

RAFAEL SILVA NAITO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE COLETA SOBRE O
RENDIMENTO E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE
POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO GRAVATÁ (*Bromelia balansae*
Mez.)**

ASSIS

2022

RAFAEL SILVA NAITO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE COLETA SOBRE O
RENDIMENTO E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE
POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO GRAVATÁ (*Bromelia balansae*
Mez.)**

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)

Orientador(a): Dr.^a Cassia Roberta Malacrida Mayer

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

ASSIS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

N159i Naito, Rafael Silva

Influência de diferentes locais de coleta sobre o rendimento e compostos antioxidantes de polissacarídeos da polpa do gravatá (*Bromelia Balansae* Mez.) / Rafael Silva Naito. Assis, 2022.

54 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis

Orientadora: Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer

1. Biotecnologia vegetal. 2. Compostos bioativos.
3. Gravatá. 4. Bromélia. 5. Polissacarídeos. I. Título.

CDD 631.52

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAEL SILVA NAITO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CÂMPUS DE ASSIS.

Aos 14 dias do mês de março do ano de 2022, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RAFAEL SILVA NAITO, intitulada **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE COLETA SOBRE O RENDIMENTO E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO GRAVATÁ (*Bromelia balansae* Mez.)**.

A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / UNESP/FCL-Assis, Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/FCL-Assis, Prof. Dr. HARVEY ALEXANDER VILLA VÉLEZ (Participação Virtual) do(a) Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas / UFMA/ São Luis - Maranhão. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **APROVADO**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER

Dedicatória

Dedico a meus pais e irmão que sempre me apoiaram nos meus objetivos e para todos que se incentivarem na busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a meus pais Vera Lucia e Celso pelos ensinamentos, apoio incondicional em todas minhas escolhas e por todo apoio e suporte para que eu continuasse seguindo meu objetivo.

À meu irmão Daniel e minha cunhada Nathália por todo o apoio e bom humor sempre.

Aos demais familiares que confiaram e sempre me apoiaram.

À minha orientadora Cassia Roberta Malacrida Mayer que sempre esteve disposta a me ajudar. Meus sinceros agradecimentos por todo o ensinamento e confiança.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À UNESP – Assis e ao departamento de Biotecnologia que me deu suporte estrutural e tornarem possível toda essa experiência.

Aos servidores Alan e Lino por sempre estarem dispostos a ajudar, sem vocês este trabalho não estaria completo.

Ao servidor Sivaldo por todas as conversas bem humoradas me animando sempre que eu chegava à faculdade.

Aos meus amigos Alexandre, Romário, Amanda, Tamiris, Marcelo, André, Rodrigo, Ana Luiza, Fernanda, Gabriel, Carol, Helena, Cauê, Camila, Nicolas, Paolo, Giordano, Nayara, Leonardo, Iara, Pamela e José Renato por todo o apoio em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Natalia, Letícia, Walter, Aline, Beatriz e Camilla por toda a ajuda e companheirismo nesse período.

À todos os servidores técnicos e administrativos da UNESP – Assis que ajudaram de alguma forma a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina, não perguntar o que se ignora.”

São Beda

RESUMO

Os frutos do gravatá (*Bromelia balansae* Mez.) são amplamente utilizados na medicina popular e na alimentação e podem ser encontrados em diversos estados brasileiros. O fruto do gravatá apresenta compostos polifenólicos e elevadas concentrações de carotenoides totais, açúcares totais e vitamina C, além de demonstrar elevada capacidade antioxidante. Visto isso, observou-se a possibilidade de realizar a otimização da extração de polissacarídeos da polpa do fruto de gravatá e avaliar a influência de diferentes locais de coleta na composição do material obtido. Os frutos de gravatá foram coletados nas cidades de Assis – SP, Gonçalves – MG e Tarumã – SP. A extração dos polissacarídeos foi realizada da forma convencional e pelo método de extração assistida por ultrassom, que foi otimizada através de um delineamento Box-Behnken com três variáveis independentes, potência do ultrassom, tempo e razão amostra/solvente. Os polissacarídeos extraídos foram submetidos à avaliações de carboidratos totais, compostos fenólicos, ácido ascórbico e atividade antioxidante. A otimização da extração de polissacarídeos não se ajustou para um nível de significância. As análises de carboidratos totais dos polissacarídeos obtidos não apresentaram diferenças entre os métodos de extração e as amostras com maior porcentagem de polissacarídeos foram as amostras de Assis – SP, 91,91% (ultrassom) e 87,33% (convencional). Os compostos bioativos encontrados na fração polissacarídea diferiram de acordo com o método de extração, sendo a extração assistida por ultrassom mais adequada para a obtenção de tais compostos. Os maiores valores de compostos fenólicos totais encontrados foram de 3,66 gEAG/100g e 3,54 gEAG/100g nas amostras de Tarumã – SP e Assis – SP nesta ordem, ambas utilizando o método de extração por ultrassom. O ácido ascórbico não foi extraído junto dos polissacarídeos. A atividade antioxidante também apresentou resultados favoráveis para a extração assistida por ultrassom, sendo as amostras de Assis – SP e Tarumã – SP as que apresentaram menor IC₅₀ (14,17 mg/mL e 14,28 mg/mL respectivamente). Compostos Fenólicos podem ser encontrados ligados à carboidratos, na forma de glicosídeos e apresentam capacidade antioxidante, o que reflete os resultados encontrados. O clima do local de coleta pode ter afetado a composição final dos frutos. O uso do ultrassom na extração gerou bons rendimentos com menor tempo de processamento, além dos polissacarídeos obtidos apresentarem maiores valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Palavras-chave: Bromélia. Compostos bioativos. Gravatá. Polissacarídeos.

ABSTRACT

The fruits of the gravata tree (*Bromelia balansae* Mez.) are widely used in folk medicine and food and can be found in several Brazilian states. The gravata fruit has polyphenolic compounds and high concentrations of total carotenoids, total sugars and vitamin C, and shows high antioxidant capacity. Therefore, it was observed the possibility to optimize the extraction of polysaccharides from the pulp of the gravata fruit and evaluate the influence of different collection sites on the composition of the material obtained. The gravatá fruits were collected in the cities of Assis - SP, Gonçalves - MG and Tarumã - SP. The polysaccharides extraction was performed in the conventional way and by the ultrasound-assisted extraction method, which was optimized through a Box-Behnken design with three independent variables, ultrasound power, time and sample/solvent ratio. The extracted polysaccharides were submitted to evaluations of total carbohydrates, phenolic compounds, ascorbic acid, and antioxidant activity. The optimization of the polysaccharide extraction did not adjust to a significance level. The analyses of total carbohydrates of the polysaccharides obtained did not present differences among the extraction methods and the samples with the highest percentage of polysaccharides were the samples from Assis - SP, 91.91% (ultrasound) and 87.33% (conventional). The bioactive compounds found in the polysaccharide fraction differed according to the extraction method, being the ultrasound-assisted extraction more suitable to obtain such compounds. The highest values of total phenolic compounds found were 3.66 gEAG/100g and 3.54 gEAG/100g in the samples from Tarumã - SP and Assis - SP in that order, both using the ultrasonic extraction method. The ascorbic acid was not extracted along with the polysaccharides. The antioxidant activity also showed favorable results for the ultrasound assisted extraction, being the samples from Assis - SP and Tarumã - SP the ones that presented the lowest IC₅₀ (14.17 mg/mL and 14.28 mg/mL respectively). Phenolic compounds can be found attached to carbohydrates, in the form of glycosides and have antioxidant capacity, which reflects the results found. The climate of the collection site may have affected the final composition of the fruits. The use of ultrasound in the extraction generated good yields with less processing time, besides the polysaccharides obtained presented higher values of phenolic compounds and antioxidant activity.

Keywords: Bromelia. Bioactive compounds. Gravatá. Polysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folhas de gravatá	18
Figura 2 – Flores em racemo e frutos de gravatá	18
Figura 3 – Umidade (%) das polpas dos frutos de gravatá colhidos em três cidades diferentes	34
Figura 4 – Frutos de gravatá colhidos em Assis (A), Gonçalves (G) e Tarumã (T)	35
Figura 5 – Gráficos de contorno (A) e Superfície (B) de rendimento (%) versus razão massa/volume (g/mL); tempo (min) com potência fixada em 100 W	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas, altitude, temperatura anual, precipitação anual e classificação climática pelo método de Köppen das regiões de coleta das amostras	25
Tabela 2 – Delineamento Box-Behnken para extração assistida por ultrassom de polissacarídeos da polpa de gravatá	27
Tabela 3 – Variáveis e resultados do delineamento Box-Behnken na extração de polissacarídeos	36
Tabela 4 – Análise de Variância do modelo	38
Tabela 5 – Rendimento (%) de polissacarídeos obtidos pelos diferentes métodos de extração	42
Tabela 6 – Resultados das análises de carboidratos totais (%), compostos fenólicos totais (gEAG/100g), ácido ascórbico (mg/100g), atividade antioxidante na concentração de 15 mg/mL e valores de IC ₅₀ (mg/mL) da porção polissacarídea extraída da polpa de gravatá	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. MATA ATLÂNTICA	16
2.2. GRAVATÁ	16
2.3. CARBOIDRATOS	19
2.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VEGETAIS	20
2.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	20
2.6. COMPOSTOS BIOATIVOS	21
2.6.1. COMPOSTOS FENÓLICOS	22
2.6.2. ÁCIDO ASCÓRBICO	23
3. OBJETIVOS	23
3.1. GERAL	24
3.2. ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. GRAVATÁ	24
4.2. MÉTODOS	25
4.2.1. UMIDADE	25
4.2.2. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	26
4.2.2.1. EXTRAÇÃO CONVENCIONAL	26
4.2.2.2. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	26
4.2.2.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4.2.2.2.2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO	28
4.2.2.3. PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS	29
4.2.3. CARBOIDRATOS TOTAIS	29
4.2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	30
4.2.5. ÁCIDO ASCÓRBICO	31
4.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. UMIDADE	34
5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	36

5.3. RENDIMENTO	42
5.4. ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS	43
5.4.1. CARBOIDRATOS TOTAIS	44
5.4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	45
5.4.3. ÁCIDO ASCÓRBICO	47
5.4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

A *Bromelia balansae* Mez. é uma planta da família Bromeliaceae e gênero *Bromelia*. É uma planta perene acaule com hábitos terrestres encontrada na Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, podendo ser encontrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul.

