

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS TOLEDO**

**EVELYN DIANE PEREIRA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) E SUA INFLUÊNCIA EM COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS UTILIZADAS NA PISCICULTURA**

**TRABALHO DE DEFESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOTECNOLÓGICOS  
PPGQB**

**TOLEDO  
2019**

**EVELYN DIANE PEREIRA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) E SUA INFLUÊNCIA EM COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS UTILIZADAS NA PISCICULTURA**

Trabalho de Defesa apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Toledo.

Orientador(a): Ricardo Fiori Zara

**TOLEDO  
2019**

Ficha catalográfica elaborada por Mariana Senhorini Caron - CRB/9 - 1462  
Bibliotecária/Documentalista do Setor de Tratamento da Informação - Biblioteca Latino  
Americana - BIUNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Americana - UNILA

P436 Pereira, Evelyn Diane  
Composição química e potencial antioxidante do camu-camu (*myrciaria dubia*) e sua influência em composições nutricionais utilizadas na piscicultura. / Evelyn Diane Pereira. – Toledo-PR, 2019.  
94 f.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal da Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. Toledo-PR, 2019.

1. Oxidação - Inibição. 2. Flavonóides. 3. Compostos Bioativos I. Zara, Ricardo Fiori. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Título.

CDU 543.5



---

**TERMO DE APROVAÇÃO**

***COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CAMU-CAMU (*Myciaria dubia*) E SUA INFLUÊNCIA EM COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS UTILIZADAS NA PISCICULTURA***

Por

**EVELYN DIANE PEREIRA**

Esta dissertação foi apresentada às quatorze horas do dia vinte e nove de março de dois mil e dezenove como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Pesquisa de Processos Biotecnológicos, no Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

---

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara (Orientador – PPGQB)

---

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin (Membro Interno – PPGQB)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Dena dos Santos (Membro Externo – UFPR)

***\*A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação do PPGQB-TD***



## ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> variáveis codificadas e não codificadas.....	38
Tabela 2 - Preparo das soluções padrão para curva de calibração.....	46
Tabela 3 - Porcentagem de ingredientes utilizados para preparo das dietas (referência e enriquecidas em 10 a 30 % com camu-camu <i>in natura</i> ).....	50
Tabela 4 - Composição centesimal do camu-camu <i>in natura</i> e diferentes dietas, sem enriquecimento e enriquecidas com o fruto <i>in natura</i> de 10 a 30 %.....	51
Tabela 5 – Equação da reta e coeficiente de correlação obtido para cada metodologia de potencial antioxidante, estes a partir da curva de calibração de cada padrão avaliado em um dado comprimento de onda.....	54
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de compostos fenólicos..	55
Tabela 7 - Compostos fenólicos nas diferentes dietas (referência e enriquecidas com fruto <i>in natura</i> em 10 a 30 %) expressos em EAG g L <sup>-1</sup> .....	56
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de flavonóides .....	58
Tabela 9 - Concentração de flavonóides na dieta referência e nas dietas enriquecidas com o fruto <i>in natura</i> em 10 a 30 % em EQ g L <sup>-1</sup> .....	59
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de habilidade quelante ...	61
Tabela 11 – Habilidade quelante da dieta referência e dietas enriquecidas com fruto <i>in natura</i> em 10 á 30 % em porcentagem.....	62
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise radicalar do ABTS .....	64
Tabela 13 – Potencial antioxidante pelo método ABTS das dietas referência e enriquecidas com o fruto <i>in natura</i> em 10 a 30 % expresso em ET g L <sup>-1</sup> .....	65
Tabela 14 - Equação da reta e coeficiente de correlação dos padrões para quantificação de flavonóides e ácidos fenólicos .....	71
Tabela 15– Ácidos fenólicos e flavonóides quantificados no fruto (camu-camu) por CLAE em amostra liofilizada.....	72
Tabela 16 - Ácidos fenólicos e flavonóides quantificados por CLAE nas diferentes composições nutricionais enriquecidas com o fruto <i>in natura</i> em 10 a 30 % em porcentagem.....	72
Tabela 17 - Resultados obtidos para o Limite de Detecção .....	74
Tabela 18 - Resultados obtidos para o Limite de Quantificação.....	74
Tabela 19 - Resultados da pureza do pico de ácido ascórbico .....	76
Tabela 20 - Linearidade de concentrações de ácido ascórbico.....	77
Tabela 21 - Teste de Homocedasticidade – Cochran.....	78
Tabela 22 - Exatidão de Ácido ascórbico .....	80
Tabela 23 - Precisão primeiro dia .....	81
Tabela 24 - Precisão do segundo dia .....	81
Tabela 25 - Precisão intermediária.....	81
Tabela 26 - Resultados da robustez.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Visão parcial Camu-camuzeiro com alguns frutos .....	18
Figura 2 - Estrutura química dos flavonóides .....	20
Figura 3 - Estrutura das classes de flavonoides mais encontrados.....	21
Figura 4 - Compostos fenólicos (flavonóides) com atividade antioxidante .....	22
Figura 5 - Estrutura da ferrozina.....	23
Figura 6 – Estrutura molecular do ácido ascórbico.....	26
Figura 7 - Princípio cromatográfico. Separação de três analitos a partir de sua interação com a fase estacionária e fase móvel.....	27
Figura 8 - Principais componentes .....	28
Figura 9 - Método de fenólicos totais.....	40
Figura 10 - Método de ABTS .....	42
Figura 11 - Método de flavonoides .....	44
Figura 12 - Curvas de calibração de absorvância versus concentração em equivalente de ácido gálico (A), quercetina (B) e trolox (C), utilizados para análises de potencial antioxidante a partir da metodologia de compostos fenólicos, flavonóides e radicalar ABTS, respectivamente .....	53
Figura 13 – Concentração de compostos fenólicos, nos extratos de camu-camu, expressos como EAG (g L <sup>-1</sup> ) .....	54
Figura 14 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de compostos fenólicos .....	55
Figura 15 - Concentrações dos extratos de camu-camu expressos como EQ g L <sup>-1</sup> .	57
Figura 16 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de flavonoides .....	58
Figura 17 - Porcentagem de habilidade quelante nos extratos de camu-camu.....	60
Figura 18 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de habilidade quelante .....	61
Figura 19 - Concentrações dos extratos de camu-camu expresso em ET .....	63
Figura 20 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise do radical ABTS .....	64
Figura 21 - Cromatograma da mistura de padrões de flavonóides, para identificação dos flavonóides.....	66
Figura 22 - Cromatograma da solução amostra do fruto liofilizado (camu-camu) ....	67
Figura 23 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta referência .....	68
Figura 24 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 10 % com camu-camu .....	69
Figura 25 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 20 % com camu-camu .....	69
Figura 26 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 30 % com camu-camu .....	70
Figura 27 - Curvas de calibração de ácido gálico (A), ácido elágico (B), miricetina (C) e quercetina (D), utilizados para análises de flavonóides e ácidos fenólicos por CLAE .....	71
Figura 31 - Cromatograma solução diluente para análise de seletividade .....	75

Figura 32 - Cromatograma solução padrão para análise de seletividade.....	75
Figura 33 - Cromatograma solução amostra para análise de seletividade .....	76
Figura 34 - Curva analítica da linearidade obtida para o ácido ascórbico no intervalo de 60% -140% .....	78
Figura 35 - Análise dos Resíduos Padronizados.....	79
Figura 36 - Estabilidade do padrão de ácido ascórbico preparado para análise de quantificação por CLAE .....	83
Figura 37 - Estabilidade da amostra de camu-camu liofilizada preparada para análise de ácido ascórbico por CLAE .....	84

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1 CAMU – CAMUZEIRO .....	18
3.1.1 CAMU-CAMU .....	19
3.2 ANTIOXIDANTES.....	19
3.2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
3.2.2 FLAVONÓIDES .....	22
3.2.3 HABILIDADE QUELANTE .....	22
3.2.4 ABTS .....	24
3.2.5 ÁCIDO ASCÓRBICO.....	25
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	26
3.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	29
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
3.5.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA .....	30
3.5.2 TESTE DE COCHRAN (HOMOCEDASTICIDADE DE VARIÂNCIA) .....	30
3.5.3 TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	33
4.1.1 EQUIPAMENTOS E SOFTWARES.....	33
4.1.2 MATERIAIS .....	33
4.1.3 REAGENTES .....	33
4.1.4 AMOSTRA.....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL .....	34
4.2.1.1 UMIDADE.....	34
4.2.1.2 TÉCNICA DE DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	35
4.2.1.3 PROTEÍNAS TOTAIS.....	35
4.2.1.4 LIPÍDIOS TOTAIS .....	36
4.2.1.5 FIBRA BRUTA.....	37
4.2.1.6 CARBOIDRATOS TOTAIS .....	38
4.2.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	38
4.2.2.1 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	38
4.2.2.2 FENÓLICOS TOTAIS.....	39
4.2.2.3 HABILIDADE QUELANTE .....	40
4.2.2.4 CAPTURA RADICALAR POR ABTS .....	41
4.2.2.5 FLAVONÓIDES TOTAIS .....	44
4.2.3 LIOFILIZAÇÃO .....	44
4.2.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS.....	45

4.2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NO CAMU-CAMU POR CLAE .....	47
4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
4.2.6.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA .....	48
4.2.6.2 TESTE DE COCHRAN (HOMOCEDESTICIDADE DE VARIÂNCIA) .....	49
4.2.6.3 TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
5.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	50
5.2 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE .....	52
5.2.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	52
5.2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	54
5.2.3 FLAVONÓIDES TOTAIS .....	57
5.2.3 HABILIDADE QUELANTE .....	60
5.2.4 ABTS .....	63
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES ...	66
5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE NO CAMU-CAMU POR CLAE ....	73
5.4.1 LIMITE DE DETECÇÃO .....	74
5.4.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	74
5.3.2 SELETIVIDADE .....	75
5.3.3 LINEARIDADE.....	77
5.3.4 EXATIDÃO .....	79
5.3.5 PRECISÃO .....	80
5.3.6 ROBUSTEZ .....	82
5.3.7 ESTABILIDADE .....	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85

## NOMENCLATURA

DPPH - *2,2-difenil-1-picrilhidrazila*

FRAP - Potencial antioxidante de redução do ferro

ABTS - *Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)*

EAG - Equivalente em ácido gálico

EQ - Equivalente em quercetina

ET - Equivalente em Trolox

HQ - Habilidade quelante

ICH - *International Conference on Harmonisation*

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

DAD - Detector por arranjo de diodos

H - Horas

Min – Minutos

G - Grama

ANOVA - Análise de variância;

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar, iluminando cada passo, por colocar pessoas especiais no meu caminho, me dando força para não desistir em cada obstáculo, para que assim pudesse chegar a essa conquista.

Ao meu namorado Daniel Vianey Cardoso, pelo companheirismo, emocional e técnico, obrigada por ser meu companheiro nas horas difíceis, nos dias de desespero e choro, nos laboratórios dias de semana ou ainda nos finais de semana inteirinhos. Agradeço ainda pela alegria, paciência (sei que não sou fácil e precisou ter bastante), incentivo nos momentos mais difíceis, por literalmente me suportar durante esse período que precisei me dedicar bastante a essa pesquisa, além de ter se dedicado juntamente, são tantos os agradecimentos que devo, enfim, pela estabilidade emocional e por me passar toda tranquilidade e segurança de que no final tudo daria certo, só bastava eu me dedicar.

Aos meus pais Suzi e Alexandre, minha madrasta Elizete e meus irmãos Kelvyn e Kauane, por todas as mensagens, fotos, todos os áudios enviados com todo amor, carinho, incentivo e paciência, para que sobre tudo a distância fosse minimizada, sempre me incentivando, cada uma do seu jeitinho para que eu seguisse firme e chegasse ao final de mais um objetivo. Ter vocês nas horas difíceis foi de grande valia para conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador professor Ricardo Fiori Zara. Primeiramente agradeço por ter me escolhido como sua orientanda, por ter acreditado no meu trabalho, pela confiança, ensinamentos, compreensão, dedicação que depositou em mim, por todas as horas que passou corrigindo nossos trabalhos, por todas as palavras de motivação e aprendizado, que também foram fundamentais para a conclusão dessa dissertação e agradeço ainda pelos abraços para me acalmar, ou até mesmo os de companheirismo, obrigada professor.

A professora Lilian Dena e seu orientado Edson Silva, por terem apostado no nosso trabalho de modo a complementar os estudos realizados por eles, de modo a dividir conosco seus conhecimentos e até mesmo amostras, muito obrigada.

A todos os professores do programa pela ajuda, discussões e principalmente pelos conhecimentos ensinados em aula e fora dela. Em especial ao professor Clayton Antunes, que sempre, seja na disciplina, nos corredores ou até mesmo na

rua dispôs de seu tempo, sempre com muita paciência, repassando seus conhecimentos e conselhos.

Aos meus amigos, desculpa por ter sido ausente nos últimos tempos, mas agradeço a eles também pelo incentivo e compreensão. Prometo que agora serei mais presente (pelo menos até o início de mais um objetivo), que as saídas para comer serão mais constantes, as risadas, enfim, serei eternamente grata pelo que aprendo com vocês.

A UTFPR – Campus Toledo, pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos de mestrado, ao Programa de Pós Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos agradeço o acolhimento da instituição desde que cheguei ao Paraná, para graduação e agora felizmente ao final da pós graduação, meus singelos agradecimentos. Estendo este aos técnicos dos laboratórios de Processos Químicos do campus Toledo e também ao Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) pelo suporte.

Agradeço a empresa Prati Donaduzzi, empresa onde trabalho, a qual sedeu reagentes e empréstimo de equipamento para que ensaios desta pesquisa fosse realizada.

Enfim, a todos, que de alguma forma, perto ou longe, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

Estudos envolvendo compostos antioxidantes naturais têm chamado a atenção da comunidade científica, pois os antioxidantes naturais são associados aos efeitos benéficos à saúde humana e animal. Neste estudo foi avaliado o potencial do fruto (camu-camu), bem como de diferentes dietas para alimentação alternativa de peixes, a partir de análises de composição centesimal e metodologias para determinação do potencial antioxidante. Além disso, foram desenvolvidas metodologias analíticas para identificação e quantificação de flavonóides, ácidos fenólicos e ácido ascórbico, sendo realizada também a validação da metodologia de quantificação de ácido ascórbico. O potencial antioxidante foi avaliado, a partir de quatro metodologias já existentes, inibição dos radicais livres ABTS, habilidade quelante, determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Para tanto, foram preparados extratos, conforme planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. Para quantificação dos flavonóides e ácidos fenólicos, uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvida, visto que as já descritas não se aplicaram a matriz de interesse. Vale ressaltar que são atribuídas ao fruto camu-camu, diversas propriedades, sendo uma das principais, o elevado teor de ácido ascórbico, contudo, existe falta de aplicabilidade das metodologias existentes para sua quantificação. Neste estudo desenvolveu-se e validou-se uma metodologia, utilizando CLAE. Após realização, das análises e avaliação dos dados, verificou-se o potencial antioxidante do camu-camu e pôde-se concluir que este fruto possui potencial antioxidante enquanto polpa e fruto *in natura*, além de quando utilizado como enriquecimento nutricional em diferentes composições nutricionais, o qual transfere suas propriedades de inibição radicalar, por possuir dentre outros, alto percentual de ácido ascórbico (em média 0,0028 g de ácido ascórbico por g de amostra). Podendo ser comprovado esta transferência através das análises realizadas também utilizando a dieta referência (sem adição do fruto).

**PALAVRAS CHAVE:** Inibição da oxidação; CLAE; Flavonóides; Ácidos fenólicos; Ácido ascórbico; Compostos bioativos.

## ABSTRACT

Studies involving natural antioxidant compounds have drawn the attention of the scientific community, as natural antioxidants are associated with beneficial effects on human and animal health. In this study the potential of the fruit (camu-camu), as well as of different diets for alternative feeding of fish, were evaluated, based on analyzes of the centesimal composition and methodologies to determine the antioxidant potential. In addition, analytical methodologies were developed for the identification and quantification of flavonoids, phenolic acids and ascorbic acid, and also the validation of the ascorbic acid quantification methodology. The antioxidant potential was evaluated from four existing methodologies, ABTS free radical inhibition, chelating ability, determination of total phenolic compounds and total flavonoids. In order to quantify the flavonoids and phenolic acids, an analytical methodology by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed, since the already described were not applied to the matrix of interest. It is worth noting that camu-camu fruit are attributed to several properties, one of the main ones being the high ascorbic acid content, however, there is a lack of applicability of the existing methodologies for its quantification. In this study, a methodology was developed and validated using HPLC. After the analysis and evaluation of the data, the antioxidant potential of camu-camu was verified and it was concluded that this fruit has antioxidant potential as a pulp and fruit in natura, as well as when used as nutritional enrichment in different nutritional compositions, which transfers its radical inhibition properties, as it has, among others, a high percentage of ascorbic acid (on average 0.0028 g of ascorbic acid per g of sample). This transfer can be verified through the analyzes performed also using the reference composition (without addition of the fruit).

**KEYWORDS:** Inhibition of oxidation; CLAE; Flavonoids; Phenolic acids; Ascorbic acid; Bioactive compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos envolvendo compostos antioxidantes naturalmente presentes em alimentos, têm chamado a atenção da comunidade científica e da população em geral (BEZERRA, *et al.*, 2014), principalmente em alimentos de origem vegetal. Nessa vertente, as frutas se destacam no que diz respeito a sua composição. Um fruto típico amazônico que vem sendo avaliado, o camu-camu, pertencente à família Myrtaceae (MAEDA e ANDRADE, 2003), tem sido conhecido como o fruto muito rico em ácido ascórbico (Vitamina C) podendo apresentar até 0,8 % de vitamina C (ANDRADE *et al.*, 1995 e YUYAMA *et al.*, 2002).

Vários frutos amazônicos, como por exemplo, camu-camu, cupuaçu, tucumã, açai, entre outros, tem se destacado, por apresentarem potencialidades como antioxidantes, dentre eles vitamina C. As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis e flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos e outras substâncias encontradas nos vegetais (GONÇALVES, 2008). Os compostos fenólicos são importantes constituintes de várias frutas e hortaliças, sendo que a quantificação dessas substâncias revela informações a respeito da atividade antioxidante, qualidade do alimento e dos potenciais benefícios à saúde (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

A alta produtividade da floresta amazônica, associada à necessidade de alimentos alternativos para peixes confinados, criou grande interesse em verificar a possibilidade do uso dos frutos regionais para reduzir os custos da piscicultura de espécies tropicais (OLIVEIRA, 2005).

Segundo TACON e DE SILVA (1997), em muitos países, o aumento da produção piscícola tem sido possibilitado pela intensificação do cultivo por meio do uso de composições balanceadas. A exemplo, a *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), é uma espécie de peixe onívoro e por isso utiliza de forma eficiente os nutrientes presentes nos alimentos tanto de origem animal como vegetal (HANLEY, 1987; DEGANI e REVACH, 1991; GONÇALVES *et al.*, 2005), tornando-o um peixe muito versátil para a produção em cativeiro. Esta espécie é a mais produzida no Brasil e o estado do Paraná o maior produtor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características químicas do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*), bem como avaliar sua influência no preparo de dietas utilizadas na alimentação de peixes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises de composição centesimal do fruto e das diferentes composições nutricionais;
- Preparar extratos alcoólicos a partir do fruto e das diferentes composições nutricionais;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonóides;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos (do fruto e das diferentes composições nutricionais) por meio dos seguintes métodos: ABTS e Habilidade quelante;
- Desenvolver e validar metodologia analítica, empregando cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de vitamina C, no fruto e nas diferentes composições nutricionais;
- Identificar e quantificar ácidos fenólicos e flavonóides no fruto e nas diferentes composições nutricionais empregando cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliação estatística no conjunto de dados de interesse das análises realizadas;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CAMU – CAMUZEIRO

A Amazônia apresenta um dos maiores índices de biodiversidade do mundo, no qual estão incluídas espécies vegetais com grande potencial econômico, mas ainda não domesticadas (MAUÉS e COUTURIER, 2002). O camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia*) é uma planta frutífera nativa, natural da Amazônia, de porte arbustivo, encontrado nas margens inundáveis dos rios e lagos da Bacia Amazônica (VILLACHICA, 1996). Conhecido também como caçari, ou aração d'água, pertence à família da *Myrtaceae*, sendo arbustos e arvoretas que medem até 8 metros de altura, com ramificações desde a base formando caules secundários (MAUÉS e COUTURIER, 2002).

A safra do camu-camu depende do solo, de modo que, em solos de terra firme, onde os nutrientes e a água podem ser controlados, o camu-camuzeiro pode produzir mais de duas safras anuais, o que acontece também com outras espécies de *Myrtaceae* (YUYAMA, 2011).

A Figura 1 retrata a imagem de parte de um camu-camuzeiro, encontrado no estado de Roraima.

**Figura 1 - Visão parcial Camu-camuzeiro com alguns frutos**



**Fonte: EMBRAPA Roraima (2015)**

A espécie distribui-se por grande parte da Amazônia brasileira, nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (MAUÉS e COUTURIER, 2002). É encontrada, ainda, na Amazônia peruana e na Amazônia

venezuelana (MCVAUGH, 1963). De acordo com Villachica (1996), a Amazônia peruana apresenta as populações mais expressivas de *Myrciaria dubia*, observando-se em algumas localidades formações praticamente mono específicas.

No Brasil, a produção de camu-camu tem se disseminado em diferentes estados. Porém, é possível encontrar um cultivo expressivo do camu-camu em Roraima (SILVA, 2012).

### 3.1.1 CAMU-CAMU

O camu-camu é uma espécie de ocorrência amazônica, sendo encontrada desde a porção oriental do Peru, até a região central do estado do Pará e pode ser encontrada às margens de rios e lagos de água escura. Este fruto ficou conhecido por apresentar um alto teor de vitamina C, chegando a ser até 100 vezes maior que o da laranja (SILVA e ANDRADE, 1997).

O fruto do tipo baga esférica lisa e brilhante, no estágio final de maturação apresenta coloração vermelha - arroxeada (MAUÉS e COUTURIER, 2002), podendo medir de 2 a 4 cm de diâmetro e conter de uma a quatro sementes por fruto (VILLACHICA, 1996).

A comercialização é feita em pequena, escala, em feiras, na região produtora, porém a grande parte é feita em forma de polpa congelada. O fruto é muito pouco conhecido dentro do País, mas é muito procurado pelos japoneses, americanos e europeus, sendo exportados em contêineres refrigerados, em tambor de 200 L. No Japão, a polpa é transformada em bebidas gaseificadas em latas de alumínio e vidros, vinagre, recheio de pão, aperitivo, sorvetes, balas, comprimidos. No Brasil, a empresa de cosméticos Semprebella produziu xampu, modelador, desembaraçante e condicionador, e a empresa Tucuxi, em Manaus, o xarope (REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA v. 33, n. 2 p.335-690, YUYAMA, 2011).

### 3.2 ANTIOXIDANTES

Por definição, os antioxidantes são substâncias que previnem, interceptam ou reparam possíveis danos causados por radicais livres às células. Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétron livre, com alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de estabilização (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

### 3.2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

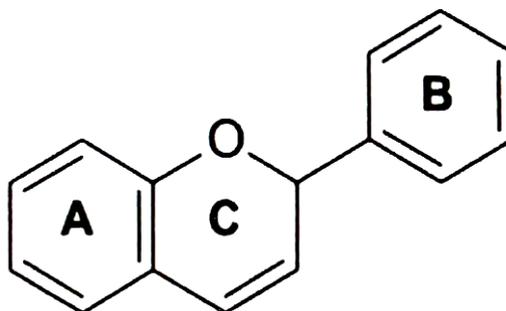
Os compostos fenólicos têm sido muito estudados devido a sua influência na qualidade dos alimentos e por apresentarem atividades farmacológicas, e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (ANGELO e JORGE, 2007). Estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente, com os flavonóides demonstram sua capacidade antioxidante (SOARES *et al.*, 2008).

Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (ANGELO e JORGE, 2007). São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração  $C_6-C_3-C_6$  (HARBORNE *et al.*, 1999). A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 2) (ANGELO e JORGE, 2007).

Figura 2 - Estrutura química dos flavonóides



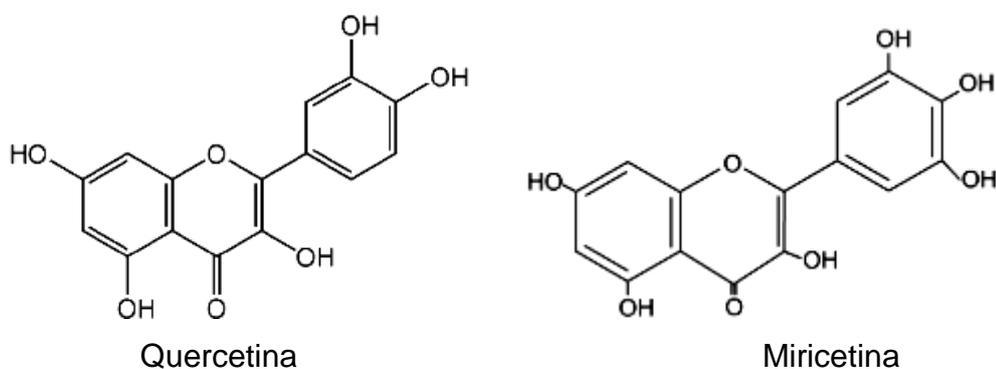
Fonte: Adaptado de ANGELO e JORGE (2007)

Os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos) possuem estrutura comum,  $C_6-C_1$  (BALASUNDRAM *et al.*, 2006), como os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siringico.

Já os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral ( $C_6-C_3$ ), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (BRAVO, 1998).

Um grupo importante de flavonoides são os flavonóis, e que o diferencia dos demais flavonóides é a presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C. Os flavonóis ocorrem em alimentos geralmente como O-glicosídeos, com mono, di ou triglicosídeos. Os mais encontrados são a quercetina e miricetina (MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Na Figura 3 podem ser observadas as estruturas químicas desses principais compostos.

**Figura 3 - Estrutura das classes de flavonoides mais encontrados**



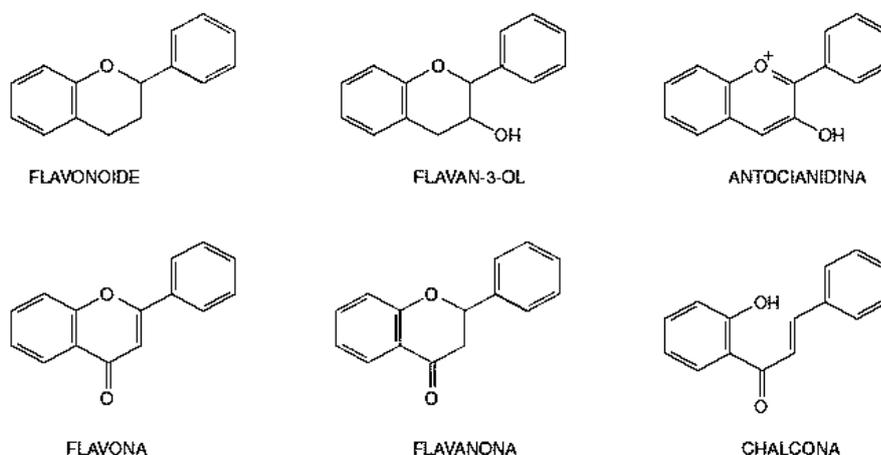
**Fonte: Adaptado de Fujita (2015)**

Maeda *et al.*, (2006), a partir de estudo realizado utilizando o néctar de camu-camu, afirmam que o sabor amargo e adstringente é acentuado e característico do fruto. É necessária a utilização da despulpadeira, para separação da polpa, para que não ocorra, à trituração do epicarpo e/ou quebra das sementes, uma vez que são nestas partes tissulares que concentram a maior parte dos compostos fenólicos (MAEDA *et al.*, 2006), podendo apresentar concentração na faixa de 1,37 % (SILVA, 1997) a 2,11 % (ANDRADE, 1991).

### 3.2.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são os compostos de fenol e pode ser divididos em seis subclasses principais: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavonóides, antocianinas e isoflavonas, respectivamente representadas na (Figura 4). Dessas espécies, os flavonóis são os flavonóides mais amplamente representados nos alimentos. Nos frutos é possível encontrar flavonóides como a quercetina, rutina e kaempferol.

Figura 4 - Compostos fenólicos (flavonóides) com atividade antioxidante

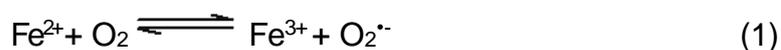


Fonte: Autoria própria (*Chemistry 4D Draw*)

### 3.2.3 HABILIDADE QUELANTE

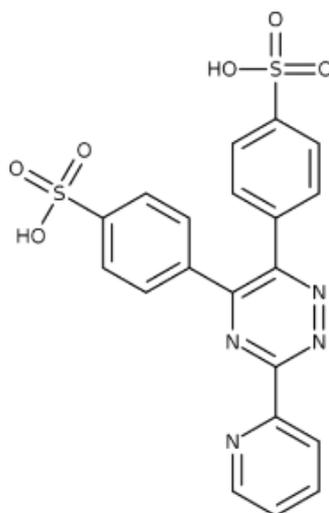
Aproximadamente 65 % dos íons  $Fe^{2+}$  em nosso organismo estão ligados à hemoglobina, em torno de 4 % à mioglobina, 1 % aos compostos hêmicos que promovem oxidação celular, menos de 1 % à transferrina do plasma sanguíneo e entre 15 e 30 % estão na forma de ferritina (BOROSKI *et. al.*, 2015).

No entanto, o íon  $Fe^{2+}$  livre e na presença de  $O_2$ , é facilmente convertido para o íon  $Fe^{3+}$ , originando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), conforme expresso a seguir (1). Estes radicais formados podem reagir com compostos orgânicos, iniciando uma reação em cadeia originando outros radicais livres, como alquila ( $R^{\cdot}$ ), peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), entre outros (BOROSKI *et. al.* 2015).



Em 1970, Lawrence L. Stookey desenvolveu uma técnica de análise para determinação de ferro (II), baseada na habilidade quelante da ferrozina (*3-(2-piridil)-5,6-bis(ácido4-fenilsulfônico)-1,2,4-triazina*) (Figura 5), em formar um complexo estável e solúvel em água, com este íon (BOROSKI *et. al.*, 2015). Esta técnica vem sendo muito utilizada para determinar a atividade antioxidante de diversos tipos de amostras, sendo que o mecanismo de ação antioxidante avaliado, como o próprio nome sugere, é a habilidade quelante (ALVES *et. al.*, 2010).

**Figura 5 - Estrutura da ferrozina**



**Fonte: Autoria própria (Chemistry 4D Draw)**

Substâncias que imobilizam o íon  $Fe^{2+}$  através da formação de quelatos podem ser utilizadas, atuando desta forma como antioxidantes, para assim impedir oxidação de íons metálicos (SILVA, 2013). Vale ressaltar que estas substâncias devem ter um ou mais elétrons livres para possibilitar a ligação com o metal central na hemoglobina, por exemplo.

A ferrozina forma um complexo cor-de-rosa com o  $Fe^{2+}$ , o íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$ , cuja concentração pode ser obtida através da medida de absorvância em 562 nm. A presença de grupamentos sulfônicos na estrutura favorece sua solubilidade em água (BOROSKI *et. al.*, 2015).

Quando a amostra contém substâncias que também formam complexos estáveis com o  $Fe^{2+}$ , estas competem com a ferrozina e a absorvância do complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$ , diminui, portanto, uma diminuição na absorvância indica a presença de atividade antioxidante na amostra (BOROSKI *et. al.*, 2015).

Várias modificações e adequações da técnica inicial foram efetuadas para aplicá-la em diferentes tipos de amostras, tais como: algas, cogumelos, tecidos musculares, plasma sanguíneo, entre outras (BOROSKI *et. al.*, 2015). É importante destacar que o pH entre 4 e 10 é o ideal para a formação do íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$  (STOOKEY, 1970). Caso a solução contendo a amostra apresente um valor de pH fora desta faixa, o mesmo deve ser ajustado. O ajuste deve ser realizado com solução aquosa de *NaOH* ou *HCl* 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.2.4 ABTS

Este método se dá devido à captura do cátion radical *ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)*<sup>•+</sup> (ABTS<sup>•+</sup>) e tem sido empregado para determinar a capacidade antioxidante em diferentes matrizes, sendo elas hidrofílicas ou lipofílicas (KARADAG *et. al.*, 2009).

Segundo BOROSKI *et. al.*, (2015), existem algumas críticas com relação aos métodos radicalares, como o fato dos radicais empregados nestas análises não serem encontrados naturalmente em sistemas biológicos. Além disso, por meio do método ABTS não é possível avaliar a capacidade antioxidante de nenhum composto com potencial redox menor do que o mesmo. No entanto, a determinação da capacidade antioxidante através da captura do ABTS<sup>•+</sup> vem sendo muito aplicada, na análise de vegetais, frutas, plantas medicinais, vinhos, óleos essenciais e bebidas (SANCHEZ- MORENO, 2002).

A ampla aplicação do método ABTS, se deve ao fato de ser considerada uma técnica prática, rápida, de alta sensibilidade e que produz resultados confiáveis, além de utilizar um cátion radical muito estável (BOROSKI *et.al.*, 2015).

Quando empregada a técnica em questão, a atividade antioxidante da amostra é medida através da sua capacidade em estabilizar o cátion radicalar ABTS presente na solução, que volta à forma do composto neutro ABTS. O deslocamento do equilíbrio entre as duas formas do ABTS ocasiona a descoloração da solução e a diminuição da absorvância em 734 nm (BOROSKI *et. al.*, 2015).

É necessário gerar a espécie estável ABTS<sup>•+</sup> através de uma reação de oxidação do composto ABTS, para que a técnica seja desenvolvida. A reação de oxidação pode ser química, utilizando dióxido de manganês, persulfato de potássio

ABAP (2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)); enzimática, empregando enzima peroxidase ou metamioglobina, ou, ainda, eletroquímica (SANCHEZ- MORENO, 2002).

A espécie ABTS<sup>•+</sup> formada possui coloração verde escura, com absorção em comprimentos de onda distintos em 414, 752 e 842 nm em meio aquoso e em 414, 730 e 873 nm, em meio alcoólico (KARADAG *et. al.*, 2009). Estes comprimentos de onda podem variar dentro de um pequeno intervalo de acordo com a matriz da amostra, ou do solvente empregado e equipamento. A coloração verde escura do ABTS<sup>•+</sup> se torna mais clara à medida que vai sendo convertido em sua forma neutra de ABTS (BOROSKI *et. al.*, 2015).

A determinação do ABTS<sup>•+</sup>, durante a análise, é realizada na região de 734 nm. Isto diminui as interferências de vários pigmentos que absorvem radiação eletromagnética em comprimentos de onda menores e de compostos resultantes de reações secundárias (BOROSKI *et. al.*, 2015). Sendo uma vantagem deste radical frente aos demais.

De acordo com BOROSKI *et. al.*, (2015), o tempo necessário para a reação entre o ABTS<sup>•+</sup> e os compostos antioxidantes presentes na amostra pode variar de 1 a 30 minutos, sendo frequentemente utilizado 7 minutos.

O método de ABTS, é também conhecido como método de capacidade antioxidante de equivalente Trolox (SÁNCHEZ-MORENO, 2002), quando se utiliza este padrão para expressar os resultados. A metodologia proposta por BOROSKI *et. al.*, (2015), apresenta-se como uma metodologia alternativa economicamente acessível. Sendo esta da Embrapa Agroindústria Tropical – CE, que elaborou o Comunicado Técnico 128 (BRASIL, 2007), no qual descreve o método da captura do cátion radicalar ABTS para a determinação da capacidade antioxidante total em frutas.

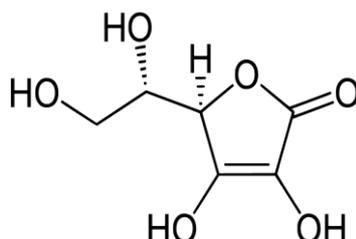
### 3.2.5 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico é uma vitamina, podendo ser encontrada em fontes, como por exemplo, frutas cítricas, brócolis e tomates (CANTER *et. al.* 2007).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é um antioxidante, bem como outras vitaminas e muitos outros nutrientes de origem vegetal (WINIFRED, 1982). O ácido ascórbico e seus ésteres funcionam como antioxidantes, protegendo

duplas ligações e eliminando o oxigênio, através da reação que ocorre. A atividade dos ascorbatos foi demonstrada em óleos vegetais, gorduras animais, vitamina A, carotenóides, óleos cítricos e em alimentos que contêm gordura, tais como peixe, margarina e leite (AUDERA *et. al.* 2001).

Figura 6 – Estrutura molecular do ácido ascórbico



Fonte: Autoria própria (*Chemistry 4D Draw*)

A eficiência dos ascorbatos como antioxidantes depende do substrato e dos compostos a serem protegidos. Uma vez que as posições 2 e 3 do ácido ascórbico são substituídas, os dois radicais livres formados nestas posições podem ser intermediários na eliminação de oxigênio e inibição da formação de radicais em ligações duplas (WINIFRED, 1982).

### 3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

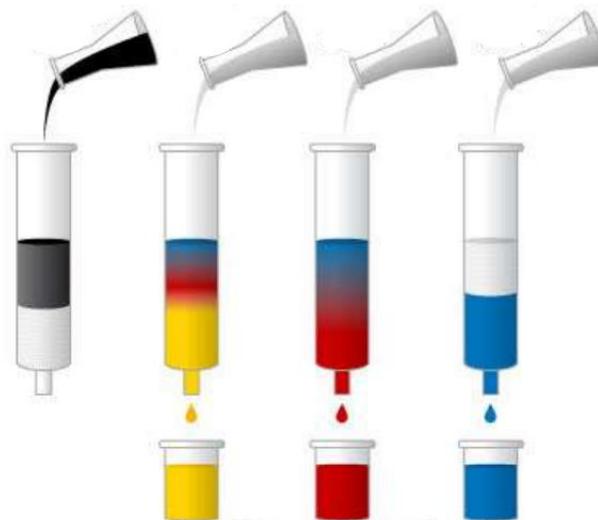
A cromatografia é uma técnica de separação de substâncias em uma amostra. A separação ocorre devido à particularidade das estruturas moleculares das substâncias que se quer separar e a composição molecular da amostra. Para tal, envolve uma fase estacionária (um sólido ou um líquido suportado em um sólido) e uma fase móvel (um líquido ou um gás) (COLLINS *et. al.*, 1993, LOUGH *et. al.*, 1995).

As separações cromatográficas podem ser realizadas utilizando diversas fases estacionárias, sendo elas, sílica imobilizada em placas de vidro (cromatografia em camada delgada), sílica imobilizada em coluna de vidro (cromatografia em coluna), sílica imobilizada ou compactada em colunas metálicas (cromatografia líquida de alta eficiência), papel filtro (cromatografia em papel), coluna capilar com paredes internas recobertas com um filme fino ( $\mu\text{m}$ ), de FE líquida ou sólida (cromatografia gasosa), coluna Recheada com sólido pulverizado (FE sólida ou FE

líquida depositada sobre as partículas do recheio) (cromatografia gasosa), (CHAVES *et. at.*, 1997, MALDANER *et. at.*, 2010).

A fase móvel flui através da fase estacionária e transporta os componentes da mistura com ela. Componentes da amostra que exibem interações mais fortes com a fase estacionária moverão mais lentamente através da coluna do que componentes com interações mais fracas. Esta diferença causa a separação dos componentes (COLLINS *et. al.*, 1993). O princípio cromatográfico pode ser observado na Figura 7.

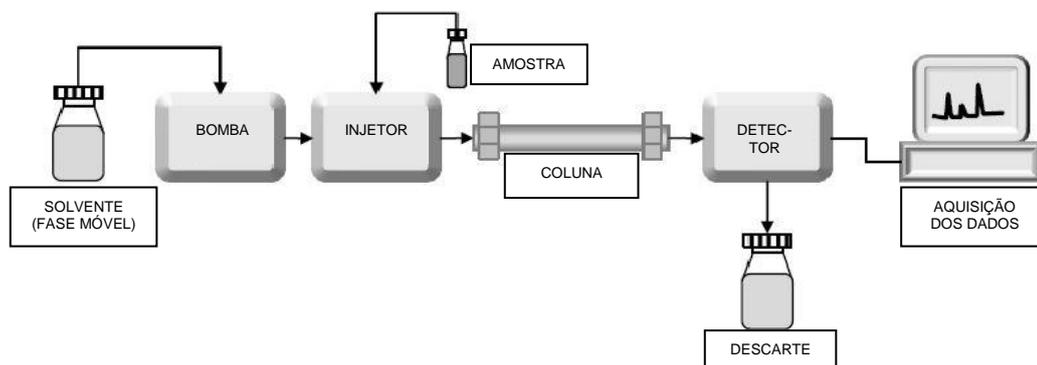
**Figura 7 - Princípio cromatográfico. Separação de três analitos a partir de sua interação com a fase estacionária e fase móvel**



Fonte: Adaptado de COLLINS, C.H *et. al.*, (1993).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma forma altamente melhorada de cromatografia líquida em coluna. Em vez de um solvente ser deixado escorrer através de uma coluna sob a gravidade, é realizado altas pressões de até 400 atm, tornando-a muito mais rápido (COLLINS *et. al.* 1993, LOUGH *et. al.* 1995). Os principais componentes podem ser observados na Figura 8.

**Figura 8 - Principais componentes**



**Fonte: Adaptado de COLLINS, C.H et. al., (1993).**

Nesse esquema são representados os principais componentes de equipamento de CLAE, onde a fase móvel é bombeada a alta pressão por todo o sistema. O injetor é responsável por realizar a coleta da amostra e a mesma é colocada no sistema por meio da fase móvel. Uma vez que a amostra se encontra no sistema, a coluna cromatográfica é responsável por realizar a separação das espécies. O sistema de CLAE também possui mais dois componentes, um responsável por observar a saída das espécies depois da separação da coluna, conhecido como detector e um componente responsável por converter os dados do detector para um formato que se pode quantificar (COLLINS *et. al.*, 1993).

A separação na cromatografia líquida de alta eficiência pode ocorrer de várias maneiras, dependendo da matriz e substâncias que se pretende separar. Por exemplo, CLAE de fase normal: Separa os analitos com base na polaridade, utilizando fase estacionária polar e fase móvel não polar. As amostras polares são assim retidas na superfície polar da coluna mais fortemente do que os materiais menos polares (COLLINS *et. al.*, 1993).

Já a CLAE de fase reversa, a fase estacionária é de natureza não polar (hidrofóbica), enquanto que a fase móvel é um líquido polar. O princípio de separação baseia-se em interações hidrofóbicas, portanto, quanto menos polar o material é, mais tempo ele será mantido na fase estacionária. Esses são os exemplos mais usuais, entretanto existe também a cromatografia por exclusão de tamanho, troca iônica, HILIC (cromatografia de interação hidrofílica), entre outras (COLLINS *et. al.*, 1993).

Uma das grandes vantagens da CLAE é a sua capacidade de separar vários tipos de moléculas. Conseqüentemente, foi necessário desenvolver vários tipos de detectores, devido às particularidades das moléculas separadas. Comercialmente encontra-se com mais facilidade detectores do tipo UV-VIS (ultravioleta visível) e DAD (Detector de Arranjo de Diódos), índice de refração, dispersão de luz, espectrômetro de massa, detector de condutividade e detector de fluorescência (COLLINS *et. al.*,1993, LOUGH *et. al.*, 1995).

### 3.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método por cromatografia líquida de alta eficiência é desenvolvido com base em levantamentos bibliográficos dos compostos de interesse, buscando elucidar suas estruturas e determinar os parâmetros de quantificação das mesmas. Estes, considerando a polaridade do eluente e da coluna, temperatura de degradação do analito de interesse, tempo de análise conforme estabilidade do analito e solubilidade.

A metodologia analítica a ser desenvolvida e validada, deve seguir conforme guia Q2 (R1) da ICH (Conferência Internacional de Harmonização) de 2005, contemplando as figuras de mérito de especificidade, linearidade, limite de quantificação, detecção, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade do método é comprovada pelo teste de pureza de pico, no qual os picos devem possuir homogeneidade espectral. Essa pureza é apresentada pelos valores de *purity angle* (ângulo de pureza) e *purity threshold* (limite de pureza), gerados por *softwares*, do conjunto de dados adquiridos pelo sistema DAD alocado no detector do cromatógrafo líquido de alta eficiência. Desta forma, é possível visualmente identificar a homogeneidade espectral através das linhas traçadas no cromatograma, para os valores de pureza (ângulo e limite), as quais não devem se cruzar, logo não se tem uma co-eluição naquele comprimento de onda, podendo assim avaliar a seletividade do método, ou seja, a capacidade do método cromatográfico de separar compostos que são estruturalmente semelhantes.

Para a análise de linearidade, as amostras devem contemplar a faixa de concentração a serem trabalhadas. Após análise do(s) analito(s), todos os valores encontrados devem demonstrar-se lineares a partir do coeficiente de correlação oriundo da curva traçada, considerando os resultados obtidos, o qual deve ser

próximo ou superior a 0,99. Assim, atenderá o critério de aceitação estipulado pelo ICH (2005).

A precisão de um método é avaliada pela proximidade entre os resultados obtidos das amostras avaliadas por meio de cálculo de dispersão de dados por Desvio Padrão Relativo (DPR). E após tratamento dos dados, os resultados obtidos de DPR para as precisões 1 e 2 devem encontrar-se dentro do valores determinados, conforme tabela da AOAC, Apêndice F, 2016, o qual leva em consideração a concentração trabalhada para determinar as especificações.

A robustez indica a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações (ICH, 2005). O método é considerado robusto quando a variação de teor dos analitos for inferior aos valores determinados para desvio padrão na repetibilidade, além dá comprovação de homogeneidade espectral, conforme apresentado na especificidade.

### 3.5 ANALISE ESTATÍSTICA

#### 3.5.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA

A Análise de Variância (ANOVA) trata-se de um método estatístico que permite realizar comparações simultâneas entre duas ou mais médias, ou seja, permite testar hipóteses sobre médias de distintas populações. Ou ainda, para comparar três ou mais tratamentos.

Um tratamento é uma condição imposta ou objeto que se deseja medir ou avaliar em um experimento. Normalmente, em um experimento, é utilizado mais de um tratamento, existem, portanto, muitas variações da ANOVA devido aos diferentes tipos de experimentos que podem ser realizados.

