicos, da casca do fruto da *Bromelia balansae* Mez e avaliar seus potenciais antioxidantes em sistemas lipídicos do tipo emulsões.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar a extração de compostos antioxidantes, em especial compostos fenólicos, com relação aos parâmetros tempo e proporção de amostra:solvente;
- Caracterizar os extratos obtidos com relação às concentrações de compostos bioativos (compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos, carotenoides e ácido ascórbico) e carboidratos;
- Avaliar a influência de diferentes locais de colheita e estágios de maturação nas concentrações de compostos bioativos;
- Avaliar a atividade antioxidante utilizando o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos em sistemas emulsionados pelo teste acelerado em estufa a 40 °C e em temperatura ambiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises químicas, físicas e os ensaios experimentais foram realizadas no Laboratório de Química de Alimentos da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP, Campus de Assis - SP.

4.1. Locais de coleta dos frutos

Foram coletados frutos de *Bromelia balansae* Mez em três localidades: Ribeirão das Antas no município de Assis-SP, no município de Tarumã-SP e no campus da Unesp em Assis-SP, colhidos na época de safra de 2020 e 2021. Para efeito de comparação, na localidade do campus da Unesp Assis-SP foram colhidos frutos em duas fases de maturação: maduros e próximos à maturação.

4.2. Material

Os frutos foram separados e selecionados visando eliminar frutos em estágio de deterioração. Posteriormente foram higienizados com água, colocados em uma superfície plana previamente higienizada com álcool etílico 70% para secagem à temperatura ambiente e, por fim, congelados até o momento de serem manuseados. Os frutos foram cortados longitudinalmente de forma manual, separando a casca da polpa e das sementes. As cascas (Figura 11) passaram por um processo de secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 70 °C por 20 horas, foram trituradas em moinho de facas e os pós obtidos foram armazenados em sacos plásticos em dessecador, protegidos da incidência de luz.



Figura 11. Amostras de cascas secas e trituradas de caraguatá: A. Ribeirão das Antas (maduro); B. Tarumã (maduro); C. Campus Unesp (imaturo); D. Campus Unesp (maduro).

Na tabela 2 estão dispostas as classificações climáticas segundo método de Köppen. Segundo Sousa e Brito (2022), a classificação climática de Köppen é a mais conhecida internacionalmente e já está em vigor há mais de um século. A temperatura e os índices pluviométricos são os parâmetros nos quais se baseia o método em questão, classificando mais de trinta tipos climáticos e abrangendo diversas áreas.

Tabela 2. Coordenadas, altitude e classificação climática pelo método de Köppen das regiões de coleta das amostras.

Localidade	Coordenadas	Altitude	Classificação climática
Ribeirão das Antas	22°31'59"S 50°27'36"W	455 m	Subtropical úmido (Cfa)
Tarumã	22°43'24"S 50°35'54"W	464 m	Subtropical úmido (Cfa)
Unesp Assis	22°38'51"S 50°26'18"W	577 m	Subtropical úmido (Cfa)

4.3. Métodos

4.3.1 Obtenção dos extratos

Os extratos antioxidantes foram obtidos em condições otimizadas. Para esta etapa de otimização foram utilizados frutos colhidos em Ribeirão das Antas - SP. Foram estudados os efeitos do tempo e proporção de amostra:solvente (m:v) na concentração de compostos fenólicos totais, utilizando dois métodos de extração: incubadora *shaker* com agitação orbital e banho ultrassônico.

4.3.2 Extração convencional

O processo de extração foi realizado em uma incubadora *shaker* com agitação orbital (Quimis[®]) utilizando temperatura de 35 °C e agitação de 200 rpm com incidência de luz reduzida. Foram testados tempos de extração de 30, 45 e 60 min e proporções de 1:30, 1:65 e 1:100 amostra:solvente. Primeiramente, foi realizada a dispersão da amostra seca em água destilada, onde foi pesado 1,0 g da casca triturada para o volume em mL de solvente pré-determinado. Após o período de extração, os extratos foram filtrados com papel filtro qualitativo e acondicionados sob refrigeração.

4.3.2.1 Extrato seco

A obtenção do extrato seco foi conduzida por secagem em estufa com circulação de ar a 105 °C por 5 horas. Foram realizadas extrações de frutos obtidos de cada localidade com os parâmetros otimizados previamente. Os extratos foram colocados em placas de Petri com peso conhecido e levados à estufa. Após secagem, as placas foram pesadas novamente, e do valor obtido subtraiu-se o peso da placa de Petri vazia, obtendo o peso da matéria seca. O valor obtido de matéria seca foi dividido pelo volume do extrato líquido após filtração, obtendo o rendimento do extrato seco em g/100 mL.

4.3.3. Extração por banho ultrassônico

A extração foi conduzida em banho ultrassônico (modelo USC-1400A), frequência de 40 kHz, em temperatura ambiente, onde foram avaliadas as variações de tempo de 30 e 60 min. A proporção de amostra:solvente foi de 1:30 (m:v), com base nos resultados obtidos na extração convencional, usando água destilada como solvente. Após o período de extração, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo e mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

4.4. Análises de biocompostos

Os extratos obtidos a partir das condições de extração otimizadas foram analisados quanto a:

4.4.1. Compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais se deu por meio de ensaios colorimétricos, como descrito por Singleton e Rossi (1965), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Alíquotas de 0,5 mL de extrato foram misturadas com auxílio de um vórtex em 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 8,0 mL de água destilada. Após 3 min, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 20% com nova agitação em vórtex. Após 60 min de repouso ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis a 765 nm, contra um branco com água destilada substituindo o extrato. Para quantificação de fenólicos totais foi construída uma curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão, em concentrações de 0 a 300 mg/L, com os mesmos procedimentos realizados com o extrato. A equação da

curva foi $y = 0,0051x - 0,015$ com $R^2 = 0,9959$. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de extrato (mg EAG.100mL⁻¹).

4.4.2. Flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi conduzida segundo método espectrofotométrico descrito por Hossain e Rahman (2011). Volumes de 0,5 mL de cada extrato foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL. Aos tubos foram adicionados 0,1 mL de cloreto de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de sódio 1M e 4,3 mL de água destilada (solvente). Foi realizada a agitação em vórtex e logo após os tubos foram deixados em repouso por 30 min ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 425 nm, contra um branco preparado com 0,5 mL de água destilada no lugar dos extratos. O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando uma curva de calibração construída com quercetina como padrão, em concentrações de 0 a 250 mg/mL, seguindo o mesmo procedimento usado para a amostra. A equação da curva foi $y = 0,0039x - 0,007$ com $R^2 = 0,9986$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de quercetina por 100 mL de extrato (mg EQ.100mL⁻¹).

4.4.3. Taninos totais

O teor de taninos do extrato foi determinado pelo método de precipitação com caseína purificada, segundo Genena (2016), com modificações. Primeiramente, foi determinado o teor de fenólicos totais no extrato pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em balão volumétrico de 10 mL procedeu-se a diluição de 3 mL de extrato com água destilada. Em tubos adicionou-se 0,5 mL do extrato diluído e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se em vórtex. Após 3 min, fez-se a adição de 1,0 mL de carbonato de sódio 20% e 8 mL de água destilada. Em paralelo foi preparado um branco com água destilada em substituição ao volume de extrato. Após 1 hora de repouso ao abrigo da luz, realizou-se a leitura de absorbância a 765 nm. Para quantificação de fenólicos totais foi construída uma curva de calibração utilizando ácido tânico como padrão, em concentrações de 0 a 200 mg/L, utilizando os mesmos procedimentos realizados com o extrato. A equação da curva foi $y = 0,0047x + 0,0065$ com $R^2 = 0,9998$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido tânico por 100 mL de extrato (mg EAT.100mL⁻¹).

A determinação de taninos foi realizada pelo método de precipitação com a caseína. Adicionou-se 1,0 g de caseína a 18 mL de extrato. A precipitação com proteína deu-se sob agitação em temperatura ambiente por 3 horas. Após separação do precipitado por filtração em papel filtro qualitativo, seguiu-se a metodologia citada anteriormente para a determinação de compostos fenólicos totais, diluindo na mesma proporção do extrato analisado inicialmente, que não passou pelo processo de precipitação. O teor de taninos foi determinado pela diferença entre o conteúdo de fenólicos totais antes e após a precipitação com a caseína.

4.4.4. Ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico foi determinada pelo método titulométrico de Tillmans, segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). Este método baseia-se na redução do indicador 2,6 Diclorofenol Indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico. A amostra foi preparada, adicionando-se 5,0 mL do extrato em um balão de 50 mL e o volume completado com ácido oxálico 2%. Pipetaram-se 10 mL e transferiu-se para um Erlenmeyer de 125 mL. Essa solução foi titulada com o reagente DCFI 0,02% até a viragem para coloração rósea clara. A solução de DCFI 0,02% foi padronizada com solução padrão de ácido ascórbico 0,02%. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 mL de extrato.

4.4.5. Carotenoides

Os carotenoides totais foram determinados espectrofotometricamente conforme método descrito por Rodríguez-Amaya (1999), com modificações. Aproximadamente 0,15 g de extrato seco obtido a partir de 10 mL de extrato liofilizado foram adicionadas a tubos de ensaio com 10 mL de etanol absoluto e agitados em vórtex por 10 min. Os sólidos foram separados da parte líquida e submetidos à nova extração com 10 mL de etanol absoluto. A mistura resultante foi filtrada em papel filtro e as fases líquidas combinadas e avolumadas com etanol em balão volumétrico de 20 mL. A solução final foi submetida à leitura de absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm e os carotenoides totais calculados utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o β -caroteno em etanol absoluto ($\epsilon = 2620$). Os resultados foram expressos em μg de carotenoides por 100 mL de extrato, utilizando a fórmula:

$$C = \frac{\text{Absorbância} \times V \times 10^6}{\epsilon (\text{etanol}) \times 100 \times g} \quad (1)$$

Onde: v = volume final após as extrações

g = massa de extrato seco

ϵ = coeficiente de absorvidade do β -caroteno em etanol

4.4.6. Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados utilizando o método fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), com modificações. A metodologia baseia-se na desidratação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados pelo ácido sulfúrico, com posterior complexação dos produtos formados com o fenol. Após a desidratação as pentoses formam o furfural, enquanto as hexoses formam o hidroximetilfurfural (HMF).

