



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIANA DE MORAIS SOUSA

**Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogenéticos de polifenóis do
jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto**

Teresina
2018

MARIANA DE MORAIS SOUSA

**Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogénicos de polifenóis do
jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia – RENORBIO, como requisito para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos
Naturais

Orientadora: Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

Co-orientador: Dr. Alessandro de Lima

Teresina

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Ficha Catalográfica elaborada por: Sônia Oliveira Matos Moutinho (Bibliotecária) . CRB 3/977

S725 Sousa, Mariana de Morais
Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogenéticos de polifenóis do
jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto / Mariana de Morais
Sousa . Teresina, PI: UFPI, 2018.
169 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia -
RENORBIO da Universidade Federal do Piauí). Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento
Nogueira.

1. *Syzygium cumini* (L.) Skeels. 2. Simplex Centroid Design. 3. Biopolifenóis. 4.
Bioacessibilidade. 5. Citogenotoxicidade. I. Nogueira, Nadir do Nascimento. II. Universidade
Federal do Piauí. III. Título.

CDD 641.3

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: MARIANA DE MORAIS SOUSA

TÍTULO DO PROJETO: “Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogenéticos de polifenóis do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto”

PROFESSORA ORIENTADORA: Nadir do Nascimento Nogueira

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Alessandra Braga Ribeiro - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior - IFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 24 de abril de 2018.

HORÁRIO: 14:30h

LOCAL: Auditório do Departamento de Enfermagem.

*Aos meus pais Pedro e Raimunda.
Aos meus irmãos Silvania e Silvanei.
Aos meus amados sobrinhos e afilhados.
Ao meu amor Heldonne Vaz.
Sem vocês nada seria!!!*

AGRADECIMENTOS

Nesta trajetória, muitas pessoas me acompanharam e contribuíram de forma inestimável para meu crescimento profissional e pessoal. Palavras de apoio, incentivo e companheirismo, de grande valia, foram preenchendo os dias que passavam e, cada uma dessas pessoas, à sua maneira, contribuiu para a realização desta pesquisa.

Agradeço primeiramente a Deus, meu alicerce e meu guia que esteve e está sempre ao meu lado, ajudando-me a concluir este trabalho. Agradeço ainda por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que me ajudaram quando precisei e, por ter me colocado diante de alguns obstáculos, para que através deles eu aprendesse e me tornasse mais forte e capaz de superá-los. Agradeço também, à minha amada Nossa Senhora, intercessora fiel, sempre ali dando “um jeitinho” para que tudo ocorresse conforme planejado.

Aos meus pais, Pedro e Raimunda, pelo amor incondicional e pelo sucesso na educação de seus filhos, diante de todas as adversidades. Aos meus irmãos, Silvanei e Sylvania, pelo carinho, compreensão e torcida. Aos meus sobrinhos Suzany, Athos, Junior, Petrus e, minha afilhada Marjhory, pelos momentos de descontração. E aos meus cunhados, que mesmo de maneira discreta sei que sempre torceram por mim. Amo vocês!

Ao meu amor Heldonne Vaz, primeiro resultado concreto desse doutorado. Muito obrigada pela compreensão, paciência nos meus momentos de estresse e pelo seu amor. Com você aprendi a valorizar mais ainda a vida, porque tudo passa, menos o amor que distribuimos incondicionalmente.

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Renorbio, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Renorbio, pelos conhecimentos transmitidos.

À minha amada orientadora Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira, professora e pesquisadora espetacular. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela oportunidade de vivenciar o meio científico, pela dedicação, paciência, amizade e carinho. Juntas, estamos construindo novos conhecimentos e, sem seu apoio nada disso seria possível.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Alessandro de Lima, pelo conhecimento científico compartilhado e sua amizade. É muito bom trabalhar com você.

A Profa. Dra. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo, por ter, gentilmente, cedido os Laboratórios de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos e, de Antioxidantes, sob sua coordenação, para que eu aprendesse o protocolo de bioacessibilidade e análise de antioxidantes. Agradeço ainda pela amizade, ensinamentos e contribuições para realização desta pesquisa. Agradeço ainda à Amanda, Nara e Rayssa por compartilharmos juntas as angústias dessas análises.

Ao Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes, por suas valiosas contribuições para este trabalho e auxílio no desenvolvimento do produto.

À Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, que também cedeu, gentilmente, o Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, sob sua coordenação, para eu realizar os ensaios de *Allium cepa*, *Artemia Salina* e *Saccharomyces cerevisiae*. Obrigada por compartilhar sua imensa experiência!!! Um agradecimento especial a Rosália, Tony, Antonielly e Ag-Anne pelo auxílio nas análises.

Ao Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira, que permitiu a liofilização do jamelão em seu Grupo de Instrumentação Analítica e Preparo de Amostra. Um agradecimento especial ao Thiago que sempre me ajudou prontamente nesse processo.

À Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó, ao Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto, ao Dr. Márcio dos Santos Rocha, Dr. Bruno Quirino Araújo, Iolanda e Renato, equipe do Laboratório de Geoquímica Orgânica, que muito me auxiliou na identificação dos compostos bioativos presentes no jamelão. Ressalto meus sinceros agradecimentos ao professor Lima Neto, muito muito obrigada por tudo, suas orientações foram indispensáveis para identificação dos bioativos!!!

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa, por tornar esse trabalho mais robusto e com potencial para publicação. Muito obrigada por partilharem comigo os seus conhecimentos.

À minha querida amiga e companheira Rosália, por partilhar comigo parte do processo de produção desta pesquisa, fonte de apoio intelectual e afetivo, os quais imensamente contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim. Agradeço o companheirismo, os conselhos e toda a atenção despendida. Trabalhar ao seu lado muito me acrescentou como pessoa e profissional.

Às minhas queridas amigas Afra e Lucianne, com quem partilhei minhas alegrias,

dúvidas, anseios e sonhos durante esses anos, sempre dispostas a me ouvir e me incentivar. Sou grata pelos bons momentos que passamos juntas, pelos conselhos e pela calma que vocês me transmitiram quando muito precisei. Agradeço eternamente pelo carinho e atenção.

Às minhas amigas de trabalho Luanne, Mariana Séfora e Juliany. Muito grata por poder contar com vocês sempre.

À minha amiga Josyanne Neves pelo auxílio nas referências bibliográficas e torcida. Muito obrigada!

A todos os colegas de turma, especialmente Raimunda e Marcelo, pelo período em que estivemos juntos, dividindo momentos de angústias, alegrias e muitos sentimentos que fortaleceram nossa amizade.

Ao Instituto Federal do Piauí, pela liberação concedida, para eu me dedicar exclusivamente a essa pesquisa e, por me ceder o Laboratório de Análise de Alimentos para realização das minhas análises. Um agradecimento especial à Diretora do Campus Teresina Zona Sul, Francisca Assunção Almeida Félix, por sempre torcer pelo meu sucesso e me auxiliar nessa qualificação. Muito obrigada!!!

À Ana Cibele, companheira de laboratório, pela imensa ajuda na execução das análises. Agradeço ainda pelos momentos de descontração e conversas agradáveis tornando essa caminhada mais branda.

Agradeço ainda ao José Augusto Gasparotto Sattler, um anjo em forma humana, que muito me auxiliou nas análises cromatográficas. Amandinha Romero sua indicação não poderia ter sido melhor. Muito obrigada!!!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI, pelo auxílio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de pesquisa.

Enfim, a todos àqueles que direta ou indiretamente, se fizeram presentes, torceram pelo meu sucesso e contribuíram para que esta pesquisa se tornasse realidade.