Os frutos da *Bromelia balansae* Mez. são utilizados na medicina popular na forma de xarope, pois possuem propriedades expectorantes para tratar tosse, inflamações na garganta e pulmões. Por ser comestível e possuir uma casca amarelada, seus frutos são conhecidos popularmente como bananinha-do-mato, gravatá, gravatá-do-mato ou caraguatá.

O fruto de gravatá é utilizado na alimentação na forma de sucos, refrigerantes ou *in natura*. A planta *Bromelia balansae* também é utilizada pelos povos tradicionais, para extração de fibras, criação de cercas vivas e de forma ornamental.

Apesar de muito abundante no território brasileiro e de sua ampla utilização por povos locais, não existem muito estudos sobre o fruto do gravatá, porém sabe-se que sua polpa é rica em carboidratos.

Os carboidratos estão presentes em toda a natureza, sendo a biomolécula mais abundante do planeta, além de serem a base da alimentação da maioria dos seres vivos não fotossintetizantes, pois sua oxidação é a principal via metabólica para a geração de energia.

O processo de extração convencional de polissacarídeos envolve muito tempo e temperaturas elevadas, o que pode alterar a composição dos carboidratos e seus biocompostos. A extração assistida por ultrassom, é considerada uma técnica verde de extração, pois utiliza menos energia e demanda menor tempo e temperatura. O processo consiste em submeter a amostra vegetal a uma sonda ultrassônica para que ocorra a quebra da parede celular das células vegetais pelo processo de cavitação, liberando os compostos de interesse.

Visto que o fruto do gravatá está amplamente difundido no território brasileiro sendo muito utilizado na medicina popular, observou-se uma possibilidade de extrair e analisar seus polissacarídeos focando em seus compostos antioxidantes, visando descobrir possíveis aplicações na suplementação de alimentos, cosméticos ou outros produtos farmacêuticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MATA ATLÂNTICA

Florestas tropicais são ecossistemas que abrigam grande biodiversidade (aproximadamente dois terços do total de espécies existentes no planeta). O Brasil possui duas grandes florestas tropicais, a Floresta Atlântica e a Floresta Amazônica, abrigando cerca de 357 milhões de hectares de florestas tropicais (30 % de todas as florestas tropicais do planeta), mais que o dobro da área do segundo colocado, a Indonésia. Com isso, o Brasil abriga cerca de 10% de todos os organismos conhecidos pela ciência, isso torna o Brasil, juntamente com a Colômbia, México e Indonésia os países com maior biodiversidade do mundo (MITTERMEIER *et al.*, 1992).

A Mata Atlântica se faz presente em 17 estados brasileiros, além de áreas no Paraguai, Uruguai e Argentina, porém os remanescentes da vegetação nativa da Mata Atlântica ocupam apenas 27% de sua área original, neste percentual estão incluídas áreas em estágio de regeneração, campos naturais, restingas, manguezais e outros tipos de vegetação nativa. As áreas em bom estado de conservação não passam de 8% da área original da floresta (ALMEIDA, 2016). A Mata Atlântica abriga mais de 20 mil espécies de plantas, sendo 50% delas espécies endêmicas (ALMEIDA, 2016), hoje a floresta faz parte dos 25 *hotspots* de biodiversidade reconhecidos no mundo, ou seja, a Mata Atlântica faz parte das 25 áreas que perderam pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original, mas que, juntas, abrigam mais de 60% da totalidade de espécies terrestres do planeta (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

2.2. GRAVATÁ

A *Bromelia balansae* Mez. é uma planta da família Bromeliaceae com hábitos terrestres que pode ser encontrada desde o norte do Pantanal, passando pelo Cerrado e por todo o litoral pela Mata Atlântica (ARRIVETTI *et al.*, 2008; SILVA, 2010), e no

interior dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (REITZ, 1983).

É uma planta acaule, com caule curto, grosso e não visível, com folhas que podem chegar a 2 m de comprimento (PARDO *et al.*, 2000; CARIOLATTO, 2019). Seus rizomas possuem aproximadamente 2 cm com nódulos não espessados perceptíveis com brácteas e internódios menores que 3 cm (BASUALDO; ZARDINI; ORTIZ, 1995) e suas folhas são duras e recobertas por espinhos nas margens (Figura 1). Suas inflorescências emergem do ápice do caule, sendo multiflora e composta por ramos florais até o ápice, apresentando coloração rosada (CARIOLATTO, 2019). A *Bromelia balansae* frutifica em cachos, atingindo entre 40 e 90 cm de altura e apresenta flores em racemo, de onde surgem os frutos (SILVA, 2010) (Figura 2), que por serem amarelos e comestíveis são popularmente conhecidos como gravatá, caraguatá ou bananinha-do-mato (FIORAVANTE *et al.*, 2016). Os frutos variam em tamanho, porém a média atingida é de 4 cm de comprimento por 2,5 cm de largura e possuem casca e polpa amarelada, fibrosa e aromática, contendo pequenas sementes globulosas (PARDO *et al.*, 2000; FIORAVANTE *et al.*, 2016). São utilizados na medicina popular na forma de xarope, pois possuem poder expectorante, e em outros usos fitoterapêuticos como em ferimentos, inflamação de garganta, tratamento de amenorréia e como anti-sifilítico (SILVA, 2010; FIORAVANTE *et al.*, 2016; BASUALDO; ZARDINI; ORTIZ, 1995). Além de utilizado na medicina popular, o fruto de gravatá também tem outras funções para os povos tradicionais, como por exemplo, extração de fibras, alimentação humana e animal e uso de seu xarope como abortivo (FIORAVANTE *et al.*, 2016; BASUALDO; ZARDINI; ORTIZ, 1995). A planta *Bromelia balansae* também é utilizada de forma ornamental (REITZ, 1983).

O processo de floração da espécie, que se inicia em dezembro e termina entre janeiro e fevereiro, é caracterizado pela alteração da coloração das folhas centrais, a frutificação se inicia em fevereiro e se prolonga até o mês de maio aproximadamente (REITZ, 1983; CARIOLATTO, 2019).

O fruto do gravatá apresenta uma riqueza de nutrientes, o que tem despertado o interesse para seu estudo. A polpa do fruto de gravatá apresenta quantidades significativas de proteínas, cinzas, fibras e carboidratos (FREITAS, 2019). O alto teor de cinzas indica elevada quantidade de sais minerais presentes na polpa do fruto,

sendo os mais abundantes o cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K) (KINUPP; BARROS, 2008).

O fruto do gravatá apresenta compostos polifenólicos – flavonoides e taninos – e elevadas concentrações de carotenoides totais, açúcares totais e vitamina C, além de demonstrar elevada atividade antioxidante (FREITAS, 2019).



Figura 1: Folhas de gravatá (Fonte: O autor).

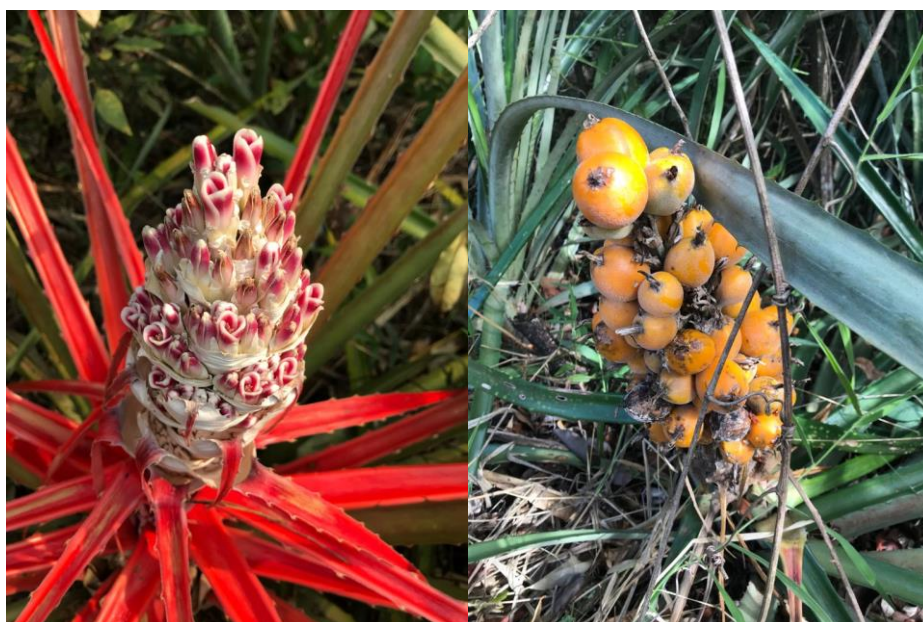


Figura 2: Flores em racemo e frutos de gravatá. (Fonte: O autor).

2.3. CARBOIDRATOS

Carboidratos são as biomoléculas mais abundantes do planeta, sendo a base da alimentação da maioria dos organismos vivos não fotossintetizantes, pois a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica para a maioria dos organismos adquirirem energia para suas células (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Polímeros de carboidratos são muito pesquisados, pois diferentes polímeros apresentam diferentes funções que podem ser utilizadas em aplicações farmacêuticas, cosméticas, alimentícias ou estruturais em materiais (LIN *et al.*, 2018). Por exemplo, polímeros insolúveis de carboidratos podem ter função estrutural e de proteção nas paredes celulares de células vegetais e bacterianas, outros polímeros de carboidratos se apresentam como lubrificantes de articulações esqueléticas e participam do reconhecimento e da coesão celular (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Os polissacarídeos são uma das maiores reservas de carboidratos nas plantas e estão envolvidos em diversas atividades bioativas, como por exemplo atividades antioxidantes, imunomodulação e atividades antidiabéticas e anticancerígenas (LIN *et al.*, 2018). Os polissacarídeos de frutos e vegetais vem atraindo a atenção tanto de produtores de alimentos quanto de consumidores, devido às suas propriedades físicas e potencial de prevenção de doenças. Os polissacarídeos encontrados em frutas e vegetais vem sendo empregados nas indústrias cosméticas e farmacêuticas, além disso, recentemente os polissacarídeos têm demonstrado grande valor na área biomédica, devido ao seu potencial antioxidante, imunoestimulatório e anticancerígeno (MARAN; MEKALA; MANIKANDAN, 2013).

Diferentes fatores ambientais podem ocasionar mudanças físicas e químicas em espécies vegetais, tais como a das Bromeliaceae, segundo Cariolatto (2019), foram encontradas variações físicas entre bromélias de mesma espécie coletadas em diferentes locais, entre essas variações podemos citar as quantidades de flores e frutos produzidas pela espécie.