Alíquotas de 1,0 mL das amostras foram transferidas para tubos de ensaio, onde foram adicionados posteriormente 1,0 mL de fenol 5% e 5,0 mL de ácido sulfúrico. Após homogeneização as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 480 nm. Foi, então, construída uma curva de calibração de D-glucose como padrão nas concentrações de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A equação da curva de calibração foi $y = 0,0094 x + 0,0158$ com $R^2 = 0,9971$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de D-glucose por mL de extrato (mg EG.mL^{-1}).

4.4.7. Poder de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método da redução do ferro (FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*), descrito por Rufino *et al.* (2006). O reagente FRAP foi preparado no dia da análise, por meio de uma mistura na proporção de 10:1:1 de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), solução TPTZ (10 mM de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina em 40 mM HCl) e FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa, respectivamente. Uma alíquota de 90 μL da solução de extrato foi adicionada a 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP e incubada a 37 - 40 °C em banho-maria por 30 min. As absorbâncias foram medidas em seguida a 595 nm contra um branco de reagente FRAP. Para avaliar o potencial de redução do ferro foi construída uma curva padrão utilizando Trolox como padrão, em concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g/L}$, com os mesmos procedimentos realizados com o extrato. A equação da curva foi $y =$

$0,0011 \times + 0,0263$ com $R^2 = 0,9909$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de Trolox por 100 mL de extrato (mg ETR.100mL⁻¹).

4.4.8. Análises LC-MS e MS/MS

Os extratos de cada espécie vegetal foram analisados por espectrometria de massas em um equipamento UFLC-ESI-IT-MS (Bruker, amaZon SL[®]). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando a coluna C18 (Supelco[®] C18, 150 x 4,60 mm, 2,7 µm). O volume de injeção e a vazão aplicados foram 2 µL e 1,00 mL min⁻¹, respectivamente. Para a eluição das amostras, foi empregado um gradiente linear com fase móvel composta de água (solvente A) e metanol, (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, de 5 a 100% (B) durante 40 min. Os seguintes parâmetros foram utilizados no espectrômetro de massas: HV End Plate Offset -500 V, nebulizador 50 psi, gás de secagem (N₂) com fluxo de 10 L min⁻¹ temperatura do capilar de 300 °C e voltagem do capilar de -4500 V. Os espectros (m/z 100-1800) foram registrados a cada 0,2 s. Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) rodando em MSⁿ automático (fragmentação inteligente) usando o modo UltraScan para aquisição de MS/MS e com aumento de energia de colisão usando a amplitude máxima de fragmentação de 60%. Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo e processados no software Data Analysis (versão 4.3, Bruker[®]).

4.4.8.1 Processamento dos dados e construção das redes moleculares (*molecular networking*)

As redes moleculares foram criadas usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do Global Natural Products Social (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Primeiramente, os dados LC-MS/MS foram convertidos para o formato mzML no software MSConvert (ProteoWizard) usando o filtro Peak Picking e então, foram carregados na plataforma GNPS. Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos MS/MS dentro de +/- 17 Da dos íons precursores m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados através da escolha apenas dos 6 íons fragmento superiores na janela +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e a tolerância dos íons fragmento MS/MS para 0,5 Da. Foi, então, criada uma rede onde os nodos foram filtrados para

ter um escore de cosseno acima de 0,7 e mais de 5 picos combinados. Além disso, as arestas entre dois nodos foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nodos aparecesse nos 10 nodos superiores mais similares um do outro. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi fixado em 100, e as arestas com escore mais baixo foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular ficasse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados em relação às bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca tiveram um escore acima de 0,7 e pelo menos 5 picos combinados (WANG *et al.*, 2016). As redes moleculares foram visualizadas usando o software Cytoscape v. 3.7.0 (SHANNON, 2003). As informações sobre as redes moleculares podem ser acessadas publicamente em:

https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=cc7a632fb65243a4b6b5ab5e1d9db71b&view=view_all_annotations_DB. As amostras do branco (injeções da fase móvel) foram analisadas como um grupo separado no GNPS e submetidas à filtragem no software Cytoscape, sendo excluídas das redes moleculares.

4.4.9. Formulação das emulsões

A formulação das emulsões seguiu a metodologia de Huang *et al.* (1996), com modificações. Os componentes da fórmula foram adicionados na proporção de 50%: 45%: 5% (óleo de girassol Gran Oils Brazil[®]: água destilada: tween 20 Vetec[®]). Todos os componentes foram pesados em béquer e previamente misturados com auxílio de um bastão de vidro. Para uma homogeneização efetiva, foi utilizado um homogeneizador ultrassônico (Omni Sonic Ruptor 400[®]) com frequência de 20 kHz, equipado com sonda ultrassônica de comprimento 4,5 cm e 1,2 cm de diâmetro. Cada emulsão foi submetida a uma potência de 200 W por 10 min e em seguida transferida para tubos de ensaio de vidro. Para efeito de comparação, foi preparada uma emulsão com antioxidante sintético BHT (Butil Hidroxitolueno, Êxodo Científica[®]) em substituição ao extrato e uma emulsão controle sem qualquer tipo de antioxidante. As concentrações de antioxidante natural do extrato (compostos fenólicos totais) e sintético (BHT) nas emulsões foram ajustadas para 200 mg.kg⁻¹.

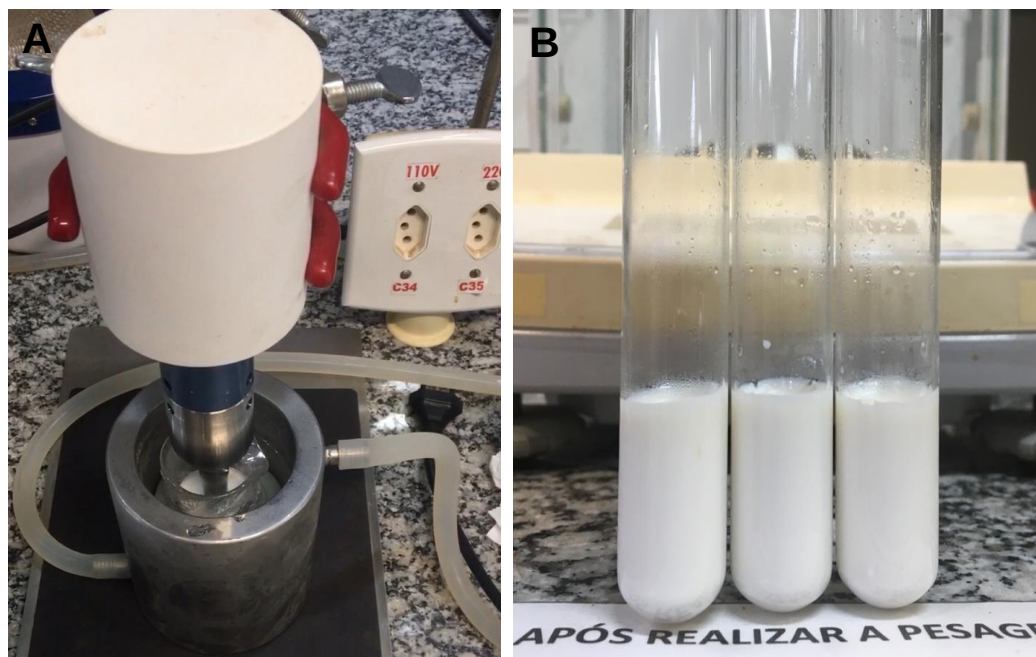


Figura 12. Homogeneização da emulsão por sonda ultrassônica: A. Sonda ultrassônica; B. Emulsão acondicionada em tubos de ensaio.

4.4.9.1. Análise de estabilidade das emulsões durante armazenamento

Imediatamente após o preparo das emulsões, foram transferidos 6 mL de cada tratamento para tubos cilíndricos, selados e estocados em temperatura ambiente (25 °C) e em estufa a 40 °C, por 8 dias. Análises para avaliação da estabilidade das emulsões foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 6 e 8.

4.4.9.2. Índice de cremeação

A estabilidade física em diferentes tempos e temperaturas de armazenamento foi analisada segundo Keowmaneechai e McClements (2002). Para tanto, foi observado se houve separação de fases e foram realizadas medições da fase inferior da emulsão a cada 48h, durante armazenamento à temperatura ambiente e a 40 °C. A estabilidade da emulsão (EE) foi determinada a partir da altura da fase inferior (H) e a altura inicial da emulsão no tubo (H_0), conforme a equação 2.

$$EE (\%) = (H / H_0) \times 100 \quad (2)$$

4.4.9.3. Índice de hidroperóxidos

Para a análise de índice de hidroperóxidos, foi utilizado o método potenciométrico descrito por Kardash-Strochkova *et al.* (2001). Pesou-se 1,0 g de emulsão em um béquer, adicionou-se 30 mL de uma solução de ácido acético:clorofórmio (3:2), e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. A solução foi submetida à agitação magnética até o final da análise. Adicionou-se 50 mL de água deionizada e aferiu-se a voltagem inicial (E'_1) durante 2-3 min, até que estabilizasse o valor. O potenciômetro foi retirado da solução e lavado com água deionizada. Adicionou-se solução padrão de iodo de normalidade e volume de acordo com a tabela 3. Novamente a voltagem foi medida (E'_2) após 2-3 min de estabilização. Foi realizado um ensaio para o branco sem emulsão. Com os resultados obtidos calculou-se o índice de peróxido através da equação 3, com resultado expresso em meqO₂/Kg. As emulsões foram analisadas nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 de armazenamento.

Tabela 3. Tabela para consulta de volume e normalidade de padrão de iodo a ser adicionado na análise potenciométrica de índice de hidroperóxido.

E'_1 , mV	N' , eq. L ⁻¹	V'_p , mL
262 – 282	$1,0 \times 10^{-3}$	0,1 – 1,0
282 – 312	$1,0 \times 10^{-2}$	0,1 – 1,0
312 – 333	0,1	0,1 – 0,5

Onde:

E'_1 – Voltagem da solução de análise, medida após a adição de água;

N' – Concentração da solução de iodo a ser adicionada;

V' – Volume da solução de iodo a ser adicionado.

$$IP = \frac{(1000)}{m} \times \frac{(V'_p \times N'_p)}{(10^{\Delta E'/S} - 1)} - \frac{(V''_p \times N''_p)}{(10^{\Delta E''/S} - 1)} \quad (3)$$

Onde:

m – massa (g)

V'_p e V''_p – volume (mL) adicionado da solução padrão de iodo, na solução de análise e no branco, respectivamente.

$N^{\circ}p$ e $N^{\circ}p$ – normalidade da solução padrão de iodo, adicionado na solução de análise e no branco, respectivamente.

$\Delta E' = E'_2 - E'_1$ e $\Delta E'' = E''_2 - E''_1$ – variação da voltagem final e inicial da solução de análise e do branco, respectivamente.