#### 3.5.2 TESTE DE COCHRAN (HOMOCEDASTICIDADE DE VARIÂNCIA)

O teste de Cochran é aplicado apenas quando todos os desvios padrão são obtidos a partir de um mesmo número de resultados em condições de repetibilidade, ou seja, para números iguais de repetição dentro de cada nível, comparando a maior variância com as demais. É um teste unicaudal, aceito depois de verificar a uniformidade da regressão e comparar a maior variância com as demais (ALVES,

1976). O teste consiste em calcular C e comparar com C tabelado, conforme Equação (2).

$$C = \frac{s_{m\acute{a}x}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior vari\^ancia}}{\text{soma de todas as vari\^ancias}} \quad (2)$$

Em que:

$k$ : representa o número de níveis do fator;

$s_i^2$ : representa a variância amostral;

$s^2$  máx: maior variância;

$i$ : representa o número de medidas em cada nível do fator;

De modo que se a repetibilidade das medidas é independente do valor da concentrao, esta condio de variância uniforme  chamada homocedástica e quando não uniforme heterocedástica.

### 3.5.3 TESTE DE TUKEY PARA COMPARAO DE MÉDIAS

Após conclusão de existência de diferença significativa entre os tratamentos por meio da análise de variância, pode-se avaliar a magnitude destas diferenças utilizando um teste de comparaes múltiplas.

O teste de Tukey permite testar qualquer contraste, sempre, entre duas médias de tratamentos, ou seja, não permite comparar grupos entre si. O teste baseia-se na Diferença Mínima Significativa (DMS ) (ANJOS, 2010). A estatística do teste é dada da seguinte forma:

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QMRes}{r}} \quad (3)$$

Em que, é a amplitude total (valor tabelado), QMRes é o quadrado médio do resíduo, e  $r$   o número de repeties. O valor de  $q$  depende do número de tratamentos e do número de graus de liberdade do resíduo. Também, em um teste

de comparações de médias, deve-se determinar um nível de significância  $\alpha$  para o teste. Normalmente, utiliza-se o nível de 5% (ANJOS, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

#### 4.1.1 EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

Os equipamentos e softwares utilizados foram: Balança Analítica, Shimadzu modelo AY220; Multiprocessador, Philips Walita, modelo RI7632; Estufa de secagem, modelo MA033/1 Marconi; Bomba á vácuo, Primatec, modelo 132; Vortex, Phonexis Lab; Agitadora orbital, Thoth modelo 6430; Centrifuga Parsec, modelo CT308; Evaporador rotativo, Marconi modelo MA 120; Banho ultratermostático, Quimis, modelo 0214M2; Espectrofotômetro UV-Vis PG Instruments, modelo T80+; Lavadora ultra-sônica digital, Sanders medical, modelo SoniClean 2; Liofilizador Liotop, modelo L101; Cromatografo líquido de alta eficiência, Shimadzu LC 2030C 3D e Thermo Scientific Ultra Mate 3000; Coluna Cromatográfica, Agilent, Eclipse XDB-C18 150 x 4,6 mm, 5 µm; Pacote Office - Microsoft Excel 2016; Pacote Office - Microsoft Word 2016; Quit Plot; Chemistry 4D Draw; Empower 3 (*Software Waters Empower™ 3*) Design-Expert, ChemSketch e Thermo Scientific™ VISIONlite™ Spectrophotometer Software.

#### 4.1.2 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram: Membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,45 µm, membrana de filtração, seringa plástica, seringa de vidro, pipeta de paster, béqueres, balões volumétricos, micropipetas, ponteiras, funil de buchner, aparato de filtração, espátula, erlenmeyer, kitassato, papel filtro, papel alumínio, microtubo, tubo falcon, suporte plástico, suporte metálico, recipientes de vidro, proveta, balão de fundo redondo, cubeta, papel macio, grau, pistilo, placa de petri e etiquetas.

#### 4.1.3 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram de alta pureza analítica (grau espectroscópio): Etanol absoluto; ácido gálico; reagente Folin Ciocalteau; carbonato de sódio; quercetina; metanol; cloreto de alumínio; trolox (*ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-*

*tetrametilcromano-2- carboxílico*); sulfato ferroso; ácido trifluoroacético; EDTA (*ácido etilenodiamino tetra-acético*); água ultra purificada.

#### 4.1.4 AMOSTRA

O fruto *in natura*(camu-camu) foi adquirido na Feira Evaristo Castro da Silva no Município de Tabatinga – Amazonas. Posteriormente, estes foram lavados, congelados e enviados ao Laboratório de Processos Químicos da Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Campus Toledo, onde foi armazenado em freezer até as análises. Anteriormente a cada análise, parte da quantidade do fruto preparou-se os extratos e outra quantia realizou-se a liofilização.

#### 4.2 MÉTODOS

##### 4.2.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

###### 4.2.1.1 UMIDADE

Pesou-se em balança analítica e em triplicata 2,0 g de cada amostra, previamente processada para as placas de Petri, em seguida, foi colocadas na estufa a temperatura de 105 °C e deixou-se por 3 horas. Calculou-se a porcentagem por diferença de massa, conforme Equação 4.

$$\% \text{ UMIDADE} = \frac{A-B}{A-C} * 100 \quad (4)$$

Em que:

A = Peso da placa + amostra

B = Peso da placa + amostra depois de submetida a temperatura de 105°C

C = Peso da placa

Em seguida, colocou-se em um dessecador, para atingir temperatura ambiente. Após ter atingido, pesou-se em balança analítica, o conjunto de placas

contendo a amostra já seca. Descontou-se o peso da placa vazia para obter-se o peso da amostra seca.

O peso da água evaporada e compostos voláteis é igual à diferença entre o peso da amostra úmida do peso da amostra seca. Os sólidos totais são calculados, pela diferença entre o peso total da amostra e o peso de água (livre).

Para esta análise utilizou-se a metodologia descrita nos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - 4ª Edição 1ª Edição Digital, Instituto Adolfo Lutz, 2008.

#### 4.2.1.2 TÉCNICA DE DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

Pesou-se em balança analítica e cadinho calcinado 5,0 g de amostra. Transferiu-se o cadinho para mufla a 550 °C, até visualmente ter ocorrido a eliminação completa do carvão, ou seja, até que ocorresse total destruição da matéria orgânica e compostos voláteis, obtendo-se cinzas brancas.

Retirou-se o cadinho e deixou-o até atingir temperatura ambiente em dessecador e na sequência pesou-se em balança analítica. O resultado obtido foi calculado (em porcentagem de cinzas) conforme Equação 5.

$$\% \text{ Cinza} = \frac{\text{Peso da cinza} \times 100}{\text{Peso da amostra}} \quad (5)$$

Metodologia conforme Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - 4ª Edição (1ª Edição Digital), Instituto Adolfo Lutz, (2008).

#### 4.2.1.3 PROTEÍNAS TOTAIS

Pesou-se em balança analítica e papel manteiga 500,0 mg da amostra. Colocou-se no tubo de digestão. Pesou-se em balança analítica 2,5 g de sulfato de sódio e adicionou-se ao tubo, verteu-se 12,0 mL de solução sulfo-cúprica (solução catalítica de ácido sulfurico e sulfato de cobre).

Levou-se a amostra para digestão a uma temperatura de até 420 °C obtendo-se uma solução esverdeada. Na sequência, adicionou-se hidróxido de sódio e realizou-se a destilação, o destilado foi coletado em um erlenmeyer

contendo 12,0 mL de ácido bórico 4,00 % em erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 40 mL de água destilada e três gotas de indicador vermelho de metila, obtendo-se uma solução de coloração verde. Realizou-se titulação da amostra com ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O percentual de proteína foi calculado conforme Equação 6.

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P} \quad (6)$$

Sendo:

$$K = Fc \times 0,0014 \times 100$$

Fc = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

P = massa da amostra em gramas.

V = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação.

Fator = fator de conversão do nitrogênio em proteína (6,25 outros produtos).

Metodologia conforme Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - 4ª Edição (1ª Edição Digital), Instituto Adolfo Lutz, (2008).

#### 4.2.1.4 LIPÍDIOS TOTAIS

Pesou-se em balança analítica e cartucho de Soxhlet, previamente preparado com papel filtro e algodão, 3,0 g de amostra. Na sequência o cartucho foi preenchido com algodão, até cobrir toda a amostra e seco em estufa a 105 °C por duas horas. Posteriormente, colocou-se o cartucho dentro do extrator de Soxhlet e adicionou-se 250 mL de éter de petróleo por 4h.

Pesou-se e foi repetida a operação de aquecimento por 30 minutos na estufa, para todas as amostras e posterior resfriadas até peso constante (aproximadamente duas horas).

A Equação 7, foi utilizada para avaliação dos dados obtidos, para porcentagem de lipídios.

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{PL \times 100}{P} \quad (7)$$

Sendo:

PL = Peso do balão com gordura – Peso do balão antes da extração.

P = peso da amostra.

Metodologia conforme Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - 4ª Edição (1ª Edição Digital), Instituto Adolfo Lutz, (2008).

#### 4.2.1.5 FIBRA BRUTA

Realizou-se a digestão ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 %) com refluxo por 30 min a partir da ebulição. Em seguida lavou-se a amostra com água quente até neutralização. Posterior, realizou-se a digestão alcalina (NaOH 1,25 % (m/v)) com refluxo por 30 min, a partir da ebulição e lavou-se a amostra com água quente até neutralização da mesma.

Posteriormente, lavou-se a amostra utilizando 5,0 mL de acetona e 5,0 mL de álcool etílico. Transferiu-se a amostra do bag de nylon para cadinho de Gooch. Os cadinhos foram identificados conforme cada amostra e forrados com uma camada grossa de lã de vidro no fundo, tratados em mufla a 500 °C por 2 h e colocados em dessecador até temperatura ambiente para a pesagem. Após transferências, filtrou-se a vácuo. Na sequência, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por aproximadamente 4 h, pesou-se, e colocou-se em mufla a 550 °C por 2 h e novamente foram pesadas para o cálculo do percentual de fibra bruta (Equação 7).

$$Fibra\ bruta\ \% = \frac{A-B}{C} * 100 \quad (7)$$

Sendo:

A= massa do cadinho+resíduo

B= massa do cadinho+cinza

C= massa da amostra

A Metodologia utilizada foi conforme AOAC (Crude Fiber Analysis in Feeds by Filter Bag Technique Ba 6a-05. 2009).

#### 4.2.1.6 CARBOIDRATOS TOTAIS

Os valores para carboidratos foram calculados através da diferença em porcentagem, da soma dos demais compostos.

#### 4.2.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

##### 4.2.2.1 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Um planejamento fatorial  $2^2$  foi utilizado para obtenção dos extratos, de modo que, adotou-se o tempo de extração (agitação em agitadora orbital), como fator 1 e temperatura fator 2. Este visou encontrar quais as variáveis que mais afetam o processo, assim como a interação entre elas, conforme Tabela 1.

**Tabela 1 - Planejamento fatorial  $2^2$  variáveis codificadas e não codificadas**

Extratos	Variáveis não codificadas (tempo (h) e temperatura °C)	Variáveis codificadas (tempo (h) e temperatura °C)
1	1,0 25	-1 -1
2	4,0 25	+1 -1
3 – 6	2,5 35	0 0
7	1,0 45	-1+1
8	4,0 45	+1+1

Foram preparados os extratos para cada condição, alterando (intercalando) o fator 1, de modo que os resultados da triplicata dos extratos preparados a 25 °C, foram identificados como 1 e 2, e 45 °C os extratos identificados como 7 e 8. O ponto central que foi preparado em quadruplicata, nas condições centrais (2,5 h 35 °C), representados pelos extratos 3 a 6. A definição destas variáveis (tempo e temperatura) e dos valores dos níveis, baseou-se na metodologia proposta por BOROSKI *et. al.*, 2015.

Vale ressaltar que as variáveis expressam as possíveis soluções ao problema, aquelas que podem ser alteradas para atingir melhor o objetivo. A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para que se entendam os processos a serem monitorados em um determinado sistema.

Quando empregada uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas (Pereira-Filho *et al.*, 2002) e isso torna a otimização de um determinado processo/procedimento menos eficiente.

Os extratos do fruto *in natura* e das diferentes dietas foram obtidos a partir de 2,0 g de amostra previamente processadas. Os preparos foram realizados conforme planejamento fatorial. De modo que para o fruto e as diferentes composições os preparos foram realizados em triplicata, utilizando toda a fruta e composições inteiras.

Com os processados em temperatura ambiente, pesou-se aproximadamente 2,0 g de amostra em um erlenmeyer de 50 mL. Na sequência adicionou-se 10,0 mL de etanol absoluto e homogeneizou-se em vórtex por aproximadamente 2 minutos. Após esta etapa, a solução foi submetida à agitação, conforme planejamento definido, em agitadora orbital ao abrigo da luz.

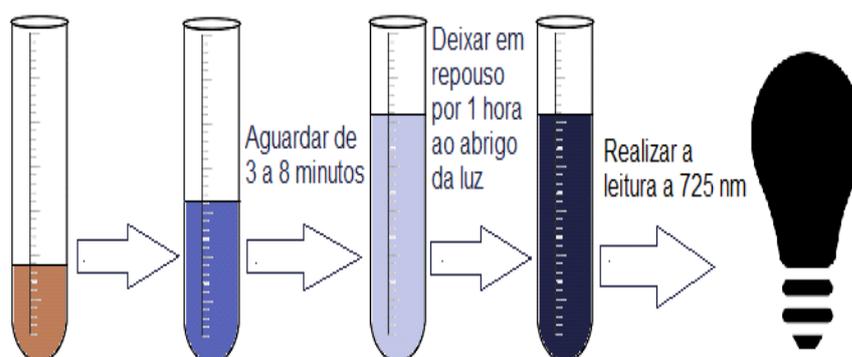
Em seguida, as amostras foram filtradas, á vácuo, com papel filtro quantitativo e avolumadas em balões volumétricos de 25,0 mL com etanol 70 %. Os filtrados foram acondicionados em tubos tipo Falcon até que fossem realizadas as análises.

#### 4.2.2.2 FENÓLICOS TOTAIS

A solução padrão de ácido gálico, foi preparada sob proteção da luz, perfazendo uma concentração de 200 g L<sup>-1</sup>. Para a curva de calibração foram efetuadas diluições desta solução, para concentrações entre 0-150 g L<sup>-1</sup>.

Adicionou-se 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1), a 250 µL solução de extrato da amostra teste (ou da solução padrão para a curva de calibração), 500 µL da solução saturada de carbonato de sódio e 4,0 mL de água destilada. Os tubos foram agitados, de modo que se manteve em temperatura ambiente e sob proteção da luz por 25 minutos. Na sequência centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm, utilizando centrífuga da marca Parsec, modelo CT308. Preparou-se um branco, utilizando 250 µL de etanol 99 % no lugar da amostra e prosseguiu-se com as mesmas condições conforme descrito para a amostra. A absorção máxima em 725 nm foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis. O resumo de tal procedimento pode ser observado na Figura 9.

**Figura 9 - Método de fenólicos totais**



**Fonte: Autoria própria. Software Pixabay.**

A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 725 nm. Os resultados dos compostos fenólicos totais são expressos em equivalente de ácido gálico (EAG g por 100 g de extrato), com base na equação da reta da curva de calibração de ácido gálico preparada previamente. Posterior, realizou-se leitura.

#### 4.2.2.3 HABILIDADE QUELANTE

O padrão de EDTA, foi preparado a  $0,0015 \text{ mgL}^{-1}$  de EDTA. Foi iniciada a análise a partir da adição de 3,0 mL de solução contendo a amostra em um tubo de ensaio com tampa, seguida da adição de 0,1 mL de  $\text{FeCl}_2$  a  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  e fez-se a leitura da absorvância em 562 nm, que representa a absorvância da solução da amostra ( $A_0$ ).

Após a primeira leitura de absorvância, a reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de ferrozina a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , seguida de agitação vigorosa por um minuto em vortex e nova leitura de absorvância em 562 nm ( $A_1$ ), após ter aguardado dez minutos de repouso. Para controle positivo, utilizou-se uma solução de EDTA  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  que foi utilizada no lugar da amostra, tanto para o  $A_0$ , quanto para a medida da atividade antioxidante utilizando a ferrozina ( $A_1$ ). Também mediu-se a absorvância ( $A_{\text{branco}}$ ) de uma solução com 3,7 mL do solvente utilizado para preparar a solução com a amostra e os demais reagentes, inclusive a ferrozina, que representou a absorvância inicial do íon complexo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{ferrozina})^3]^{2+}$ .

A porcentagem de inibição de formação do íon complexo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{ferrozina})^3]^{2+}$  está diretamente relacionada com a atividade antioxidante da amostra, pois, quanto maior for esta inibição, maior será a competição em formar complexos estáveis com

$Fe^{+2}$ , imobilizando-o e resultando em um decréscimo na intensidade da cor rosa do íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)^3]^{2+}$ . A habilidade quelante da amostra é determinada pela Equação 8, expressa abaixo (KUDA *et al.*, 2005).

$$\text{Habilidade quelante (\%)} = \left\{ \frac{[A_{\text{branco}} - (A_1 - A_0)]}{A_{\text{branco}}} \right\} \times 100 \quad (8)$$

Sendo:

$A_{\text{branco}}$  = Absorvância inicial do íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)^3]^{2+}$  com 3,7 mL de solvente;

$A_0$  = absorvância da solução da amostra;

$A_1$  = absorvância do íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)^3]^{2+}$  na presença da amostra.

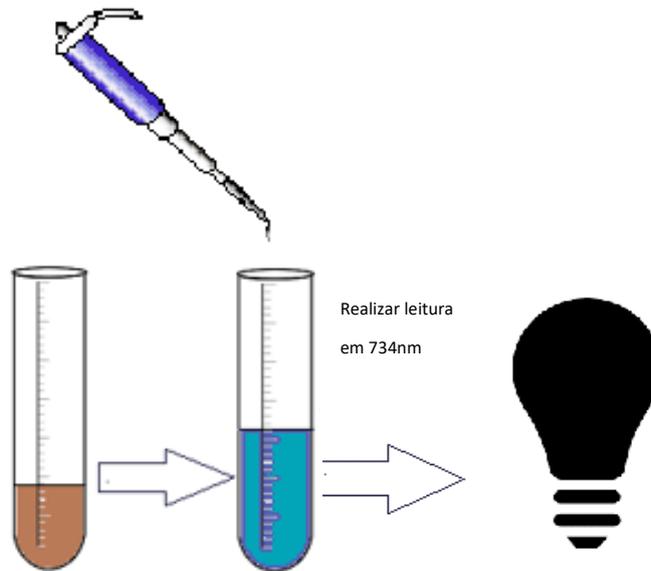
Um valor baixo de  $A_1$  é resultante de uma elevada atividade antioxidante da amostra; conseqüentemente, o percentual da habilidade quelante será elevado.

#### 4.2.2.4 CAPTURA RADICALAR POR ABTS

O padrão Trolox, utilizado na análise de ABTS, foi preparado dissolvendo 25,0 mg deste para balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se o volume com etanol. A partir desta solução, foram preparadas outras soluções de Trolox nas concentrações: 100, 500, 1000 e 1500 mol L<sup>-1</sup> em balões volumétricos de 5,0 mL.

Ao abrigo da luz, transferiu-se uma alíquota de 30 µL das soluções de Trolox (100, 500, 1000, 1500 e 2000 µmol L<sup>-1</sup>), em triplicata, para as cubetas e acrescentaram-se 3,0 mL da solução do ABTS<sup>•+</sup>. Em seguida, a mistura foi homogeneizada. Após 6 minutos de repouso, fez-se a leitura de absorvância da mesma, em 734 nm. O mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de Trolox por etanol, para obtenção do branco.

**Figura 10 - Método de ABTS**



**Fonte: Autoria própria. Software Pixabay.**

Os cálculos envolvidos na determinação da capacidade antioxidante frente ao padrão Trolox podem ser realizados a partir de soluções de diferentes concentração do extrato (BOROSKI *et. al.*, 2015).

Para obtenção da curva de calibração, as concentrações de Trolox ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) são plotadas no eixo x e as respectivas absorvâncias no eixo y, obtendo-se a equação da reta através de regressão linear.

A partir da equação da reta, calcula-se a absorvância referente a  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox. Substituindo-se na equação da reta o valor de x igual a 1000, tem-se uma absorvância (y), correspondente a  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox. Por exemplo, conforme Equação 9.

$$y = -0,00031 x + 0,68274$$

$$y = -0,00031 \cdot 1000 + 0,68274 \quad (9)$$

$$y = 0,3827$$

A partir das absorvâncias obtidas das soluções de diferentes concentrações dos extratos, plota-se um gráfico com a absorvância no eixo y e as diferentes concentrações da solução do extrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no eixo x. Em seguida, determina-se a equação da reta através de regressão linear.

Para calcular a capacidade antioxidante da amostra em equivalente Trolox, deve-se substituir o valor de absorvância correspondente a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do padrão Trolox, na equação da reta obtida pela absorvância do radical ABTS em função da concentração de extrato da amostra em 734 nm. O valor obtido para o termo x corresponde à concentração de extrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) equivalente a 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox conforme exemplificado na Equação 10.

$$y = -0,00031 x + 0,51506$$

$$0,38274 = -0,00031 x + 0,51506 \quad (10)$$

$$x = 426,84 \text{ mg L}^{-1}$$

O valor de x igual a 426,84  $\text{mg L}^{-1}$  corresponde à concentração de extrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) equivalente a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox. Considerando que a concentração da solução de Trolox está em 1L de solução, igual à da amostra, observa-se que a capacidade antioxidante de 426,84 mg de extrato equivale a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox. A equivalência de 1g de extrato em  $\mu\text{mol}$  de Trolox é obtida através da Equação 11.

$$\mu\text{mol de Trolox g}^{-1} \text{ extrato} = \frac{1000 \mu\text{mol de Trolox}}{0,42684 \text{ g de extrato}} = 2342,80 \mu\text{mol de Trolox g}^{-1} \text{ extrato} \quad (11)$$

Sabendo que a massa total de extrato obtido na extração inicial com etanol foi de 1,413 g, isto equivale a 3310,37  $\mu\text{mol}$  de Trolox (2342,80  $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$  extrato x 1,413 g extrato).

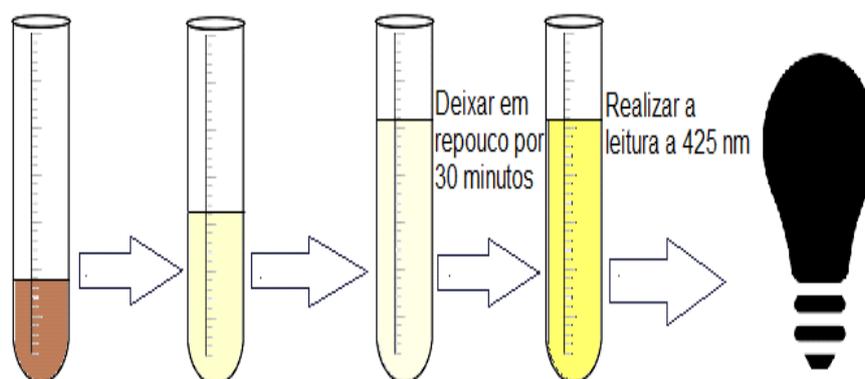
Esta análise pode também ser realizada empregando somente um extrato da amostra, ou seja, a partir de uma solução de uma única concentração de extrato. No entanto, é importante ressaltar que o emprego de curva com diferentes concentrações garantem dados mais confiáveis por minimizar o efeito da matriz no experimento.

#### 4.2.2.5 FLAVONÓIDES TOTAIS

A solução padrão de quercetina, foi preparada sob proteção da luz, em uma concentração de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . Em seguida foram efetuadas as devidas diluições em etanol 99 %, para se obter soluções de concentração entre  $0-160 \text{ mg L}^{-1}$ , a fim de construir a curva de calibração.