2.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VEGETAIS

Diversos compostos podem ser extraídos de células vegetais, e a eficiência da extração é avaliada pelo rendimento e pela quantidade do composto obtido. O método tradicional de extração utiliza elevadas temperaturas, porém demanda muito tempo e um grande volume de solventes (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A extração é o método mais comumente utilizado para recuperar polissacarídeos que seriam perdidos nos resíduos de alimentos sólidos. A quantidade e qualidade dos extratos obtidos está diretamente relacionada à técnica de extração utilizada (MARAN; PRIYA, 2014). Diversos métodos de extração vêm sendo desenvolvidos para aprimorar as extrações de compostos vegetais, como por exemplo os métodos de extração por solvente com agitação e aquecimento, extração sob refluxo, extração por micro-ondas, extração enzimática, extração assistida por ultrassom, tratamento assistido por ultrassom combinado com água subcrítica, extração por campo elétrico moderado e extração por campo elétrico pulsante (GRASSINO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; MARAN; PRIYA, 2014).

2.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Segundo Maran e Priya (2014), a metodologia de extração assistida por ultrassom tem se provado uma técnica promissora, isso porque é um dos métodos mais baratos, rápidos, simples e eficientes. Com isso, a extração assistida por ultrassom vem sendo utilizada em diversos materiais para a extração de diferentes compostos. A extração assistida por ultrassom é considerada uma técnica de extração verde e limpa para a produção de compostos bioativos com alta qualidade (SKENDERIDIS *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Além de ser rápida, simples e com menor uso de solventes, a extração assistida por ultrassom preserva a estrutura e as propriedades moleculares presentes no composto extraído, devido à extração ocorrer em temperaturas mais baixas (SKENDERIDIS *et al.*, 2016).

A elevada eficácia da extração assistida por ultrassom se dá devido a ruptura da parede celular, diminuição das partículas e otimização da transferência do conteúdo

celular para o solvente, causada pelo colapso das bolhas produzidas na cavitação (MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINHELHAUSEN, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

O processo de cavitação ocorre devido ao movimento causado pelas ondas do ultrassom criarem área de compressão e depressão no meio. Quando os ciclos de depressão forem suficientemente fortes, pode ocorrer a quebra das ligações moleculares da amostra, criando vácuos que são preenchidos por gases dissolvidos no meio, formando microbolhas de cavitação. Durante os ciclos de compressão e depressão as microbolhas aumentam e diminuem de tamanho, o que ocasiona sua implosão, e assim, liberando calor e pressão nas regiões vizinhas (VEILLET; TOMAO; CHEMAT, 2010; COELHO, 2015).

2.6. COMPOSTOS BIOATIVOS

Ao metabolizar o oxigênio, os seres vivos produzem radicais livres em suas células, essas moléculas ou átomos altamente reativos e instáveis apresentam um ou mais elétrons não pareados, podendo reagir com qualquer molécula que entra em contato. Em baixas concentração os radicais livres podem ser benéficos, nos defendendo contra agentes infecciosos, auxiliam na formação de ATP, na regulação do crescimento celular e na formação de prostaglandinas e leucotrienos (FLAUZINO, 2020).

O consumo de frutas e vegetais vem sendo associado a diminuição da incidência e mortalidade causada por diversas doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. A proteção oferecida pelas frutas e vegetais está associada ao alto conteúdo de constituintes químicos com propriedades antioxidantes (LIMA *et al.*, 2007).

Alimentos de origem vegetal são ótimas fontes de energia, proteína, vitaminas e minerais, sendo a principal fonte de vitamina C, folato, fibras e compostos bioativos. Os compostos bioativos presentes nos alimentos de origem vegetal podem agir de diversas maneiras, por exemplo a ação antioxidante deve-se ao potencial de oxido-redução de determinadas moléculas. Os compostos antioxidantes tem a capacidade de competir por sítios ativos e receptores em diversas estruturas celulares e na

modulação da expressão dos genes que codificam proteínas (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009)

Assim como em outros produtos agrícolas, a composição química de frutos depende de muitos fatores externos, como por exemplo, condições climáticas, composição do solo, intensidade de luz, temperatura, estágio de maturação do fruto, método de colheita e condições de armazenamento, que afetam diretamente a formação do fruto, concentração de sólidos solúveis, firmeza e coloração (TOLIĆ *et al.*, 2017; PARRA-CORONADO; FISCHER; CAMACHO-TAMAYO, 2015).

2.6.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos e são amplamente distribuídos no reino vegetal (ROCHA *et al.*, 2011). Mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Os fenólicos estão presentes em vegetais, frutas e produtos industrializados (SILVA *et al.*, 2010).

A estrutura básica dos compostos fenólicos é um anel aromático carregando um ou mais grupos hidroxila. Compostos fenólicos de plantas são classificados com fenóis simples ou polifenóis, baseado no número de unidade fenólicas na molécula. Fazem parte dos compostos fenólicos vegetais os fenólicos simples, cumarinas, ligninas, lignanas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonóides (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário e são desenvolvidos por plantas em resposta a danos nos tecidos, como exposição à radiação ultravioleta, patógenos, ferimentos e infecções (FLAUZINO, 2020). Tem a função de auxiliar no crescimento e reprodução, além de serem importantes pigmentos, possuírem ação antipatogênica e atividade antioxidante (FLAUZINO, 2020; SILVA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos podem variar sua concentração de acordo com a estação do ano em que o fruto é cultivado, Xu *et al.* (2011) encontraram diferenças na quantidade de compostos fenólicos de uvas de um mesmo cultivar no mesmo local de

coleta em estações do ano diferentes. Apesar dos compostos fenólicos serem bastante estudados, ainda existem informações limitadas sobre os efeitos individuais das condições climáticas sobre estes compostos, como por exemplo, temperatura, nível de chuva, tempo de exposição à luz solar, umidade relativa do ar e do solo (TOLIĆ *et al.*, 2017).

2.6.2. ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é uma substância hidrossolúvel e termolábil com elevada importância nutricional, pois atua na absorção do ferro e apresenta grande atividade antioxidante, além de atuar na atividade imunológica, sendo parte do processo de cicatrização formando o colágeno, inibição de nitrosaminas, na oxidação da fenilalanina e tirosina, na produção de interferon, na reação inflamatória, na síntese de adrenalina, corticoesteróides e ácidos biliares (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003; FLAUZINO, 2020).

Os seres humanos e outros primatas não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, devido a uma deficiência da gulonolactona oxidase. A falta desse composto impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003). O organismo adulto saudável apresenta uma reserva de ácido ascórbico de 1500 mg, e essa reserva tem de ser repostada através da alimentação, na dose de 45 a 75 mg por dia (FLAUZINO, 2020), em situações adversas, tais como infecções, gravidez e amamentação, doses maiores são necessárias (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003).

O ácido ascórbico fornece proteção oxidativa às células em meio aquoso contra a oxidação descontrolada, devido seu alto poder redutor (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010). O ácido ascórbico participa dos processos de oxirredução nas células, e tem papel importante na biossíntese das catecolaminas, previne o escorbuto e é importante para o organismo no combate a infecções, além de ser fundamental na integridade dos vasos sanguíneos. (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi otimizar a extração de polissacarídeos da polpa do fruto de gravatá (*Bromelia balansae* Mez.) utilizando extração assistida por ultrassom e avaliar a influência de diferentes locais de coleta com diferentes classificações climáticas na composição do material obtido.

3.2. ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de polissacarídeos assistida por ultrassom, quanto à potência, tempo de extração e razão amostra/solvente visando maior rendimento;
- Analisar o material obtido quanto à presença de biocompostos (compostos fenólicos totais e ácido ascórbico) e quantidade total de carboidratos;
- Determinar a atividade antioxidante da fração polissacarídea;
- Verificar a variabilidade quanto à composição e rendimento da proporção polissacarídea com relação a diferentes localidades de colheita dos frutos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1. GRAVATÁ

Os frutos maduros foram colhidos nos períodos de frutificação de 2020/2021 nas cidades de Assis – SP, Tarumã – SP e Gonçalves – MG. A identificação botânica foi confirmada pela bióloga Letícia Chedid Seidinger. Após a coleta, os frutos foram levados até o laboratório, onde foram lavados em água corrente para retirar todas impurezas presas a superfície e congelados. Para as análises os frutos foram descongelados, descascados e as sementes assim como a polpa foram separados manualmente. A Tabela 1 demonstra a classificação climática das regiões onde foram coletadas as amostras de gravatá.

Tabela 1: Coordenadas, altitude, temperatura anual, precipitação anual e classificação climática pelo método de Köppen das regiões de coleta das amostras.

Região	Coordenadas	Altitude	Temperatura Anual	Chuva Anual (mm)	Classificação Climática*
Assis	Latitude: -22.661	560 m	22,19 °C	125,17	Am
	Longitude: -50.3995				
Gonçalves	Latitude: -22.659	1229 m	16,82 °C	159,83	Cfb
	Longitude: -45.8542				
Tarumã	Latitude: -22.7508	430 m	20,9 °C	125,16	Cfa
	Longitude: -50.5763				

*Am: Tropical com excesso de chuvas e inverno seco; Cfb: Subtropical temperado sem estação seca; Cfa: Subtropical quente sem estação seca

4.2. MÉTODOS

4.2.1. UMIDADE

A umidade foi determinada em estufa com circulação de ar forçada a 70 °C. Primeiramente, em cadinhos tarados, foram pesadas amostras contendo entre 3 e 10 g de polpa de gravatá, após a pesagem as amostras foram levadas à estufa, onde ficaram pelo período de 48 h. Passadas as 48 h iniciais, as amostras foram pesadas em intervalos de 2 em 2 horas até ser obtida uma massa constante. O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

4.2.2. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

4.2.2.1. EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

A extração foi realizada em uma incubadora *shaker* com agitação orbital e aquecimento. Primeiramente as amostras foram preparadas pesando a polpa do fruto de gravatá e adicionando o solvente para a extração, água destilada foi utilizada como solvente líquido, na proporção de 0,625 (g/mL) (MALINOVSKA; KUSMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015).