A todos a minha sincera gratidão.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

RESUMO

SOUSA, M. M. **Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogénicos de polifenóis do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto.** 2018. 169 p. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

O jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) é um fruto rico em nutrientes essenciais, e em compostos bioativos com ação antioxidante e farmacológica comprovada. Estudos têm evidenciado os benefícios do jamelão na saúde, no entanto, o consumo desse fruto e de seus derivados têm encontrado resistências em função de sua elevada adstringência. Diante disso, esse estudo objetivou avaliar o potencial tecnológico do uso do jamelão em novos produtos; caracterizar o perfil polifenólico do fruto; avaliar a bioacessibilidade dos compostos bioativos identificados; analisar os possíveis efeitos toxicogénicos, bem como propor um novo produto para fins de inserção no mercado. Inicialmente, fez-se uma revisão na literatura de artigos científicos e patentes sobre o tema, no âmbito nacional e internacional, empregando os termos “*Syzygium cumini*”, “*Eugenia jambolana*”, “*jambolan*”, “*jamun*” or “*java plum*”. Posteriormente, empregou-se técnica multivariada de misturas, simplex centroid design, para otimizar diferentes proporções do solvente extrator (água, etanol e acetona), e quantificação do conteúdo total das classes polifenólicas, bem como a determinação da atividade antioxidante. A caracterização dos polifenóis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas. Avaliou-se os efeitos citogenotóxicos do extrato aquoso do jamelão, por meio de bioensaios com *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn, em diferentes concentrações. Foram determinados os componentes da mistura complexa, assim como sua ação antioxidante frente ao radical peróxido e oxidação lipídica. Para digestão *in vitro* das diferentes classes polifenólicas, empregou-se soluções de enzimas fisiológicas, nos diferentes estágios do processo digestivo. A extração de biopolifenóis no processo simulado de digestão foi comparado à extração química, e verificado seus efeitos na resposta ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados do levantamento científico e tecnológico apontaram 23 artigos e 20 patentes, utilizados na construção da revisão. O estudo mostrou que as características químicas, nutricionais e fitoquímicas do fruto favorecem o consumo *in natura*, bem como a elaboração de sucos, néctares, geléias, bebidas alcoólicas e especiarias. No entanto, demonstra que o principal entrave da aplicação do jamelão na indústria de alimentos é o controle de antocianinas e de taninos, que afetam cor e sabor, respectivamente. A análise multivariada demonstrou que as melhores respostas da extração de polifenóis foram obtidas com a mistura binária água:acetona, 0,5:0,5 (v.v⁻¹). A identificação dos biopolifenóis demonstrou que quercetina deoxihexosídeo e trímero de epigallocatequina foram as principais responsáveis pela ação antioxidante. O extrato aquoso do fruto também apresentou ação antioxidante, demonstrada pelos ensaios ORAC (112,31 ± 12,56 µmolTrolox.g⁻¹) e inibição da oxidação lipídica (53,66%). Os resultados da citogenotoxicidade demonstraram que concentrações inferiores a 1500 µg.mL⁻¹, não exibiram efeito citotóxicos pelos métodos analisados. O estudo demonstrou ainda que o extrato aquoso do fruto não apresentou efeitos genotóxicos e mutagénicos significativos (p>0,05), em nenhuma das concentrações testadas nas raízes de *A. cepa*. Quanto à digestão, os resultados demonstraram aumentos significativos (p<0,05) dos biopolifenóis durante a digestão gástrica. Na etapa duodenal, flavonoides e proantocianidinas foram estáveis às mudanças de pH, enquanto antocianinas sofreram degradação ao entrar em contato com o pH neutro. A atividade antioxidante das frações bioacessíveis está correlacionada às elevadas concentrações de flavonoides e proantocianidinas, refletindo na modulação de enzimas antioxidantes em *S.*

cerevisiae. A partir dos resultados, conclui-se que o jamelão é uma fonte de compostos fenólicos bioacessíveis, capazes de prevenir, sequestrar radicais livres e reparar danos ocasionados pelo estresse oxidativo, além de modular a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Aliado a esses aspectos, os biopolifenóis encontrados no fruto não ocasionam riscos de instabilidade genética, se consumido nas concentrações adequadas. Esses dados demonstram a expressiva ação antioxidante do jamelão, estimulando seu consumo e, aproveitamento industrial, com perspectivas de aplicação na saúde.

Palavras-chave: *Syzygium cumini* (L.) Skeels; otimização; simplex centroid design; biopolifenóis; bioacessibilidade; citogenotoxicidade.

ABSTRACT

SOUSA, M. M. **Bioaccessibility, antioxidant capacity and toxicogenic effects of polyphenols of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) and technological application of fruit.** 2018. 169 p. Thesis (Post-Graduation in Biotechnology - RENORBIO) - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

Jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) is a fruit that is rich in essential nutrients and bioactive compounds with proven antioxidant and pharmacological activities. Multiple studies have shown the health benefits of jambolan; however, the consumption of this fruit and its derivatives has found resistance because of its high astringency. Therefore, this study is aimed to evaluate the technological potential of jambolan in new products, characterize the polyphenolic profile of the fruit, evaluate the bioaccessibility of the identified bioactive compounds, identify any possible toxicogenic effects, and propose a new product for insertion into the market. Initially, we present a review of national and international scientific articles and patents on the subject, which use the terms "*Syzygium cumini*", "*Eugenia jambolana*", "jambolan", "jamun" or "java plum". Subsequently, we show data using multivariate mixing techniques and simplex centroid design to optimize different extractive solvents (water, ethanol and acetone), quantify total polyphenolic classes, and determine antioxidant activity. The characterization of polyphenols was performed using high performance liquid chromatography, coupled with mass spectrometry. Cytotoxic effects of the aqueous extract of jambolan were evaluated using bioassays with *Artemia salina* Leach and *Allium cepa* Linn in varying concentrations. The components of the complex mixture were identified, and their antioxidant action against the peroxy radicals and lipid oxidation was determined. For the *in vitro* digestion of different polyphenolic classes, solutions of physiological enzymes were used in different stages of the digestive process. The extraction of biopolyphenols in the simulated digestion process was compared with that of the chemical extraction process, and its effects on oxidative stress responses in *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated. The results of the scientific and technological survey indicated that 23 articles and 20 patents, were used for the review. A study has shown that the chemical, nutritional and phytochemical characteristics of the fruit favor consumption *in natura*, as well as the consumption of juices, nectars, jellies, alcoholic drinks and spices. However, it also shows that the main impediment for the application of jambolan in the food industry is the control of anthocyanins and tannins, which affect color and taste, respectively. Our multivariate analysis showed that the best polyphenylene extraction responses were obtained with a water:acetone binary mixture, 0.5:0.5 (v:v). The identification of biopolyphenoids demonstrated that quercetin deoxyhexoside and the trimer of epigallocatechin were mainly responsible for antioxidant activity. The aqueous extract of the fruit also presented antioxidant activity, as demonstrated by the ORAC assays ($112.31 \pm 12.56 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$), and inhibition of lipid oxidation (53.66%). Cytotoxicity results revealed that concentrations below $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ did not exhibit any cytotoxic effects by the methods analyzed. Our results also demonstrated that the aqueous extract of the fruit did not present any significant genotoxic or mutagenic effects ($p > 0.05$) at any of the concentrations tested in *A. cepa* roots. The results also showed a significant increase ($p < 0.05$) in biopolyphenols during gastric digestion. In the duodenal stage, flavonoids and proanthocyanidins were stable under pH changes, while anthocyanins underwent degradation under neutral pH conditions. The antioxidant activity of the bioaccessible fractions is correlated to high concentrations of flavonoids and proanthocyanidins, reflecting the modulation of antioxidant enzymes in *S. cerevisiae*. From

these results, it can be concluded that jambolan is a source of bioaccessible phenolic compounds capable of preventing and sequestering free radicals, repairing damage caused by oxidative stress, and modulating the enzymatic activity of superoxide dismutase and catalase. In addition, the biopolyphenols found in the fruit are non-genotoxic at the appropriate concentrations. These data demonstrate the beneficial antioxidant action of jambolan, promoting its consumption and industrial use in health applications.