Adicionaram-se  $250 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de cloreto de alumínio 5 % (v/v em etanol 99 %) e  $4,25 \text{ mL}$  de etanol a  $500 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de extrato da amostra teste. Agitaram-se os tubos e os mesmos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos. Preparou-se um branco nas mesmas condições descritas para a amostra, com etanol 99 %. A absorção máxima em  $425 \text{ nm}$  foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis contra o branco.

**Figura 11 - Método de flavonoides**



**Fonte: Autoria própria. Software Pixabay.**

A absorvância foi medida em espectrofotômetro a  $425 \text{ nm}$ . Os resultados dos flavonoides foram expressos em equivalente de quercetina (EQ em  $\text{mg}$  por  $100 \text{ g}$  de extrato), com base na equação da reta da curva de calibração de ácido gálico preparada previamente. Posterior, realizou-se leitura das amostras.

#### 4.2.3 LIOFILIZAÇÃO

Quando utilizado em experimentos, frutos, é possível encontrar diferentes percentuais de umidade para este, com o passar do tempo. Deste modo, para que

se obtenha uma maior homogeneidade amostras, utiliza-se a anostragem em base seca.

Logo, as amostras do camu-camu utilizadas para o preparo das soluções quantificadas a partir do emprego da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, foram liofilizadas, utilizando o Liofilizador Liotop, modelo L101. Liofilizou-se por 72 h a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS

Utilizou-se para identificação e quantificação a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção molecular na região do ultravioleta/visível.

As condições do sistema cromatográfico foram:

Soluções de Limpeza: Coluna: Metanol 10 % em água (v/v)

Injetor: Metanol 70 % em água (v/v)

Fase móvel: Isocrático 50 % canal A : 50 % canal B

Canal A: Água ultrapurificada acidificada com ácido fosfórico ( $3,06\text{ mmol L}^{-1}$ )

Canal B: Metanol

Fluxo:  $0,5\text{ mL min}^{-1}$

Volume de injeção:  $20\text{ }\mu\text{L}$

Coluna cromatográfica: C18 ( $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ ,  $5,0\text{ }\mu\text{m}$ ) – AkzoNobel Kromasil

Temperatura:  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$

Equipamento: CLAE – Shimatzu LC 2030C 3D / Thermo Scientific Ultra Mate

3000Detector: DAD - UV/Vis:  $370\text{ nm}$

Tempo de corrida:  $35,00\text{ min}$

Tempo de retenção aproximado: Ácido siringico  $4\text{ min}$ ; Ácido gálico  $10\text{ min}$ ; Rutina  $12\text{ min}$ ; Ácido elágico  $16\text{ min}$ ; Miricetina  $17\text{ min}$ ; Quercetina  $33\text{ min}$ ;

Preparou-se as soluções padrão de ácido siringico, ácido gálico, rutina, ácido elágico, miricetina, quercetina, sob proteção da luz, em uma concentração de  $0,2\text{ g L}^{-1}$  (solução estoque). Em seguida, foram efetuadas as devidas diluições, para que se chegasse as concentrações descritas na Tabela 2. Inicialmente, adicionou-se

40 % do volume do balão com metanol e levou-se ao ultrassom por 5 minutos. Posterior, foram adicionadas 10 % do volume água purificada e 30 % de ácido clorídrico diluído e submeteu-se a vortex por 5 minutos. Em seguida, esperou-se até que a solução estivesse em temperatura ambiente e o volume do balão foi completado com metanol. Filtrou-se com PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para análise de identificação dos flavonóides, apenas foi realizado o preparo da solução estoque e preparado um mix, contendo seis padrões (ácido siringico, rutina, resverastrol, ácido elágico, miricetina e quercetina), de modo que a concentração de cada padrão foi de 0,05  $\text{g L}^{-1}$ , na solução padrão mix.

Posteriormente, foram realizadas diluições, a partir da solução estoque preparada (0,2  $\text{g L}^{-1}$ ), para se obter soluções de concentração de acordo com a faixa linear de cada padrão, conforme Tabela 2. Construiu-se, portanto, a curva de calibração, para os flavonóides e ácidos fenólicos a serem quantificados.

**Tabela 2 - Preparo das soluções padrão para curva de calibração**

<b>Padrão</b>	<b>Concentração <math>\text{g L}^{-1}</math></b>				
Ácido elágico	0,072	0,060	0,048	0,036	0,024
Miricetina	0,015	0,013	0,010	0,008	0,005
Quercetina	0,017	0,014	0,011	0,008	0,006

O preparo das amostras foi realizado em triplicata e sob proteção da luz, em uma concentração de aproximadamente 80  $\text{g L}^{-1}$ . Após pesagem da amostra liofilizada, foi realizada diluição. Inicialmente adicionou-se 40 % do volume do balão com metanol e levou-se ao ultrassom por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 10 % do volume de água purificada e 30 % de ácido clorídrico diluído e submeteu-se a vortex por 5 minutos. Em seguida, esperou-se até que a solução estivesse em temperatura ambiente e o volume do balão foi completo com metanol. Filtrou-se com PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ .

Após comprovação da aplicabilidade do método (desenvolvimento da metodologia analítica), realizou-se a quantificação e identificação dos flavonóides, presente no fruto (camu-camu) e nas composições nutricionais.

#### 4.2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NO CAMU-CAMU POR CLAE

A metodologia analítica testada inicialmente, para determinação de ácido ascórbico na amostra, baseou-se na metodologia desenvolvida e validada por Khiem (2013). Porém, como tal metodologia apresentou desacordo com as especificações do ICH (2005) e não se aplicou a matriz, um novo método foi desenvolvido e validado.

Utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção molecular na região do ultravioleta/visível. O sistema cromatográfico utilizado foi:

Soluções de Limpeza: Coluna: Metanol 10 % em água (v/v)

Injetor: Metanol 70 % em água (v/v)

Fase móvel: Isocrático 90 % canal A : 10 (%) canal B

Canal A: Ácido Trifluoroacético 0,1 % (água purificada)

Canal B: Ácido Trifluoroacético 0,1 % (metanol)

Fluxo: 1,0 mL min<sup>-1</sup>

Volume de injeção: 10 µL

Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) – Agilent Eclipse XDB

Temperatura: 30 °C

Equipamento: CLAE – Shimadzu LC 2030C 3D

Detector: DAD - UV/Vis: 254 nm

Tempo de corrida: 5,00 min

Tempo de retenção aproximado: 1,74 min

Utilizou-se como diluente água ultrapurificada.

Para preparo dos padrões, pesou-se 10 mg do padrão de ácido ascórbico em balão volumétrico (âmbar) de 100 mL, adicionou-se 50 mL de diluente. A mistura foi submetida à ultrassom até completa solubilização. Após atingir temperatura ambiente o volume foi completo com diluente. Por fim, foi filtrado em membrana PVDF 0,45 µm. A concentração final da solução de ácido ascórbico foi de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Após realização de testes durante o desenvolvimento, foi encontrada a massa a ser pesada de amostra, que após término do preparo equivaleria à

concentração de ácido ascórbico igual à do padrão. Deste modo, pesou-se 35,76 mg da amostra de camu-camu, e transferiu-se para balão volumétrico (âmbar) de 100 mL, adicionou-se 50 mL de diluente e submetido a ultrassom até completa solubilização. Após atingir temperatura ambiente o volume foi completo com diluente. Por fim, foi filtrado em membrana PVDF 0,45 µm.

Sabendo que, a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, foram estimadas as figuras de mérito de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade. Isto, conforme preconiza guia Q2 (R1) da conferência internacional de harmonização (*International Conference on Harmonisation, ICH*) que aborda o procedimento de validação analítica (ICH, 2005). As Equações 12 e 13 determinam os limites encontrados para os teste de limite de detecção e quantificação, respectivamente.

$$LD = \frac{3 * \text{Média das concentrações}}{\text{Média do S/N}} \quad (12)$$

$$LQ = \frac{10 * \text{Média das concentrações}}{\text{Média do S/N}} \quad (13)$$

Após comprovação da aplicabilidade do método (desenvolvimento da metodologia analítica), realizou-se a quantificação do ácido ascórbico (validação da metodologia analítica) presente no fruto (camu-camu), pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

##### 4.2.6.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA

A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada para tratamento estatístico dos dados encontrados, a partir das análises de potencial antioxidante avaliados por espectrofotometria e nas análises de quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides.

O nível de significância utilizado foi de 0,05, ou seja o critério de  $p < 0,05$ .

Para análise, utilizou-se o software Statistica 6.0.

#### 4.2.6.2 TESTE DE COCHRAN (HOMOCEDESTICIDADE DE VARIÂNCIA)

O Teste de COCHRAN foi aplicado na avaliação dos resultados obtidos a partir da análise de linearidade realizada na validação da metodologia analítica para a determinação de ácido áscorbico presente no camu-camu por CLAE.

#### 4.2.6.3 TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

O Teste de Tukey, foi realizado para tratamento estatístico dos dados encontrados, a partir das análises de potencial antioxidante avaliados por espectrofotometria e nas análises de quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides.

Para análise, utilizou-se o software Statistica 6.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os ingredientes das diferentes dietas podem ser verificados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Porcentagem de ingredientes utilizados para preparo das dietas (referência e enriquecidas em 10 a 30 % com camu-camu *in natura*)**

Ingredientes (%)	Camu-camu (%)			
	0	10	20	30
Farelo de soja	54,07	54,51	54,94	55,38
Camu-camu	0,00	10,00	20,00	30,00
Milho	31,31	20,87	10,44	0,00
Farinha de vísceras	8,00	8,00	8,00	8,00
Fosfato bicálcico	2,87	2,87	2,87	2,87
Óleo de soja	2,00	2,00	2,00	2,00
Premix <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50
DL – metionina	0,23	0,23	0,23	0,23
BHT <sup>2</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02

<sup>1</sup>Suplemento mineral e vitamínico, níveis de garantia por quilograma do produto (Supremais): Vit. A, 1.200.000UI; Vit. D3, 200.000UI; Vit. E, 12.000mg; Vit. K3, 2.400mg; Vit. B1, 4.800mg; Vit. B2, 4.800mg; Vit. B6, 4.000mg; Vit. B12, 4.800mg; Ác. Fólico, 1.200mg; Pantotenato Ca, 12.000mg; Vit. C, 48.000mg; Biotina, 48mg; Colina, 65.000mg; Niacina, 24.000mg; Ferro, 10.000mg; Cobre, 6.000mg; Manganês, 4.000mg; Zinco, 6.000mg; Iodo, 20mg; Cobalto, 2mg; Selênio, 20mg. <sup>2</sup>Butil hidroxitolueno.

**Fonte: Silva, (2019).**

Na Tabela 4 podem-se observar os resultados da análise de composição centesimal do fruto e das diferentes dietas.

**Tabela 4 - Composição centesimal do camu-camu in natura e diferentes dietas, sem enriquecimento e enriquecidas com o fruto *in natura* de 10 a 30 %**

FRUTO	UMIDADE (%)	PROTEINA BRUTA (%)	FIBRA BRUTA (%)	CINZAS (%)	LIPÍDIOS (%)	CARBOIDRATOS (%)
<i>In natura</i> (Inteiro)	86,31 ± 0,34	0,79 ± 0,02	0,86 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,58 ± 0,04	11,22 ± 1,42
DIETA	UMIDADE (%)	PROTEINA BRUTA (%)	FIBRA BRUTA (%)	CINZAS (%)	LIPÍDIOS (%)	CARBOIDRATOS (%)
Referência 0 %	6,36 ± 0,28 a	32,60 ± 2,42 c	4,72 ± 0,42 c	8,59 ± 1,45 c	4,40 ± 3,28 c	43,33 ± 2,82 a
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 10 %	8,35 ± 0,64 a	32,12 ± 3,58 d	4,34 ± 0,35 d	8,54 ± 0,98 c	5,24 ± 4,24 b	41,41 ± 2,36 b
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 20 %	7,51 ± 0,51 a	32,77 ± 2,46 b	4,81 ± 0,32 b	8,89 ± 0,65 b	5,90 ± 4,15 a	40,12 ± 2,28 c
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 30 %	7,86 ± 0,55 a	33,10 ± 2,65 a	5,31 ± 0,56 a	9,06 ± 0,11 a	5,93 ± 3,44 a	38,74 ± 1,98 d

*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si (p<0,05), pelo Teste de Tukey. Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Dentre os resultados obtidos a partir da análise de composição centesimal, ressalta-se a porcentagem de umidade encontrada para o fruto, conforme expresso na Tabela 4, o mesmo apresenta 86,31 %. Foi necessário no preparo dos extratos utilizar o fruto *in natura*, previamente multiprocessado e macerado em grau e pistilo, para obter-se homogeneidade. Diferentemente das amostras utilizadas nas análises cromatográficas, as quais se utilizaram a amostra liofilizada, isto a fim de obter-se maior repetibilidade dos resultados.

Após análise dos resultados obtidos para as diferentes dietas, pôde-se observar que na maioria das análises houve variação estas na maioria das análises significativas quando comparadas as dietas entre si. Exceto a diminuição da porcentagem de proteína bruta que foi reduzida, porém a porcentagem de fibra apresentou um aumento percentual, quando adicionado o fruto inteiro.

Devido à alteração na proporção dos ingredientes em cada dieta, a exemplo o milho, ingrediente rico em carboidrato, que a cada dieta foi reduzido sua quantidade em 30 %, de modo que foi adicionado o fruto distribuidamente em todos os ingredientes na mesma porcentagem, explica as variações encontradas nos resultados das análises, pois propriedades destes ingredientes também são substituídas quando alteradas suas porcentagens (quantidades).

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

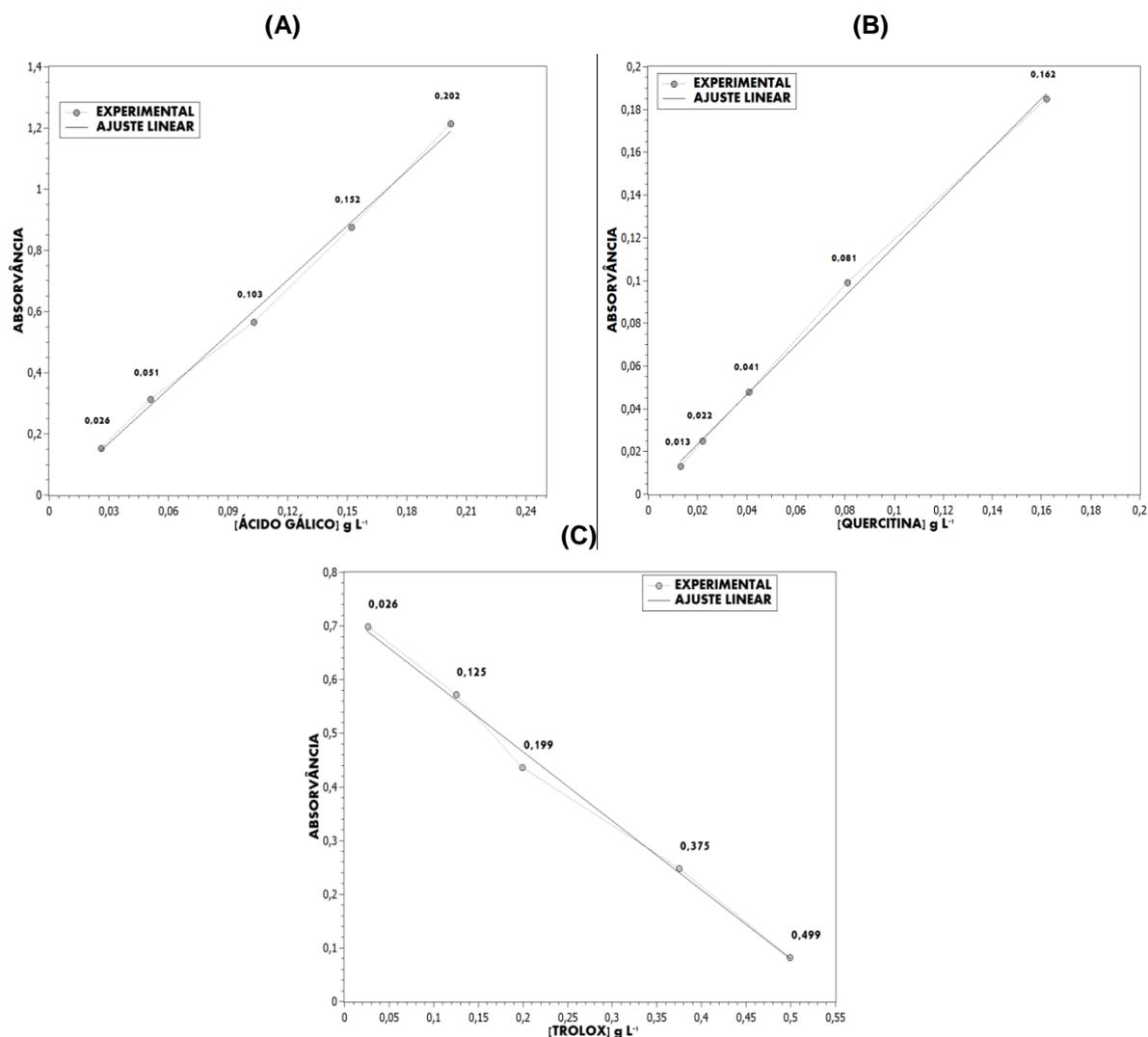
Os extratos foram preparados conforme planejamento fatorial  $2^2$  proposto. Utilizou-se para preparo dos extratos, o fruto *in natura* (inteiro), dieta referência e dietas enriquecidas com o fruto *in natura* em 10 a 30 %.

A seguir estão descritos os resultados encontrados para cada análise de potencial antioxidante.

### 5.2.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração obtidas, estão expressas na Figura 12.

Figura 12 - Curvas de calibração de absorvância versus concentração em equivalente de ácido gálico (A), quercetina (B) e trolox (C), utilizados para análises de potencial antioxidante a partir da metodologia de compostos fenólicos, flavonóides e radicalar ABTS, respectivamente



Fonte: Autoria própria. Quitplot

As equações das retas obtidas a partir das curvas de calibração dos padrões (ácido gálico, quercetina e Trolox), os comprimentos de onda os quais mediu-se as absorvâncias e seus respectivos coeficiente de correlação podem ser observados na Tabela 5.

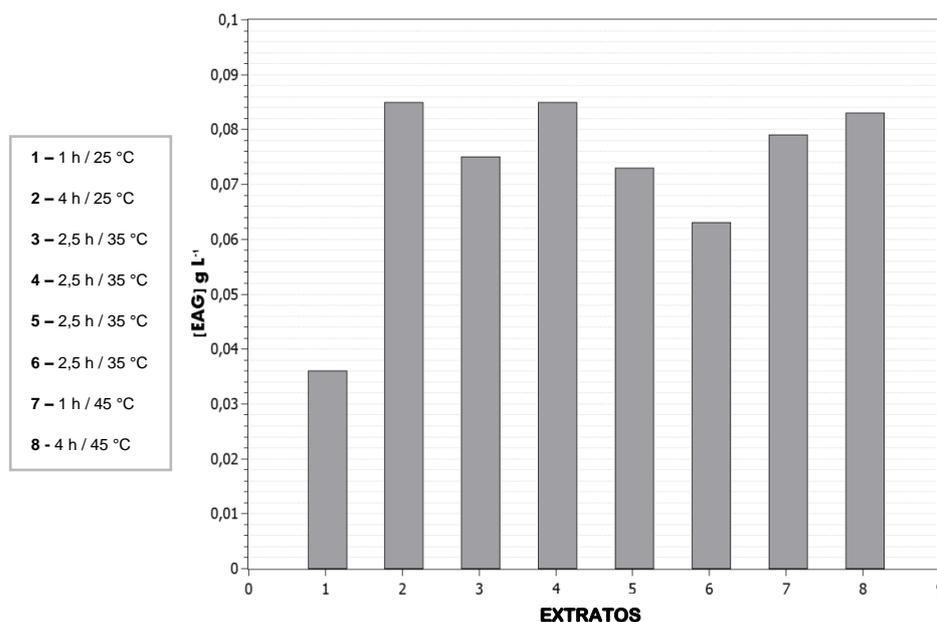
**Tabela 5 – Equação da reta e coeficiente de correlação obtido para cada metodologia de potencial antioxidante, estes a partir da curva de calibração de cada padrão avaliado em um dado comprimento de onda**

METODOLOGIA	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	EQUAÇÃO DA RETA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO
Compostos fenólicos	720	$Y = 5,9328.x - 0,0089$	0,997
Flavonóides	425	$Y = 1,1562.x + 0,0006$	0,998
ABTS	734	$Y = -1,2877.x + 0,7229$	0,995

## 5.2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

A partir dos resultados expressos na Figura 13, pode-se observar que os melhores valores foram obtidos nos extratos 2 e 4 (0,09 e 0,09 g de equivalente de ácido gálico por litro, respectivamente), os quais não apresentaram diferença significativa. Enquanto que o pior resultado (extrato 1) foi de 0,04 EAG g L<sup>-1</sup>.

**Figura 13 – Concentração de compostos fenólicos, nos extratos de camu-camu, expressos como EAG (g L<sup>-1</sup>)**



Fonte: Autoria própria. Software *Quitplot*

Para esta análise, as extrações realizadas a 25 °C por 4h e a 35 °C por 2,5 h de agitação, foram as que melhor extraíram os compostos fenólicos presentes na amostra. As temperaturas 25 °C e 35 °C não apresentaram diferenças significativas entre si e seriam as melhores condições experimentais. Já para os tempos de agitação, houve diferenças significativas entre todos os resultados.

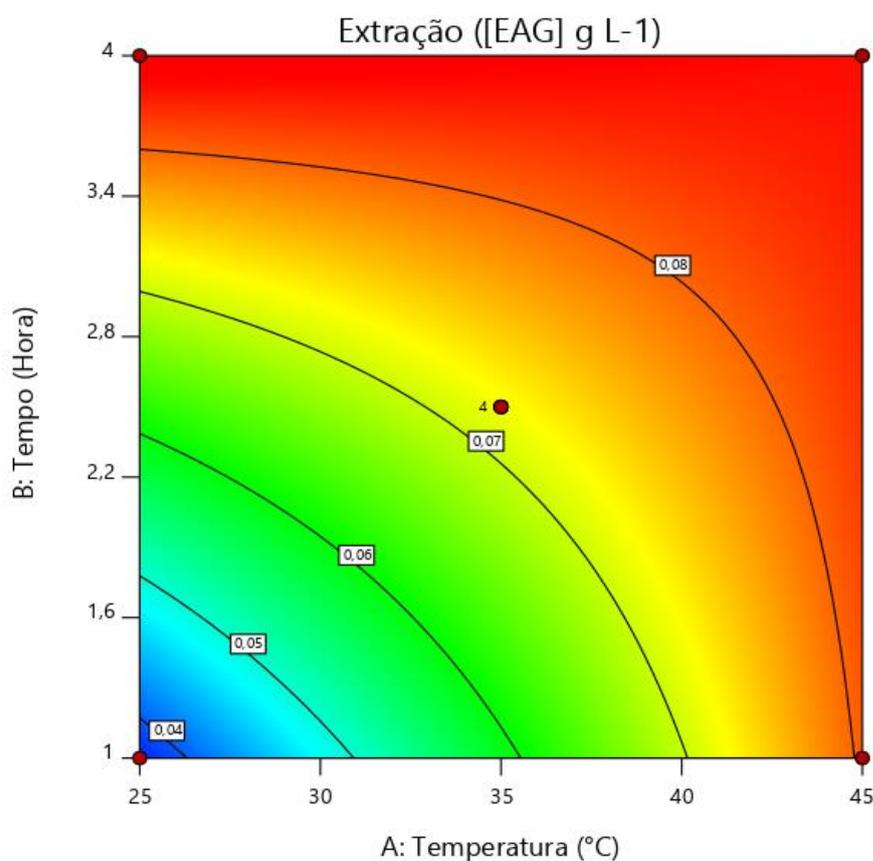
**Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de compostos fenólicos**

ANOVA				
Temperatura	Tempo de Agitação	Temperatura x Tempo de Agitação	p	Coefficiente de correlação
***	***	***	0,03	0,991

Onde: Quanto maior a quantidade de \* (0,05) maior significância entre os dados.