Após a adição do solvente, as amostras foram levadas ao *shaker* por um período de 150 minutos e agitação de 80 rpm a temperatura de 60 °C. Passados os 150 minutos, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2058 g, com a finalidade de precipitar os sólidos. O sobrenadante foi coletado e concentrado em um rotaevaporador, onde a água destilada foi evaporada sob pressão reduzida na temperatura de 70 °C. As amostras concentradas foram mantidas em refrigeração a 4 °C durante 30 minutos para posterior purificação.

4.2.2.2. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

4.2.2.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O processo de extração dos polissacarídeos foi otimizado utilizando a metodologia de superfície de resposta, para isso foi realizado um delineamento Box-Behnken com três variáveis independentes: potência do ultrassom, tempo e razão solvente/amostra, e uma variável dependente: rendimento de polissacarídeos. Baseado em estudos prévios obtidos na literatura os níveis de variação foram: potência do ultrassom (X_1): 50, 100, 150 W; tempo (X_2): 5,0, 7,5, 10,0 min; razão amostra/solvente (X_3): 0,05, 0,06, 0,07 g/mL (OLIVEIRA *et al.*, 2016; MARAN; PRIYA, 2014; CHEN *et al.*, 2015; SKENDERIDIS *et al.*, 2016). Os experimentos foram conduzidos utilizando um aparelho de ultrassom de potência com frequência de 20 KHz e uma sonda ultrassônica de comprimento 4,5 cm e 1,2 cm de diâmetro. As amostras utilizadas para o delineamento foram os gravatás da cidade de Tarumã – SP. O delineamento experimental é apresentado na Tabela 2.

O software Minitab 18 (Minitab Inc. Pensilvânia, EUA) foi utilizado para a realização das análises estatísticas do modelo. A significância do modelo avaliada através da análise de variância (ANOVA).

Tabela 2: Delineamento Box-Behnken para extração assistida por ultrassom de polissacarídeos da polpa de gravatá.

Experimento	Potência (W)	Tempo (min)	Razão amostra/solvente (g/mL)
1	100	7,5	0,06
2	150	5,0	0,06
3	100	10,0	0,05
4	150	10,0	0,06
5	50	7,5	0,05
6	50	5,0	0,06
7	50	7,5	0,07
8	100	5,0	0,07
9	150	5,0	0,06
10	50	10,0	0,06
11	150	7,5	0,05
12	100	5,0	0,05

13	100	10,0	0,07
14	100	7,5	0,06
15	100	5,0	0,05
16	100	10,0	0,05
17	150	7,5	0,07
18	150	10,0	0,06
19	100	7,5	0,06
20	100	7,5	0,06
21	100	7,5	0,06
22	150	7,5	0,05
23	100	10,0	0,07
24	50	5,0	0,06
25	100	5,0	0,07
26	50	7,5	0,05
27	150	7,5	0,07
28	50	7,5	0,07
29	50	10,0	0,06
30	100	7,5	0,06

4.2.2.2.2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO

As extrações foram realizadas em béqueres de 50 mL, a temperatura durante as extrações foi controlada por um banho termostatizado para evitar superaquecimento das amostras. Primeiramente, as amostras foram preparadas pesando a polpa do fruto de gravatá e adicionando o solvente para a extração, água destilada foi utilizada como solvente líquido.

Após a adição do solvente, as amostras foram levadas ao ultrassom, com posterior centrifugação por 10 minutos a 2058 g, com a finalidade de precipitar os sólidos. O sobrenadante foi coletado e concentrado em rotaevaporador, onde a água destilada foi evaporada sob pressão reduzida na temperatura de 70 °C. As amostras concentradas foram mantidas em refrigeração a 4 °C durante 30 minutos para posterior purificação.

4.2.2.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDEA

A purificação da fração polissacarídea foi utilizada com a finalidade de remover todas impurezas presentes nas amostras, foram consideradas impurezas os monossacarídeos e dissacarídeos. A purificação foi realizada adicionando uma solução de etanol e água destilada à concentração de 80% (v/v). Posteriormente, as amostras foram mantidas em refrigeração a uma temperatura de 4 °C durante 24 horas. Os polissacarídeos foram separados por centrifugação a 2058 g durante 10 minutos com posterior secagem em estufa a 40 °C por 24 horas (CHEN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Os extratos de polissacarídeos brutos secos foram macerados com auxílio de um almofariz e pistilo, a fim de se obter um pó, que foi armazenado em dessecador para usos futuros. Os cálculos de rendimento foram realizados em base seca para os dois métodos de extração. Assim foram obtidas 6 amostras diferentes de polissacarídeos, divididas por locais de coleta dos frutos e método de extração. Sendo os locais de coleta Assis (A), Gonçalves (G) e Tarumã (T) e os métodos de extração convencional (C) e assistido por ultrassom (U), foram obtidas as amostras denominadas AC, AU, GC, GU, TC e TU.

O rendimento dos extratos foi calculado através da equação 1, onde R corresponde ao rendimento, M_g corresponde à massa seca de polpa de gravatá e M_e corresponde à massa seca de extrato obtido após a extração.

$$R (\%) = \frac{M_e (g)}{M_g (g)} \times 100\% \quad (1)$$

4.2.3. CARBOIDRATOS TOTAIS

Para a determinação de carboidratos totais foi utilizada a metodologia Fenol-Sulfúrico descrita por Dubois *et al.* (1956) com modificações. A metodologia consiste

na desidratação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados pela 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).

Primeiramente foi contruída uma curva de calibração de D-glucose, para isso foram feitas soluções de D-glucose em água destilada nas concentrações 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL, 1 mL de cada amostra foi pipetada para tubos de ensaio, onde posteriormente foram adicionados 1 mL de solução fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e suas absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 480 nm. A equação da curva de calibração foi $y = 0,0094x + 0,0158$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9971$. Foram preparadas soluções de carboidratos na concentração de 100 µg/mL. Alíquotas de 1 mL das amostras foram transferidas para tubos de ensaio, onde foram adicionados posteriormente 1 mL de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico. Após homogeneização as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 480 nm.

4.2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a determinação dos compostos fenólicos totais foi utilizada a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), sendo utilizado o reagente Folin-Ciocalteu para o ensaio colorimétrico. A medição de absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

Primeiramente foi construída uma curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão em concentrações de 0 a 100 mg/L nas mesmas condições de análise das amostras. A equação da curva de calibração foi $y = 0,0066x$ com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9902$. As amostras foram solubilizadas em água destilada na concentração de 2,5 mg/mL. Em ambiente protegido de luz, foi adicionado a um tubo de ensaio 0,5 mL da amostra, 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu. A mistura foi deixada em repouso por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de Na_2CO_3 10%, o tubo foi então homogeneizado em vórtex e deixado em ambiente escuro durante 1 hora até a leitura em

espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata para todas as amostras e os teores de compostos fenólicos foram expressos em grama equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (g EAG/100g).

4.2.5. ÁCIDO ASCÓRBICO

A quantificação de ácido ascórbico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Souza (2007), que utiliza a reação do 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) com o ácido ascórbico contido na amostra, com posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm.

Primeiramente foi criada uma curva de calibração utilizando ácido oxálico 0,4% como padrão em concentrações de 0 a 0,0595 mg/mL nas mesmas condições de análise das amostras. A equação da curva de calibração foi $y = 0,1963x + 0,0027$ com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9983$. Essa análise foi realizada em 21 tubos de ensaio, sendo 3 para o branco geral e 3 para cada amostra, AC, AU, GC, GU, TC e TU. Os 3 tubos de cada amostra, contando o branco, foram divididos em um branco da amostra, amostra 1 e amostra 2, por exemplo: B_b (Branco do branco geral), B₁ e B₂ (branco 1 e 2); AC_b (Branco amostra AC), AC₁ e AC₂; AU_b, AU₁ e AU₂; GC_b, GC₁ e GC₂; GU_b, GU₁ e GU₂; TC_b, TC₁ e TC₂; TU_b, TU₁ e TU₂.

A preparação das amostras se deu solubilizando 0,1 g de pó de carboidrato em ácido oxálico 0,4% em balões volumétricos de 10 mL. Alíquotas de 1 mL dos extratos de cada amostra foram pipetadas nos tubos b, 1 e 2, no tubo b também foi adicionado 9 mL de água destilada para ser usado como branco da amostra. O branco geral foi feito com ácido oxálico 0,4% no lugar dos extratos de polissacarídeos, onde 1 mL de ácido oxálico foi adicionado aos tubos B_b, B₁ e B₂, sendo que o tubo B_b foi acrescido de 9 mL de água destilada.

Primeiramente o branco (B_b) foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, então 9 mL de solução DCFI foi adicionado ao tubo B₁ que foi homogeneizado em vórtex, com posterior leitura de sua absorbância, em seguida o mesmo processo foi feito com o tubo B₂. Após as primeiras leituras foi adicionado pequenos cristais de ácido ascórbico aos tubos B₁ e B₂ que foram homogeneizados em vórtex resultando em uma solução

incolor, então foi realizada a leitura da absorbância dos tubos B₁ e B₂ novamente. Foi realizado o mesmo processo com todas as amostras. A leitura real das absorbâncias foi obtida subtraindo-se o valor da segunda leitura do valor da primeira. Os testes foram realizados em triplicata para todas as amostras.

4.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante dos polissacarídeos extraídos foi realizada através da metodologia descrita por Kalantzakis *et al.* (2006) adaptada. Este método de determinação consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O preparo da curva padrão e das amostras foram realizadas de acordo com Rufino *et al.* (2007). Primeiramente foram preparadas soluções de DPPH[•] 0,06 mM em álcool metílico nas concentrações 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM, em ambiente escuro a absorbância das diferentes concentrações foram medidas no comprimento de onda de 515 nm. A equação da curva de calibração obtida foi $y = 0,0107x - 0,0099$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9997$. O preparo das amostras foi realizado adicionando álcool metílico 50%, acetona e água destilada na proporção 2:2:1. Primeiramente foi adicionado o álcool metílico na amostra, com posterior homogeneização e repouso por 60 min. Após o repouso, a amostra foi levada para centrifugação a 2058 g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e adicionado a um balão volumétrico. Após a retirada do álcool metílico 50%, foi adicionada a acetona à amostra com posterior homogeneização e repouso por 60 min. Passados os 60 minutos, as amostras foram levadas para centrifugação a 2058 g por 15 min, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao mesmo balão do álcool metílico, que foi completado até o menisco com água destilada e homogeneizado. Foram preparadas soluções com três concentrações diferentes (5, 10 e 15 mg/mL).