Keywords: *Syzygium cumini* (L.) Skeels; optimization; simplex centroid design; biopolyphenols; bioaccessibility; cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Divisão esquemática do trabalho de tese	25
Figura 2	Jamelãozeiro (A). Folhas e flores (B). Frutos em diferentes estágios de amadurecimento (C)	26
Figura 3	Estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos (A), hidroxicinâmicos (B), antocianinas (C), monômeros e polímeros de flavon-3-ols(D) e ácido elágico (E)	32
Figura 4	Liberação de polifenóis da matriz alimentar e absorção pela corrente sanguínea	34
Figura 5	Redução tetravalente e univalente do oxigênio molecular	38
Figura 6	Peroxidação lipídica dos ácidos graxos presentes na membrana celular	39
Figura 7	Sistema enzimático de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	41

CAPÍTULO 1

Figura 1	Etapas de identificação, seleção e inclusão dos artigos na revisão sistemática	60
Figura 2	Diagrama de pesquisa e triagem das patentes analisadas	70

CAPÍTULO 2

Figura 1	Perfis para valores preditos de resposta máxima em função do sistema solvente para compostos bioativos e atividade antioxidante	97
Figura 2	Cromatograma de polifenóis do extrato acetona:água (0,5:0,5, v.v ⁻¹) do jamelão, obtido por CLAE-MS/MS, modo de ionização negativa	98

CAPÍTULO 3

Figura 1	Cromatograma de CLAE-MS obtido em 200-600 nm de compostos fenólicos do EAJ. Picos: 1 e 2: Não identificados. 3a: Ácido clorogênico monohidratado. 3b: Ácido caftarico. 4: Ácido protocatéquico monohidratado. 5: Derivado de ácido quínico. 6: Ácido quínico. 7: Ácido gálico 4-O-hexosídeo. 8: Delfinidina-3,5-diglicosídeo. 9:	118
----------	--	-----

Dihidromiricetina-5. 10: Metil-dihidromiricetina-4. 11: Petunidina-3,5-diglicosídeo. 12: malvidina-3,5-diglicosídeo. 13: Metil-dihidromiricetina-5
14: Não identificado

- Figura 2 Atividade *scavenger* do radical peroxil pelo EAJ, água deionizada e Trolox (50 μ M) avaliada pelo ensaio ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) 120
- Figura 3 Fases da divisão celular: Intérfase (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E). Anormalidades cromossômicas: atrasos cromossômicos (F), micronúcleo (G), pontes cromossômicas (H) e cromossomos soltos (I) 125

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Efeito preventivo (a, pré-tratamento), *scavenger* (b, co-tratamento) e reparador (c, pós-tratamento) dos polifenóis bioacessíveis do jamelão e, comparação com a extração química, em relação aos danos induzidos pelo H₂O₂ (10mM) em linhagens de *S. cerevisiae* 151
- Figura 2 Efeitos modulatórios dos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas (a, pré-tratamento; b, co-tratamento; c, pós-tratamento) 153
- Figura 3 Modulação da atividade enzimática da *Cat* pelos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas no pré-tratamento (a), co-tratamento (b) e pós-tratamento (c) 156
- Figura 4 Modulação da atividade enzimática da *Sod* pelos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas no pré-tratamento (a), co-tratamento (b) e pós-tratamento (c) 158

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1	Composição nutricional, conteúdo de vitaminas e minerais e valor energético total (VET) de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels <i>in natura</i>	28
Tabela 2	Constituintes polifenólicos em frutos de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels	30

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Descrição dos estudos que atenderam aos critérios de inclusão para produtos com o fruto do jamelão (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels)	62
Tabela 2	Patentes de aplicação do jamelão (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) na indústria de alimentos	71

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Proporções de solventes extratores de polifenóis do jamelão de acordo com SCD* e, respostas observadas.	92
Tabela 2	Resultados ANOVA dos modelos de regressão estimados por SCD para otimização do sistema solvente de extração dos polifenóis do jamelão e adequação da proposta.	93
Tabela 3	Coefficientes de correlação de Pearson's (<i>r</i>) entre compostos bioativos e atividade antioxidante do jamelão	95
Tabela 4	Coefficientes de regressão para modelos quadráticos	95
Tabela 5	Conteúdo total de polifenóis, flavonoides, flavanois, antocianinas monoméricas, proantocianidinas e atividades antioxidante que foram obtidos usando a mistura ótima de solventes (acetona:água, 0,5:0,5, v.v ⁻¹)	96
Tabela 6	Identificação de polifenóis na mistura binária acetona:água (0,5:0,5, v.v ⁻¹) por CLAE-MS no modo de ionização negativa	99
Tabela 7	Identificação de antocianinas no jamelão (mistura binária acetona:água, 0,5:0,5, v.v ⁻¹), por CLAE-MS no modo de ionização positiva.	102

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Identificação de polifenóis no EAJ por CLAE-MS no modo de ionização negativa	117
Tabela 2	Índice de atividade antioxidante (IAA) pelo sistema lipídico Rancimat®	121
Tabela 3	Efeitos citotóxicos do EAJ e controles em ensaios com <i>A. salina</i> Leach	122
Tabela 4	Efeitos do EAJ sobre o crescimento radicular de <i>A. cepa</i> Linn	123
Tabela 5	Perfil citotóxico de diferentes concentrações do EAJ sobre espécimes de <i>A. cepa</i> Linn	124
Tabela 6	Aberrações cromossômicas e micronúcleo de espécimes de <i>A. cepa</i> Linn expostos a diferentes concentrações de EAJ	125

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Alterações no teor total de polifenóis, flavonóides, flavanois, antocianinas e proantocianidinas durante simulação da digestão <i>in vitro</i> do jamelão, comparação com método químico de extração e, índice de bioacessibilidade	142
Tabela 2	Identificação de polifenóis nas diferentes fases da digestão <i>in vitro</i> por CLAE-MS/MS, no modo de ionização negativa	146
Tabela 3	Alterações na atividade antioxidante na simulação da digestão <i>in vitro</i> do jamelão, em comparação com método químico de extração e índice de bioacessibilidade	148
Tabela 4	Coefficientes de correlação de Pearson's (<i>r</i>) entre compostos bioativos e atividade antioxidante do jamelão nas etapas do processo de digestão simulada	149

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	[dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)]
ABTS	sal de diamônio 2,2'-azino-bis(ácido 3-ethylbenzotiazolina-6'-sulfônico)
Agli	Aglicona
AM	Antocianinas monoméricas
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Official Methods of Analysis
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxi-butil-tolueno
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio diidratado
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CiCl	cloreto de cianidina
Cid 3-glu	Cianidina-3-glicosídeo
CL ₅₀	Concentração letal 50%
CN	Controle negativo
CO ₂	Gás carbônico
CP	Controle positivo
CR	Crescimento da raiz
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre/zinco (citoplasmática)
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre
DMACA	p-Dimetilaminocinmaldeído
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
E123	Bordeaux
E124.1	Ponceau