S - constante = 28,2 mV

4.5. Análise estatística

As determinações analíticas foram expressas como a média $\pm$ desvio padrão de três repetições e comparadas pelo teste de Tukey após análise de variância (ANOVA, com intervalo de confiança de 95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da extração de compostos fenólicos

Visando otimizar a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos utilizando um método de extração simples, foram analisados diferentes parâmetros na extração convencional em *shaker* (Tabela 4), utilizando baixa temperatura e água destilada como solvente. A escolha da água como solvente, foi pensada com o intuito de permitir a aplicação dos extratos em emulsões alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, implicando em baixa toxicidade para a saúde, além de produzir menos impactos ambientais com solventes orgânicos.

Os melhores resultados foram obtidos na proporção 1:30 em tempo de 60 min. Nas proporções de 1:65 e 1:100 o tempo não afetou significativamente o processo de extração. Independente do tempo, a proporção 1:30 apresentou maior concentração em compostos fenólicos.

Tabela 4. Otimização da extração de compostos fenólicos por extração convencional utilizando *shaker*.

Amostra	Tempo (min)	Razão amostra:solvente (g:mL)	Concentração (mg/mL)*
1	30	1:30	0,273 ± 0,003 ^{b **}
2	45	1:30	0,266 ± 0,010 ^b
3	60	1:30	0,285 ± 0,001 ^a
4	30	1:65	0,134 ± 0,002 ^c
5	45	1:65	0,132 ± 0,003 ^c
6	60	1:65	0,141 ± 0,002 ^c
7	30	1:100	0,093 ± 0,001 ^d
8	45	1:100	0,092 ± 0,002 ^d
9	60	1:100	0,100 ± 0,001 ^d

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes indicam que há diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Diante destes resultados, foi realizada uma comparação com a extração ultrassônica utilizando banho na mesma proporção otimizada e nos tempos de extração de 30 e 60 min (Tabela 5). No tempo de 60 min, o resultado obtido não diferiu significativamente dos maiores resultados obtidos por extração convencional, enquanto no tempo de 30 min observou-se um desempenho inferior. Assim, optou-se pela extração convencional nas etapas posteriores do trabalho.

Tabela 5. Comparação da extração de compostos fenólicos totais utilizando banho ultrassônico e *shaker*.

Amostra	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)*
<i>Shaker</i>	30	0,273 ± 0,003 ^{b **}
<i>Shaker</i>	60	0,285 ± 0,001 ^a
Banho	30	0,258 ± 0,002 ^c
Banho	60	0,280 ± 0,006 ^{ab}

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes indicam que há diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Utilizando os parâmetros otimizados para a extração convencional, foram realizadas extrações utilizando amostras de cada localidade, e a partir das mesmas foi realizada a determinação do extrato seco, compostos bioativos e atividade antioxidante (Tabela 6). Foram observadas diferenças significativas entre as localidades e entre os frutos maduros e imaturos.

5.2. Caracterização dos extratos

Na tabela 6 são apresentadas as concentrações de extrato seco, compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos totais, ácido ascórbico, carotenoides, carboidratos e atividade antioxidante (FRAP), nos extratos aquosos da casca de caraguatá colhidos em diferentes localidades.

A secagem de extratos é uma técnica em que um líquido é retirado da superfície ou interior de um material através da evaporação. Apresenta vantagens por aumentar a vida útil, ter baixo custo, facilitar a armazenagem e o transporte dos produtos e concentrar seus componentes químicos. O teor de sólidos no extrato está diretamente ligado à solubilidade entre amostra:solvente no processos extrativos, influenciando na densidade do produto final, fato que pode justificar as diferenças de massa seca entre as quatro amostras deste trabalho, submetidas às mesmas condições (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Como pode ser observado, os extratos da casca madura (EUM) e imatura (EUI) da Unesp, apresentaram os maiores valores de compostos fenólicos totais, seguido de Tarumã (ET) e Ribeirão das Antas (ERA). Diferenças de local de colheita, solo, genótipos, manejo, clima e época de frutificação podem interferir na concentração destes compostos (TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001).

A exposição à radiação solar, atrelada à presença de lipídios, implicam em síntese de radicais livres nas plantas, devido ao estresse gerado. Em resposta, há a formação de metabólitos secundários como os compostos fenólicos e carotenoides (LIMA *et al.*, 2007). As concentrações de compostos fenólicos verificadas neste trabalho foram inferiores às obtidas por Santos *et al.* (2017) em extratos de abacaxi (*Ananas comosus* L.), que foram de aproximadamente 70 mg EAG.100mL⁻¹ (Equivalente de ácido gálico por 100mL de extrato). Silva (2010) obteve em extratos aquosos da casca madura de caraguatá na região de Campo Grande - MS 13 mg EAG.g⁻¹, com extratos obtidos utilizando água destilada na proporção 1:3 m.m⁻¹ fruto:água, agitação em liquidificador por 20 min e posterior filtragem.

Tabela 6. Concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos totais, ácido ascórbico, carotenoides, carboidratos e atividade antioxidante (FRAP) no extrato aquoso da casca do caraguatá colhido em diferentes localidades e diferentes fases de maturação.

	Ribeirão das Antas	Tarumã	Unesp Imaturo	Unesp Maduro
Extrato seco (g.100mL⁻¹)	1,8 ± 0,05 ^{a **}	1,9 ± 0,05 ^a	1,2 ± 0,05 ^c	1,6 ± 0,05 ^b
Compostos Fenólicos (mg EAG.100mL⁻¹)*	29,97 ± 0,12 ^{d **}	39,57 ± 0,12 ^c	47,47 ± 0,64 ^b	53,90 ± 0,50 ^a
Flavonoides (mg EQ.100mL⁻¹)*	7,73 ± 0,06 ^{c **}	7,48 ± 0,25 ^c	8,27 ± 0,12 ^b	8,93 ± 0,05 ^a
Taninos Totais (mg AT.100mL⁻¹)*	3,03 ± 0,40 ^{a **}	1,73 ± 0,12 ^b	3,13 ± 0,38 ^a	2,48 ± 0,50 ^{ab}
Ácido Ascórbico (mg.100mL⁻¹)*	2,90 ± 0,00 ^{b **}	2,43 ± 0,05 ^c	2,93 ± 0,05 ^b	3,33 ± 0,05 ^a
Carotenoides (µg.100mL⁻¹)*	65,93 ± 1,13 ^{c **}	57,23 ± 1,50 ^d	74,07 ± 2,73 ^b	112,47 ± 3,41 ^a
Carboidratos Totais (mg EG.mL⁻¹)*	14,00 ± 1,33 ^{bc **}	17,11 ± 1,02 ^a	13,55 ± 0,39 ^c	17,00 ± 1,53 ^{ab}
FRAP (mg ET.100mL⁻¹)*	131 ± 4,58 ^{d **}	201 ± 2,52 ^c	319 ± 2,65 ^b	373 ± 2,65 ^a

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes nas linhas indicam que há diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

O estágio de maturação também é um fator que influi significativamente nos teores de compostos fenólicos, onde alguns frutos imaturos tendem a apresentar maiores valores (DELVA; GOODRICH-SCHNEIDER, 2013). Tal informação contradiz as concentrações de fenólicos no EUM, o qual apresentou valor significativamente

superior aos demais, inclusive ao EUI. Sugere-se que o aumento na concentração de compostos fenólicos no EUM esteja ligado ao fato de tais compostos serem os principais responsáveis pela cor e sabor dos frutos (KAYS, 1991). Dessa forma, a classe dos compostos fenólicos têm importante função no gosto e odor, assim como, em processos de escurecimento (CARVALHO *et al.*, 2014).

A síntese de flavonoides nos vegetais se dá por meio da via fenilpropanoide, processo catalisado pela enzima fenilalanina amônio-liase. Tal enzima é uma intermediadora entre os metabolismos primário e secundário e, sua intervenção nos vegetais, está correlacionada a altos teores de flavonoides (LILLO *et al.*, 2008).

Kutcham (2001) mostra a importância do nitrogênio do solo na disponibilidade de flavonoides totais das folhas do maracujazeiro Pérola do Cerrado, e como os metabólitos secundários resultam de interações químicas entre os vegetais e o ambiente onde está inserido, sofrendo interferências ambientais. Freitas *et al.* (2007) confirmam a maior presença de flavonoides em folhas mais jovens do maracujazeiro amarelo, as quais tinham maior disponibilidade de nitrogênio, fato que Langenheim *et al.* (1986) afirmaram ocorrer devido as folhas serem mais jovens e estarem mais susceptíveis ao estresse, gerando, conseqüentemente, mais metabólitos.

As maiores concentrações de flavonoides foram verificadas no EUM, possivelmente sob influência do estágio de maturação. Arabbi *et al.* (2004) afirmaram que fatores climáticos, época de plantio e colheita, e grau de maturidade dos frutos na hora da colheita, podem afetar em até 100% a disponibilidade de flavonoides.

Segundo Gliszczynska-Swiglo *et al.* (2007), a luz é um fator que deve ser levado em consideração em se tratando de flavonoides. Essa informação foi observada quando em estudo com a cultura de brócolis, os autores verificaram correlação positiva na concentração de flavonóis com a radiação UV em todas as fases da cultura. Isso pode explicar os menores teores de flavonoides no ET, onde os frutos estão menos expostos ao sol, em função da grande presença de eucaliptos no local. Santos *et al.* (2017) encontraram através de extratos de frutos da família Bromeliaceae, como o abacaxi, valores de aproximadamente 2 mg EEC.100mL⁻¹ (equivalente de epicatequina por 100 mL de extrato).

A síntese de taninos em plantas está diretamente ligada a fatores como espécie, cultivo e condições ambientais. Diante disso, a concentração tende a ser maior em espécies que prosperam em solos pouco férteis, de baixa calagem, comum em regiões tropicais e subtropicais (OTERO; HIDALGO, 2004). E na maioria das espécies, a casca é a parte da planta que apresenta maior concentração de taninos

(UCELLA FILHO *et al.*, 2019). Frutos conhecidamente adstringentes dispõem de taninos solúveis em altas concentrações até o estágio de maturação. Quando maduros, prevalece o sabor adocicado, enquanto a concentração de taninos diminui a baixos níveis (LI; DU; MA, 2011). Os resultados de taninos obtidos no EUI corroboram com a questão do estágio de maturação, já que foi o maior teor encontrado entre os extratos analisados. O solo de Assis é conhecidamente pobre em nutrientes, enquanto Tarumã possui solo mais fértil, de latossolo roxo, o que pode explicar o resultado mais baixo do ET e os resultados mais altos de EUI, EUM e ERA.