Após o preparo das amostras, foi realizada a determinação da atividade antioxidante. Para isso, 1 mL da solução de 15 mg/mL foi adicionado a 4 mL da solução de DPPH[•] 0,6 mM, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e deixadas no escuro pelo período de 25 minutos. Após isso, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 515 nm. Uma amostra controle sem polissacarídeos foi

preparada e teve sua absorvância medida da mesma forma. Os valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA) pela equação 2, onde Abs controle é a absorvância obtida do controle e Abs amostra é a absorvância obtida da amostra.

$$AA = \frac{(Abs\ controle - Abs\ amostra)}{Abs\ controle} \times 100 \quad (2)$$

A quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH[•] pela metade, ou seja, concentração eficiente (CE₅₀) foi determinada graficamente. A absorvância das amostras de 5, 10 e 15 mg/mL foi medida a 515 nm, para isso, 1 mL de amostra foi adicionado à 4 mL de solução DPPH[•] 0,06 mM com posterior homogeneização. As medidas foram tomadas nos tempos 0 e 25 min. Utilizando a curva de calibração e as absorvâncias medidas foi calculado a concentração de DPPH[•] das amostras nos tempos 0 e 25 min. A porcentagem de DPPH[•] remanescente foi calculado a partir da equação 3, onde [DPPH_{t25}] corresponde à concentração de DPPH[•] após 25 minutos de reação com as amostras e [DPPH_{t0}] corresponde à concentração inicial de DPPH[•].

$$DPPH_{remanescente} = \frac{[DPPH\ t25]}{[DPPH\ t0]} \times 100 \quad (3)$$

Foram plotados gráficos a partir da concentração das amostras (mg/mL) versus porcentagem de DPPH[•] remanescente, e pela equação de regressão linear dos gráficos foram utilizados para se obter os valores de CE₅₀ para cada amostra de polissacarídeo.

4.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir do delineamento experimental foram avaliados com 5% de significância. As determinações analíticas foram expressas como média $\pm$ desvio padrão de três repetições e foram comparadas pelo teste de Tukey por análise de variância (ANOVA). Todos os cálculos foram realizados em base seca.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. UMIDADE

Na Figura 3 pode-se observar as porcentagens de umidade encontradas nas polpas de gravatás de frutos colhidos em diferentes locais. É possível verificar que os gravatás da cidade de Tarumã – SP apresentam uma porcentagem menor de umidade.

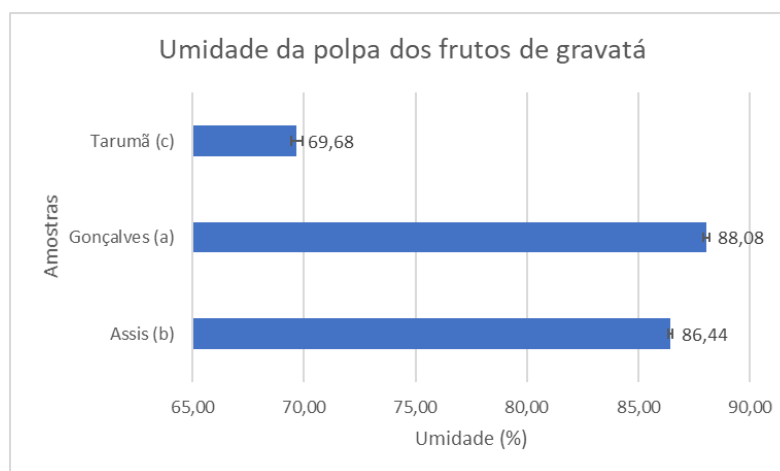


Figura 3: Umidade (%) das polpas dos frutos de gravatá colhidos em três cidades diferentes. Valores médios ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes entre parênteses após os nomes das amostras indicam diferença estatística (Teste de Tuckey $p < 0,05$).

Em estudos de fenologia do gênero *Bromelia*, Cariolatto (2019) encontrou exemplares de *Bromelia balansae* Mez. em diferentes locais de coleta com diferentes características físicas, como por exemplo, tamanho do fruto, número de frutos por

cacho e taxa de sólidos solúveis. Essas diferenças podem ser observadas nos frutos colhidos nas três cidades diferentes (Figura 4). Filippon (2009) trabalhando com a espécie *Bromelia antiacantha* Bertol., também encontrou diferenças físicas entre os indivíduos, sendo elas no tamanho do broto, tamanho das folhas, número de frutos e tamanho dos frutos.



Figura 4: Frutos de gravatá colhidos em Assis (A), Gonçalves (B) e Tarumã (C) (Fonte: O autor).

As mudanças climáticas entre as diferentes regiões afetam as plantas e consequentemente seus frutos, isso pode justificar as diferenças de umidade entre os gravatás de diferentes locais de coleta. Evaristo *et al.* (2017) encontrou diferenças nas umidades encontradas no endocarpo e mesocarpo de macaúbas coletadas em três regiões diferentes do estado de Minas Gerais. Foram obtidos os valores de umidade

43,61% para frutos nativos da região central do estado (Sete Lagoas), 38,33% e 46,77% para frutos das regiões norte (Montes Claros) e Zona da Mata (Acaiaca) respectivamente. As regiões de Sete Lagoas e de Acaiaca apresentam a mesma classificação climática, clima temperado úmido com inverno seco e verão úmido (Cwa) isso pode explicar os valores semelhantes de umidade nos frutos.

Os gravatás coletados em diferentes locais com diferentes classificações climáticas apresentaram diferenças estatísticas no valor de umidade da polpa, sendo os gravatás de Tarumã – SP os exemplares com menor porcentagem de umidade e os gravatás de Gonçalves – MG com a maior. Essa diferença pode ser explicada devido a variações climáticas e do solo encontradas em cada região de coleta e, ainda, devido a possíveis diferenças no período de maturação dos frutos.

5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

No processo de extração assistida por ultrassom, três parâmetros podem influenciar o rendimento de polissacarídeos: potência, tempo e razão amostra/solvente. Na Tabela 3 são apresentadas as variáveis independentes utilizadas no delineamento e o rendimento (%) obtido em cada experimento. A análise de variância (ANOVA) do delineamento estão presentes na Tabela 4.

Tabela 3: Variáveis e resultados do delineamento Box-Behnken na extração de polissacarídeos.

Experimento	Variáveis Codificadas			Potência (W)	Tempo (min)	Razão amostra/solvente (g/mL)	Rendimento (%)
	X ₁	X ₂	X ₃				
1	0	0	0	100	7,5	0,06	11,38
2	1	-1	0	150	5	0,06	14,47
3	0	1	-1	100	10	0,05	13,07

4	1	1	0	150	10	0,06	14,03
5	-1	0	-1	50	7,5	0,05	13,25
6	-1	-1	0	50	5	0,06	19,68
7	-1	0	1	50	7,5	0,07	15,31
8	0	-1	1	100	5	0,07	11,08
9	1	-1	0	150	5	0,06	13,24
10	-1	1	0	50	10	0,06	13,58
11	1	0	-1	150	7,5	0,05	17,05
12	0	-1	-1	100	5	0,05	19,94
13	0	1	1	100	10	0,07	23,83
14	0	0	0	100	7,5	0,06	17,59
15	0	-1	-1	100	5	0,05	22,72
16	0	1	-1	100	10	0,05	21,41
17	1	0	1	150	7,5	0,07	20,98
18	1	1	0	150	10	0,06	20,06
19	0	0	0	100	7,5	0,06	15,95
20	0	0	0	100	7,5	0,06	19,96
21	0	0	0	100	7,5	0,06	21,88
22	1	0	-1	150	7,5	0,05	19,57
23	0	1	1	100	10	0,07	25,12
24	-1	-1	0	50	5	0,06	18,03
25	0	-1	1	100	5	0,07	16,45
26	-1	0	-1	50	7,5	0,05	14,06
27	1	0	1	150	7,5	0,07	16,29

28	-1	0	1	50	7,5	0,07	14,11
29	-1	1	0	50	10	0,06	20,25
30	0	0	0	100	7,5	0,06	14,73

Tabela 4: Análise de variância do modelo.

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Modelo	9	0,02	0,002	1,72	0,15
X₁ (Potência)	1	0,0003	0,0003	0,29	0,595
X₂ (Tempo)	1	0,002	0,002	1,31	0,265
X₃ (Razão)	1	0,00003	0,00003	0,02	0,880
X₁²	1	0,002	0,002	1,53	0,231
X₂²	1	0,003	0,003	1,08	0,311
X₃²	1	0,0007	0,0007	0,59	0,450
X₁.X₂	1	0,001	0,001	1,12	0,302
X₁.X₃	1	0,00003	0,00003	0,02	0,883
X₂.X₃	1	0,01	0,01	9,30	0,006
Erro	20	0,02	0,001		
Falta de Ajuste	3	0,005	0,002	1,65	0,215
Erro Puro	17	0,02	0,001		
Total	29	0,04			
R² = 0,437	R² ajustado = 0,1836				

Segundo Maran e Priya (2014), a relação entre amostra/solvente tem grande efeito sobre a extração. Quanto maior a quantidade de solvente utilizado maior será a extração, pois a área de contato entre a amostra e o líquido é maior, fazendo com que os polissacarídeos se dissolvam completamente no solvente. Porém, quando essa relação chega a um limite, o rendimento da extração pode diminuir, pois quanto mais solvente, menor será a taxa de energia que o ultrassom consegue transferir para a amostra.

Uma maior potência do ultrassom afeta positivamente o rendimento final da extração, até um limite, pois os resultados obtidos passaram a diminuir. Chen *et al.* (2015) obteve resultados que indicam um maior rendimento na extração de polissacarídeos quanto maior a potência do ultrassom, pois quanto maior a força ultrassônica mais as células vegetais se rompem, liberando seus componentes no solvente. Porém uma potência muito alta pode causar a hidrólise dos polissacarídeos devido a alta intensidade da cavitação gerada pelo ultrassom, resultando em menor rendimento da extração.

A eficiência da extração de polissacarídeos aumenta conforme o tempo do processo, pois o número de micro bolhas criadas pelo ultrassom aumenta o processo de cavitação provocando a disrupção das células e permitindo que o solvente entre em contato com o composto desejado. Porém um elevado tempo de extração pode causar uma redução no rendimento, causado pelo aquecimento da amostra, além da exposição excessiva ao ultrassom poder causar uma destruição estrutural e decomposição dos polissacarídeos fazendo com que a amostra libere substâncias insolúveis no solvente. (MARAN; PRIYA, 2014; MARAN; MEKALA; MANIKANDAN, 2013).