EAG	Equivalente de ácido gálico
EAJ	Extrato aquoso do jamelão
EAT	Equivalente de ácido tânico
EC	Equivalente de catequina
EQ	Equivalente de quercetina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERON's	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ESI-ITMS	Espectrometria de massa de ionização por ionização por eletrospray direta
Espacenet (EPO)	European Patent Office
ETQ	Equivalente de tanino quebracho
EUA	Estados Unidos da América
FAPEPI	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí
FD	Fator de diluição
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FIT	Flavanois totais
Fluoresceína	3',6'- dihidroxi[isoben ^z ofuran-1[3H],9''[9H]-xanten]-3-ona
FRAP	poder de redução do Fe ³⁺
FT	Flavonoides totais
G ₁	Primeira etapa do ciclo celular
G ₂	Terceira etapa do ciclo celular
GL	Graus de liberdade
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	δ-glutamil-cistenil-glicina ou glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃	Ácido carbônico
HNO ₂	Ácido nitroso

HO [·]	Radical hidroxila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
IB	Índice de bioacessibilidade
IC	Intervalo de confiança
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
K	Potássio
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kpa	Quilopascal
L [·]	Radical lipídico
LH	Ácido poliinsaturado
LO [·]	Radical alcóxila
LOO [·]	Radical peróxila
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
<i>Mesh Tyler</i>	Diâmetro das perfurações da peneira
MF	Matéria fresca
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
mmHg	Milímetro de mercúrio
Mn	Manganês
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês-dependente (mitocondrial)
MS	Massa nominal
MS	Matéria seca
MS ²	Etapa 1 da fragmentação da massa nominal
MS ³	Etapa 2 da fragmentação da massa nominal
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
Na	Sódio
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de sódio

Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH oxidases	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases
Nd	Não detectado/não determinado
·NH ₂	Amino radical
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
·NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°Brix	Sólidos solúveis
ONOO ⁻	Peroxinitritos
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PCT	Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
ppm	Parte por milhão
PrT	Proantocianidinas
PT	Polifenóis totais
QM	Quadrado médio
<i>r</i>	Coefficientes de correlação de Pearson's
<i>R</i> ²	Coefficiente de determinação
ROOH	Hidroperóxido
S	Segunda etapa do ciclo celular
SCD	Simplex centroid design
-SH	Grupos sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
SS	Soma dos quadrados
-SS	Pontes dissulfeto
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente de Trolox
TI	Tempo de indução
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
t _R	Tempo de retenção

Trolox®	(S)-(-)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UDP- glicotransferase	Uridina difosfato-glicotransferase
USDA	United States Department of Agriculture
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV-VIS	Luz ultravioleta visível em determinado comprimento de onda
VET	Valor energético total
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	Características botânicas, morfológicas e de cultivo do jamelão (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	26
2.2	Composição nutricional do jamelão	27
2.2.1	Proteínas, lipídios e carboidratos	27
2.2.2	Vitaminas, minerais e carotenóides	29
2.3	Composição fenólica do jamelão	29
2.3.1	Ácidos fenólicos	30
2.3.2	Antocianinas	31
2.3.3	Taninos	31
2.4	Biodisponibilidade de polifenóis	33
2.4.1	Ácidos fenólicos	34
2.4.2	Antocianinas	35
2.4.3	Taninos e ácido elágico	36
2.5	Espécies reativas, radicais livres e estresse oxidativo/nitrosativo	37
2.5.1	Espécies reativas de oxigênio (ERO)	37
2.5.2	Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	40
2.5.3	Mecanismos de proteção contra as ERON's	40
2.5.3.1	Enzimas antioxidantes	41
2.5.3.2	Antioxidantes não enzimáticos	42
	Referências	46
3	OBJETIVOS	53
3.1	Objetivo geral	53
3.2	Objetivos específicos	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
	CAPÍTULO 1 - Utilização do jamelão (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) na indústria de alimentos: Uma revisão sobre aplicações tecnológicas.	55
	CAPÍTULO 2 - Otimização multi-resposta do sistema de solventes para extração de polifenóis e atividade antioxidante na polpa do jamelão (<i>Syzygium</i>	82

cumini (L.) Skeels).

CAPÍTULO 3 - Efeitos toxicogénicos de biopolifenóis antioxidantes do extrato aquoso do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) em *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn. 108

CAPÍTULO 4 - Polifenóis bioacessíveis do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels): Identificação por CLAE-MS, ação antioxidante e modulação da atividade de enzimas em modelos com *Saccharomyces cerevisiae*. 132

CAPÍTULO 5 – Processo de extração e fabricação do suco tropical de jamelão utilizando polissacarídeos para redução da adstringência. 165

5 CONCLUSÕES 168

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se buscado fontes de alimentos que apresentem quantidades expressivas de compostos antioxidantes, devido à associação inversa entre o consumo de alimentos ricos nesses compostos e o estresse oxidativo *in vivo*, minimizando o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Nesse contexto, destaca-se o jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), fruto rico em compostos fenólicos, principalmente antocianinas, responsáveis pela ação antioxidante e por várias propriedades farmacológicas (LESTARIO et al., 2017).

A determinação do conteúdo de antocianinas e de outros compostos bioativos em frutos como o jamelão inclui extração, separação e quantificação por métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Entre essas etapas, destaca-se a extração, que visa separar substâncias de interesse da matriz complexa. Na extração, consideram-se fatores que irão determinar o tipo; a eficiência de atividade; o meio e a estrutura celular em que podem atuar (MUSSI et al., 2015).

Apesar dos esforços empregados por pesquisadores de todo o mundo, ainda não foi possível estabelecer um método/solvente oficial pela AOAC para extração de compostos bioativos. Esse fato decorre do elevado número, e complexidade estrutural desses compostos. Dessa forma, fica evidente a necessidade do desenvolvimento, validação e otimização de novos métodos de extração de polifenóis, como etapa prévia à sua caracterização de forma precisa, e obtenção de resultados confiáveis (AZMIR et al., 2013).

Dentre os solventes mais empregados para extração de polifenóis em frutos e vegetais destacam-se a água, etanol, metanol e acetona, ou a mistura destes (BACHIR BEY et al., 2014). A identificação do melhor sistema solvente ocorre por otimização da extração, que pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos. Entretanto, para estudar a melhor combinação de solventes, que permita a extração dos principais compostos de interesse, a técnica estatística multivariada para otimização de misturas é a mais adequada (BOCHI et al., 2014).

Independente da técnica ou solvente empregado na extração de polifenóis do jamelão, estudos têm demonstrado que esses compostos presentes no fruto possuem ação antioxidante *in vitro* comprovada (BALIGA, 2011; ATALE et al., 2014). Entretanto, não se sabe quais biopolifenóis são responsáveis pela bioatividade. Para um composto químico exercer