Valores de p inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Obteve-se para este modelo, p-valor 0,03, neste caso, o tempo é um termo significativo. Se houver muitos termos de modelo insignificantes (sem contar os necessários para dar suporte à hierarquia), a redução do modelo poderia ter melhorado-o. A avaliação estatística de extração para esta análise esta expressa na Figura 14.

**Figura 14 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de compostos fenólicos**



Fonte: Autoria própria. Design Expert

Quando comparado o potencial de compostos fenólicos totais, obtido a partir dos extratos de camu-camu, aos valores encontrados para outros frutos, estes são

menores, de acordo com Souza e Vieira (2011), a exemplo, a goiaba, acerola, abacaxi, graviola, bacuri e cupuaçu, os quais apresentam em média respectivamente 0,03 EAG g L<sup>-1</sup>, 0,03 EAG g L<sup>-1</sup>, 0,01 EAG g L<sup>-1</sup>, 0,02 EAG g L<sup>-1</sup>, 0,01 EAG g L<sup>-1</sup> e 0,01 EAG g L<sup>-1</sup>.

Realizou-se esta análise para as diferentes dietas, cujas extrações foram realizadas considerando uma das melhores condições, conforme análise estatística, ou seja, a 25 °C por 4 horas. Utilizou-se a curva de calibração (A), expressa na Figura 12 para cálculo da concentração de composto fenólicos, sendo estes expressos em EAG g L<sup>-1</sup>. Conforme expresso na Tabela 7.

**Tabela 7 - Compostos fenólicos nas diferentes dietas (referência e enriquecidas com fruto *in natura* em 10 a 30 %) expressos em EAG g L<sup>-1</sup>**

<b>COMPOSTOS FENÓLICOS (EAG g L<sup>-1</sup>)</b>	
Referência 0 %	0,0322 ± 0,01 % d
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 10 %	0,0436 ± 0,02 % c
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 20 %	0,0514 ± 0,02 % b
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 30 %	0,0646 ± 0,02 % a

*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si (p<0,05) pelo Teste de Tukey. Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Segundo GONÇALVEZ (2008), a variação dos resultados obtidos pode ser explicada devido a variação do conteúdo da própria fruta, sendo estas épocas de plantio e colheita, entre outras, bem como das perdas durante o preparo das dietas.

Para análise de compostos fenólicos, o tratamento feito (para ambas as dietas), foi a 25°C com 4 h de agitação. Este tratamento foi escolhido baseando-se nos resultados do planejamento desenvolvido para avaliação do fruto. Visto que, com este tratamento obteve-se maior extração e porcentagem de compostos fenólicos totais.

A análise estatística indicou que o p-valor do conjunto de dados, foi de 0,037, logo menos que 0,05, houve diferença significativa entre os extratos preparados a partir das diferentes dietas (referência e enriquecidas em diferentes concentrações com o fruto *in natura*).

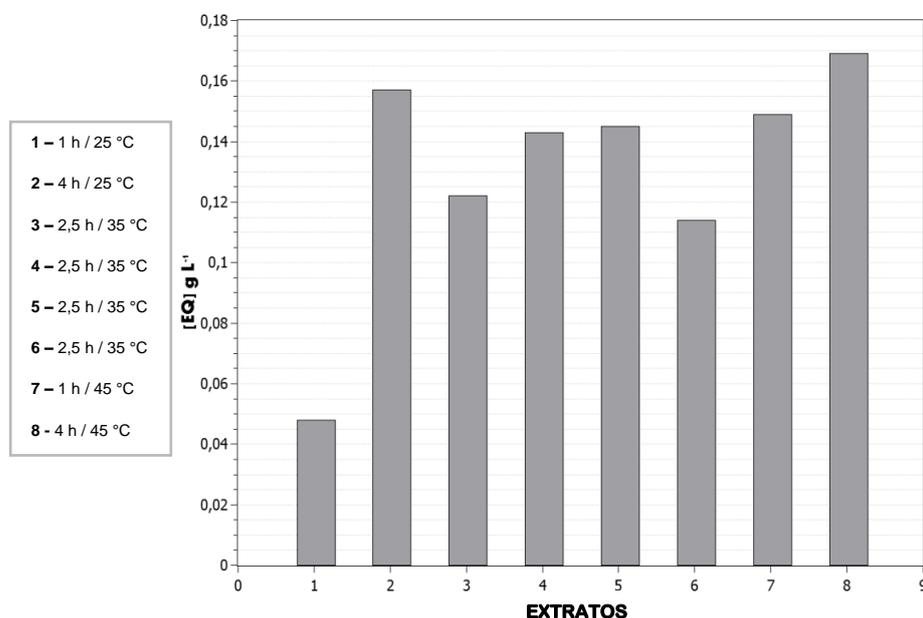
A partir da análise de compostos fenólicos realizada, observou-se, que houve um aumento na concentração por miligrama em equivalente de ácido gálico nas dietas, conforme aumentou-se a concentração em porcentagem do fruto. Com isso, pode-se concluir que o potencial antioxidante nas amostras analisadas, sofreram influência do enriquecimento, visto que o potencial aumentou com a porcentagem substituída, embora não tenha sido proporcional.

Vale ressaltar que a análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de diversos interferentes (ANGELO E JORGE, 2007).

### 5.2.3 FLAVONÓIDES TOTAIS

A Figura 15 evidencia que os extratos 8 e 2 obtiveram uma maior quantidade de Flavonóides (0,17 e 0,16 EQ g L<sup>-1</sup>).

**Figura 15 - Concentrações dos extratos de camu-camu expressos como EQ g L<sup>-1</sup>**



Fonte: Autoria própria – Software *Quitplot*

Portanto, as melhores extrações realizadas, foram a partir de 4 h de agitação e temperaturas de 25 °C e 45 °C. No processo de otimização da obtenção dos extratos utilizados para análise de flavonóides, observou-se que todas as

temperaturas e tempos de agitação mostraram diferenças significativas entre si, conforme Tabela 8.

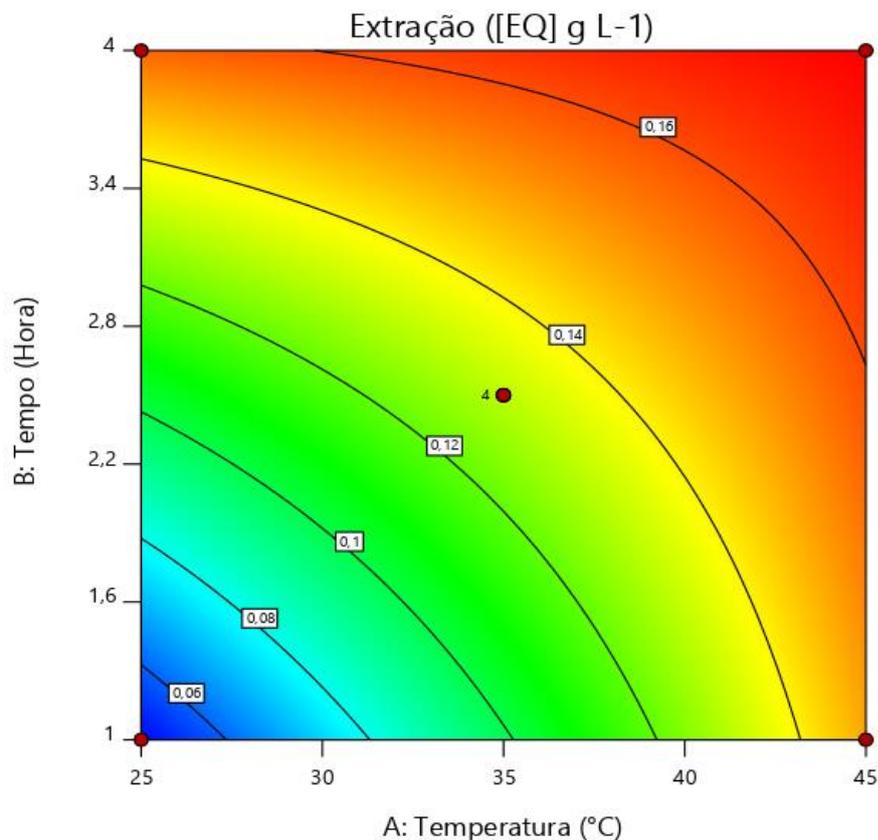
**Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de flavonóides**

ANOVA				
Temperatura	Tempo de Agitação	Temperatura x Tempo de Agitação	p	Coefficiente de correlação
***	***	***	0,01	0,995

Quanto maior a quantidade de \* (0,05) maior significância entre os dados.

Obteve-se para este modelo, p-valor 0,01, indicando que os termos do modelo são significativos. Neste caso, tempo e temperatura são termos significativos no modelo. Para que fosse possível concluir qual foi a melhor condição de extração, avaliou-se o gráfico de contorno, conforme Figura 16.

**Figura 16 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de flavonoides**



Fonte: Autoria própria. Design Expert

A partir dos resultados obtidos, observou-se que houve variações nos teores de flavonóides nas diferentes dietas. Segundo Gonçalves, 2008, os teores de flavonóides em frutas podem variar em até 100 % entre um semestre e outro, sendo

estes influenciados por fatores extrínsecos tais como, as condições climáticas, época de plantio e colheita e grau de maturidade dos frutos.

Utilizou-se a melhor condição de extração (45 °C com 4 h de agitação), para preparo dos extratos a partir da dieta referência e enriquecidas com o fruto *in natura* em 10 a 30 %.

Por meio, da equação obtida a partir da curva de calibração (B) expressa na Figura 12, foi possível obter os resultados de concentração de flavonóides nas diferentes dietas, sendo estes expressos em EQ g L<sup>-1</sup>. Conforme expresso na Tabela 9.

**Tabela 9 - Concentração de flavonóides na dieta referência e nas dietas enriquecidas com o fruto *in natura* em 10 a 30 % em EQ g L<sup>-1</sup>**

FLAVONÓIDES TOTAIS (EQ g L <sup>-1</sup> )	
Referência 0 %	0,068 ± 0,54 b
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 10 %	0,037 ± 0,25 c
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 20 %	0,102 ± 0,33 a
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 30 %	0,133 ± 0,25 a

*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si (p<0,05) pelo Teste de Tukey. Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Quando avaliados os resultados de flavonóides totais para as diferentes dietas, observou-se, que foram obtidos valores inferiores ao encontrado, para a média da melhor condição de extração para o fruto (0,17 EQ g L<sup>-1</sup>).

A partir da análise estatística, determinou-se p-valor do conjunto de dados, o qual foi de 0,04, ou seja, houve diferença significativa (p<0,05), entre os extratos preparados a partir das diferentes dietas (referência e enriquecidas em diferentes concentrações com o fruto *in natura*).

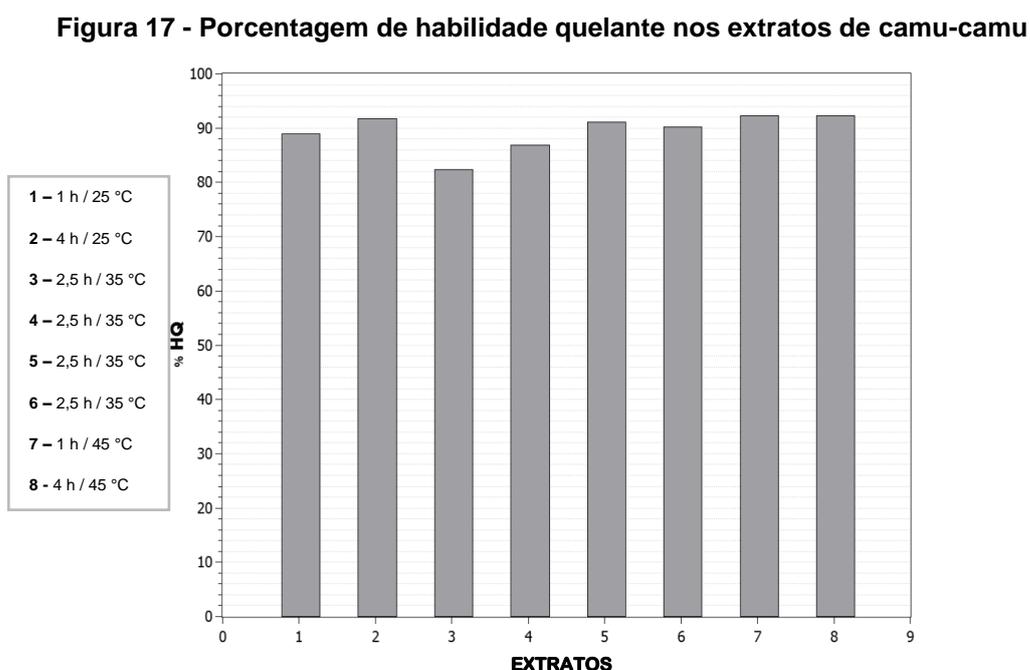
O teor de flavonoides existentes na natureza, principalmente em frutas e hortaliças estão relacionados com grande variedade de atividades biológicas (SAVI *et al.*, 2017). A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que as concentrações de flavonoides presentes nas dietas a partir do enriquecimento de diversas concentrações do fruto contribuem nesse sentido. Uma vez que a diferença entre os valores encontrados para a dieta referência e as enriquecidas foi significativa.

A biodiversidade das espécies resulta em variações de componentes básicos, como carboidratos, proteínas, lipídeos, fibra alimentar, minerais, vitaminas e também dos compostos bioativos, como flavonóides (SAVI *et al.*, 2017).

No caso das frutas, o calor influencia negativamente, até mesmo no processo de extração de flavonóides, enquanto nas hortaliças, influencia positivamente, facilitando a extração, conforme experimento realizado por Savi *et al.*, (2017), uma vez que as fibras são carboidratos complexos, podendo ser solúveis ou insolúveis e após este aquecimento possa ter ocorrido um aprisionamento dos flavonoides na fibra.

### 5.2.3 HABILIDADE QUELANTE

Para a análise da habilidade quelante calculou-se a porcentagem de inibição de formação do íon complexo  $[Fe^2(ferrozina)^3]^{2+}$ , nos extratos do fruto camu-camu. Esta porcentagem está diretamente relacionada com o potencial antioxidante da amostra. Quanto maior for à inibição, maior será a capacidade em formar complexos estáveis com  $Fe^{2+}$ , imobilizando-o e resultando em um decréscimo na intensidade da cor rosa do íon complexo  $[Fe^{2+}(ferrozina)^3]^{2+}$ . A Figura 17 mostra as porcentagens obtidas.



Fonte: Autoria própria – Software Quitplot

Pode-se observar que os extratos 2, 7 e 8 foram os que obtiveram maior habilidade quelante, com 92,27 %, 92,57 % e 92,90 % respectivamente. No entanto o extrato 3 foi o que obteve-se a menor porcentagem habilidade quelante, com 82,47 %. O extrato 2, obtido a partir da agitação por 4 horas a 25 °C, enquanto que os extratos 7 e 8 foram obtidos a partir de 1 h e 4 h respectivamente a 45 °C.

Ao realizar o Teste de ANOVA para os fatores tempo e temperatura, avaliados na extração, para a metodologia de Habilidade Quelante, a temperatura em 45 °C e 25 °C, não apresentaram diferenças significativas, conforme dados expressos na Tabela 10.

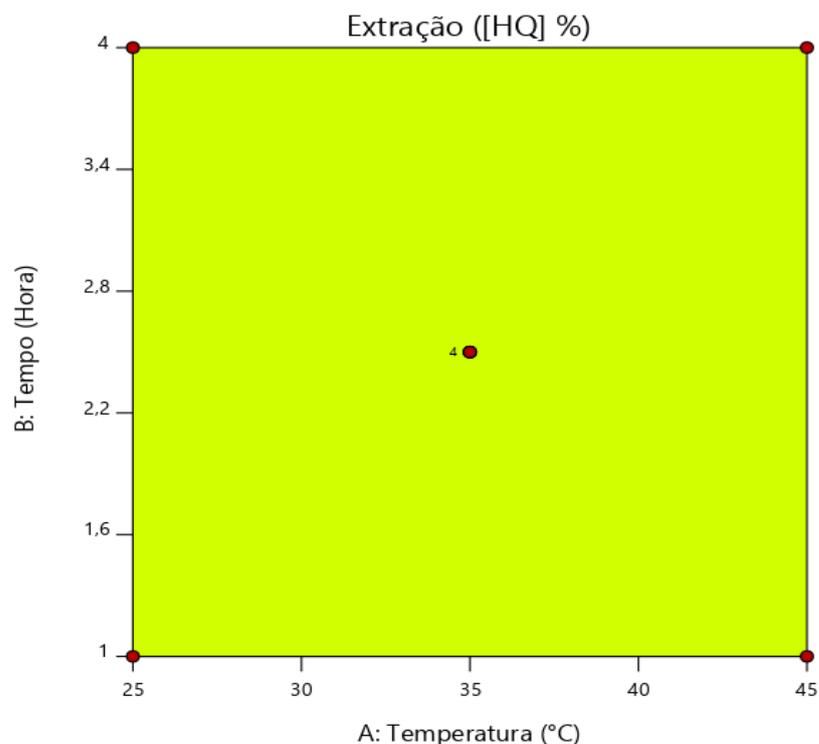
**Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise de habilidade quelante**

ANOVA				
Temperatura	Tempo de Agitação	Temperatura x Tempo de Agitação	P	Coefficiente de correlação
**	*	-	0,69	0,993

Quanto maior a quantidade de \* (0,05) maior significância entre os dados, se – não houve.

Avaliou-se também o gráfico de contorno, expresso na Figura 18.

**Figura 18 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise de habilidade quelante**



Fonte: Autoria própria. Design Expert

Obteve-se para este modelo, p-valor 0,69, neste caso, não há termos significativos. Deste modo, avaliou-se estatisticamente a melhor condição e realizou-se o preparo dos extratos das diferentes dietas, a 45 °C com 1h de agitação. Os dados obtidos (em porcentagem de habilidade quelante), a partir da avaliação das diferentes dietas estão expressos na Tabela 11.

**Tabela 11 – Habilidade quelante da dieta referência e dietas enriquecidas com fruto *in natura* em 10 á 30 % em porcentagem**

<b>HABILIDADE QUELANTE (%)</b>	
Referência 0 %	71,12 ± 2,55 d
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 10 %	72,24 ± 2,23 c
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 20 %	73,16 ± 1,13 b
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 30 %	76,87 ± 1,46 a

*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si (p<0,05) pelo Teste de Tukey. Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Pode-se observar que o enriquecimento nutricional, com o fruto *in natura*, comparado a dieta referência, obteve-se porcentagem maior de habilidade quelante. De modo que a média das triplicatas das amostras (em porcentagem de habilidade quelante), da dieta referência foi de 71,12 %, ou seja, 5,75 % a menos do que a dieta enriquecida em 30 % com o fruto *in natura*. Isto pode ser explicado, pois foi descoberto que os grupamentos hidroxila têm um papel fundamental na habilidade dos flavonóides de diminuir o sinal de oxidação (BRESSAN, 2014), logo, os resultados encontrados para a dieta referência possivelmente se deu, pela menor quantidade de grupos funcionais hidroxila do que nas dietas enriquecidas com o fruto *in natura*.

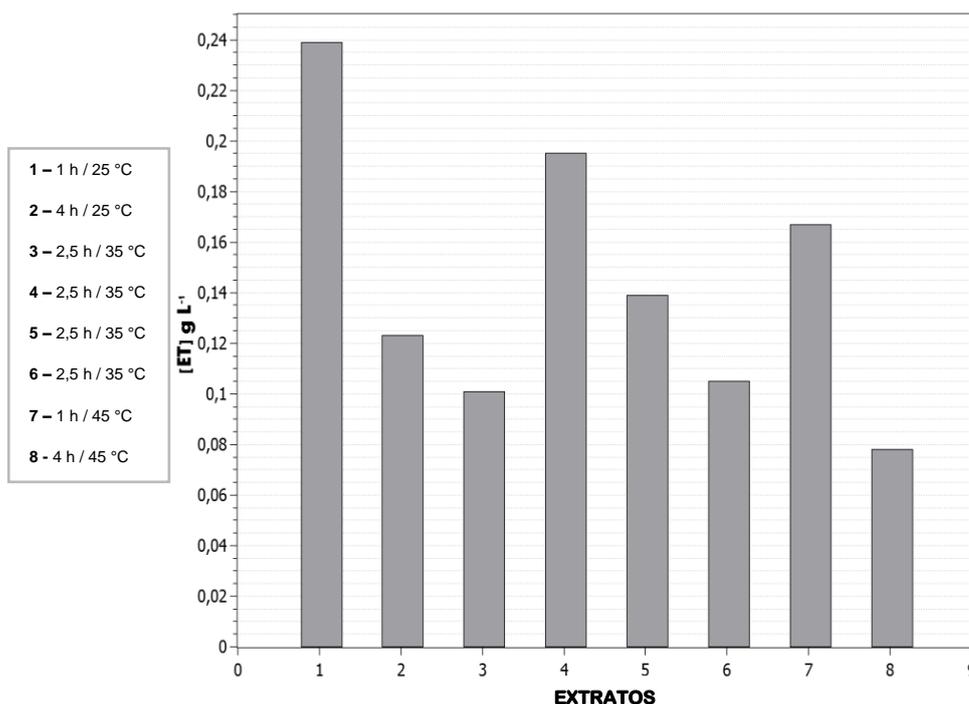
É possível melhorar a determinação da habilidade quelante através de uma mudança nas condições de pH do meio. Contudo, a habilidade quelante de uma molécula também pode ser comparada pelo tempo necessário para produzir uma mudança observável no sinal de oxidação (BRESSAN, 2014).

A análise estatística indicou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre os extratos preparados a partir das diferentes dietas (referência e enriquecidas), obtendo-se  $p$  igual a 0,01, comparado todo o grupo. Logo, houve diferença significativa.

#### 5.2.4 ABTS

De acordo com Boroski (2015), a teoria que fundamenta a técnica de determinação de potencial antioxidante, estabelece que quanto maior a concentração em equivalente Trolox, maior será a capacidade da amostra analisada de estabilizar o radical ABTS. Logo, após avaliação dos resultados obtidos, é possível observar a partir da Figura 19, que os extratos 1, 4 e 7, foram os extratos que apresentaram maiores capacidades de inibir o cátion radicalar do ABTS, frente aos demais extratos a partir do fruto analisados.

**Figura 19 - Concentrações dos extratos de camu-camu expresso em ET**



Fonte: Autoria própria – Software Quitplot

Conforme apresentado na Tabela 12 foi realizada a comparação múltipla pelo teste de Tukey.