De modo geral, à medida que os frutos amadurecem, estes tendem a diminuir sua acidez e seu teor de ácido ascórbico (CARNELOSSI *et al.*, 2004). Aranha (2018) ao analisar extratos de acerola, observou diferenças na concentração de ácido ascórbico entre acerola imatura ($152,2 \text{ mg.g}^{-1}$) e madura ($36,12 \text{ mg.g}^{-1}$). No entanto, Andrade (1991) ressalta que é possível um aumento no teor de ácido ascórbico em frutos maduros. Determinados frutos cítricos e hortaliças podem promover uma retenção ou até mesmo um aumento nas concentrações de ácido ascórbico após a armazenagem. Isso acontece com o aspargo, que aumenta seus teores de ácido ascórbico após dois dias da colheita, se armazenado em temperatura de 4°C (LEE; KADER, 2000).

O EUM apresentou teor de ácido ascórbico superior às demais amostras, inclusive em relação à amostra do mesmo local obtidas a partir de frutos imaturos (EUI). Andrade *et al.* (2002) observaram teores de ácido ascórbico mais elevados em laranjas e acerola nos últimos estágios de maturação.

A composição de carotenoides em frutos também está relacionada com o grau de maturação. No processo de amadurecimento de frutos, a síntese de carotenoides é potencializada, favorecendo não somente a quantidade, mas também a variedade de tal biocomposto, sendo possível a visualização de cores, que dependendo do alimento, vão do amarelo ao vermelho (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). De fato, a síntese de carotenoides é aumentada com o amadurecimento dos vegetais. Entretanto, a concentração de tal composto pode diminuir sob efeito de reações de degradação, quando em estágios avançados, por clivagem enzimática (BORGES *et al.*, 2019). Os EUI e EUM apresentaram os maiores teores de carotenoides, e mesmo sendo estatisticamente iguais, os frutos maduros apresentaram maior concentração do biocomposto em questão. O ET e ERA, embora maduros, apresentaram concentrações menores que o EUI, possivelmente por fatores inerentes às localidades.

A carotenogênese nos vegetais também está ligada a fatores como clima e temperatura local. Temperaturas elevadas somadas à radiação solar contínua podem interferir de duas maneiras nos níveis de carotenoides, aumentando as concentrações ou ocasionando fotodegradação e levando à perda de seu conteúdo (DE AZEVEDO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005). Nenhum dos locais de coleta está exposto à radiação solar durante todo o dia, o que sugere não ter havido perda de conteúdo por fotodegradação. O local de coleta da Unesp tem maior incidência de radiação solar no período da tarde, enquanto as demais localidades, por estarem cercadas de árvores de grande porte, acabam por receberem pouca luz solar e de forma aleatória durante o dia, de acordo com a abertura entre as árvores.

Nos períodos do ano com maior estiagem e baixas temperaturas, os vegetais diminuem ou interrompem seu desenvolvimento como meio de sobrevivência, sendo este chamado período de dormência. Embora reduzidas, as reações metabólicas essenciais nessa fase continuam ocorrendo. A queda de temperaturas é uma condição climática que interfere consideravelmente na dormência de gemas. A fisiologia da planta ao entrar e sair da endodormência, quando o brotamento não depende de condições externas ao vegetal, podem impactar processos, tal como o fluxo de carboidratos e o deslocamento de reservas à curta distância (CARVALHO; ZANETTE, 2005). Em função da semelhança climática das três localidades de coleta, supõe-se que a temperatura não tenha sido fator determinante nos diferentes teores de carboidratos, sendo a fenologia de cada espécie, atrelada ao estágio de maturação, a possível razão para as diferenças encontradas. As concentrações mais elevadas do extrato EUM, em relação ao EUI, reforçam essa influência do amadurecimento do fruto.

No teste FRAP, o EUM apresentou a maior atividade antioxidante, diferindo estatisticamente dos demais. O resultado corrobora com os resultados de compostos bioativos encontrados, onde o extrato em questão apresentou os maiores teores de compostos bioativos, com exceção de taninos totais. Levando em consideração os teores de biocompostos e atividade antioxidante obtidas, selecionou-se o extrato EUM para aplicação em sistema lipídico.

5.3. Análises LC-MS e MS/MS

Os dados analisados na plataforma GNPS para os extratos de caraguatá geraram uma rede molecular com 67 íons precursores representados como nodos, que foram agrupados em 14 clusters de acordo com a sua similaridade química

(escore cosseno) (Figura 13). A análise do padrão de fragmentação dos íons das moléculas protonadas de acordo com dados da literatura permitiu anotar 15 substâncias nos extratos aquosos de caraguatá.

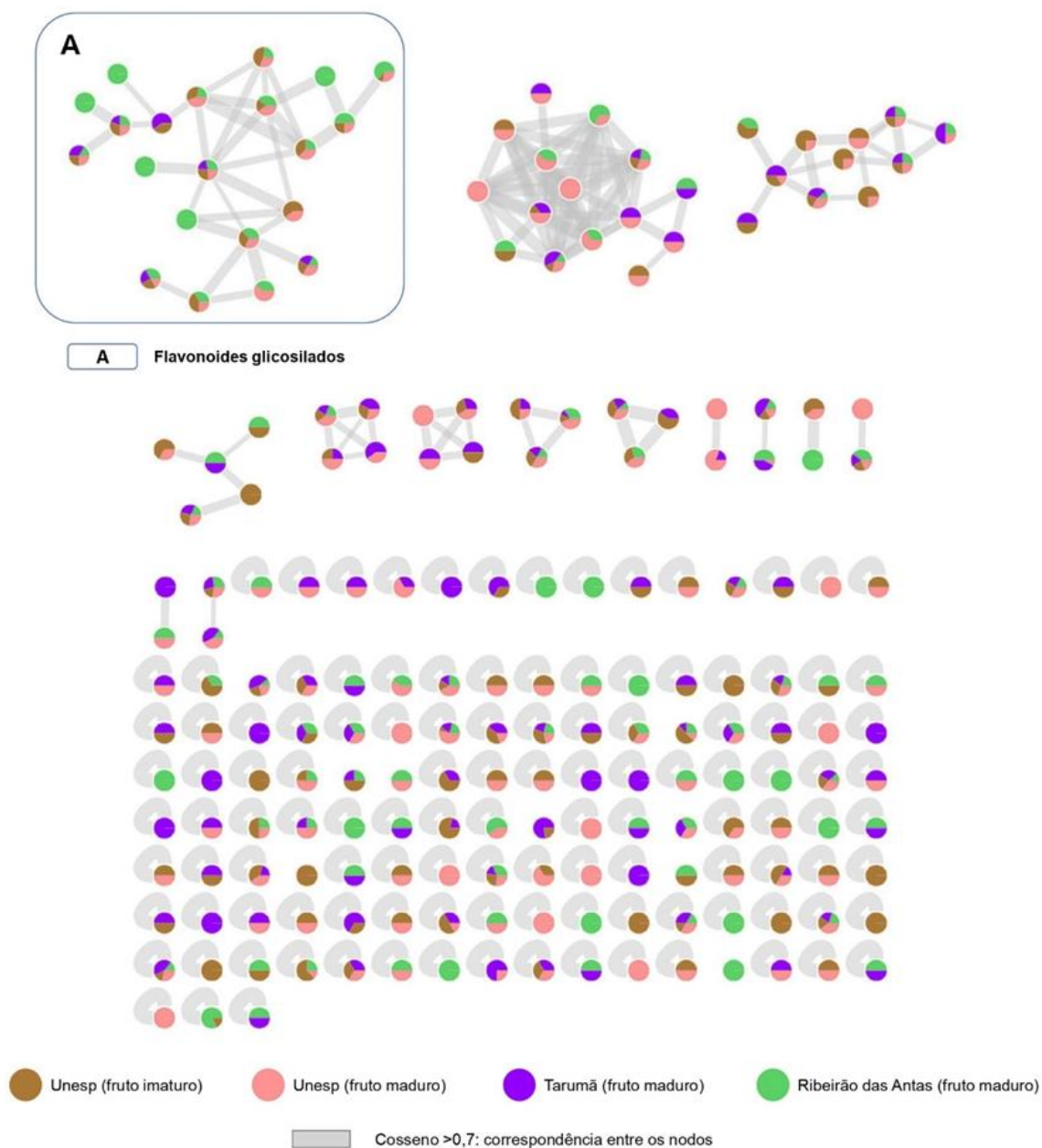


Figura 13. Cluster de acordo com as similaridades químicas dos compostos. Fonte: CEMMO USP Ribeirão Preto-SP, 2023.

As redes moleculares foram formadas de acordo com os íons precursores e as perdas neutras características de cada classe, e revelou que esses extratos aquosos possuem metabólitos secundários, sendo identificados principalmente os flavonoides glicosilados (Tabela 7) e alguns representados na figura 14. Tais resultados sugerem que a maior atividade antioxidante do EUM no método FRAP esteja ligada à presença

dos onze flavonoides glicosilados identificados na amostra dessa localidade. No ET foi possível identificar seis flavonoides glicosilados, resultado que pode estar relacionado ao menor teor de flavonoides na análise quantitativa por complexação com alumínio.

Tabela 7. Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos aquosos de caraguatá, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas.