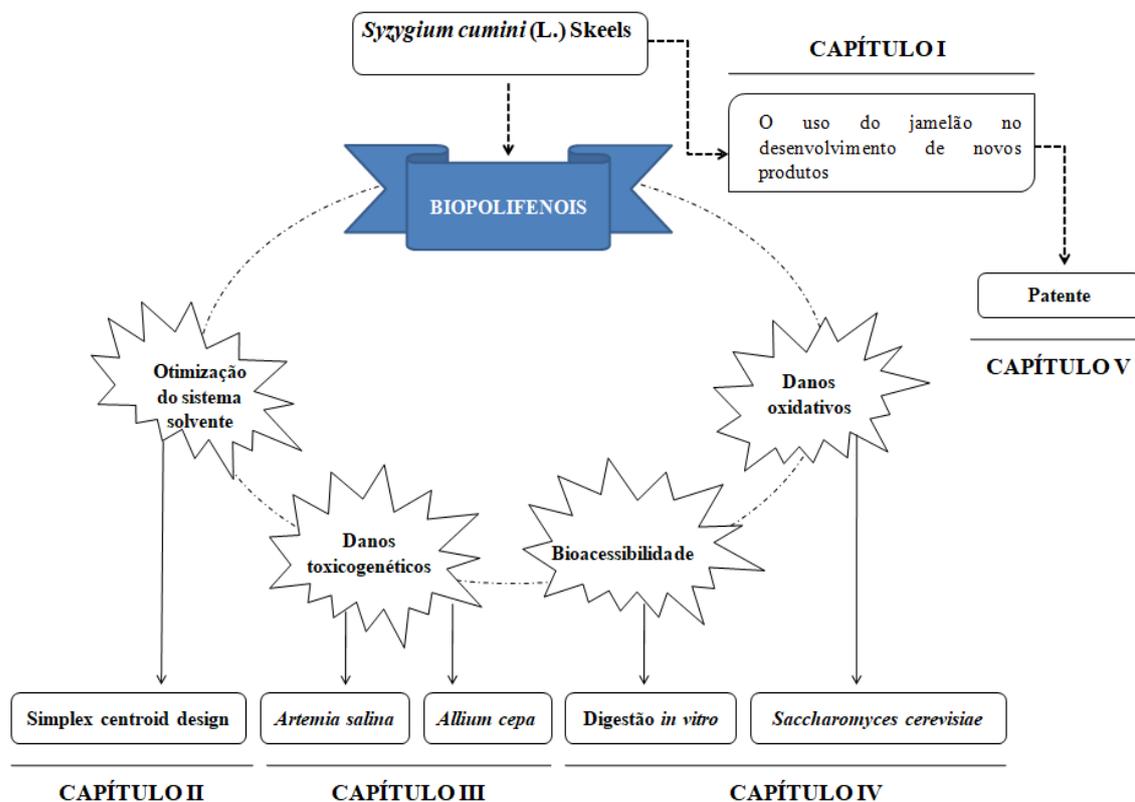
atividade biológica, deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que determine o efeito biológico e promova o mecanismo de ação (OLIVEIRA; BASTOS, 2013). Dessa forma, aliado à importância da extração e identificação de polifenóis com propriedade bioativa, é fundamental investigar a sua funcionalidade *in vitro* e *in vivo*, em função de vários fatores afetarem a sua bioacessibilidade e biodisponibilidade, interferindo diretamente no metabolismo e absorção desses compostos (MACIEJ et al., 2015).

Atualmente, os métodos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* são amplamente utilizados, uma vez que são rápidos, seguros, e não exigem cumprimentos éticos dos métodos *in vivo*. Além disso, é possível avaliar, em cada etapa do processo digestivo, a proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que durante os processos fisiológicos que ocorrem no trato gastrointestinal há liberação de espécies reativas que, em excesso, são prejudiciais à saúde. Nesse contexto, ensaios *in vitro* como DPPH, ABTS e FRAP, e ensaios não-clínicos com células eucarióticas de *Saccharomyces cerevisiae*, proficiente e mutadas quanto às defesas enzimáticas antioxidantes, são empregados para avaliar a capacidade preventiva, *scavenger* e reparadora.

Na perspectiva do desenvolvimento de novos produtos alimentícios, além dos aspectos mencionados, é necessária a realização de ensaios toxicológicos e citogenéticos, para verificar a possível ação terapêutica ou a segurança da matéria-prima empregada em relação aos riscos de instabilidade genética. Até o presente, são escassos os estudos sobre bioacessibilidade, toxicogenética e resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* dos polifenóis do jamelão, o que reforça a necessidade de mais estudos nessa área.

Tendo em vista a necessidade de estabelecer um sistema solvente para extração de biopolifenóis no jamelão, e que estes atendam aos aspectos citogenéticos, que sejam bioacessíveis e capazes de proporcionar possíveis efeitos modulatórios frente às ações oxidativas, este trabalho de tese intitulado “Bioacessibilidade, capacidade antioxidante e efeitos toxicogenéticos de polifenóis do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e aplicação tecnológica do fruto”, foi desenvolvido, cujos resultados encontram-se apresentados em capítulos (Figura 1), elaborados na forma de artigos submetidos/publicados em periódicos de impacto, e de patente, objetivando divulgar o conhecimento científico e tecnológico produzidos e, o fortalecimento dessa linha de pesquisa.

Figura 1 – Divisão esquemática do trabalho de tese



Fonte: Sousa (2018).

O **Capítulo 1** apresenta uma prospecção científica e tecnológica, a fim de conhecer o estado da arte e aplicação do jamelão no desenvolvimento de novos produtos, no contexto nacional e internacional. O **Capítulo 2** aborda a exploração dos biopolifenois, com ação antioxidante, presentes no jamelão, bem como sua caracterização por HPLC-MS. No **Capítulo 3**, foram avaliados os aspectos toxicogénéticos do fruto e, seu potencial na captura do radical peroxil e inibição da peroxidação lipídica. No **Capítulo 4**, foram determinados os polifenois bioacessíveis, após a simulação gastrointestinal *in vitro*. Além disso, verificou-se a capacidade dos biopolifenois acessíveis, em cada etapa da digestão, de prevenir, minimizar e reparar danos ocasionados pelo estresse oxidativo. No **Capítulo 5**, apresentamos a patente de processo para obtenção do suco tropical do jamelão, com adstringência reduzida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características botânicas, morfológicas e de cultivo do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels

Botanicamente, o jamelão foi classificado como *Eugenia jambolana* e, posteriormente, reclassificado como *Syzygium cumini*, família *Myrtaceae* (FRAUCHES et al., 2016). O fruto, nativo da Índia, se desenvolve, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais e possui várias sinônimas, como jambolão, jalão, cereja, azeitona preta, azeitona roxa, azeitona-doce, *jambul*, *jaman* (Ásia), *faux pistachier* (França), *indian blackberry* (Inglaterra), *jambal* e *duhat* (Finlândia) (JAISWAL et al., 2015; SINGH et al., 2015).

Os jamelõezeiros são cultivados no Brasil como árvore ornamental e de sombra, por serem perenifólios, de copa frondosa e densa, de 15 a 20 metros de altura, conforme observado na Figura 2A (SANTIAGO et al., 2016). As folhas são simples, coriáceas, glabras, aromáticas, lustrosas, medindo de 8 a 14 cm de comprimento, com proeminente nervura principal e pecíolo de 1 a 3 cm; as flores, dominadas por estames brancos, ficam dispostas em ramos axilares ramificados (Figura 2B). Os frutos têm forma elipsoide, 2,0 a 3,0 cm de comprimento longitudinal, e cor roxa escura, quando maduros (Figura 2C) (SANTANA et al., 2015). Apresentam sabor ácido adocicado, ocasionado pela combinação de taninos com as glicoproteínas salivares, proporcionando sensação de adstringência (FARIA et al., 2011; BRANDÃO et al., 2011).

Figura 2 - Jamelãozeiro (A). Folhas e flores (B). Frutos em diferentes estágios de amadurecimento (C)



Fonte: Sousa (2018).

A multiplicação das árvores ocorre por semeadura direta ou mudas em viveiro. Crescem em qualquer tipo de solo e em clima quente e úmido (FRAUCHES et al., 2016). No Brasil, principalmente na região Nordeste, a árvore floresce nos meses de agosto a setembro, sendo os frutos encontrados abundantemente nos meses de outubro a dezembro. Em outras regiões do país, a frutificação ocorre mais de uma vez no ano, acontecendo também de janeiro a maio (OLIVEIRA et al., 2016). Cada árvore produz entre 50 e 100 Kg de frutos por safra, e cada 1 kg da fruta contém aproximadamente 165 unidades (NDYOMUGYENYI; OKOT; MUTETIKKA, 2014).