A partir da análise do delineamento Box-Behnken realizado variando-se os parâmetros obteve-se os resultados expressos nos gráficos de contorno (Figura 5A) e superfície (Figura 5B).

De acordo com a Figura 5A, observa-se que para relações amostra/solvente menores (abaixo de 0,06 g/mL aproximadamente), o aumento do tempo de extração diminui o rendimento de extração, enquanto que para valores superiores a 0,06 g/mL, o aumento do tempo de extração tende a aumentar o rendimento de extração.

A partir da Tabela 3, determinamos os maiores e menores valores de rendimento encontrados no delineamento, onde é possível observar que os melhores resultados foram encontrados nos experimentos 23, 13, 15, 21 e 16, nesta ordem, e os menores valores nos experimentos 8, 1, 3, 9 e 4, nesta ordem. O maior valor de rendimento encontrado foi de 25,12% no tratamento 23 (100 W, 10 min e 0,07 g/mL), enquanto o menor valor encontrado foi de 11,08% no tratamento 8 (100 W, 5 min e 0,07 g/mL). Comparando-se esses dois tratamentos observa-se que o aumento do tempo de extração aumentou o rendimento da extração. O maior valor de rendimento encontrado é superior ao encontrado por Lima e Portari (2019), que encontraram 17,89% de carboidratos totais em polpa de frutos de gravatás colhidos no município de Monte Alto – SP através do cálculo de diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteínas, lipídios e cinzas.

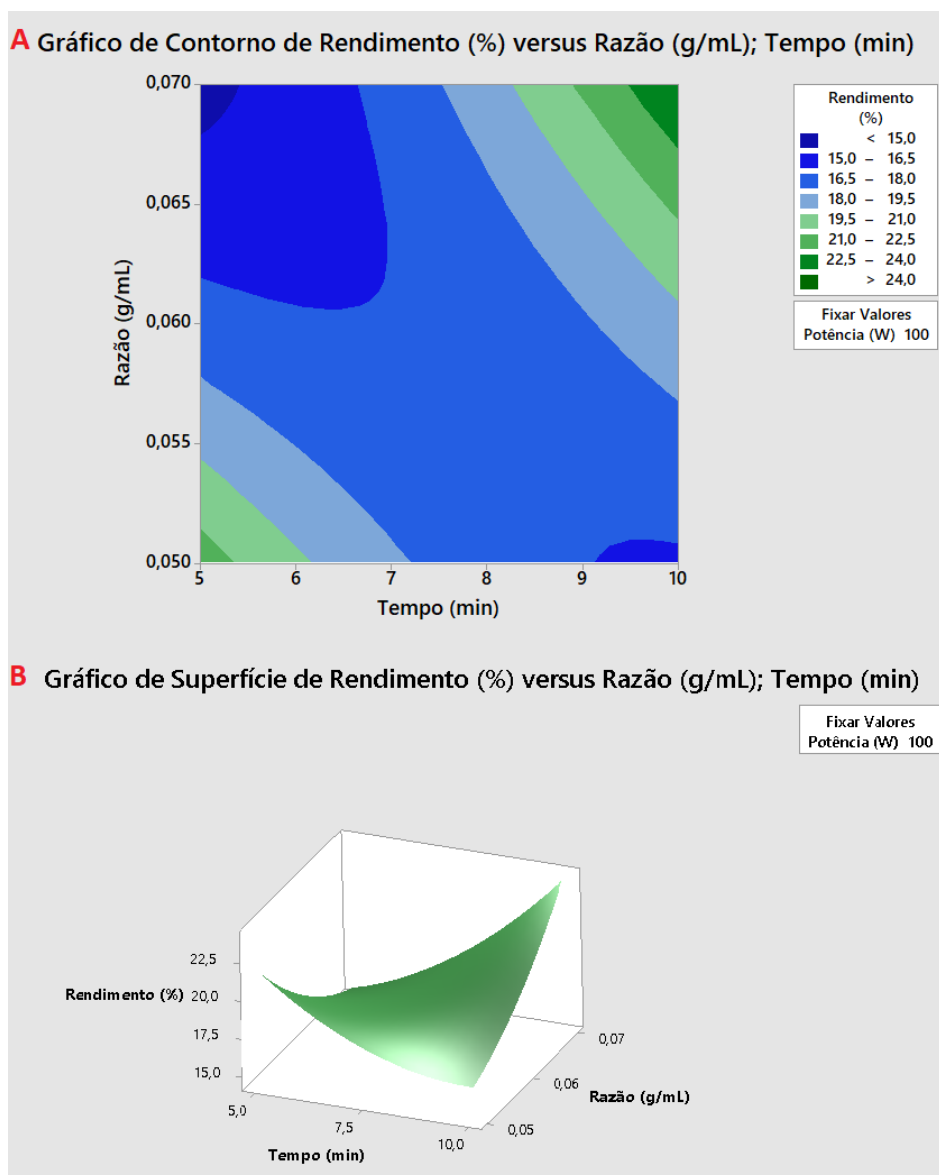


Figura 5: Gráficos de contorno (A) e superfície (B) de rendimento (%) versus razão massa/volume (g/mL); tempo (min) com potência fixada em 100 W.

A partir da análise de variância dos resultados do delineamento experimental verificou-se que o modelo testado não se ajustou aos dados para um nível de significância $p < 0,05$. O delineamento resultou em um modelo polinomial de segunda ordem com a equação $\text{Rendimento} = 128,9 + 0,072 \cdot X_1 - 12,87 \cdot X_2 - 2329 \cdot X_3 - 0,000591 \cdot X_1^2 + 0,224 \cdot X_2^2 + 10571 \cdot X_3^2 + 0,01026 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,36 \cdot X_1 \cdot X_3 + 148,0 \cdot X_2 \cdot X_3$ ($R^2 = 0,437$).

Mesmo com o delineamento não apresentando nível de significância, para as análises seguintes, foram utilizados os parâmetros de potência do ultrassom de 100

W, tempo de 10 min e razão amostra/solvente igual a 0,07 (g/mL), pois os resultados convergiam para esses valores.

5.3. RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

A Tabela 5 demonstra o rendimento da extração de polissacarídeos obtidos de cada amostra. É possível verificar que não houveram diferenças significativas entre os métodos de extração, apenas para as amostras de Gonçalves – MG, indicando que ambas metodologias podem ser utilizadas para a obtenção de polissacarídeos, porém a extração assistida por ultrassom demanda menos tempo e preserva mais as amostras de polissacarídeos, devido a temperatura de extração ser menor.

Tabela 5: Rendimento (%) de polissacarídeos obtido pelos diferentes métodos de extração.

Amostra	Método de Extração*	
	Convencional	Ultrassom
Assis	10,84 ± 2,79 ^{a**}	10,91 ± 0,58 ^a
Gonçalves	6,20 ± 0,93 ^b	12,26 ± 2,6 ^a
Tarumã	14,07 ± 2,87 ^a	15,21 ± 4,10 ^a

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

**Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística (Teste de Tuckey $p < 0,05$).

Foi verificado em estudo que nas mesmas condições de temperatura e tempo, a extração convencional de polissacarídeos apresentou resultados 1,6 vezes menores que a extração assistida por ultrassom, porém a diferença foi reduzida quando o período de tempo em que a amostra foi submetida à extração convencional aumentou (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Maran, Mekala e Manikandan (2013) encontraram um rendimento de polissacarídeos de $16,04 \pm 0,53$ % na polpa de abóbora-cheirosa (*Cucurbita moschata*), Chen, *et al.* (2015) obtiveram $3,13 \pm 0,07$ % de rendimento de

polissacarídeos na polpa de amora (*Morus alba*), o cornel japonês (*Cornus officinalis*) apresentou $9,29 \pm 0,31$ % de polissacarídeo em sua polpa (YOU; YIN; ZHAO, 2013) e o fruto de *Camptotheca acuminata* apresentou um rendimento de polissacarídeos de $6,81 \pm 0,04$ % (SUN, *et al.*, 2019). Analisando os resultados obtidos é possível determinar que o fruto do gravatá é uma boa fonte de polissacarídeos de origem não convencional.

5.4. ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS

As análises de carboidratos totais, compostos fenólicos, ácido ascórbico e atividade antioxidante resultaram nos valores expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das análises de carboidratos totais (%), compostos fenólicos totais (g EAG/100g), ácido ascórbico (mg/100g), atividade antioxidante na concentração de 15 mg/mL e valores de IC₅₀ (mg/mL) da porção polissacarídea extraída da polpa de gravatá.

Amostra	Carboidratos Totais (%)	Compostos Fenólicos (g EAG/100g)	Ácido Ascórbico (mg/100g)	Atividade Antioxidante (%)	CE ₅₀ (mg/mL)
AC	$87,33 \pm 3,37^{a*}$	$3,44 \pm 0,05^b$	$0,06 \pm 0,03^c$	$62,17 \pm 0,91^d$	$19,28 \pm 0,18^a$
AU	$91,81 \pm 2,19^a$	$3,54 \pm 0,04^{ab}$	$0,06 \pm 0,01^c$	$93,16 \pm 0,17^a$	$14,17 \pm 0,95^c$
GC	$57,97 \pm 1,06^c$	$1,39 \pm 0,03^d$	$0,10 \pm 0,01^{bc}$	$62,00 \pm 2,98^d$	$16,00 \pm 0,36^b$
GU	$42,57 \pm 1,14^d$	$2,82 \pm 0,03^c$	$0,17 \pm 0,03^a$	$60,25 \pm 1,55^d$	$15,08 \pm 0,13^{bc}$
TC	$74,73 \pm 6,46^b$	$3,44 \pm 0,15^b$	$0,14 \pm 0,02^{ab}$	$68,46 \pm 0,72^c$	$14,71 \pm 0,07^{bc}$

TU	$73,85 \pm 3,32^b$	$3,66 \pm 0,04^a$	$0,19 \pm 0,01^a$	$86,05 \pm 0,48^b$	$14,28 \pm 0,02^c$
-----------	--------------------	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------

*Valores médios (n=3) $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística (Teste de Tuckey, $p < 0,05$).

5.4.1. CARBOIDRATOS TOTAIS

Observando a Tabela 6 é possível notar que para as amostras de Assis – SP e Tarumã – SP o método de extração não afetou a quantidade de carboidratos totais, porém as amostras de Gonçalves – MG diferiram entre si de acordo com o método utilizado para a extração.