Nº	T _R (min)	Aduto [M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS/MS (m/z)	Substância	Amostra	Referência/Base de dados *
1	3,21	361	325, 343, 269	Sacarose	ERA, EUM	WANG <i>et al.</i> , 2016
2	8,45	579	433, 287	Kaempferitrina	ERA, ET, EUI, EUM	WANG <i>et al.</i> , 2016; DEL REY <i>et al.</i> , 2018
3	16,95	741	595, 433, 287	Kaempferol 3-O- (ramnopiranosil)- galactopiranosídeo	ERA, EUI, EUM	MURAKAMI <i>et al.</i> , 2000; WANG <i>et al.</i> , 2016
4	17,41	465	303	Isoquercitrina	ERA	PERES <i>et al.</i> , 2013; NEGRI; SANTI; TABACH, 2013 KIM <i>et al.</i> , 2013; NEGRI; SANTI; TABACH, 2013; FARIAS; MENDEZ, 2014; PONTES, 2022
5	17,45	611	465, 303	Quercetina 3-O- hexose	ERA, EUI, EUM	FARIAS; MENDEZ, 2014; PONTES, 2022
6	17,85	477	315	Cirsimarina	ET, EUI	ZHANG <i>et al.</i> , 2021
7	18,01	595	449, 287	Kaempferol-3- rutinosídeo	ERA, ET, EUI, EUM	FARIAS; MENDEZ, 2014
8	18,08	433	415, 287	Kaempferol-7-O- ramnosídeo	EUM	WANG <i>et al.</i> , 2016
9	19,01	625	479, 317	Isoramnetina 3- glicosídeo 7- ramnosídeo	ERA	RUTZ <i>et al.</i> , 2022
10	19,06	449	287	Cianidina 3-O- glicosídeo	ERA, EUI, EUM	KAJDŽANOSKA; GJAMOVSKI; STEFOVA, 2010; KIM <i>et al.</i> , 2013
11	19,56	535	287	Kaempferol O- (malonil)-hexose	ERA, EUI, EUM	KIM <i>et al.</i> , 2013; RUTZ <i>et al.</i> , 2022
12	21,61	431	311	Apigenina-C- hexose	ERA, ET, EUI, EUM	KIM <i>et al.</i> , 2013
13	21,91	433	287	Kaempferol-3-O- ramnosídeo	ERA, ET, EUI, EUM	NEGRI; SANTI; TABACH, 2013
14	33,11	595	309, 287, 147	Kaempferol- cumaroil-hexose	ERA, ET, EUI, EUM	KIM <i>et al.</i> , 2013
15	35,37	551	303	Quercetina 3-O- (malonil)- glicosídeo	ERA, EUI, EUM	DNP, 2013; RUTZ <i>et al.</i> , 2022; PONTES <i>et al.</i> , 2022

* Base de dados: GNPS (WANG *et al.*, 2016); Dicionário de Produtos Naturais (DNP, 2013); LOTUS (RUTZ *et al.*, 2022).

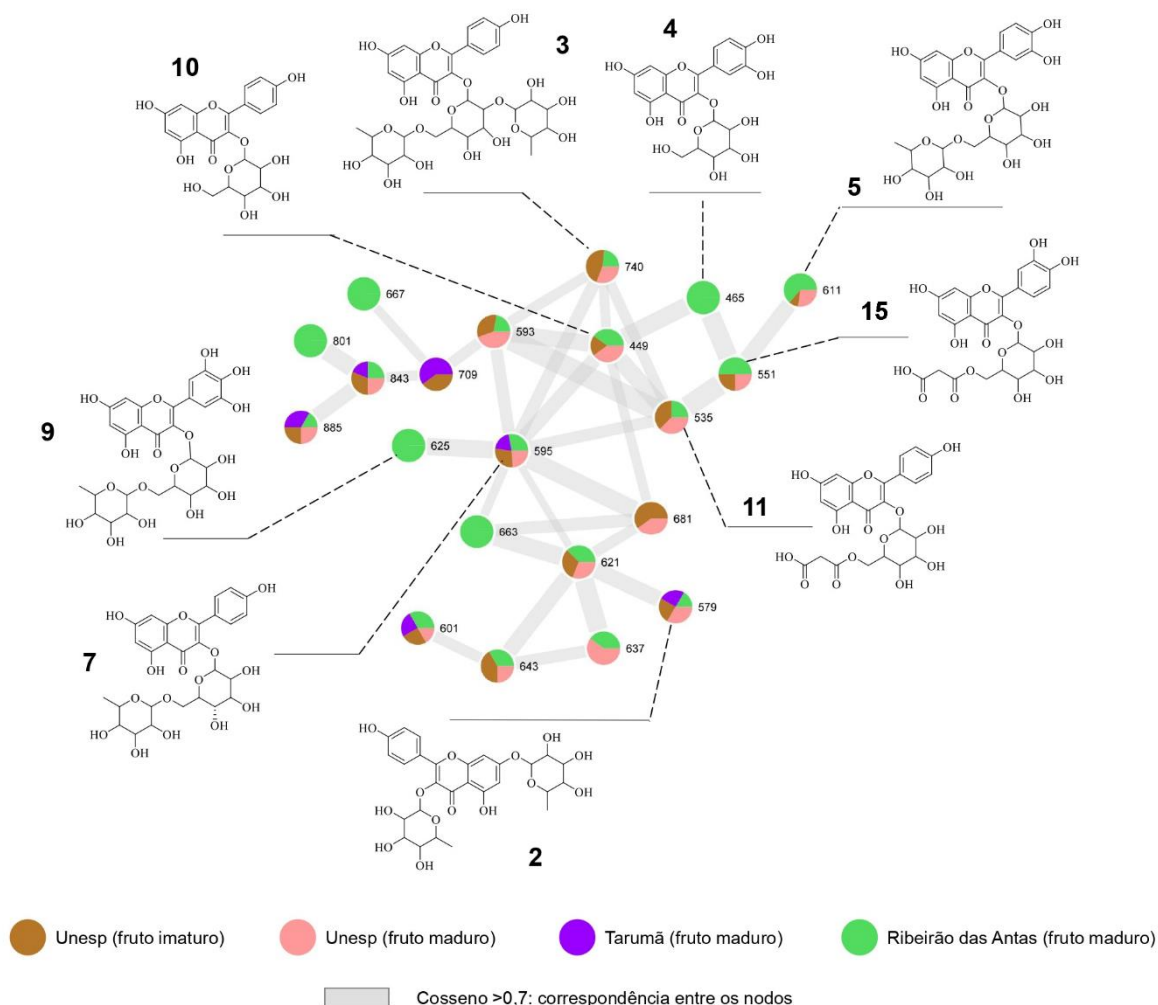


Figura 14. Cluster dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos. Fonte: CEMMO USP Ribeirão Preto-SP, 2023.

Os flavonoides glicosilados estão entre as principais classes de substâncias encontradas nos extratos aquosos de caraguatá e foram agrupados em um mesmo cluster da rede molecular. Para a proposição de cada uma das estruturas, os dados foram confrontados com os fragmentos (m/z) descritos por estudos de identificação química correspondente de cada composto, como mostrado na tabela 7.

Assim, os íons precursores dessa classe de substância em m/z 579 $[M+H]^+$ (2), m/z 741 $[M+H]^+$ (3), m/z 595 $[M+H]^+$ (7, 14), m/z 433 $[M+H]^+$ (8, 13) e m/z 535 $[M+H]^+$ (11) foram agrupados devido à fragmentações características relacionadas à perda do glicosídeo, e que resultaram na formação dos íons em m/z 287, esses íons produto formados puderam ser atribuídos à aglicona do Kaempferol. Já os íons precursores

m/z 465 $[M+H]^+$ (4), m/z 611 $[M+H]^+$ (5) e m/z 551 $[M+H]^+$ (15) também foram agrupados devido a fragmentações características relacionadas à perda do glicosídeo, e que resultaram na formação dos íons em m/z 303, no qual o íon produto formado pode ser atribuído à aglicona da Quercetina. Outros íons precursores m/z 477 $[M+H]^+$ (6), m/z 625 $[M+H]^+$ (9), m/z 449 $[M+H]^+$ (10), m/z 431 $[M+H]^+$ (12) não agruparam entre si, mas a formação dos seus respectivos fragmentos foram atribuídos à perda também de glicosídeos, formando m/z 315, m/z 317, m/z 287, m/z 311 característicos de outros derivados fenólicos.

O glicosídeo foi estabelecido pelo padrão de clivagem da ligação O-glicosídica com o rearranjo dos átomos de hidrogênio do grupo hidroxila da unidade de sacarídeo seguida da eliminação do monossacarídeo com perdas de 146 Da (deoxihexose) seguida de 162 Da (hexose) (VUKICS; GUTTMAN, 2010). Dito isso, foi possível anotar os flavonoides: Kaempferol 3-O-(ramnopiranosil)- galactopiranosídeo (3); Quercetina 3-O-hexose (5); Kaempferol-3-rutinosídeo (7); e Isoramnetina 3-glicosídeo-7-ramnosídeo (9). Perdas sucessivas de 146 Da (deoxihexose) permitiram a anotação de Kaempferitrina (2); Kaempferol-7-O-ramnosídeo (8); Kaempferol-3-O-ramnosídeo (13). Já a perda única de 162 Da, permitiram a anotação de Isoquercitrina (4); Cirsimarina (6); Cianidina 3-O-glicosídeo (10). Kaempferol O-(malonil)-hexose (11), Quercetina 3-O-(malonil)-glicosídeo tiveram perdas de 162 Da e 86 Da, este último atribuído ao resíduo de malonil, além da perda de 162 Da o composto anotado Kaempferol-cumaroil-hexose (14) houve a perda de 146 Da, atribuído ao resíduo cumaroil.

5.4. Estabilidade física das emulsões

5.4.1. Índice de cremeação em diferentes tempos de armazenamento

Emulsões óleo/água são assim denominadas por apresentarem pequenas gotículas de óleo dispersas em meio aquoso, onde as gotículas estão envoltas por moléculas de emulsificantes, responsáveis por diminuir a tensão interfacial e promover uma eficiente dispersão das fases ao longo tempo. A facilidade e o baixo custo são vantagens deste sistema, porém são instáveis quando submetidas a aquecimento, resfriamento, congelamento, secagem, pH extremos e altas concentrações de minerais (BAKRY *et al.*, 2016). Nas tabelas 8 e 9 estão apresentadas as porcentagens

de estabilidade das emulsões no decorrer de 8 dias, em temperatura ambiente e por teste acelerado em estufa a 40 °C.

Tabela 8. Estabilidade das emulsões em temperatura ambiente durante 8 dias de armazenamento.

EE (%) [*]			
Dia	Controle	BHT	Extrato
0	100,0 ± 0,000 aA ^{**}	100,0 ± 0,000 aA	100,0 ± 0,000 aA
2	96,7 ± 0,057 bB	96,7 ± 0,000 bB	100,0 ± 0,000 aA
4	93,2 ± 0,115 cC	96,7 ± 0,057 bB	100,0 ± 0,000 aA
6	93,2 ± 0,115 cC	96,7 ± 0,057 bB	100,0 ± 0,000 aA
8	93,2 ± 0,115 cB	93,3 ± 0,000 cB	100,0 ± 0,000 aA

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, indicam que há diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

Tabela 9. Estabilidade das emulsões a 40 °C durante 8 dias de armazenamento.