2.2 Composição nutricional do jmelão

2.2.1 Proteínas, lipídios e carboidratos

O jmelão apresenta importantes componentes nutritivos como proteínas, lipídios e carboidratos (Tabela 1), que variam com as condições edafoclimáticas, maturação, colheita e armazenamento. O fruto apresenta proteínas, principalmente no estágio inicial da maturação (BRANDÃO et al., 2011) e aminoácidos livres como alanina, asparagina, tirosina, glutamina e cisteína (SHAHNAWAZ et al., 2009; HERCULANO et al., 2014).

Os frutos do jmelãozeiro possuem baixos teores lipídicos, contribuindo para reduzido aporte energético (BORGES et al., 2016). O perfil de ácidos graxos indica a presença dos ácidos palmítico, esteárico, cis-vacênico, araquidônico e gadoleico e, ácidos graxos essenciais como linoléico e α -linolênico, fundamentais na regulação de vários processos metabólicos (RYDLEWSKI et al., 2017).

Com relação aos carboidratos, a quantidade encontrada na polpa do jmelão é de aproximadamente 15% (p/p), valores duas vezes maiores do que na acerola e pitanga, frutos da família *Myrtaceae* (USDA, 2018). Os açúcares redutores predominantes são glicose, galactose, frutose, manose e maltose, e o não redutor, sacarose (RUFINO et al., 2010). A fibra dietética compreende 3,85% do total de carboidratos na polpa do fruto, demonstrando baixos teores de fibras, quando comparado a frutos como juçara (64%), amora (43,9%) e framboesa vermelha (58,4%) (SOUZA et al., 2014; INADA et al., 2015).

Tabela 1 - Composição nutricional, conteúdo de vitaminas e minerais e valor energético total (VET) de *S. cumini* (L.) Skeels *in natura*

Composição	Conteúdo	Referências
Umidade	83,13 g.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Proteínas	0,72 g.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Lipídios	0,23 g.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Carboidratos	15,56 g.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Maltose	210 mg.g ⁻¹	Noomrio; Dahot (1996)
Sacarose	95,5 mg.g ⁻¹	Noomrio; Dahot (1996)
Frutose	57,50 mg.g ⁻¹	Noomrio; Dahot (1996)
Galactose	52,50 mg.g ⁻¹	Noomrio; Dahot (1996)
Glicose	20 mg.g ⁻¹	Noomrio; Dahot (1996)
Fibra Alimentar	0,6 g.100 g ⁻¹	Paul; Shasa (2004)
Cinzas	0,36 g.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Minerais		
Cálcio	19 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Ferro	0,19 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Magnésio	15 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Fósforo	17 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Potássio	79 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Sódio	14 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Zinco	0,28 mg.100 g ⁻¹	Paul; Shasa (2004)
Cobre	0,07 mg.100 g ⁻¹	Paul; Shasa (2004)
Vitaminas		
Ácido ascórbico	14 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Tiamina	0,006 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Riboflavina	0,012 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Niacina	0,260 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Vitamina B-6	0,038 mg.100 g ⁻¹	USDA (2018)
Vitamina B-12	Nd	USDA (2018)
Carotenoides		
β-caroteno	50 mg.100 g ⁻¹	Paul; Shasa (2004)
Cis-neoxantina	0,6 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Cis-luteína	1.3 ± 0.1 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
All-trans-luteína	39.0 ± 2.2 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
All-trans-zeaxantina	1.7 ± 0.0 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Fitoeno	5.6 ± 0.9 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
All-trans-βcryptoxantina	0.3 ± 0.1 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Fitoflueno	2.9 ± 0.0 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
15-cis- β-Caroteno	3.1 ± 0.1 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
13-cis- β-Caroteno	3.8 ± 0.0 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
All-trans-α-caroteno	2.7 ± 0.0 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
All-trans- β-caroteno	22.7 ± 1.6 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
9-cis- β-Caroteno	4.9 ± 0.2 μg.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
VET	60 Kcal.100g ⁻¹	USDA (2018)

USDA: United States Department of Agriculture. Nd: não detectado/não determinado. VET: valor energético total.

2.2.2 Vitaminas, minerais e carotenóides

O jamelão contribui com o aporte diário de diversas vitaminas. A vitamina C no fruto contribui com 14 mg na ingestão de 100 g do fruto e está associada às propriedades bioativas, além de aumentar a absorção do ferro, por mantê-lo no estado ferroso e formar quelato ferro-ascorbato que é mais solúvel (COELHO et al., 2016). O fruto também apresenta tiamina, riboflavina, niacina, pro-vitamina A e vitamina B-6 (JAISWAL et al., 2015).

Entre os minerais presentes no fruto, destacam-se cobre, manganês, zinco, ferro, cromo, magnésio, cálcio, sódio e potássio. Macro e microminerais atuam no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, e são essenciais na estrutura de várias enzimas, desempenhando papéis como catalisadores e antioxidantes indiretos (SHAHNAWAZ et al., 2012).

Com relação ao perfil de carotenóides do jamelão, ressalta-se a presença de β -caroteno, all-trans-luteína e all-trans- β -caroteno. Os carotenóides constituem uma das classes importantes de fitoquímicos com ação antioxidante e anti-inflamatória, além de estarem relacionados à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e carcinogênicas (PRIYADARSHANI, 2017).

2.3 Composição fenólica do jamelão

Os frutos do jamelão são excelentes fontes de compostos fenólicos, destacados por seus efeitos farmacológicos. Setenta e quatro compostos foram identificados nas partes comestíveis do fruto, entre os quais destacam-se ácidos fenólicos e flavonoides, especialmente antocianinas e proantocianidinas (TAVARES et al., 2016).

O conteúdo total de polifenóis no jamelão varia entre os estudos (Tabela 2). Essa variação decorre da inexistência de metodologia oficial, bem como do uso de vários solventes extratores dos polifenóis (BORGES et al., 2016). Além disso, esses fitoquímicos diferem em função da variedade dos frutos (ALI, 2011), dos aspectos fisiológicos da maturação (BRANDÃO et al., 2011; LESTARIO et al., 2017) e da copigmentação com outros polifenóis (SARI et al., 2012).