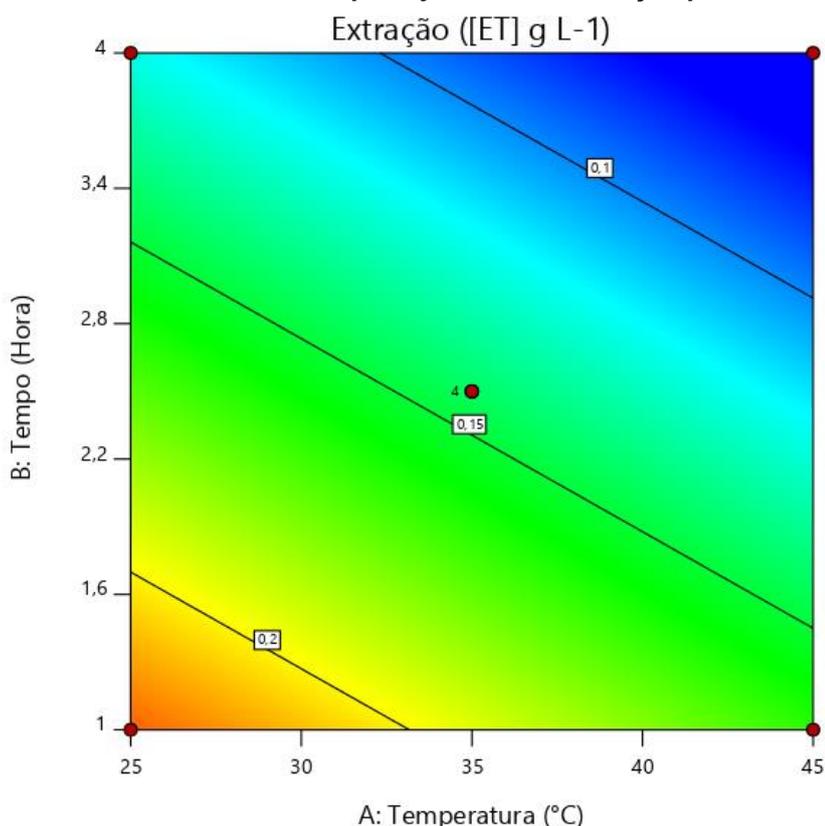
**Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dois fatores (Temperatura x Tempo de Agitação) do processo de extração, utilizados na análise radicalar do ABTS**

ANOVA				
Temperatura	Tempo de Agitação	Temperatura x Tempo de Agitação	P	Coefficiente de correlação
*	***	-	0,06	0,996

Quanto maior a quantidade de \* (0,05) maior significância entre os dados, se - não houve.

Na análise de ABTS, o efeito da temperatura não foi significativo já as temperaturas de extração foi significativo. Já avaliando entre os tempos de extração, existe uma maior significância entre os dados. O extrato 1, preparado a 25 °C com agitação de 1 h, foi a condição em que se obteve o resultado mais expressivo. Porém, foram avaliadas as extrações e verificou-se este resultado, conforme Figura 20.

**Figura 20 - Gráfico de contorno do planejamento de extração para análise do radical ABTS**



Fonte: Autoria própria. Design Expert.

Obteve-se para este modelo, p-valor 0,06, neste caso, não haveria termos significativos. Concluiu-se, que a melhor extração foi a realizada a 25 °C por 1 h.

Posterior análise estatística adotou-se a melhor condição e realizou-se a avaliação dos extratos preparados a partir das diferentes composições nutricionais. A Tabela 13, expressa os resultados encontrados.

**Tabela 13 – Potencial antioxidante pelo método ABTS das dietas referência e enriquecidas com o fruto *in natura* em 10 a 30 % expresso em ET g L<sup>-1</sup>**

POTENCIAL ANTIOXIDANTE – ABTS	
Referência	0,103 ± 0,75 d
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 10 %	0,122 ± 0,56 c
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 20 %	0,154 ± 0,95 b
Enriquecida com o fruto <i>In natura</i> (Inteiro) 30 %	0,175 ± 1,12 a

*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si (p<0,05). Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Pode-se a partir dos resultados obtidos, afirmar que em média, a dieta que maior apresentou tal capacidade foi a enriquecida com o fruto *in natura* em 30 %. Esta dieta frente as demais apresenta uma diferença de 0,072 ET g L<sup>-1</sup> frente à dieta referência.

De acordo com Halliwell (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos, ácidos ascórbicos, fenólicos e carotenóides. Como no processo de produção destas composições (tanto a referência quanto às enriquecidas), estas são submetidas á altas temperaturas, ocorre à degradação destes compostos, que em temperaturas mais elevadas sofrem o processo de degradação térmica.

A análise estatística indicou que não houve diferença significativa (p>0,05), entre os extratos preparados a partir das diferentes dietas enriquecidas, obtendo-se p-valor igual a 0,075, aceita-se a "hipótese nula" e não se descarta a hipótese de que as variáveis não tenham tido efeito significativo sobre os resultados.

Quando confrontados os valores encontrados para o potencial antioxidante, a partir da capacidade de estabilização do íon radicalar ABTS<sup>•+</sup> para os extratos do fruto camu-camu, bem como das dietas enriquecidas, aos valores obtidos para outros alimentos, como, por exemplo, o tomate (0,413 ET g L<sup>-1</sup>), azeite virgem de

oliva (0,448 ET g L<sup>-1</sup>), cerveja (0,250 ET g L<sup>-1</sup>) e chá preto (0,901 ET g L<sup>-1</sup>) (VIEIRA. *et al.*, 2011), pode-se afirmar que estes, possuem maior capacidade de estabilizar o íon radicalar ABTS<sup>•+</sup> do que o fruto *in natura* e as diferentes dietas.

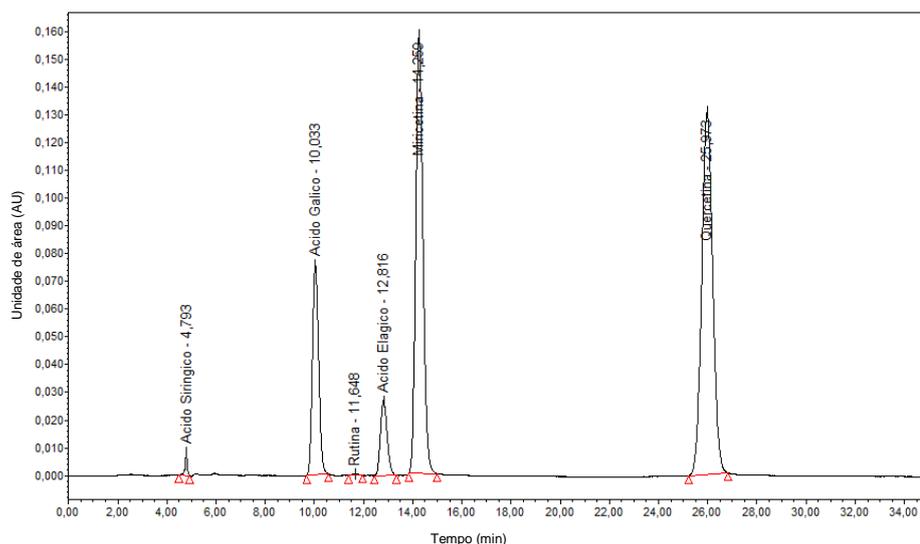
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonóides por CLAE basearam-se no método proposto por Gray (2007). Porém, como não se aplicou as matrizes a serem avaliadas, foi necessário o desenvolvimento de um novo método, visando atender as especificações conforme AOAC.

A partir da metodologia analítica desenvolvida, identificaram-se os compostos, através do tempo de retenção observado para cada solução padrão injetados separadamente.

Então, preparou-se um padrão mix contendo os seis padrões a serem identificados (ácido siríngico, ácido gálico, rutina, ácido elágico, miricetina e quercetina), conforme Figura 21.

**Figura 21 - Cromatograma da mistura de padrões de flavonóides, para identificação dos flavonóides**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

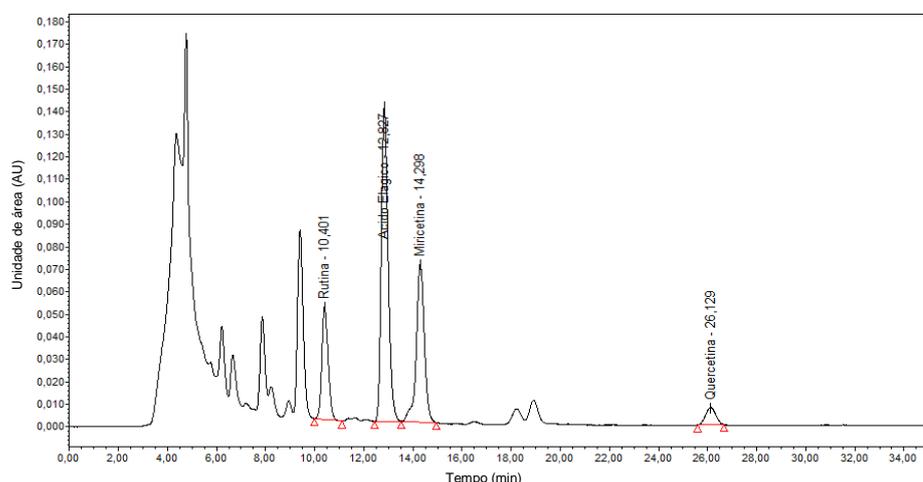
Considerou-se para identificação, o tempo de retenção obtido para cada composto, a partir da injeção do padrão mix, pureza espectral, resolução e perfil

cromatográfico. Posteriormente, realizou-se a identificação dos flavonóides, conforme representados nas Figuras 22, 23, 24, 25 e 26.

Estudo realizado por Fidelis *et al.*, (2018) e Fujita (2015), afirmam que o camu-camu é constituído parcialmente dos seis flavonóides apresentados no cromatograma (Figura 21), apresentando análises realizadas para tal confirmação. Porém, se diferem entre si. Deste modo, optou-se por avaliar a maior quantidade possível de ácidos fenólicos e flavonóides no camu-camu. A época de colheita, estado de maturação do fruto, bem como o preparo de amostra e as condições de análise podem justificar a diferença dos resultados encontrados.

A Figura 22, expressa o cromatograma da análise do fruto liofilizado.

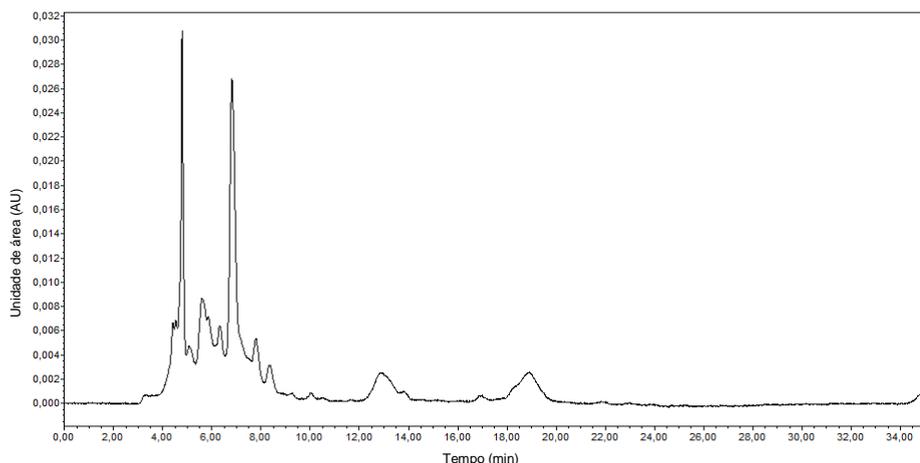
**Figura 22 - Cromatograma da solução amostra do fruto liofilizado (camu-camu)**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

Quando avaliada a dieta referência (sem enriquecimento), é possível observar que não foram identificados os flavonóides e ácidos fenólicos abordados neste trabalho, ou seja, não foram detectados, conforme Figura 23.

**Figura 23 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta referência**

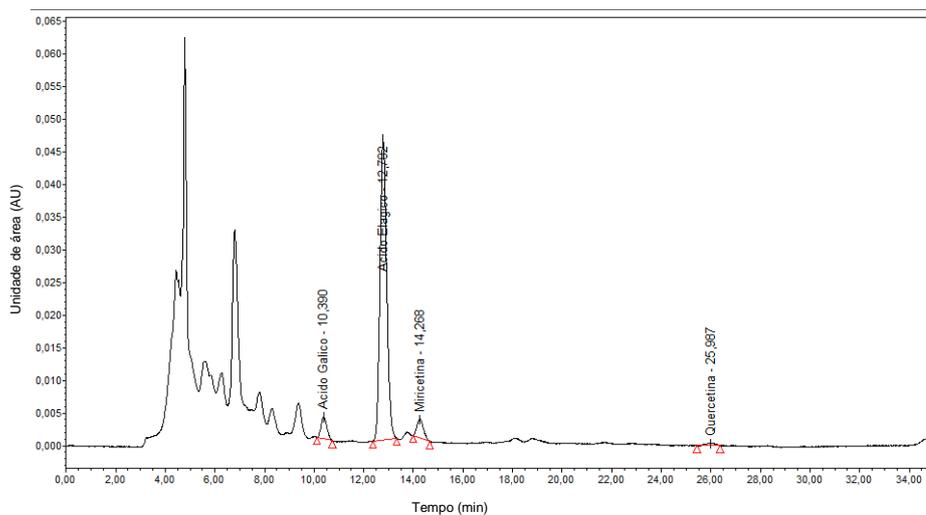


**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

Não foram identificados os flavonóides na solução amostra preparada a partir da dieta referência, observou-se sua composição. Ao avaliar o composto majoritário da dieta referência (farelo de soja), segundo Lima (2002), certamente a soja constitui importante fonte de isoflavonas (compostos fenólicos heterocíclicos com estrutura similar ao  $\beta$ -estradiol), ou seja, potencial antioxidante, porém de acordo com Genovese e Lajolo (2001), os fatores que afetam a composição de isoflavonas em soja estão também relacionados à variedade e condições de cultivo, condições de processamento da soja, ou ainda metodologias de análise. Por sua vez, neste experimento utilizou-se o farelo de soja para compor as dietas, obtido após tratado com calor e reagentes, o que explica os resultados encontrados.

Esse último fator constitui etapa importante na avaliação do teor de isoflavonas em soja e milho, tanto pela eficiência do método de extração quanto da própria análise (LIMA, 2002). Este fator justifica o resultado obtido, uma vez que o farelo de soja e milho não foram alvos deste trabalho, logo este fator não foi considerado a dieta enriquecida com o fruto, em 10 %, estão expressos na Figura 24.

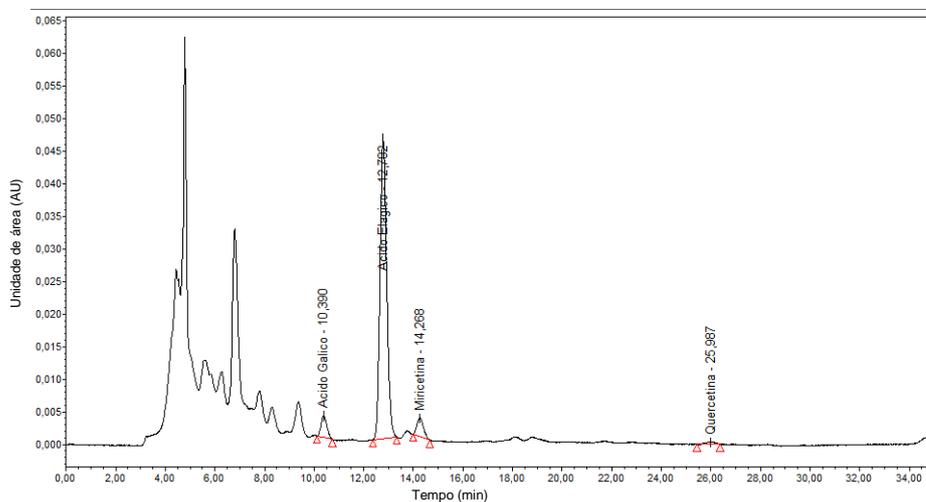
**Figura 24 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 10 % com camu-camu**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

Através da Figura 25, puderam-se observar os flavonóides dieta enriquecida em 20 %, com o fruto.

**Figura 25 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 20 % com camu-camu**

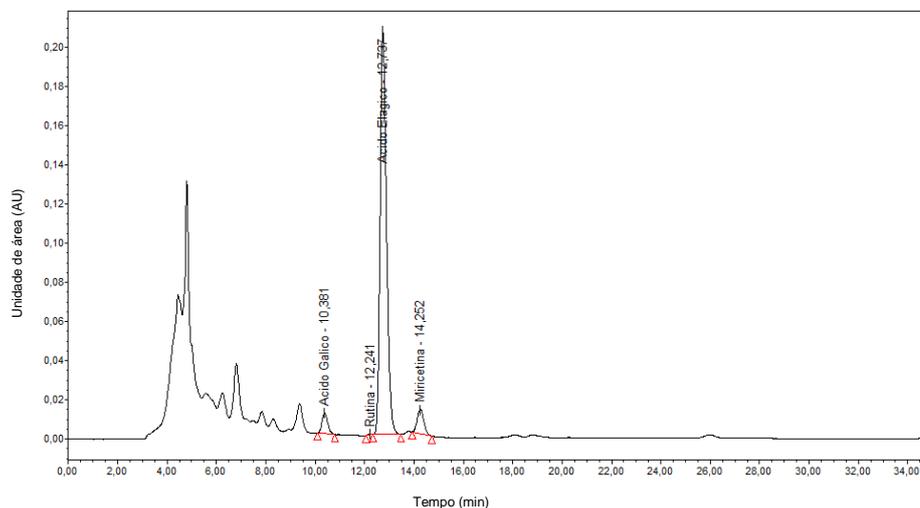


**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

Assim como a dieta enriquecida em 10 % de camu-camu, foi possível identificar ácidos fenólicos e flavonóides (ácido gálico, ácido elágico, miricetina e quercetina), na dieta enriquecida em 20 %.

Por fim, foi avaliada a dieta enriquecida em 30 % com camu-camu, conforme Figura 26.

**Figura 26 - Cromatograma da solução amostra preparada a partir da dieta enriquecida em 30 % com camu-camu**



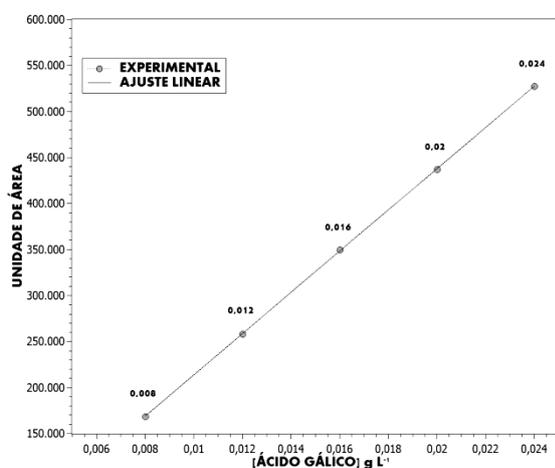
**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

Diferente das outras dietas enriquecidas com o camu-camu, a dieta enriquecida em 30 %, não foi possível identificar a quercetina. Isto pode ser explicado, uma vez que a quercetina é uma aglucona da rutina (PEDRIALI, 2015). Por definição, a aglunação é o modo pelo qual elementos distintos se unem e integram, formando um todo em que dificilmente se reconhecem as partes originais. Nesta amostra, portanto, a rutina pôde ser de identificada.

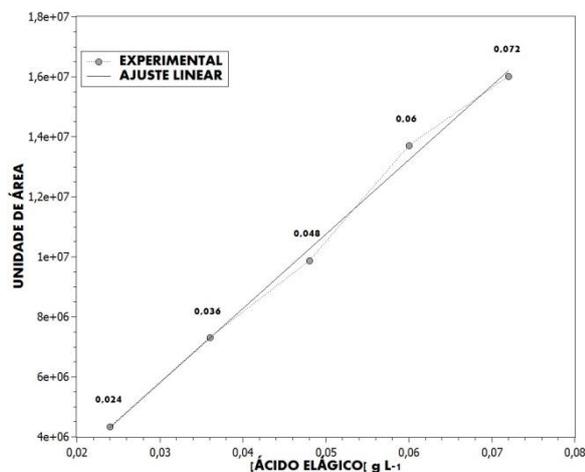
Após análise das curvas de calibração, obteve-se as curvas de calibração, conforme Figura 27.

..... Figura 27 - Curvas de calibração de ácido gálico (A), ácido elágico (B), miricetina (C) e quercetina (D), utilizados para análises de flavonóides e ácidos fenólicos por CLAE

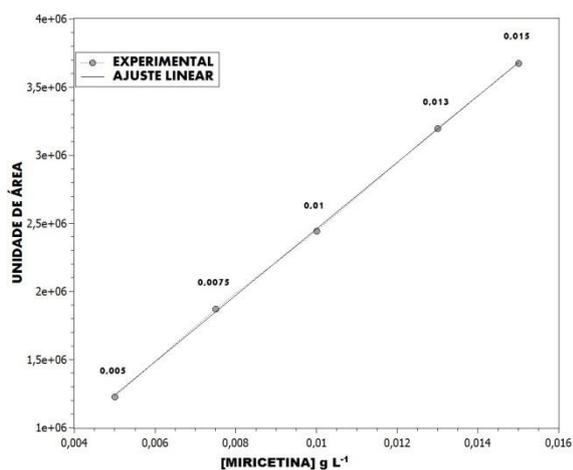
(A)



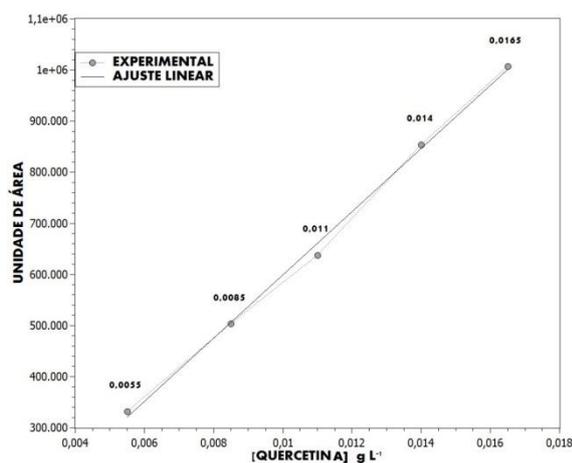
(B)



(C)



(D)



Fonte: Autoria própria. Quitplot

Determinou-se a equação da reta obtida para cada solução padrão, conforme Tabela 14.

Tabela 14 - Equação da reta e coeficiente de correlação dos padrões para quantificação de flavonóides e ácidos fenólicos

Padrão	Equação da reta	R (coeficiente de correlação)
Ácido gálico	$Y = 2E+07.X - 10637$	1,00
Ácido elágico	$Y = 2E+08.X - 2E+06$	0,99
Miricetina	$Y = 2E+08.X + 18981$	1,00
Quercetina	$Y = 6E+07.X - 10018$	1,00

Os resultados obtidos para o fruto (camu-camu) estão expressos na Tabela 15. Ressaltando que a rutina foi identificada, porém não foi quantificada por estar fora da faixa linear, isto porque esta estava abaixo do limite de quantificação.

**Tabela 15– Ácidos fenólicos e flavonóides quantificados no fruto (camu-camu) por CLAE em amostra liofilizada**

<b>Flavonóides</b>	<b>Concentração (g g<sup>-1</sup> de amostra)</b>
Ácido elágico	0,027 ± 0,95
Miricetina	0,007 ± 0,61
Quercetina	0,006 ± 0,64

*Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Embora o ácido gálico tenha sido identificado, por não ter apresentado pureza espectral, o mesmo não foi quantificado.

Como se trata de uma matriz bastante complexa, sendo constituída por uma gama de compostos, e provavelmente outros flavonóides, a análise de flavonóides totais, utilizando o fruto, apresentou um resultado maior (0,048 g g<sup>-1</sup>) do que a soma das concentrações expressas na Tabela 14 (0,040 g g<sup>-1</sup>). Porém, pode-se afirmar que o enriquecimento a partir do fruto foi eficaz.