EE (%) [*]			
Dia	Controle	BHT	Extrato
0	100,0 ± 0,000 aA ^{**}	100,0 ± 0,000 aA	100,0 ± 0,000 aA
2	96,8 ± 0,057 bB	96,9 ± 0,057 bB	100,0 ± 0,000 aA
4	93,7 ± 0,115 cB	93,7 ± 0,173 cB	100,0 ± 0,000 aA
6	93,7 ± 0,115 cB	93,7 ± 0,173 cB	100,0 ± 0,000 aA
8	93,7 ± 0,115 cB	93,7 ± 0,173 cB	100,0 ± 0,000 aA

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, indicam que há diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

Nas duas condições de temperatura em que foram analisadas as emulsões, o tratamento com extrato de caraguatá foi o único a não apresentar cremeação, apresentando diferença estatística dos demais tratamentos a partir do 2º dia de análise. A estabilidade física, neste caso, pode estar ligada ao fato de tal emulsão ter, aparentemente, ficado mais espessa quando comparada aos outros tratamentos, o que pode ser justificado pelo elevado teor de carboidratos observado nos extratos.

As emulsões controle e o tratamento com BHT apresentaram variação estatística significativa a partir do 2º dia de análise. As emulsões com BHT mantiveram o mesmo índice de cremeação até o 6º dia de análise, enquanto as emulsões controle tiveram um aumento da cremeação no 4º dia. No 8º dia, o tratamento com BHT teve um aumento de cremeação e tornou-se estatisticamente igual ao controle.

No teste acelerado em estufa, os tratamentos controle e BHT também apresentaram variação no índice de cremeação no 2º dia, mantendo-se estáveis até o 8º dia de análise.

Na comparação das temperaturas ao final dos 8 dias de armazenamento, as emulsões apresentaram comportamentos similares, com índices de cremeação semelhantes, sendo a emulsão com a presença do extrato mais estável que as demais. Independente da temperatura, as principais alterações na estabilidade das emulsões controle e BHT ocorreram no início do período de armazenamento.

5.4.2. Estabilidade oxidativa das emulsões

O efeito de antioxidantes polares naturais do extrato aquoso de caraguatá em comparação ao antioxidante sintético mais apolar (BHT), reafirma o paradoxo polar, onde há uma predisposição de um antioxidante polar ser mais eficaz em meios mais apolares, enquanto antioxidantes apolares tendem a ser mais efetivos em meios mais polares como no caso de emulsões óleo em água (O/A). A teoria do paradoxo polar afirma que o antioxidante polar teria um melhor desempenho em meios apolares, como óleo puro, pelo fato de ficar alocado na interface óleo puro/ar, local onde geralmente ocorrem processos oxidativos, vindo a inibir tal reação. No caso de antioxidantes apolares, o melhor desempenho em emulsões, se explica por ficarem localizados na interface óleo/água, promovendo uma proteção às micelas contra oxidação (LAGUERRE *et al.*, 2015). Nas tabelas 10 e 11 e nas figuras 15 e 16 estão

dispostos os resultados obtidos de hidroperóxidos analisados nas emulsões, com diferentes tratamentos e faixas de temperatura.

Tabela 10. Índice de hidroperóxidos de emulsões analisadas em temperatura ambiente durante 8 dias de armazenamento.

Índice de hidroperóxidos (meq O ₂ /Kg)			
Dia	Controle	BHT	Extrato
0	0,848 ± 0,115 dA	0,848 ± 0,115 bA	0,848 ± 0,115 dA
2	0,915 ± 0,000 dA	0,915 ± 0,000 abA	1,016 ± 0,174 dA
4	1,217 ± 0,000 cB	1,116 ± 0,174 abB	1,737 ± 0,000 cA
6	1,217 ± 0,000 cB	1,116 ± 0,174 abB	2,588 ± 0,328 bA
8	1,475 ± 0,095 bB	1,375 ± 0,183 aB	2,569 ± 0,000 bA

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, indicam que há diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

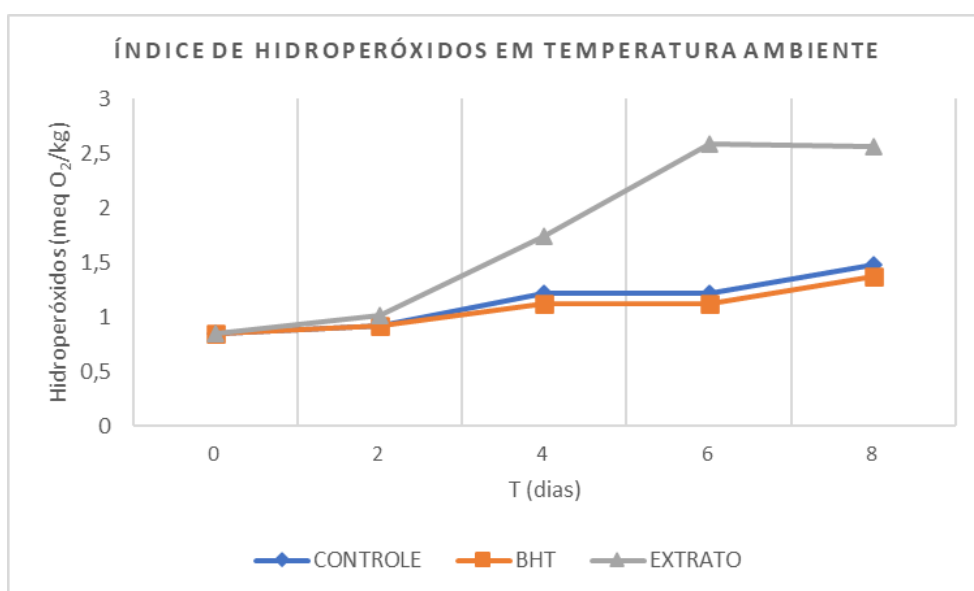


Gráfico 1. Resultados dos tratamentos em temperatura ambiente.

Tabela 11. Índice de hidroperóxidos de emulsões analisadas a 40 °C durante 8 dias de armazenamento.

Índice de hidroperóxidos (meq O ₂ /Kg)			
Dia	Controle	BHT	Extrato
0	1,118 ± 0,172 ^{cAB}	0,851 ± 0,118 ^{dB}	1,217 ± 0,000 ^{dA}
2	1,564 ± 0,300 ^{cA}	1,050 ± 0,290 ^{cdA}	1,741 ± 0,527 ^{cdA}
4	2,734 ± 0,000 ^{bcAB}	1,737 ± 0,000 ^{bcB}	3,717 ± 0,913 ^{bcA}
6	4,945 ± 1,318 ^{abA}	2,402 ± 0,576 ^{abB}	5,701 ± 0,622 ^{abA}
8	6,348 ± 1,306 ^{aA}	2,734 ± 0,000 ^{aB}	6,169 ± 1,433 ^{aA}

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

**Letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, indicam que há diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

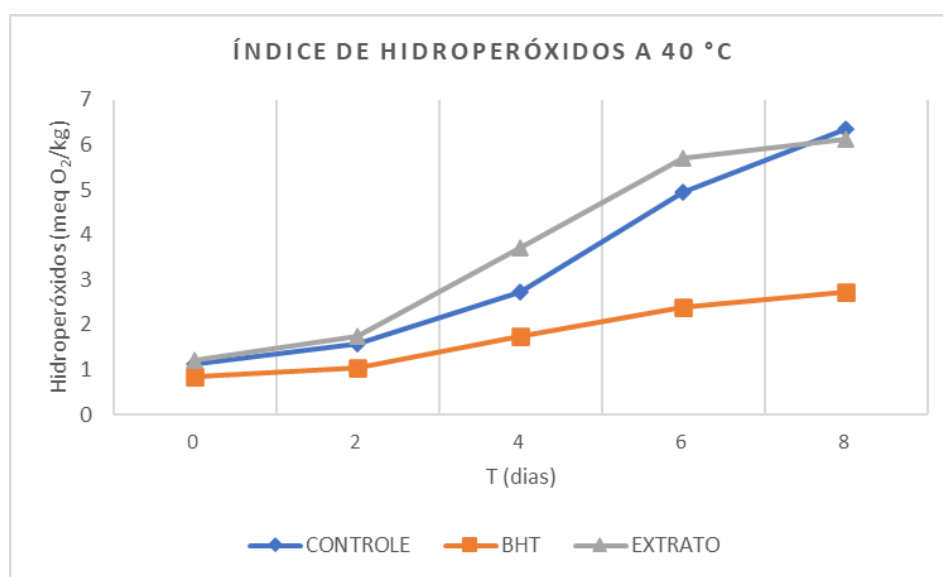


Gráfico 2. Resultados dos tratamentos a 40 °C

As emulsões analisadas em temperatura ambiente e por teste acelerado em estufa, demonstraram baixos valores de hidroperóxidos, que aumentaram gradualmente no decorrer dos dias, porém com diferenças estatísticas entre os tratamentos. Como observado na aplicação em temperatura ambiente, o controle e tratamento BHT não diferiram estatisticamente no período analisado, enquanto o tratamento com extrato evidenciou vulnerabilidade de tal emulsão, sugerindo que o

extrato acelerou a oxidação, possivelmente por questões inerentes a sua interação com o sistema.

No teste acelerado em estufa a 40 °C foi possível concluir que o extrato, nas condições em que foi aplicado, de fato não foi capaz de retardar processos oxidativos na emulsão. Sob efeito de aquecimento, o tratamento com BHT teve seu efeito protetor evidenciado, diferindo significativamente do controle e do tratamento com extrato, ambos iguais estatisticamente. Aranha (2018) observou elevada taxa de oxidação em emulsões O/A adicionadas de extratos aquosos de acerola em teste acelerado em estufa a 40 °C, igualando-se ao tratamento controle. Enquanto a aplicação do mesmo extrato de acerola que passou por processo de microencapsulação com goma arábica e maltodextrina, em diferentes combinações e concentrações, se igualaram ao tratamento com antioxidante sintético TBHQ (Terc-Butil-Hidroquinona).

A atividade antioxidante de compostos demonstrada em testes *in vitro*, muitas vezes, não se relaciona com a atividade do mesmo composto quando aplicado em testes acelerados em sistemas emulsionados. A forma com que os antioxidantes interagem no meio reacional está diretamente ligada a suas estruturas, sofrendo ainda, interferência de outros compostos presentes no extrato. Ban *et al.* (2016) relatam que testes *in vitro* são eficientes para demonstrar ações antioxidantes preliminares, não sendo capazes de indicar com exatidão o desempenho de compostos *in vivo*, em função de fatores que comprometem seu desempenho, como a solubilidade dos componentes nos sistemas de alimentos, concentração dos componentes nas áreas suscetíveis a processos oxidativos, compatibilidade e estabilidade química, intensidade de exposição à luz e oxigênio.

6. CONCLUSÃO

A otimização da extração demonstrou que a proporção 1:30 (casca:água destilada) por 60 minutos em *shaker* originou concentrações mais elevadas de compostos fenólicos. Apenas na menor proporção de casca:água destilada, o maior tempo de extração apresentou aumento na concentração de fenólicos.