Os maiores valores de carboidratos totais foram encontrados nos gravatás coletados no município de Assis – SP indicando um maior valor de polissacarídeos encontrados. Os gravatás do município de Gonçalves – MG apresentaram os menores valores de polissacarídeos, principalmente nas amostras obtidas pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

O clima do local, os nutrientes encontrados no solo e umidade relativa do ar diferentes podem resultar em diferentes composições para a mesma espécie de fruto. Em ambientes frios os compostos fotoassimilados pela fotossíntese não são totalmente direcionadas ao crescimento vegetal, assim, existe um aumento na concentração destes solutos no citoplasma, estabilizando o equilíbrio termodinâmico e diminuindo o estresse pela desidratação ocasionada pelo frio. Da mesma forma, alterações na composição dos carboidratos presentes na parede celular estão relacionadas com a proteção ao frio (CARVALHO, 2012).

A região de Gonçalves – MG é consideravelmente mais fria do que as regiões de Assis – SP e Tarumã – SP, podendo ser uma das causas do menor valor de polissacarídeos na polpa do gravatá. A região de Assis – SP é a mais quente dentre as regiões escolhidas para a coleta das amostras, o que pode promover um maior acúmulo de polissacarídeos na polpa dos frutos colhidos nessa localidade. =

A diferença entre a extração convencional e a extração assistida por ultrassom nas amostras de Gonçalves – MG podem ser explicadas devido ao clima mais frio da região que possivelmente promoveu uma formação de polissacarídeos diferente das demais, e com o ultrassom as estruturas químicas desses polissacarídeos podem ter sido quebradas, resultando em um menor valor de carboidratos totais. Porém nas amostras de Assis – SP e Tarumã – SP ambos os métodos de extração podem ser aplicados para se obter polissacarídeos.

Utilizando o método fenol-sulfúrico, Zhu *et al.* (2012) obtiveram o valor de carboidratos totais de 42,3% em cogumelos *Lentinus edodes*, enquanto Caldas *et al.* (2015) testando néctares de suco de uva encontraram 13,78% e 15,07% em duas amostras diferentes. Souza *et al.* (2011) determinaram o teor de carboidratos totais em resíduos de polpa de frutas tropicais e encontraram 27,98% em goiaba, 10,76% em acerola, 9,54% no abacaxi, 12,99% na graviola, 9,14% no bacuri e 0,6% no cupuaçu. Assim, os extratos brutos de polissacarídeos extraídos da polpa do gravatá apresentaram elevados valores de carboidratos totais, indicando que, independente do tipo de extração, o processo foi eficiente.

5.4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Regiões com elevadas taxas de incidência de raios solares promovem uma geração de radicais livres nas plantas, essa condição pode favorecer a biossíntese de compostos com propriedades antioxidantes como, por exemplo, compostos fenólicos e carotenoides (LIMA *et al.*, 2007). As frutas apresentam quantitativa e qualitativamente, composições variadas de polifenóis em função de fatores intrínsecos (cultivar, variedade, estágio de maturação) e extrínsecos (condições climáticas e edáficas) (MELO *et al.*, 2008). Diferentes regiões possuem diferentes taxas de incidência solar, condições climáticas e edáficas o que resulta em diferentes quantidades de compostos fenólicos presentes nos frutos de gravatá, como pode ser observado na Tabela 6.

As amostras de polissacarídeos com maior quantidade de compostos fenólicos são dos frutos de gravatá das cidades de Tarumã – SP e de Assis – SP. Os frutos da

cidade de Gonçalves – MG apresentaram as menores concentrações de compostos fenólicos independente do método de extração utilizado. No entanto, é possível notar que as amostras de Tarumã – SP e de Gonçalves – MG foram bastante influenciadas pelo método de extração, sendo o método utilizando ultrassom mais eficaz na extração dos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a alguma molécula, como açúcares (glicosilados), ésteres (esterificados), amidos (amidados) e hidroxilas (hidroxilados). No caso dos compostos fenólicos glicosilados, muitos parâmetros podem influenciar na eficiência da extração dependendo do tipo de açúcar ligado. O tempo e a temperatura expostos à amostra podem influenciar na degradação ou hidrólise do glicosídeo que o composto fenólico está ligado, afetando assim sua extração e quantificação (SPOLADORE, 2014). A extração convencional expõe as amostras a uma temperatura elevada por tempo superior comparada a extração por ultrassom, o que pode ter afetado a quantidade final de compostos fenólicos pela degradação dos glicosídeos e dos compostos fenólicos livres.

Compostos fenólicos tendem a ser hidrosolúveis, pois são frequentemente encontrados ligados a açúcares, sendo chamados de glicosídeos, como por exemplo a lignina que é encontrada ligada a celulose. Ácidos fenólicos podem ser encontrados ligados à lignina combinados em grupos ésteres ou na fração solúvel em álcool do tecido vegetal na forma de glicosídeos. Flavonóides são compostos fenólicos majoritariamente solúveis em água e geralmente são encontradas na forma de glicosídeos, os flavonóides podem ser encontrados em várias combinações glicosídicas diferentes (HARBORNE, 1973).

Aumentar a temperatura de extração pode causar uma maior difusão dos polissacarídeos e outras moléculas no solvente aquoso. Porém aumentar muito a temperatura pode diminuir a eficácia da extração, devido a despolimerização da cadeia de carboidratos. As extrações com menor calor facilitam a obtenção de compostos fenólicos com alta capacidade antioxidante (SKENDERIDIS *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016). O aumento da concentração de compostos bioativos pode ter sido resultado da intensa transferência de massa causada pelo processo de cavitação gerado pela sonicação, o que facilita o fluxo de solvente no interior dos tecidos vegetais, melhorando a extração (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Visto isso podemos concluir que apesar dos extratos polissacarídeos dos frutos de Assis – SP obtidos através da

extração convencional apresentarem maior quantidade de carboidratos totais, os compostos fenólicos totais presentes são inferiores aos encontrados nas amostras de Tarumã – SP obtidos através da metodologia de extração assistida por ultrassom, possivelmente causada pela queda na eficácia da extração de tais compostos devido a temperatura elevada na extração convencional. Analisando frutos do Cerrado, Silva (2010) obteve o valor 2,474 g EAG/100g de compostos fenólicos na polpa, 1,3 g EAG/100g na casca e 0,152 g EAG/100g nas sementes de gravatás coletados em Campo Grande – MS. Assim, é possível deduzir que a maior porção de fenólicos encontrados em frutos de gravatás estão ligados a fração de polissacarídeos.

Analisando polpa de goiaba, Haida *et al.* (2015) encontraram 0,113 g EAG/100g na polpa com sementes, Silva (2010) obteve o valor de 0,801 g EAG/100g para frutos de araçá. Souza, Vieira e Lima (2011) analisando resíduos de frutos tropicais, obtiveram 0,025 g EAG/100g em resíduos de goiaba, 0,248 g EAG/100g em resíduos de acerola, 0,009 g EAG/100g em resíduos de abacaxi, 0,019 g EAG/100g em resíduos de graviola e 0,005 g EAG/100g em resíduos de cupuaçu.

De maneira geral, os polissacarídeos encontrados na polpa dos frutos de gravatá apresentam quantidades elevadas de compostos fenólicos, se mostrando uma boa fonte desses compostos.

5.4.3. ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico é um composto com potencial antioxidante muito pesquisado pois é muito sensível a diversas condições de processamento e armazenamento. A degradação da vitamina C pode ser relacionado com pH, luz, contato com oxigênio e temperatura (GABAS; ROMERO; MENEGALLI, 2003). Na Tabela 6 pode-se observar as concentrações de ácido ascórbico encontradas nas amostras de polissacarídeos de gravatá.

Os valores de ácido ascórbico foram inferiores aos encontrados por Freitas (2019), que encontrou 48,34 mg/100g de ácido ascórbico na polpa de gravatás enquanto Krumreich *et al.* (2015) encontrou o valor de ácido ascórbico de 60,01 mg/100g na polpa de frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. Assim, é possível deduzir

que o ácido ascórbico presente na polpa do fruto de gravatá não está ligado aos seus polissacarídeos, sendo assim, o processo de extração de polissacarídeos não extraiu ácido ascórbico.

5.4.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os valores de atividade antioxidante encontrados utilizando a metodologia de captura dos radicais DPPH podem ser observados na Tabela 6.

O CE_{50} indica a concentração capaz de reduzir a concentração de DPPH na amostra em 50%, ou seja, quanto menor o CE_{50} maior será a atividade antioxidante da amostra analisada. É possível notar que para os polissacarídeos de Assis – SP houve uma diferença entre os métodos de extração, o que não foi observado para as amostras dos municípios de Gonçalves – MG e Tarumã – SP. No caso em que houve diferença entre as metodologias de extração, o método de extração assistido por ultrassom se mostrou mais eficiente para preservar os compostos antioxidantes.

O maior valor encontrado foi na amostra de Assis – SP submetida à extração assistida por ultrassom, seguida pela amostra de Tarumã – SP que passou pelo mesmo processo. A atividade sequestradora de radical livre dos compostos fenólicos não depende apenas da capacidade de formar um radical fenoxil, mas também na estabilidade do radical fenoxil. Compostos fenólicos com substituintes que podem estabilizar os radicais fenoxil possuem maior capacidade antioxidante. Estudos em lignina indicam que nos compostos fenólicos, o grupo hidroxila livre é essencial para a atividade antioxidante. A lignina apresentou valores de IC_{50} menores que os antioxidantes comerciais (PAN, *et al.*, 2006; OLIVEIRA, *et al.*, 2019). Os ácidos fenólicos possuem um anel benzênico, um agrupamento carboxílico e um grupo hidroxila e/ou metoxila isso os torna compostos com propriedades antioxidantes pois possuem a capacidade de sequestrar os radicais livres (SOARES, 2002).

Os extratos que apresentaram maiores valores de compostos fenólicos (Assis – SP e Tarumã – SP obtidos através de extração assistida por ultrassom), apresentaram os menores valores de IC_{50} , ou seja, maior capacidade antioxidante, devido a maior

extração e preservação dos compostos fenólicos presentes nos polissacarídeos do fruto de gravatá.