Após ter observado o cromatograma oriundo da dieta referência, o qual não apresentou pico/picos referentes aos flavonoides e ácidos fenólicos, ou ainda estes estavam abaixo do limite de detecção, não avaliou-se qualitativamente e quantitativamente nesta dieta estes compostos. Os resultados obtidos através da quantificação dos ácidos fenólicos e flavonóides nas diferentes dietas enriquecidas em diferentes concentrações do fruto *in natura* (10 a 30 %), estão expressos na Tabela 16.

**Tabela 16 - Ácidos fenólicos e flavonóides quantificados por CLAE nas diferentes composições nutricionais enriquecidas com o fruto *in natura* em 10 a 30 % em porcentagem**

<b>Dietas</b>	<b>Concentração g g<sup>-1</sup></b>		
	<b>Ácido elágico</b>	<b>Miricetina</b>	<b>Quercetina</b>
Enriquecida em 10 % com o fruto <i>in natura</i>	0,042 ± 0,01	0,009 ± 0,00	0,007 ± 0,00
Enriquecida em 20 % com o fruto <i>in natura</i>	0,056 ± 0,02	0,011 ± 0,00	0,010 ± 0,01
Enriquecida em 30 % com o fruto <i>in natura</i>	0,095 ± 0,02	0,015 ± 0,01	0,015 ± 0,00

*As médias em ambas as colunas não diferiram entre si (p<0,05), pelo teste de Tukey. Média das análises em triplicata ± desvio padrão.*

Os resultados encontrados apresentam pureza espectral, ou seja, em termos de concentração, pode-se afirmar que estas dietas, contém estes flavonóides, ainda que em pequenas concentrações em todas as dietas.

Quatro compostos foram identificados na dieta enriquecida em 30 % com fruto *in natura*. A rutina não foi quantificada, pois sua concentração estava abaixo do limite de quantificação. A soma dos flavonóides quantificados por CLAE, foi inferior ao obtido para os flavonóides totais (0,1330 g L<sup>-1</sup>), logo, existem outros flavonóides não foram contemplados neste trabalho.

Mais uma vez, o ácido gálico foi identificado, mas não quantificado, embora para as dietas enriquecidas com o fruto *in natura*, o ácido apresentou pureza espectral, porém como visou-se avaliar a influência do enriquecimento com camu-camu, e na amostra do fruto, por se tratar de uma matriz complexas apresentou demais sinais analíticos e não foi quantificado, para está dieta, optou-se por não quantificar.

O estudo do potencial de ácidos fenólicos e flavonóides presente nas composições nutricionais enriquecidas com o fruto *in natura* foi realizado, uma vez que, buscou-se identificar estes compostos bioativos, visto que estes possuem propriedades neutralizantes espécies reativas relacionadas ao anti-obesogênico, hipolipidêmico, anti-inflamatório, efeitos anti-genotóxicos e neuroprotetores através de ensaios *in vitro* e experimentos *in vivo* (AZEVEDO *et al.*, 2015; FRACASSETTI *et al.*, 2013).

Os compostos bioativos tais como ácidos fenólicos e flavonóides quando oncorporados á alimentação de peixes são responsáveis por prolongar a vida dos eritrócitos e desempenhar um papel essencial na respiração celular dos peixes (NAYAK *et al.*, 2007), além de melhorar a absorção de nutrientes da dieta e impedir a ação dos radicais livres sobre os lipídios e aminoácidos protéicos (ARIDE *et al.*, 2010).

#### 5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE NO CAMU-CAMU POR CLAE

#### 5.4.1 LIMITE DE DETECÇÃO

A relação sinal/ruído (S/N), foi calculada através do software *Empower 3* (*Waters*), conforme Equação 10, o qual apresentou para todas as concentrações propostas, relação superior a 3, conforme especificado pelo ICH (2005). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 17.

**Tabela 17 - Resultados obtidos para o Limite de Detecção**

Concentração (g L <sup>-1</sup> )	S/N	LD médio (g L <sup>-1</sup> )
0,1000	4907,80	
0,0500	4241,91	
0,0250	2737,46	0,00004
0,0100	1754,09	
0,0050	782,26	

O limite de detecção para o ácido ascórbico calculado para a metodologia proposta foi de 0,00004 g L<sup>-1</sup>.

#### 5.4.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

A relação sinal/ruído (S/N), foi calculada através do software *Empower 3* (*Waters*), conforme Equação 11, o qual apresentou para todas as concentrações propostas, relação superior a 10, conforme especificado pelo ICH (2005). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 18.

**Tabela 18 - Resultados obtidos para o Limite de Quantificação**

Concentração (g L <sup>-1</sup> )	S/N	LQ médio (g L <sup>-1</sup> )
0,1000	4958,25	
0,1000	4964,27	0,00020
0,1000	4970,29	

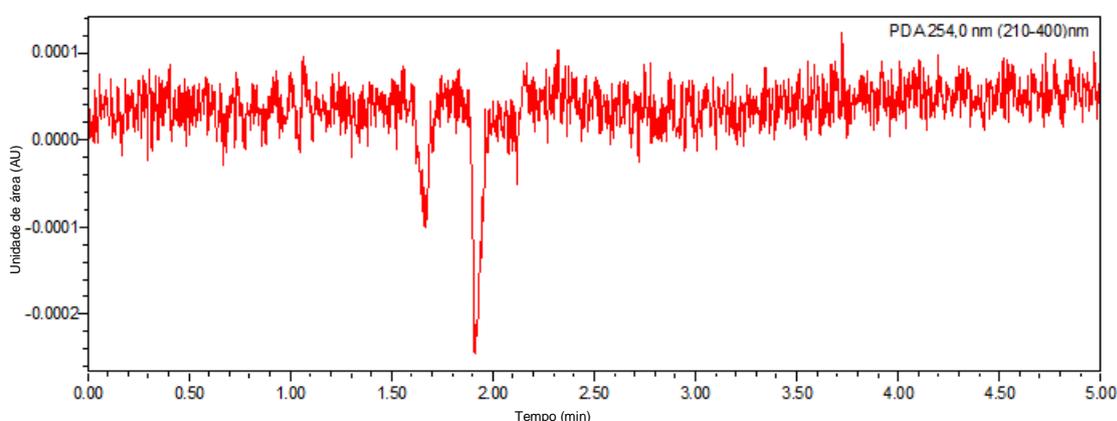
O limite de quantificação para o ácido ascórbico calculado para a metodologia proposta foi de 0,00020 g L<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 SELETIVIDADE

As Figuras de 31 a 33 apresentam os cromatogramas obtidos, a partir da análise do diluente (água ultra purificada), solução padrão (ácido ascórbico) e solução amostra de camu-camu, respectivamente.

As avaliações dos cromatogramas das soluções permitiram concluir que os sinais analíticos com tempo de retenção de 1,71 min visualizados, são oriundos da substância de interesse (ácido ascórbico).

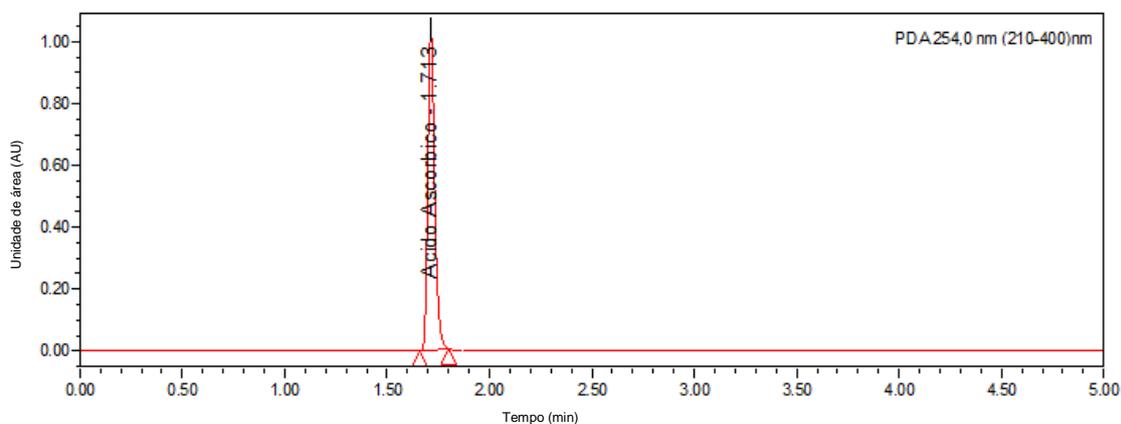
**Figura 28 - Cromatograma solução diluente para análise de seletividade**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

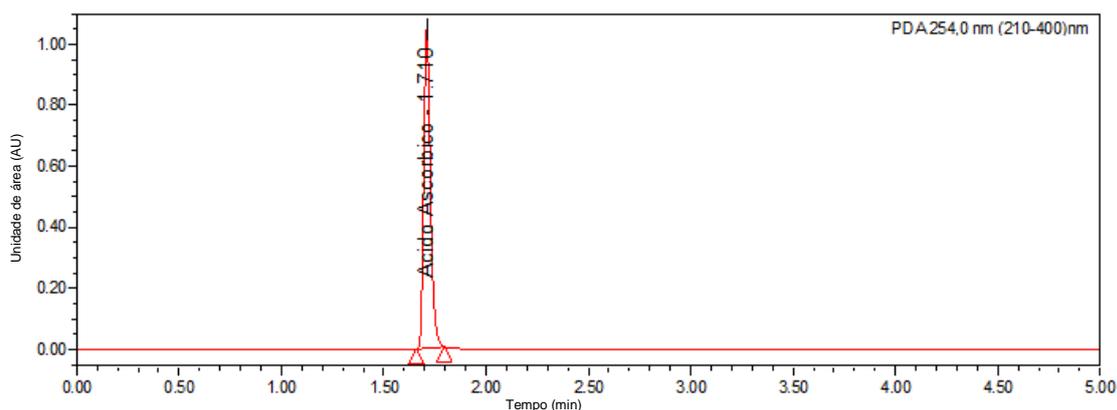
Pode-se observar que o diluente não possui nenhum sinal analítico, logo não irá interferir na quantificação do analito de interesse.

**Figura 29 - Cromatograma solução padrão para análise de seletividade**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

**Figura 30 - Cromatograma solução amostra para análise de seletividade**



**Fonte: Autoria própria – Software Empower 3**

O método é considerado específico se os cromatogramas das soluções que não contêm analito, não possuem resposta na área de eluição dos picos de interesse, e se a resposta dos picos de interesse não for afetada pelos demais solutos testados.

Recomenda-se ainda, comprovar a pureza dos picos para demonstrar que o pico cromatográfico corresponde a uma única substância, utilizando, por exemplo, duas colunas com características diferentes, ou utilizando detectores seletivos como detector de arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetro de massas (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004). Neste, foi utilizado o detector DAD.

A partir da utilização de um sensor DAD, é possível determinar os valores de ângulo de pureza e limite de pureza.

Na Tabela 19, portanto, são demonstrados os resultados de pureza do pico para o ácido ascórbico na solução analisada para o parâmetro especificidade. Ressaltando que não foram observados picos secundários na injeção do diluente, deste modo, não foi necessário avaliar resolução entre os picos.

**Tabela 19 - Resultados da pureza do pico de ácido ascórbico**

<b>Amostra</b>	<b>Ângulo de pureza</b>	<b>Limite de pureza</b>
Padrão	0,054	2,816
Amostra	0,053	2,816

Conforme Kling, *et al.*, (2015), uma vez que o valor de ângulo de pureza seja inferior ao limite de pureza em todas as soluções testadas, pode-se concluir que, o analito de interesse é considerado puro. Deste modo, o pico de ácido

ascórbico, permaneceu puro nas condições testadas. Sendo o método, portanto, específico para análise de quantificação de ácido ascórbico presente no fruto camu-camu.

### 5.3.3 LINEARIDADE

Para a linearidade, foram preparadas curvas em triplicatas, com concentração de 60 a 140% de ácido ascórbico. Os resultados encontrados para o parâmetro de linearidade são mostrados na Tabela 20.

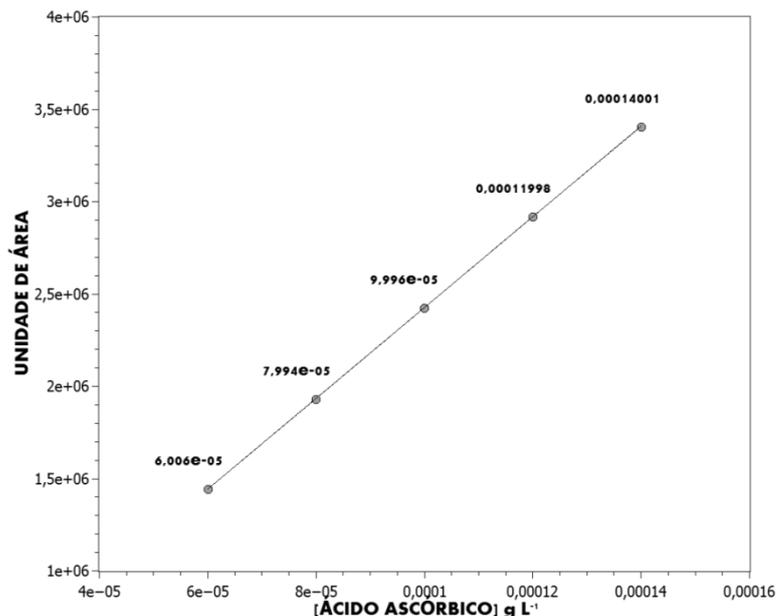
**Tabela 20 - Linearidade de concentrações de ácido ascórbico**

Identificação		Concentração teórica (g L <sup>-1</sup> ) de Ácido ascórbico	Área (mAU)	DPR (%)	Coefficiente de correlação
Linearidade	60 %	0,06006	1459466	0,93	0,9997
		0,06006	1439133		
		0,06006	1434023		
Linearidade	80 %	0,07994	1955775	1,35	
		0,07994	1929412		
		0,07994	1903508		
Linearidade	100 %	0,09996	2450818	0,95	
		0,09996	2419797		
		0,09996	2405673		
Linearidade	120 %	0,11998	2944299	0,81	
		0,11998	2914596		
		0,11998	2897808		
Linearidade	140 %	0,14000	3422215	0,60	
		0,14000	3394198		
		0,14000	3401264		

\*DRP: Desvio padrão relativo

O resultado obtido para R foi de 0,9997, para o intervalo de concentração de 60 % a 140 %, sendo este satisfatório, visto que o critério mínimo aceitável para o R é de 0,99 (ICH, 2005). A Figura 34, mostra o gráfico da linearidade com a respectiva equação da reta encontrada para o intervalo de 0,06006 a 0,14000 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. Por fim, a especificação para o DPR adotada foi de 5,3%, conforme especificado na Tabela da AOAC, de acordo com a concentração de trabalho.

**Figura 31 - Curva analítica da linearidade obtida para o ácido ascórbico no intervalo de 60% - 140%**



Fonte: Autoria própria – Software *Quitplot*

A Tabela 20 mostra os resultados do Teste de Cochran aplicado aos resultados obtidos na Linearidade. Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de hipóteses:

Homogeneidade de variância

H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Cochran.

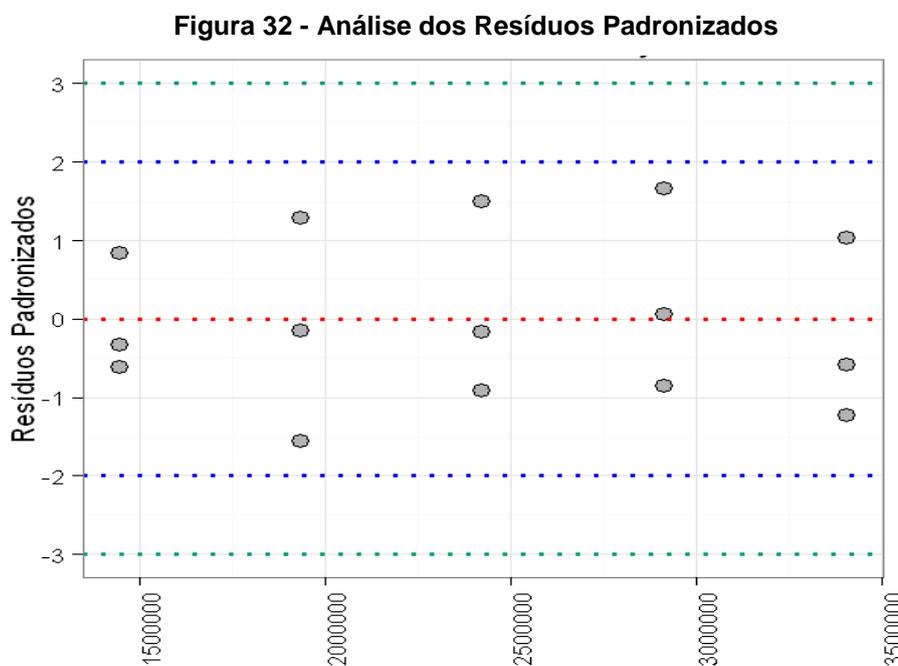
**Tabela 21 - Teste de Homocedasticidade – Cochran**

Estatística	Grau de	P.valor
0,2893	3	1

Como P-valor (1) do Teste de Cochran é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5 %. Logo, temos um modelo homocedástico.

Como critério, foram considerados valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

O gráfico dos resíduos (Figura 35) demonstra que o método não apresenta tendências significativas ao longo da faixa linear de trabalho. Variações observadas ao longo das concentrações de trabalho não comprometem a capacidade do método.



**Fonte: Autoria própria – Software Quitplot**

Sabendo que, a linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que seja diretamente proporcional à concentração de um analito em uma amostra, o método em análise é linear.

#### 5.3.4 EXATIDÃO

A exatidão é o parâmetro que demonstra quão próximo estão os resultados da análise, frente aos valores reais do analito presente na amostra, ou seja, compara a concentração experimental obtida à concentração teórica. Para verificação do parâmetro, foram preparadas soluções amostras, com concentrações de 80 %, 100 % e 120 % de ácido ascórbico.

Os resultados da análise de exatidão encontram-se na Tabela 22.

**Tabela 22 - Exatidão de Ácido ascórbico**

Identificação		[ ] <sub>Experimental</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
Exatidão	80 %	0,080	100,15	98,81	1,35
		0,079	98,80		
		0,078	97,47		
Exatidão	100 %	0,100	100,40	99,36	0,95
		0,099	99,13		
		0,098	98,55		
Exatidão	120 %	0,120	100,51	99,65	0,81
		0,119	99,50		
		1,186	102,11		

Os resultados para a exatidão demonstram que os valores de recuperação para o ativo nos três níveis de concentração, estão de acordo com o esperado, conforme Tabela da AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais – Internacional, 2016), disposta no Apêndice F (Diretrizes de Requisitos para o desempenho de Método Padrão), a qual especifica o percentual de 90 e 107 %, para a recuperação, o DPR máximo entre as amostras de cada nível foi de 5,3 %. Dessa forma pode-se afirmar que o método em questão é exato para a quantificação de ácido ascórbico nos três níveis testados.

### 5.3.5 PRECISÃO

Esse teste foi avaliado a partir de análises em triplicata de amostras, preparadas nas concentrações equivalentes a 80, 100 e 120 %, respectivamente 0,080, 0,100 e 0,120 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, sendo considerada a concentração 100,00 % , 0,100 g L<sup>-1</sup>. Para encontrar a quantidade de amostra a ser pesada que equivalassem às concentrações em questão, foram realizados testes durante o desenvolvimento do método, comparando a resposta do padrão (área), com a da amostra.

Após avaliação dos resultados obtidos, chegou-se então, na relação de que eram seriam necessárias 0,03584 g de amostra liofilizada para balão volumétrico de 0,1 L, para realização do preparo da solução amostra, a qual equivaleu-se a concentração de 0,100 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico.

Avaliando os resultados obtidos (utilizando para o preparo a amostra do fruto liofilizado), avaliou-se a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico.

O DPR especificado conforme tabela da AOAC, disposta no Apêndice F, é de 5,3 % para as precisões primeiro e segundo dia. Já para a precisão intermediária o DPR máximo deve ser 8,0 %. Os resultados da precisão do primeiro dia, segundo dia e Intermediária estão demonstrados nas Tabelas 23, 24 e 25.

**Tabela 23 - Precisão primeiro dia**

Concentração	[ ] <sub>Amostra</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Teor (%)	Teor médio(%)	DPR (%)
Precisão 80%	0,080	87,51	89,04	1,66
	0,080	89,17		
	0,080	90,45		
Precisão 100%	0,100	89,16	88,93	0,29
	0,100	88,65		
	0,100	88,99		
Precisão 120%	0,120	88,62	88,95	1,61
	0,120	87,70		
	0,120	90,51		

**Tabela 24 - Precisão do segundo dia**

Concentração	[ ] <sub>Amostra</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Teor (%)	Teor médio(%)	DPR (%)
Precisão 80%	0,080	97,78	99,15	1,38
	0,080	99,16		
	0,080	100,53		
Precisão 100%	0,100	93,20	96,28	2,67
	0,100	97,81		
	0,100	97,82		
Precisão 120%	0,120	97,36	97,15	0,49
	1,164	91,61		
	1,165	94,68		

**Tabela 25 - Precisão intermediária**

Concentração	Teores 1º dia (%)	Teores 2º dia (%)	Teor médio	DPR (%)	DPR <sub>total</sub> (%)
Precisão 80 %	87,51	97,78	94,10	6,04	
	89,17	99,16			
	90,45	100,53			
Precisão 100 %	89,16	93,20	92,61	4,71	0,77
	88,65	97,81			
	88,99	97,82			
Precisão 120 %	88,62	97,36	93,05	4,94	
	87,70	96,59			
	90,51	97,51			

Como demonstrado nas Tabelas 23 e 24, o desvio padrão relativo entre as amostras em cada nível de concentração apresentou resultados dentro do esperado, tanto na precisão do primeiro dia quanto na precisão do segundo dia, assim, demonstrando a repetibilidade do método.

O mesmo também é válido para comparações de resultados com análise em dias e analistas diferentes (precisão intermediária), onde se obteve o DPR conforme especificado. Os teores encontrados também atenderam a especificação de concentração (90-107%), conforme descrito Tabela da AOAC - Apêndice F.

Com os resultados obtidos e apresentados, o método mostra-se preciso para quantificação de ácido ascórbico no fruto camu-camu, nos níveis de concentração testados.

### 5.3.6 ROBUSTEZ

Neste parâmetro, avaliou-se a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas alterações de forma a garantir a confiabilidade dos resultados durante a rotina laboratorial.

Todos os itens foram quantificados e avaliados quanto à pureza do pico. Os resultados das análises quantitativas foram comparados com os resultados de análises para o método sem alterações. Os resultados destas análises podem ser observados na Tabela 26.

**Tabela 26 - Resultados da robustez**

<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>CONCENTRAÇÃO (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TEOR (%)</b>	<b>VARIAÇÃO</b>
Sem alteração	0,998	98,96	0,00
Temperatura 28°C	0,998	101,24	2,30
Temperatura 32°C	0,998	100,03	1,07
Fluxo 0,9 mL min <sup>-1</sup>	0,998	102,10	3,16
Fluxo 1,1 mL min <sup>-1</sup>	0,998	93,16	5,86
Proporção de fase móvel	0,998	101,70	2,76
Proporção de fase móvel	0,998	101,55	2,61
Extração 2 minutos	0,998	95,19	3,77
Extração 4 minutos	0,998	94,13	4,83
Extração 6 minutos	0,998	95,75	3,21
Coluna	0,998	101,41	2,45

A análise dos resultados das variações cromatográficas no teste de robustez demonstrou-se boa, devido à variação ser menor do que 8,0% (conforme AOAC – Apêndice F), em relação à condição original do método.