Tabela 2 - Constituintes polifenólicos em frutos de *S. cumini* (L.) Skeels

Compostos Fenólicos	Valores médios	Referência
Polifenóis totais		
Etanol (MF)	390±0,5 mg EAG.100 g ⁻¹	Benherlal; Arumughan (2007)
Metanol 0,1% HCl (MS)	596,29 mg EAG.100 g ⁻¹	Veigas et al. (2007)
Acetona:metanol(MF)	185±3,8 mg EAG.100 g ⁻¹	Rufino et al. (2010)
Acetona:metanol (MS)	1117±67,1 mg EAG.100 g ⁻¹	Rufino et al. (2010)
Metanol:água 8:2 (MF)	148,3 ±32,4 mg EAG.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Metanol:água 8:2 (MS)	809,0 mg EAG.100 g ⁻¹	Saxena et al. (2013)
Hexano (MS)	420,0 mg EAG.100 g ⁻¹	Shad et al. (2014)
Metanol:água (MS)	3120,0 mg EAG.100 g ⁻¹	Shad et al. (2014)
Ácido gálico	1973 ± 0,81 mg.100 g ⁻¹	Zhang; Lin (2009)
Flavonoides totais		
Etanol (MF)	7,0 ± 0,04 mg.100 g ⁻¹	Benherlal; Arumughan (2007)
Metanol:água 8:2 (MF)	91,2±15,7 mg EC.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Hexano (MS)	13,2±3,15 mg EQ.g ⁻¹	Shad et al. (2014)
Metanol:água (MS)	25,2±3,15 mg EQ.g ⁻¹	Shad et al. (2014)
Antocianinas monoméricas		
	230 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Veigas et al. (2007)
	134±0,2 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Benherlal; Arumughan (2007)
	93,3±3,4 mg cid 3-glu.100 g ⁻¹	Rufino et al. (2010)
	210,9 ±9 mg cid 3-glu.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
	400 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Saxena et al. (2013)
Antocianinas		
Cianidina	90,50 ± 0,20 mg agli.100 g ⁻¹	Correia et al. (2011)
Delfinidina-3,5-diglicosideo	95.6 ± 4,2 mg cid 3-glu.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Cianidina-3,5-diglicosideo	8.8 ± 0,4 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Petunidina-3,5-diglicosideo	68.0 ± 1,7 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Peonidina-3,5-diglicosideo	4.7 ± 0,7 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Malvidina-3,5-diglicosideo	32.0 ± 1,5 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Delfinidina acetil-diglicosideo	0.4 ± 0,0 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Petunidina 3-glicosideo	1.1 ± 0,0 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Malvidina 3-glicosideo	0.4 ± 0,1 mg cid 3-glu. 100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Proantocianidinas totais		
Metanol:água 7:3	4693 ± 79 mg ETQ.100 g ⁻¹	Correia et al. (2011)
Metanol:água 8:2	3,9±0,8 mg EAT.100 g ⁻¹	Faria et al. (2011)
Ácido elágico		
	3546,00 ± 3,0 mg.100 g ⁻¹	Zhang; Lin (2009)
	104,8 ± 0,4 mg.100 g ⁻¹	Correia et al. (2011)

MF: matéria fresca. MS: matéria seca. HCl: ácido clorídrico. EAG: equivalente de ácido gálico. EC: equivalente de catequina. EQ: equivalente de quercetina. Cid 3-glu: cianidina-3-glicosídeo. Agli: aglicona. ETQ: equivalente de tanino quebracho equivalente. EAT: equivalente de ácido tânico.

2.3.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos encontrados no jamelão incluem os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos (Figuras 3A e 3B), na forma livre ou conjugada com ésteres, glicosídeos e,

raramente com ácidos orgânicos (TAVARES et al., 2016). Os principais ácidos hidroxibenzóicos presentes no fruto são ácidos gálico e dihidroxibenzoico; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos presentes, incluem ácidos cafeico, p-cumárico, sinápico e ferúlico (HERCULANO et al., 2014; MARAN et al., 2014).

2.3.2 Antocianinas

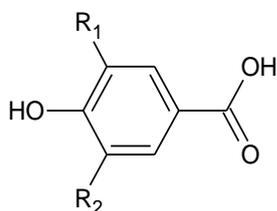
As principais antocianinas identificadas no fruto são 3,5-diglicosídeos derivados de delphinidina, petunidina, malvidina, cianidina e peonidina, sendo petunidina 3,5-diglicosídeo e delphinidina as antocianinas majoritárias no fruto (Figura 3C) (LESTARIO et al., 2017). Além da glicose, outros carboidratos ligados aos pigmentos antociânicos, como galactose, ramnose, xilose, manose e frutose também foram identificados. A característica não acilada das antocianinas do jamelão aumenta a sua instabilidade, tornando-as ponto crítico de controle de processamento (SAXENA et al., 2013).

2.3.3 Taninos

Os frutos do jamelão apresentam elevado conteúdo de taninos hidrolisáveis, especialmente elagitaninos e, de taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 3D) (TAVARES et al., 2016). A hidrólise dos elagitaninos libera o ácido elágico (Figura 3E), polifenol que exibe importante atividade anticarcinogênica e efeito contra radiação pelos raios gama (FJAERAA; NANBERG, 2009). A análise de proantocianidinas realizada por ressonância magnética nuclear associada à espectrometria de massas e análises por HPLC demonstrou que o polímero predominante em frutos de *S. cumini* é propelargonidina com (-)-epiafzelechina, como constituinte monomérico principal, ligados a grupos galoil, como 3-O-galato (ZHANG; LIN, 2009).

Figura 3 - Estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos (A), hidroxicinâmicos (B), antocianinas (C), monômeros e polímeros de flavon-3-ols(D) e ácido elágico (E)

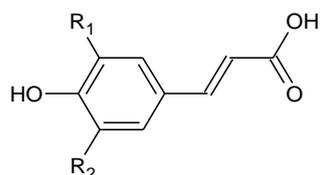
(A)



$R_1 = R_2 = \text{OH}$ (ácido gálico)

$R_1 = R_2 = \text{H}$ (ácido p-hidroxibenzoico)

(B)



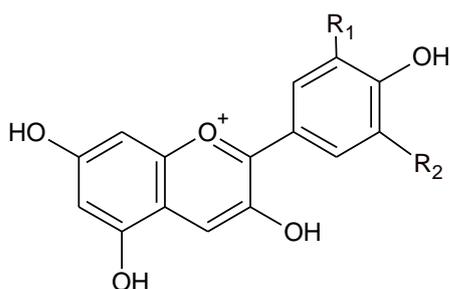
$R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$ (ácido cafeico)

$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$ (ácido ferúlico)

$R_1 = R_2 = \text{H}$ (ácido p-cumárico)

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ (ácido sinápico)

(C)



$R_1 = R_2 = \text{H}$ (pelargonidina)

$R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$ (cianidina)

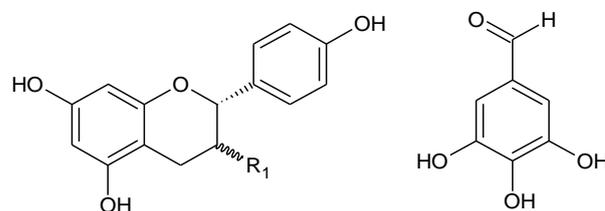
$R_1 = R_2 = \text{OH}$ (delfinidina)

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ (malvidina)

$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$ (peonidina)

$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$ (petunidina)

(D)



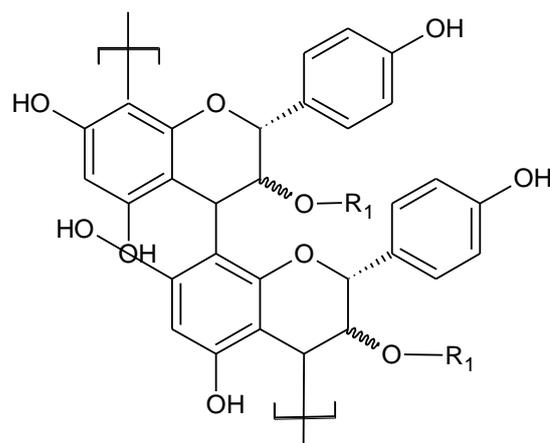
G: Grupo galoil

$R_1 =$ OH, afzelechina

$R_1 =$ OG, afzelechinagalato

$R_1 =$ OH, epiazelechina

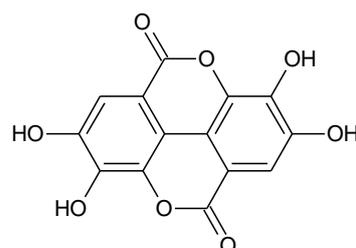
$R_1 =$ OG, epiazelechinagalato



Ligação C4-C8

$R_1 = \text{H, G}$; propelargonidina

(E)



Fonte: Adaptado de Angelo; Jorge (2007), Lopes et al. (2007) e Zhang; Lin (2009).