Ao comparar os melhores resultados da extração convencional com o banho ultrassônico, nas mesmas proporções de casca:água destilada e tempo, verificou-se que este último não potencializou a extração de compostos fenólicos.

As diferentes localidades de coleta dos frutos apresentaram nítida influência nos teores de compostos bioativos. O EUI e EUM evidenciaram os maiores teores de bioativos e atividade antioxidante, exceto no teor de taninos, onde o ET apresentou melhor resultado. O estágio de maturação também demonstrou interferência nos resultados, como demonstrado com os frutos maduros e imaturos colhidos na mesma localidade (EUI e EUM), onde os frutos maduros evidenciaram as maiores concentrações de bioativos.

Por espectrometria de massas, as redes moleculares foram formadas de acordo com os íons precursores e as perdas neutras características de cada classe, e revelou que esses extratos aquosos possuem metabólitos secundários, sendo identificados principalmente os flavonoides glicosilados.

As emulsões demonstraram elevada estabilidade física nas análises de cremeação, com destaque para as emulsões tratadas com extrato.

No índice de hidroperóxido em temperatura ambiente, o controle e tratamento BHT não diferiram estatisticamente no período analisado, enquanto o tratamento com extrato evidenciou vulnerabilidade de tal emulsão, sugerindo que o extrato acelerou a oxidação, possivelmente por questões inerentes a sua interação com o sistema. No teste acelerado em estufa a 40 °C, foi possível concluir que o extrato, nas condições em que foi aplicado, de fato não foi capaz de retardar processos oxidativos na emulsão. Sob efeito de aquecimento, o tratamento com BHT teve seu efeito protetor evidenciado, diferindo significativamente do controle e do tratamento com extrato, ambos iguais estatisticamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. S. **Curvas de maturação e caracterização nutricionais do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (HBK) Mc Vaugh) cultivado em terra firme na Amazônia Central Brasileira**. Campinas – SP, 1991. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), UNICAMP, Campinas, 1991.

ANDRADE, R. S. G.; DINIZ, M. C. T.; NEVES, E. A.; NÓBREGA, J. A. Determinação e distribuição de ácido ascórbico em três frutos tropicais. **Eclética Química**, v. 27, n. Especial, 2002.

ALVES, L. R.; CHECCHIO, M. V.; SOUSA JUNIOR, G. S.; ALVES, R. C.; CARREGARI, S. M. R.; GRATÃO, P. L. Fisiologia do estresse vegetal e metabolismo antioxidante de resposta. In: C. R. Bastos *et al.* (Coord.). **Tópicos especiais em Genética Aplicada**. Jaboticabal, SP: Funep, p. 21-32, 2017.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: Técnicas de extração. **B.CEPPA**, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.

ANDRADE, R. S. G.; DINIZ, M. C. T.; NEVES, E. A.; NÓBREGA, J. A. Determinação e distribuição de ácido ascórbico em três frutos tropicais. **Eclética Química** [online], v. 27, n. spe, pp. 393-401, 2002.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoides in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

ARANHA, F. Q.; BARROS, Z. F.; MOURA, L.S.A.; GONÇALVES, M. C. R.; BARROS, J. C.; METRI, J.C.; SOUZA, M. S. O papel da vitamina c sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 89-97, maio/ago., 2000.

ARAUJO, J. C.; PESSOA, F. A.; CAMBRA, M. F. E. S.; PEIXOTO, M. N.O.; MANSUR, K. L.; SANTOS, E. E. S.; SEOANE, J. C. S. Abordagem geossistêmica em trilhas da Mata Atlântica: Geodiversidade, geoética e interpretação ambiental para o atingimento dos ODS da Agenda 2030. **Revista de Geociências**, São Paulo, v. 4, 1, n. 2, p. 527 - 541, 2022.

ARRIVETTI, L. O. R.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; GALVANI, F.; CORRADINI, E. Extração e caracterização de fibras de gravatá (*Bromelia balansae* Mez) provenientes do Pantanal. Anais da I Jornada Científica – **Embrapa São Carlos**, v. 1, p. 106, 2009.

ASADI, S.; AHMADIANI, A.; ESMAEILI, M. A.; SONBOLI, A.; ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F. *In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1341-1349, 2010.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BALIN, P. S.; ZANATTA, F. C.; JORGE, B. C.; LEITÃO, M.; KASSUYA, R. M.; CARDOSO, C. A. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 79-86, 2018.

BAN, L.; NARASIMHAMOORTHY, B.; ZHAO, L.; GREAYES, J. A.; SCHROEDER, W. D. Antioxidant activities from different rosemary clonal lines. **Food chemistry**, Barking, v. 201, p. 259-263, 2016.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFI, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 143-82, jan. 2016.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; Bassi P. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.

BEECHER, G. R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, pp. 3248S – 3254S, 2003.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. 2.ed. São Paulo: **Varela**, p.163-190: Vitaminas, 1992.

BOOKER, L. F.; BURKEY, K. O.; JONES, A. M. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana*. **Planta, Célula e Meio Ambiente**, v. 35, 1456-1466, 2012.

BORGES, C. V.; MINATEL, I. O.; AMORIM, E. P.; BELIN, M. A. F.; GOMEZ-GOMEZ, H. A.; CORREA, C. R.; LIMA, G. P. P. Ripening and cooking processes influence the carotenoid content in bananas and plantains (*Musa* spp.). **Food Research International**, v. 124, p. 129-136, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANCO, G. F.; CASTRO, I. A. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 88, p. 1747-1758, 2011.

CANNIATTI BRAZACA, S. G.; ROCHA, L. C.; SILVA, A. G. Caracterização físico-química, digestibilidade proteica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

CARDOSO, C. A. L., RE-POPPI, N., COELHO, R. G. Fruit oil of *Bromelia balansae*. **Journal Essential Oil Research**, v. 22, p. 558–559, 2010.

CARDOSO, I. C.; PEREIRA, H. M. G.; TAPPIN, M. R. R.; BEHRENS, M. D. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Supl, 1-126, 2017.

CARIOLATTO, L. P. **Fenologia, caracterização, físico-química de frutos e sementes de *Bromelia balansae* no município de Santo Cristo – RS**. Cerro Largo – RS, 2019. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Tecnologia Sustentáveis). Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2019.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGE, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 115, n. 4, p. 443-51, apr. 2013.

CARNELOSSI, M. A. G.; TOLEDO, W. F. F.; SOUZA, D. C. L.; LIRA, M. L.; SILVA, G. F. DA; JALALI, V. R. R.; VIÉGAS, P. R. A. Conservação pós-colheita de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1119- 1125, 2004.

CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A.; RIOS, A. O.; MORESCO, K. S. Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia-GO, v. 44, n. 4, p. 399-408, 2014.

CARVALHO, R. I. N.; & ZANETTE, F. Variações do conteúdo de carboidratos em gemas e ramos de dois anos de macieira em região de baixa ocorrência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 352-355, dezembro 2005.

CEPF Mata Atlântica: Hotspot de Biodiversidade. **Critical Ecosystem Partnership Fund (Fundo de Parceria para Ecossistemas Críticos)**, 2011. Disponível em: <https://www.cepf.net/Documents/final_portuguese_atlanticforest.pdf> Acesso em: 07/10/2022.

CHEMAT, F.; ZILLE-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

COELHO, R. G; HONDA, N. K; VIEIRA, M. C.; BRUM, R. L.; PAVAN, F. R., LEITE, C. Q.; CARDOSO, C. A. Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1277–1280, 2010.

COFFANI-NUNES, J. V. Bromélias. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.) **Sustentável Mata Atlântica – A exploração de recursos vegetais**. Editora Senac, São Paulo, p. 119-132, 2002.

COSTA, C. T. C; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, Supl.1, p. 15-19, maio 2010.

DE AZEVEDO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 591–597, 2005.

DEL REY, B. G.; GUIMARÃES, L. L.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H.; FREITAS, M. S.; HATTEBERGER, B.; SILVA, C. M. M.; CARVALHO, M. R.; TOMA, W. The antiulcer and antioxidant mechanisms of the butanolic fraction extract obtained from *Bauhinia forficata* leaves: a medicinal plant frequently used in Brazilian folk medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 6, p. 69-76, 2018.

DELVA, L.; GOODRICH-SCHNEIDER, R. Antioxidant activity and antimicrobial properties of phenolic extracts from acerola (*Malphigia emarginata* DC) fruit.

International Journal of Food Science and Technology, v. 48, n. 5, p. 1048-1056, 2013.

DOMINGUES, B. C. L.; RIBEIRO, T. R.; NEVES, A. L.; NASCIMENTO JÚNIOR, N. M. Suplementos alimentares: Aspectos químicos e aplicações de macro e micronutrientes. **Revista Virtual de Química**. p. 3-4, 2022.

ESCLAPEZ, M. D.; PÉREZ, J. V. G.; MULET, A.; CÁRCEL, J. A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 108 – 120, 2011.

FAITH, D. Biodiversity, The Stanford Encyclopedia of Philosophy, Edward N. Zalta (ed.), **Spring Edition**, 2021.

FARIAS, L. S.; MENDEZ, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *Pruinosa*. **Quimica Nova**, v. 37, p. 483-486, 2014.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FREITAS, M. S. M.; MONNERAT, P. H.; VIEIRA, I. J. C.; CARVALHO, A. J. C. Flavonoides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), Santa Maria, RS, v. 37, p. 1634-1639, 2007.

GIVNISH, T. K.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. **Aliso**, Claremont, v. 23, p. 3-26, 2007.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; RINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; KALUZEWICZ, A.; LEMANSKA, K.; KNAFLEWSKI, M.; TYRAKOWSKA, B. The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence, **Food Chemistry**. v. 100, p. 241-245, 2007.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, K. **Encyclopedia of Bromeliads**, version 4. Retrieved on April 1, 2020.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 556-559, 1978.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v. 88, p. 1813-1820, 2008.

- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd ed. London: **Taylor and Francis**; 1999.
- HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSSENMAIR, K. E.; MCKEY, D. Extraction and quantification of “condensed tannins” as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. **Naturwissenschaften**, v. 89, n.11, p. 519–24, 2002.
- HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; PEREIRA, J. G. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 35-42, jan./jun.1992.
- HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, p. 672-676, 2011.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- HYATT, J. R.; ZHANG, S.; AKOH, C. C. Comparison of antioxidant activities of selected phenolic compounds in O/W emulsions and bulk oil. **Food Chemistry**, v. 349, n. 1, p. 129037, 2021.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985.
- JORGE, N.; ANGELO, P. M. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- KAYS, S. J. *Postharvest physiology of perishable plant products*. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1991.
- KAJDZANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, 2010.
- KIM, D. S.; NA, H.; KWACK, Y.; KIM, S. K.; HEO, J. W.; CHUN, C. Composition of secondary metabolites in various parts of 'Seolhyang' strawberry plants. **Horticultural Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 224-230, 2013.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 148, 2005.
- KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiologists**, v. 125, n.1, p. 58-60, 2001.
- LANGENHEIM, C. A.; MACEDO, C. A.; ROSS, M. K.; STUBBLEBINE, W. H. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 51-59, 1986.