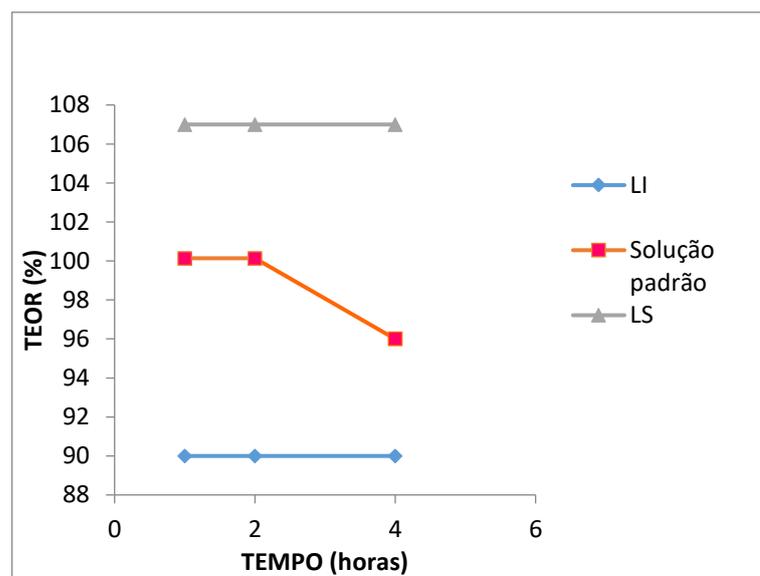
### 5.3.7 ESTABILIDADE

Durante a aplicação de métodos na rotina analítica, nem sempre é possível realizar a análise imediata das amostras preparadas. Dessa forma, foi preparada uma amostra e um padrão conforme preparo da especificidade e avaliou-se a estabilidade destas soluções em 0, 2 e 4 horas.

A definição do tempo de análise se deu por estar sendo avaliado o teor de uma vitamina, ou seja, este composto apresenta variações significativas em espaços curtos de tempo.

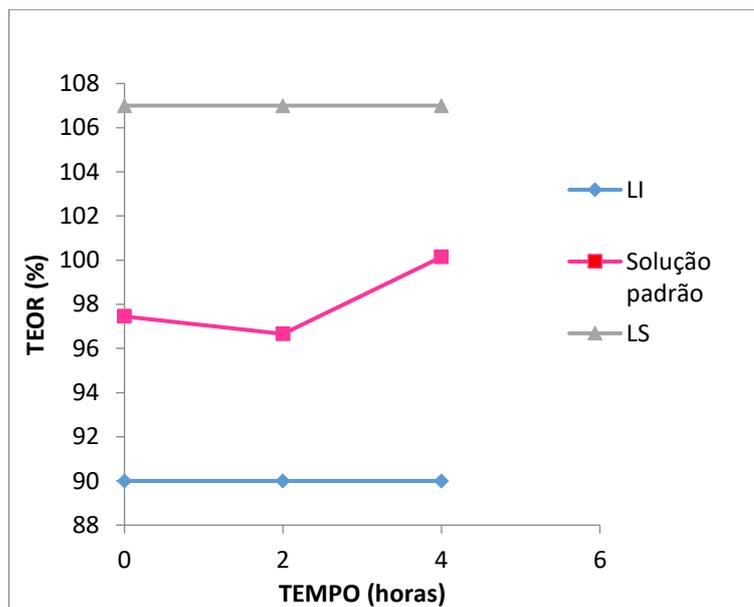
Foram plotados gráficos (Figura 36 e 37), para expressar os resultados obtidos, teor versus tempo.

**Figura 33 - Estabilidade do padrão de ácido ascórbico preparado para análise de quantificação por CLAE**



Fonte: Autoria própria *Software Excell*

**Figura 34 - Estabilidade da amostra de camu-camu liofilizada preparada para análise de ácido ascórbico por CLAE**



Fonte: Autoria própria Software Excell

Analisando-se os resultados, conclui-se que no período de 4 horas, as amostras e padrões mantêm-se estáveis, ou seja, a variação dos teores calculados não atinge os limites inferiores e superiores calculados. Sendo assim, o tempo de estabilidade da amostra após preparo considerado para esta metodologia, foi de 4 h.

Vale ressaltar que nas diferentes dietas avaliadas, não foi possível detectar a presença de ácido ascórbico em sua composição, portanto, o método proposto avaliou a seletividade do ácido ascórbico frente aos demais compostos apenas no fruto. Logo as figuras de mérito citadas, apenas contemplaram o fruto, o qual apresentou concentração de  $0,0028 \text{ g g}^{-1}$  de ácido ascórbico na amostragem avaliada.

As diferentes dietas, durante o processo de fabricação (peletização), são submetidas á altas temperaturas, o que possivelmente ocasionou a degradação do composto (ácido ascórbico).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados das análises de composição centesimal, pode-se concluir que o fruto é constituído majoritariamente de água, assim como a polpa, enquanto que a dieta referência e enriquecidas em diferentes concentrações de camu-camu é de carboidratos. A dieta em 30 % com o fruto *in natura*, o percentual de carboidratos é próximo ao de proteínas.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se o potencial antioxidante do camu-camu, sendo este comprovado através de análises de composição centesimal, determinação de compostos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, habilidade quelante, radicalar ABTS e teor de ácido ascórbico. O potencial antioxidante do fruto, quanto utilizado em diferentes porcentagens, no enriquecimento nutricional na alimentação de peixes, também pôde ser quantificado.

Pôde-se concluir ainda, que o fruto possui alto teor de vitamina C, concentrações de flavonoides, ácidos fenólicos e baixa concentração de gorduras, sendo uma grande fonte de água tornando-o um fruto promissor. Tais características além de terem sido observadas para o fruto isoladamente, também puderam ser observadas para as composições enriquecidas com o fruto. Existe, portanto, a necessidade de serem difundidas suas características, tornando-o viável para na alimentação no cultivo de peixes, principalmente nas regiões de maior produção.

O desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de vitamina C, foi o maior desafio deste trabalho, o qual buscou-se atender todas as figuras de mérito conforme especificações, o qual requereu um tempo apenas para a realização de estudos e pesquisas para que fosse possível.

Os resultados encontrados contribuí para elaboração de futuros trabalhos envolvendo o camu – camu, bem como traz uma proposta de aplicação do mesmo válida. Comparado a dieta referência as enriquecidas com o fruto, obteve-se maior potencial antioxidantes através das análises realizadas, ressaltando e potencializando suas principais características.

Futuros trabalhos podem ser elaborados, baseando-se nas análises aqui dispostas. Estes visando novas aplicações e/ou outras condições de extração.

## REFERÊNCIA

AGUIAR, C. L. **ISOFLAVONAS DE SOJA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**. B.CEPPA, Curitiba, v.20, n.2, p.323-334, 2002.

AGUINAGA, Y. J.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; MANRIQUE, W. G.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; FERNANDES, J. B. K. ***Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae***, Fish. Shellfish Immunol.47, 2015.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, M. R. **Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos**. Química Nova v.33, n.10. São Paulo, 2010.

ALVES, D. C. de O. **Uma comparação entre análise de variância e análise de regressão aplicadas ao mercado de ações**. Revista de Administração de Empresas, v.16 n.2, São Paulo, 1976.

AMARAL, S.; MIRA, L.; NOGUEIRA, J.; SILVA, A.; FLORENCIO, M. **Plant extracts with anti-inflammatory properties: a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure e antioxidant activity relationships**. Bioorganic e Medicinal Chemistry. v.17, p.1876-1883, 2009.

ANDRADE, J. S. **Curvas de maturação e características nutricionais do camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) *McVaugh*) cultivado em terra firme na Amazônia Central Brasileira**. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, Campinas, 1991.

ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; GALEAZZI, M. A. M.; FERREIRA, S. A. N. **Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and reaping of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaugh*) fruits cultivated in the upland of brasilian central Amazon**. Acta Horticult., 370: 177-180, 1995.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão**. Revista Instituto Adolfo Lutz, v.66, n.1, p.01-09, 2007.

ANJOS, A dos.; **Capítulo 7: Análise de Variância**. Disponível em: <<http://www.est.ufpr.br/ce003/material/cap7.pdf>>. Acesso em 05/02/2019.

ANSELMO. A. A. S. **Resíduos de frutos amazônicos como ingredientes alternativos em rações extrusadas para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum***. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais Programa em Biologia de Água Doce e Pesca Interior – BADPI, 2008.

AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL.17th etd., AOAC International, Arlington, 2016.

- ARIDE, P. H. R.; FERREIRA, M. S.; DUARTE, R. M.; OLIVEIRA, A. M.; FREITAS, D. V.; SANTOS, A. L. W.; NOZAWA, S. R.; VAL, A. L. **Ascorbic acid (vitamin C) and iron concentration in Tambaqui, *Collossoma macropomum*, iron absorption.** Journal of the World Aquaculture Society, v.41, p.291-297, 2010.
- AUDERA, C.; PATULNY, R. V.; SANDER, B. H.; DOUGLAS, R. M. **Mega-dose vitamin C in treatment of the common cold: a randomised controlled trial.** Med J Aust, 2001.
- AZEVEDO R. V.; FOSSE-FILHO, J. C.; CARDOSO, L. D.; MATTOS, D. C.; VIDAL-JÚNIOR, M. V.; ANDRADE, D. R. **Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia.** Revista Ciência Agronômica, v.46, p.72-79, 2015.
- AZIZ, F. A.; NOOR, M. M. **Ethanol extract of dragon fruit and its effects on sperm quality and histology of the testes in mice.** Biomedical Research, v.21, n.2, p.126-130, (2010).
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chem, 2006.
- BARBOSA. A. C. L.; HASSIMOTTO. N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; **TEORES DE ISOFLAVONAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA SOJA E PRODUTOS DERIVADOS.** Ciência Tecnologia Alimento, v.26, n.4, p.921-926. Campinas, 2006.
- BARRETO, A. G.; MATTA, L. M. C. C. V. M.; FREITAS, S. P. **Clarificação de polpa de camu-camu por microfiltração.** v.16, n.3, p.207-215, Campinas, 2013.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. **The Free Radical Theory of Aging Matures.** Physiological Reviews, 1998.
- BENZIE, I. F. F. **Evolution of dietary antioxidants.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology, v.136, p.113–126, 2006.
- BEZERRA, A. M. F., BEZERRA, K. K. S., BEZERRA, W. K. T., MEDEIROS, A. P. de. **Avaliação da atividade antioxidante de substâncias presentes nas hortaliças.** INTESA (Pombal - PB - Brasil) v. 8, n. 2, págs. 139 - 142, 2014.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta.** Rev. Nutr., 12, 1999.
- BOROSKI M.; VISENTANINER J.; COTTICA S.; MORAIS D. **Antioxidantes princípios e métodos analíticos.** 1 ed., Curitiba, Appris, 2015.
- BRAVO, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance.** Nutr Ver, 1998.

BRESSAN, L. P. **Plataforma de detecção eletroquímica para avaliação da habilidade quelante do cobre por compostos naturais neuroprotetores.** TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO, Santa Maria, 2014.

BUTKHUP, L. *et al.* **Study of the Phenolic Composition of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-eastern Thailand and its Antioxidant and Antimicrobial Activity.** South African Journal of Enology + Viticulture, [S.I.], 31, p. 89-98, 2010.

CANTER, P. H.; WIDER, B.; EMST, E. **The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials.** Rheumatology, 2007.

CARVALHO, H. H.; JONG, E. V.; BELLÓ, R. M.; SOUZA, R. B; TERRA, M. F. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análise.** Ed. Da Universidade, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos.** Ed. da Unicamp. São Paulo, 2003.

CELESTINO, S. M. C. **Metodologia Científica: Princípios de secagem de alimentos.** EMBRAPA Cerrados. Planaltina, DF: [s.n.], p.16-17, 2010.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA. Climatologia. **Climatologia da região de Presidente Prudente.** Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/>>. Acesso em: 10 out. 2017.

CHAVES, M. H.; **Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”.** Química Nova, v.20, n.5, p.560-562, 1997.

CHIRINOS, R.; BETALLELUZ-PALLARDEL, J. G. I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; **Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages.** Food Chemistry v.120 p.1019–1024, 2010.

CHOO J. C. Rhun Yian Koh, Anna Pick Kiong Ling. **Medicinal properties of Pitaya: a review.** Review Article Spatula DD. v.6, n.2, 2016.

CHOO, W. S; YONG, W. K. **Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits.** Pelagia Research Library , [S.I.], v. 2, p.418-425, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CULOTTA, V. C. **Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism.** In: **CULOTTA, Valeria Cizewski. Current Topics in Cellular Regulation.** Elsevier, 2001. p. 117-132. v. 36. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070213701800054>>. Acesso em: 04 out. 2016.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. de A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. **A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura.** R. Bras. Zootec., v.39, p.68-87, 2010.

DEGANI, G.; REVACH, A. **Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* X *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel 1822).** Aquaculture Fish Management, v.22, p.397-403, 1991.

DINIZ, J. **Composição química e atividade antioxidante de diferentes espécies de pitaias.** Dissertação de mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Toledo-PR, 2017.

EMBRAPA RORAIMA. **Estudo de biodiversidade e de técnicas convencionais e biotecnológicas visando à domesticação, melhoramento e valoração de fruteiras nativas da Amazônia.** Roraima, 2015.

FARIAS, A. S. L.; LÍVIO G. DA COSTA. L. G.; CALILIB, R. F.; RIOSC, R. M.; OLIVEIRA, E. C. Petrobras Transporte S.A., 20091-060 Rio de Janeiro – RJ, Brasil - Departamento de Metrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22453-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil - Petróleo Brasileiro S.A., 20271-000 Rio de Janeiro, Brasil, 2015.

FIDELIS, M.; SANTOS, J.S.; ESCHER, G.B.; CARMO, L.A.; SILVA, M.C.; PUTNIK, P.; GRANATO, D. **In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, *Myrtaceae*) seed coat: A multivariate structure-activity study.** Food Chem Toxicol, v.120, p.479-490, 2018.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS, B. F. A. **Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*).** Food Chemistry, v.139, p.578–588, 2013.

FUJITA, A.; **Avaliação do fruto amazônico camu – camu em dietas para tilápia do Nilo.** Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

FUJITA, A.; **Produtos derivados do camu-camu: efeito da secagem sobre elagitaninos e flavonóides, atividade antioxidante e antimicrobiana.** Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos.** Food Ingredients , v.11 , p.62-64, 2001.

GONÇALVES, A. E. de S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina**

c. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Área de Bromatologia. São Paulo, 2008.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L.E; BARROS, M.M.; ROCHA, D.F.; KLEEMAN, G.K.; SANTA ROSA, M.J. **Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em alimentos vegetais para a tilápia-do-Nilo.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.6, p.2155-2163, 2005.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO L.E.; BARROS, M.M.; ROCHA, D.F.; KLEEMAN, G.K.; SANTA ROSA, M.J. **Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do Nilo, B.** Inst. Pesca, São Paulo, 35(2): 201 - 213, 2009.

GRAY D. **Evaluation of a Method to Determine Flavonol Aglycones in Ginkgo biloba Dietary Supplement Crude Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography.** J AOAC v.90, n.1, p.43–53, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. **Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future.** Annals new York Academy of Sciences, New York, v.899, p.136–147, 2016.

HALLIWELL, B. **Antioxidants in Human Health and Disease.** Annual Review of Nutrition, United Kingdom, v.16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, Oxford, 3° ed. 1999.

HANLEY, F. **The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L).** Aquaculture, v.66, p.163-179, 1987.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants.** London: Taylor e Francis, 2° ed. 1999.

HARTLEY, Louise *et al.* **Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases.** Cochrane Heart Group, [S.l.], v.10, p. 1-39, 2017.

HE, F. J.; NOWSON, C. A.; MACGREGOR, G. A. **Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies.** Lancet, [S.l.], v.367, p.320-326, 2006.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2A Guideline Validation of analytical procedures: definitions and methodology, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. **Review of methods to determine antioxidant capacities.** Food Analytical Methods, v.2, n.1, p. 41-60, 2009.

KHIEM, H. **Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products.** Clemson University – TigerPrints. All Theses.Paper 1745. 2013.

KHALILI, Mohd Adzim *et al.* Hypocholesterolemic effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on hypercholesterolemia induced rats. International Food Research Journal, [S.l.], v.16, p.431-440, 2009.

KLING, D. P.; **Desenvolvimento de metodologias de digestão e análise de metais em microalgas por absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama.** Dissertação apresentada ao corpo Docente do Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Rio de Janeiro, 2015.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** [S.l: s.n.], 2004.

LATTANZIO, Vincenzo *et al.* **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.** In: Phytochemistry: Advances in Research. Kerala, India: Research Signpost, cap.2, p.23-67, 2006. Disponível em: <[http://trnres.com/ebook/uploads/imperato/T\\_1231133597Imperato-2.pdf](http://trnres.com/ebook/uploads/imperato/T_1231133597Imperato-2.pdf)>. Acesso em: 03 out. 2017.

LINDSAY, D. G. European research on the functional effects of dietary antioxidants – EUROFEDA. In: LINDSAY, David G.; ASTLEY, Siân B. **Molecular Aspects of Medicine.** Colney, Norwich NR4 7UA, UK: Pergamon, cap. 1, p. 1-38. v. 23, 2002.

LOUGH, W. J.; WAINER, I.W. **High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice.** Blackie Academic and Professional, 1995.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. **Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada.** Acta Amaz. v.33 n.3, Manaus, 2003.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.** Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1559-1568, 2010.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, n.2, 2006.

MAUÉS, M.M. & COUTURIER, G. **Biologia floral e fenologia reprodutiva de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaugh*, *Myrtaceae*) no Estado do Pará, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica 25, 2002.

MCCORD, J. M. **The evolution of free radicals and oxidative stress.** The American Journal of Medicine, [S.l.], v.108, p. 652–659, 2002.

McVAUGH, R. **Tropical american myrtaceae.** Fieldiana — Botany, v.29, n.8, p.393-532, Chicago, 1963.

NAYAK, S. K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S. C. **Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp.** Labeo rohita (Ham.), Fish. Shellfish Immunol. v.23, p.892-896, 2007.

NEVES, C.; DOMICIANO, F. **Pesquisas com a cultura da pitaya são desenvolvidos pela APTA.** Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/noticia\\_apta.php?id=4725](http://www.apta.sp.gov.br/noticia_apta.php?id=4725)>. Acesso em: 11 out. 2017.

NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; COLOMBO, R. C.; ROBERTO, S. R.; ZEVALLOS, L. C. **Days after anthesis and postharvest behavior define maturity, harvesting time and nutraceutical content of camu–camu fruit.** Scientia Horticulturae, v.224, p.37-47, 2017.

NURUL, S. R.; ASMAH, R. **Variability in nutritional composition and phytochemical properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) from Malaysia and Australia.** International Food Research Journal, [S.l.], v.21, p.1689-1697, 2014.

OLIVEIRA, A. M. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui alimentados com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagáveis.** Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus-AM, 2005.

PALACIOS, M. E.; DABROWSKI, K.; ABIADO, M. A.; LEE, A. **Effect of Diets Formulated with Native Peruvian Plantson Growth and Feeding Efficiency of Red Pacu (*Piaractus brachypomus*) Juveniles.** Journal Of The World Aquaculture Society, v.37, n.3, 2006.

PEDRIALI, C. A.; **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

PEREIRA, V. R.; **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria de alimentos.** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos - Curso de Bacharelado em Química de Alimentos Disciplina de Seminários em Alimentos, 2008.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. **Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS.** Química Nova, vol.25, n.2, p.246-253, 2002.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais.** Universidade de São Paulo, Dissertação de mestrado. São Paulo, 2009.

RIBANE, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELOL, L. F. **C. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS.** Quim. Nova, v. 27, n.5, p.771-780, 2004.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; DA SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; DA SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T.da S. **Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado.** Rev. Bras. Frutic., v. 33, n. 4, p.1215-1221, Jaboticabal – SP, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C. **Review : methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.** Food Science and Technology International, v.8, p.121-137, 2002.

SANTOS, F. R. D. dos.; COSTA, I. C. B. da.; CARVALHO, de S. E.; Magno, R.R., Sarkis, Müller, R.C., dos Santos, S.A. **Teores de vitamina c em três frutas comercializadas em Benevides e Belém do Pará.** Em Anais do 57º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2017.

SAVI, P. do R. S.; SANTOS, L. dos.; GONÇALVES, A. M.; BIESEK, S.; LIMA, C. P. de. **Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil.** Demetra: alimentação, nutrição & saúde, v.12, n.1, 2017.

SHAHIDI, F., NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** Lancaster: Technomic, 1995.

SILVA, C. T. C. **Conservação pós-colheita de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B K.) McVaugh) pelo uso de atmosfera modificada e refrigeração.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 1997.

SILVA, E. L. C. **Avaliação do fruto amazônico camu – camu em dietas para tilápia do Nilo.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Palotina – PR, 2019.

SILVA, M. E. C. **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE DE FERRO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE SORO DE LEITE OBTIDOS COM DIFERENTES ENZIMAS”.** DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, Universidade de Campinas, Campinas, 2013.

SILVA, V. X. **Determinação do ponto de colheita do camu-camu [(*Myrciaria dubia*) (H.B.K) *Mc Vaugh*] por meio de atributos de qualidade e funcionais.** Dissertação de mestrado, Roraima, 2012.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **"Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.** "Phenolics Determination, p.144-158, v.16, n.3, 1965.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L.B. **Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais.** Revista Ciênc. agrotec., Lavras, v.35, n.3, p.554-559, 2011.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel.** Revista Brasileira de Fruticultura v.30, n.1 Jaboticabal, 2008.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes *Phenolic acids as antioxidants.*** Revista de Nutrição v.15, n.1 Campinas, 2002.

STINTZING, F.C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R., **Evaluation os color proprieties and chemical quality parameters of cactus juices.** Eur. Food Res. Technol., p.216-303, 2003.

STOOKEY, L. L. **Ferrozina - Um novo reagente espectrofotométrico para ferro.** Analytical Chemistry, v.42, n.7, p. 779-781, 1970.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. **Recent advances in betalain research.** Phytochemistry, [S.I.], v.62, p.247–269, 2016.

SUCUPIRA, N. R., SILVA, A. B. da., PEREIRA, G., COSTA, J. N. da. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos.** <sup>a</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CE, Brasil. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, 2012.

TACO, Tabela brasileira de composição de alimentos. Versão II. 4 ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

TACON, A. G. J.; DE SILVA, S. S. **Feed preparation and feed management strategies within semi-intensive fish farming system in the tropics.** Aquaculture, v.151, p.379-404, 1997.

TALALAY, P.; FAHEY, J. W. **Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism.** Journal of Nutrition, [S.I.], v.11, p. 27-33, 2001.

VIEIRA L. M.; SOUZA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; DE LIMA, A. **Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais.** Revista Bras. Frutic., v. 33, n. 3, p.888-897, Jaboticabal, 2011.

VILLACHICA, H. L. **El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaugh*) en la Amazonia peruana.** Mirigraf, Lima, 1996.

WHO. G. **Potassium intake for adults and children.** Geneva, World Health Organization (WHO), 2012.

WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** LWT - Food Science and Technology, [S.I.], v.28, p.25-30, 1994.

WINIFRED M. C. **Antioxidant Properties of Ascorbic Acid in Foods.** Hoffmann-LaRoche, Inc., Kingsland Road, Nutley, NJ 07110, 1982.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. **Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C.** Acta Amaz, v.32, n.1, p.169-174, 2002.

YUYAMA, K. **A cultura de camu-camu no Brasil.** Revista Brasileira de Fruticultura. v.33, n.2 Jaboticabal, 2011.