Yang *et al.* (2013) realizaram a extração dos polissacarídeos brutos de *Opuntia dillenii* utilizando a metodologia de extração assistida por ultrassom, e avaliando os polissacarídeos extraídos quanto à atividade antioxidante foi encontrado um valor de EC₅₀ de 408,32 µg/mL em amostras com 90,12% de pureza. Chen *et al.* (2003) obtiveram uma porcentagem inibitória de 61,6% em polissacarídeos extraídos de chá verde. Em frutos de *Medemia argun*, Mohammed *et al.* (2020) encontraram um IC₅₀ de 5,17 mg/mL nos polissacarídeos extraídos. Krumreich *et al.* (2015) encontraram 178,56 mg equivalentes ao trolox/100g ao analisar os compostos antioxidantes da polpa de *Bromelia antiacantha* Bertol.

Os polissacarídeos extraídos das polpas de gravatás apresentam significativa capacidade antioxidante, principalmente as amostras extraídas pela metodologia assistida por ultrassom.

6. CONCLUSÕES

O clima de diferentes locais de coleta pode afetar a composição final dos frutos, desde a umidade da polpa até o rendimento dos carboidratos e os compostos bioativos encontrados.

As frações polissacarídeas obtidas apresentaram elevada quantidade de carboidratos totais, principalmente as amostras extraídas dos gravatás coletados no município de Assis – SP, o que indica que os métodos de extração foram eficientes.

Os frutos da cidade de Tarumã – SP apresentaram os menores valores de umidade da polpa e os maiores valores de compostos fenólicos, indicando que talvez a quantidade reduzida de água no fruto promoveu uma maior biossíntese dos compostos bioativos.

O uso de ultrassom na extração de polissacarídeos gerou bons rendimentos com tempo menor de processamento, além disso os polissacarídeos obtidos por essa

metodologia apresentaram maiores valores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Os polissacarídeos da polpa de gravatá se mostraram fontes interessantes de compostos antioxidantes, visto que o fruto está amplamente presente no território brasileiro, seus polissacarídeos poderiam ser uma boa fonte de aditivos alimentares, farmacêuticos ou cosméticos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. S. **Recuperação ambiental Mata Atlântica**. 3. ed. Ilhéus. Editus, 2016.

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.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismo de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009.

BASUALDO, I.; ZARDINI, E. M.; ORTIZ, M. Medicinal Plants of Paraguay: Underground Organs, II. **Economy Botany**, v. 49, p. 387-394, 1995.

CALDAS, B. S.; CONSTANTINO, L. V.; SILVA, C. H. G. A.; MADEIRA, T. B.; NIXDORF, S. L. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v.7, p. 53-63, 2015.

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 Sil, Cerro Largo, 2019.

CARVALHO, C. P. **Influências de baixas temperaturas no crescimento, conteúdo de carboidratos e aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez. Cultivada *in vitro***. São Paulo – SP, 2012. 119 p. Dissertação (Mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2012.

CHEN, C.; YOU, L. J.; ABBASI, A. M.; FU, X.; LIU, R. H. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 122-132, 2015.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry**, v. 90, p. 17-21, 2003.

COELHO, R. A. **Obtenção de óleo de sementes de quiuí (*Actinidia deliciosa*) utilizando extração com solvente pressurizado e extração assistida com ultrassom**. Curitiba – PR, 2015. 76 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EVARISTO, A. B.; GOULART, S. M.; MARINS, A. D.; PIMENTEL, L. D.; GROSSI, J. A. S. Caracterização físico-química de frutos de macaúba provenientes de três regiões do estado de Minas Gerais. **Agro Tecnologia**, v. 8, p. 81-92, 2017.

FILIPPON, S. **Uso e manejo de caraguatá (*Bromelia antiacantha*) no planalto norte catarinense: Está em curso um processo de domesticação?**. Florianópolis – SC, 2014. 198 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

FIORAVANTE, M. B.; HIANE, P. A.; CAMPOS, R. P.; CANDIDO, C. J. Qualidade nutricional e funcional de biscoito de farinha de caraguatá (*Bromelia balansae* Mez). **Eniabeu E-journals**, v. 9, p. 221-235, 2016.

FLAUZINO, C. A. O. **Avaliação do potencial nutricional e antioxidante de resíduos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtidos após extração do óleo**. Assis – SP, 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Biociências). Universidade Estadual Paulista, Assis, 2020.

FREITAS, M. N. **Caracterização química da polpa de gravatá (*Bromelia antiacantha* Bertol.)**. Assis – SP, 2019. 28 p. Monografia (Conclusão de Curso em Engenharia Biotecnológica). Universidade Estadual Paulista, Assis, 2019.

GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F. C. Cinética de degradação do ácido ascórbico em ameixas liofilizadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 66-70, 2003.

GALINDO-LEAL, C. CÂMARA, I. G. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. 1. ed. Belo Horizonte. IDM Composição e Arte, 2005.

GRASSINO, A. N.; BRNČIĆ, M.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; ROCA, S.; DENT, M.; BRNČIĆ, S. R. Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 198, p. 98-100, 2015.

HAIDA, K. S.; HAAS, J.; MELLO, S. A.; HAIDA, H. S.; ABRÃO, R. M.; SAHD, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de goiaba (*Psidium guajava* L.) fresca e congelada. **Revista Fitos**, v. 9, p. 37-44, 2015.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. 1. ed. Nova York. [Chapman and Hall Ltd], 1973.

KALANTZAKIS, G.; BLEKAS, G.; PEGKLIDOU, K.; BOSKOU, D. Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 329-335, 2006.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 846-857, 2008.

KRUMREICH, F. D.; CORRÊA, A. P. A.; SILVA, S. D. S.; ZAMBIANI, R. C. Composição físico-química e de compostos bioativos em frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 450-456, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo. [s.n.], 2002.

LIMA, M. C.; PORTARI, G. V. Centesimal composition and oxidant compounds of two fruits from the *Cerrado* (Brazilian Savannah). **Revista Ceres**, v. 66, p. 41-44, 2019.

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 Brasil Fruticultura**, v. 29, p. 695-698, 2007.

LIN, L. M.; ZHAO, L. J., DENG, J., XIONG, S. H.; TANG, J.; LI, Y. M.; XIA, B. H.; LIAO, D. F. Enzymatic extraction, purification, and characterization of polysaccharides from *Penthorum chinense* pursh: Natural antioxidant and antiinflammatory. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

MALINOVSKA, R. J.; KUZMANOVA, S.; WINHELHAUSEN, E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 446-453, 2015.

MANELA-AZULAY, M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 73, p. 265-274, 2003.

MARAN, J. P.; MEKALA, V.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2018-2026, 2013.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 530-536, 2014.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 193-201, 2008.

MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T.; AYRES, J. M.; FONSECA, G. A. B. O país da diversidade. **Ciência Hoje**, v. 14, p. 20-27, 1992.

MOHAMMED, J. K.; MAHDI, A. A.; AHMED, M. I.; MA, M.; WANG, H. Preparation, deproteinization, characterization, and antioxidant activity of polysaccharide from *Medemia argun* fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 919-926, 2020.

OLIVEIRA, C. F.; GIORDANI, D.; LUTCKEMIER, R.; GURAK, P. D.; OLIVEIRA, F. C.; MARCZAK, L. D. F. Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. **LWT – Food Science and Technology**, v. 71, p. 110-115, 2016.

OLIVEIRA, D. R.; AVELINO, F.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S. E.; ROSA, M. F.; OLIVEIRA, D. L. V. Avaliação da atividade antioxidante de lignina organosolve obtida do mesocarpo do dendê. **Encontros Universitários da UFC**, v. 4, p. 2302, 2019.

PAN, X.; KADLA, J. F.; EHARA, H.; GILKES, N.; SADDLER, J. N. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 5806-5813, 2006.

PARDO, M. F.; LÓPEZ, L. M. I.; CANALS, F.; AVILÉS, F. X.; NATALUCCI, C. L.; CAFFINI, N. O. Purification of Balansain I, an Endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3795-3800, 2000.

PARRA-CORONADO, A. FISHCER, G. CAMACHO-TAMAYO, J. H. Development and quality of pineapple guava fruit in two locations with different altitudes in Cundinamarca, Colombia. **Bragantia**, v. 74, p. 359-366, 2015.

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

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1215-1221, 2011.

ROLIM, G. S.; CAMARGO, M. B. P.; LANIA, D. G.; MORAES, J. F. L. Classificação climática de Köppen e de Thotnthawaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 66, p. 711-720, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNES, J. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPQA, 2007. 4 p. (EMBRAPA/CNPQA. Comunicado Técnico, 127).

SILVA, G. M. **Potencial antioxidante de frutos do cerrado e do pantanal, no estado de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande – MS, 2010, 77 p. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682, 2010.

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

SKENDERIDIS, P.; PETROTOS, K.; GIAVASIS, I.; HADJICHRISTODOULOU, C.; TSAKALOF, A. Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, p 1-13, 2016.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 202-210, 2011.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Belo Horizonte – MG, 2007. 296 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SPOLADORE, S. F. **Modelagem matemática da secagem de casca de maracujá e influência da temperatura na cor, compostos fenólicos e atividade antioxidante**. Campo Mourão – PR, 2014. 35 p. Monografia (Conclusão de curso em Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

SUN, H.; LI, C.; NI, Y.; YAO, L.; JIANG, H.; REN, X.; FU, Y.; ZHAO, C. Ultrasonic/microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits and its antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 557-564, 2019.

TOLIĆ, M. T.; KRBAVČIĆ, I. P.; VUJEVIĆ, P.; MILINOVIĆ, B.; JURČEVIĆ, I. L.; VAHČIĆ, N. Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). **Polish Journal of Food and Nutritional Sciences**, v. 67, p. 67-74, 2017.

TREWARTHA, G. T. **Mcgraw-Hill**. 3. ed. Nova York [s.n.], 1954.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, p. 905-911, 2010.

XU, C.; ZHANG, Y.; ZHU, L.; HUANG, Y.; LI, J. Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1078-1086, 2011.

YANG, Q.; CHEN, H.; ZHOU, X.; ZHANG, J. Optimum extraction of polysaccharides from *Opuntia dillenii* and evaluation of its antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 736-742, 2013.

YOU, Q.; YIN, X.; ZHAO, Y. Enzyme assisted extraction of polysaccharides from the fruit of *Cornus officinalis*, **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 607-610, 2013.

ZHANG, D. Y.; WAN, Y.; XU, J. Y.; WU, G. H.; LI, L.; YAO, X. H. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 473-479, 2016.

ZHU, H.; SHENG, K.; YAN, E.; QIAO, J.; LV, F. Extraction, purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 840-843, 2012.