LAGUERRE, M.; BAYRASY, C.; PANYA, A.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J.; LECOMTE, J.; DECKER, E. A.; VILLENEUVE, P. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 2, p. 183-201, 2015.

LEES, K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v. 20, p. 207-220, 2000.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, 1997.

LEME, E. M. C. Bromélias da Mata Atlântica. Canistrum. **Salamandra**. Rio de Janeiro, 1997.

LILLO, C.; LEA, U.S.; RUOFF, P. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, p. 587-601, 2008.

LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 695- 698, 2007.

LINDLEY, J.; MASON, T. **Journal Chemistry**. Soc. Ver. 16, 275, 1987.

LI, P.; DU, G.; MA, F. Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 710-714, 2011.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 65, 2007.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n.1, p. 209-258, 2008.

MELLO, J. C. P. & SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C .P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: **Ed.UFRGS/Ed.UFSC**, cap. 24, p.517-543, 2001.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 2, 672-688, 2017.

MURAKAMI, T.; KOHNO, K.; KISHI, A.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XIX. Absolute stereostructures of canavalioid, a new Ent-kaurane-type

diterpene glycoside, and gladiatosides A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, and C2, new acylated flavonol glycosides, from sword bean, the seeds of *Canavalia gladiata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 11, p. 1673-1680, 2000.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [online], v. 51, n.1, p.331-339, 2003.

NARVÁEZ-GÓMEZ, J. P.; GUEDES, T.; LOHMANN, L. G. Recovering the drivers of sampling bias in Bignoniaceae (Bignoniaceae) and identifying priority areas for new survey efforts. **Biodiversity and Conservation**, 2021.

NÖRNBERG, M. L.; PINHEIRO, P. N.; NASCIMENTO, T. C.; FERNANDES, A. S.; NÖRNBERG, M. F. B. L.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NÖRNBERG, J. L. Bioactive compounds in butters: carotenoids and fatty acids. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 10270-10288, feb. 2022.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. A influência do teor de sólidos no material de partida é refletida no tamanho de partícula e na densidade do produto final. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 n. 4, p. 641-650, ago./set. 2010.

OTERO, M. J.; HIDALGO, L. G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). **Livestock Research for Rural Development**, v.16, n.2, p.1- 9, 2004.

PARDO, M. F.; LOPEZ, L. M. I.; CANALS, F.; AVILES, F. X.; NATALUCCI, C. L.; CAFFINI, N. O. Purification of balansain I, endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3795-3800, 2000.

PARDO, M. F.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. Properties of a milk clotting protease isolated from fruits of *Bromelia balansae* Mez. **Journal of Biological Chemistry**, v. 382, p. 871-874, 2001.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3859–3871, 2013.

PEREIRA, G.; CHÁVEZ, E. S.; SILVA, M. E. S. O estudo das unidades de paisagem do bioma Pantanal. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 7, n. 1, 2012.

PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; SILVA, R. R.; SPÍNDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, Vol. 44, No. 9, 1168-1179, 2021.

PONTES, M. C.; CAVALCANTI, N. B.; LEAL, A. E. B. P.; OLIVEIRA, A. P.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; DELANGE, D. M.; TURATTI, I. C. C.; OLIVEIRA, G. G.; CARNEVALE NETO, F.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; ALMEIDA, J. R. G. S. Chemical constituents and antibacterial activity of *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae): identification and structural characterization. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 1, p. 100 - 215, 2022.

POTOROKO, I.; KALININA, V.; BOTVINNIKOVA, O.; KRASULYA, R.; FATKULLIN, U.; BAGALE, S. H. SONAWANE. Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 463–472, 1 nov. 2018.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing / antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAMOS, A. L. C. C.; GARCÍA, Y. M.; OLIVEIRA, A. F.; PAULA, A. C. C. F. F.; LEMOS, E. E. P.; REINA, L. C. B.; SILVA, M. R. S.; AUGUSTI, R.; ARAÚJO, R. L. B.; MELO, J. O. F. Análise de compostos bioativos em alimentos utilizando espectrometria de massas por paper spray – uma breve revisão de literatura. **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil**, Editora Científica, v. 1, p. 219-233, 2021.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 409-516, 2002.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. **Flora ilustrada Catarinense**, p. 559, 1983.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas**, p. 100, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_agrobio/_publicacao/89_publicacao09032009113306.pdf. Acesso em: 20 de fev. 2022.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Status of carotenoid analytical methods and *in vitro* assays for the assessment of food quality and health effects. **Current Opinion in Food Science**. v. 1, p. 56–63, 2015.

ROSÁRIO, M. S.; GAUTO, M. I. R.; SILVA, A. C. L. N.; SALES, J. S.; PEREIRA, F. S.; SANTOS, E. P.; RICCI JÚNIOR, E.; COSTA, M. C. P. Estudo de estabilidade de emulsão cosmética com potencial de creme hidratante para o tratamento da xerose cutânea utilizando o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 29552-29570, mar 2021.

SALAGER, J. L. “Emulsion properties and related know-how to attain them”. In: MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, cap. 2 e 3, New York, Marcel Dekker Inc., 2000.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A. Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, pp. 25 – 41, 2011.

SANDRE, A. A.; PINA, J. M.; MORAES, R. M.; FURLAN, C. M. Anthocyanins and tannins: is the urban air pollution an elicitor factor?. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 9-18, 2014.

SANTOS, I. C.; SILVA, M. A.; ALBUQUERQUE, T. G.; COSTA, H. C. Frutas e hortícolas: análise comparativa dos seus teores em compostos fenólicos e flavonóides totais. **Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge**, p. 60-63, 2017.

SHANNON, P. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SENTANIN, M. A.; RODRIGUEZ AMAYA, D. B. Teores de carotenóides em mamão e pêssago determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 13-19, jan.-mar. 2007.

SCHRAMM, L. L. Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications. **Wiley-VCH**, Weinheim, p. 448, 2005.

SCHUTTZ, R.; ARAÚJO, L. C.; SÁ, F. S. Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. **Natureza on line**, v. 10, n. 2, p. 89-92, 2012.

SFAKIANAKIS, P.; TOPAKAS, E.; TZIA, C. Comparative Study on High-Intensity Ultrasound and Pressure Milk Homogenization: Effect on the Kinetics of Yogurt Fermentation Process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 3, p. 548–557, 1 mar. 2015.

SILVA, A. E.; FERRAZ, R. L. S.; SILVA, J. P.; COSTA, P. S.; VIÉGAS, P. R. A.; BRITO NETO, J. F.; MELO, A. S.; MEIRA, K. S.; SOARES, C. S.; MAGALHÃES, I. D.; MEDEIROS, A. S. Microclimate changes, photomorphogenesis and water consumption of *Moringa oleifera* cuttings under different light spectrums and exogenous phytohormone concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 5, p. 751-760, 2020.

SILVA, E. K.; ROSA, M. T. M. G.; MEIRELES, M. A. A. Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 50–59, 2015.

SILVA, G. M. **Potencial antioxidante de frutos do Cerrado e do Pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul**. Campo Grande – MS, 2010. 61 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento), UFMS, Campo Grande, 2010.

SILVEIRA, A. C.; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. **COMUNICADO TÉCNICO 421, EMBRAPA**, Colombo-PR, 2018.

SOUSA, J. S. C.; BRITO, M. E. B. Programa computacional BHCN&CCTK: balanço hídrico climatológico normal e classificação climática de Thornthwaite e Köppen. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 5, p. 35877-35898, mai, 2022.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). In Flora Neotropica 14, Part 3. The New York Botanical Garden, **Hafner Press**, New York, p. 1658-1660, 1979.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SOUZA, A. G.; FASSINA, A. C.; SARAIVA, F. R. S. Compostos bioativos e atividade antioxidante em frutas nativas do Brasil. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v. 30, n. 1, p.73 - 78. 2018.

SUSLICK, K. S. The Chemical Effects of Ultrasound, **Scientific American**. v. 80, 1989.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005.

TAPAS, A. R., SAKARKAR, D. M., KAKDE, R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, pp. 1089 – 1099, 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, F.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 853-876, 2001.

TSUGAWA, H.; NAKABAYASHI, R.; MORI, T.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, M.; RAI, A.; SUGIYAMA, R.; YAMAMOTO, H.; NAKAYA, T.; YAMAZAKI, M.; KOOKE, R.; BAC-MOLENAAR, J.; OZTOLAN-EROL, N.; KEURENTJES, J. J. B.; ARITA, M.; SAITO, K. A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. **Nature Methods**. v. 16, n. 4, p. 295-298, 2019.

UCELLA FILHO, J. G. M.; GOMES, J. P. S.; SILVA, B. R. F.; NASCIMENTO, M. B.; STRAGLIOTTO, M. C.; AZEVEDO, T. K. B. **Potencial tanífero da casca de Azadirachta indica em plantio comercial na região do nordeste**. IV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia da Madeira. Universidade Federal do Oeste do Pará, 2019.

VÁZQUEZ-GUTIERREZ, J. L.; QUILES, A.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I. Changes in the microstructure and location of some bioactive compounds in persimmons treated by high hydrostatic pressure. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, p. 137- 144, 2011.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1–16, 2010.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, 1285-1290, 1994.

WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E. (coords.). Bromeliaceae In: MELHEM, T. S.; WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; SHEPHERD, G. J.; KIRIZAWA, M. (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, vol. 5, pp. 39-162, 2007.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEND. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W.; CRUSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTHERN T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

YANG, H.; TUO, X.; WANG, L.; TUNDIS, R.; PORTILLO, M. P.; SIMAL-GANDARA, J.; YU, Y.; ZOU, L.; XIAO, J.; DENG, J. Bioactive procyanidins from dietary sources: The relationship between bioactivity and polymerization degree. **Trends in Food Science & Technology**, n. 111, p. 114-127, 2021.

ZHANG, E.; WANG, Y.; XIE, F.; ZHUANG, X.; WANG, X.; YU, X. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the quantitative determination and pharmacokinetic analysis of cirsimarin in rat plasma. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1-7, 2021.