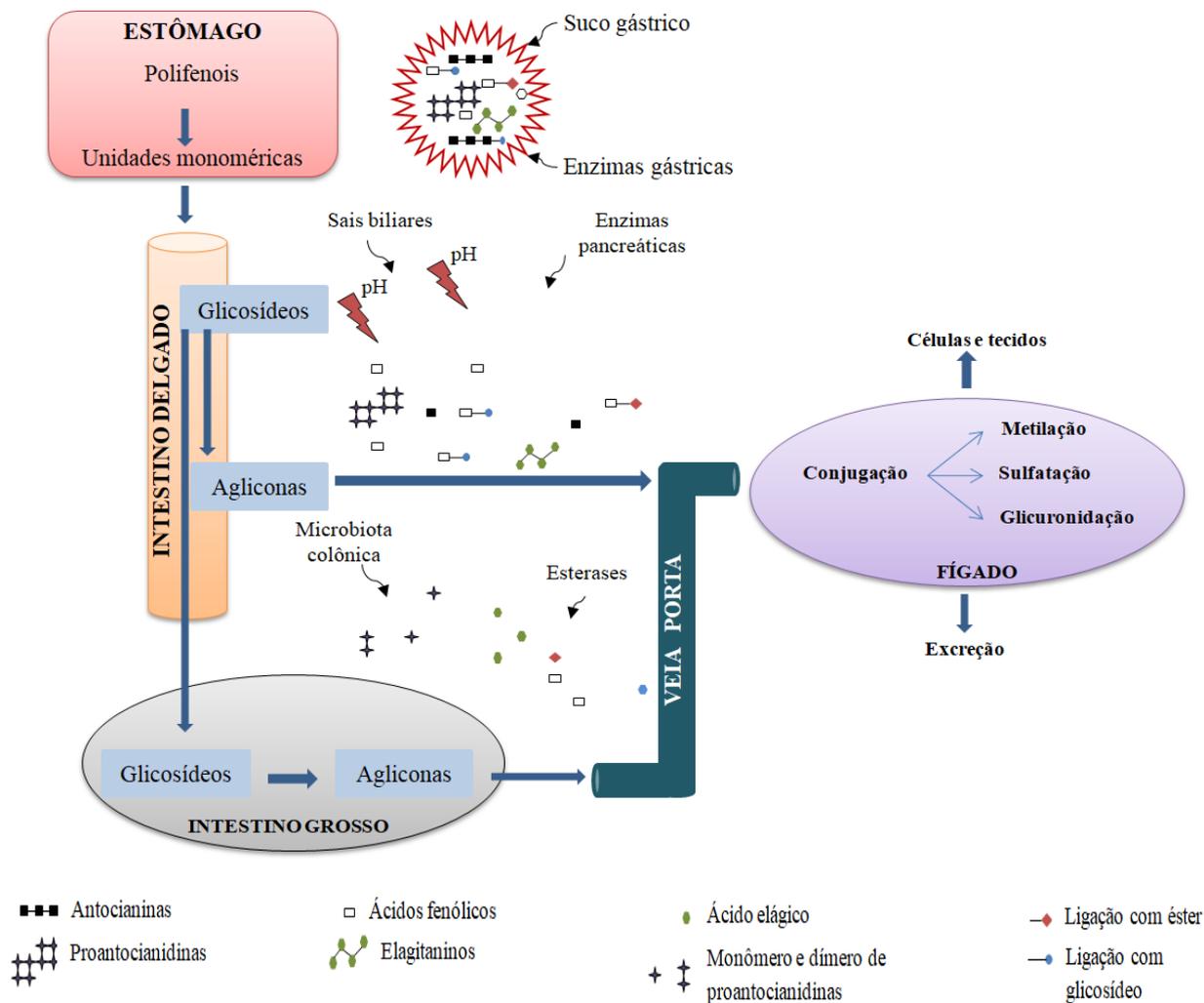
2.4 Biodisponibilidade de polifenóis

A bioatividade dos polifenóis depende da liberação desses da matriz alimentar, durante a digestão gastrointestinal (bioacessibilidade), onde são metabolizados por fluidos eletrolíticos e enzimas gástricas, intestinais, pancreáticas, hepáticas e pela microbiota; e da disponibilidade em diferentes órgãos e captação pelos enterócitos, transporte sistêmico e excreção (MARÍN et al., 2015).

Estrutura química, peso molecular e conjugação com outros compostos interferem diretamente no metabolismo e absorção dos polifenóis (MACIEJ et al., 2015). Agliconas são facilmente absorvidas pelo intestino delgado, no entanto, os polifenóis presentes na forma de ésteres ou polímeros devem ser clivados por enzimas intestinais ou microbiota, visto não serem absorvidos em sua forma nativa (WEICHSELBAUM; BUTTRISS, 2010). Assim, as variações interindividuais na absorção de polifenóis também estão relacionadas com as diferenças na composição da microbiota colônica (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Estudos relatam que após a absorção, polifenóis sofrem ação enzimática e são biotransformados da fase I e II até a fase III às formas O-sulfatadas, O-glicuronadas e O-metiladas (CARBONELL-CAPELLA, et al., 2014), catalisadas por sulfotransferases, UDP-glicotransferase e catecol-O-metiltransferase, respectivamente, no intestino delgado, fígado e rins (Figura 4) (CROZIER et al., 2009). Essas vias de conjugação são importantes no processo de detoxificação de drogas e substâncias xenobióticas, facilitando a eliminação biliar e urinária pelo aumento da hidrofilicidade dos compostos (KAUME et al., 2011).

Figura 4 - Liberação de polifenóis da matriz alimentar e absorção pela corrente sanguínea



Fonte: Adaptada de D'Archivio et al. (2010).

2.4.1 Ácidos fenólicos

O Ácido gálico é facilmente absorvido pelo trato intestinal, assim como flavonas, catequinas e glicosídeos de quercetina (MARTIN; APPEL, 2010). Outros ácidos como o clorogênico, quercetina-3-O-glicosídeo e p-cumárico podem ser absorvidos também pelo tecido estomacal (CHIANG et al., 2013).

Ensaio em animais com infusão gástrica *in situ* com ácidos hidroxicinâmicos isolados indicam que os ácidos ferúlico, p-cumárico e cafeico são absorvidos inicialmente pela mucosa gástrica, onde uma pequena parcela é absorvida intacta. Os ácidos não absorvidos no

estômago são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal proximal, enquanto os esterificados possuem sua absorção dificultada, devido à mucosa gastrointestinal não possuir esterases capazes de hidrolisá-los, o que reduz a eficiência da absorção no lúmen gástrico e intestino delgado (MANACH et al., 2004).

A absorção dos ácidos fenólicos e outros polifenóis ocorre por transporte paracelular, transcelular, transporte por endocitose e transporte ativo, mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos, presentes na mucosa gastrointestinal e em diversos tecidos corporais, podendo participar do transporte dos ácidos fenólicos em tecidos alvo (CARDINALI et al., 2013). O mecanismo de captação celular dos polifenóis também pode ser por difusão passiva, pois a concentração de polifenóis diminui durante a diálise por meio da membrana semipermeável de celulose (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

2.4.2 Antocianinas

As antocianinas não sofrem metabolismo extenso e, muitas vezes, aparecem na corrente sanguínea conjugadas, degradadas ou dimetiladas, como observado em ensaios com células Caco-2 (YI et al., 2006). Em geral, a bioabsorção desses polifenóis ocorre rapidamente após a ingestão, aparecendo no plasma 15 a 60 min pós-prandial, e excreção completa entre 6 e 8 h (GARCIA-ALONSO et al., 2009).

Sob condições *in vivo*, as antocianinas são absorvidas intactas a partir da mucosa gástrica, principalmente na forma glicosídica, e alcançam rapidamente o sistema circulatório, porém, as vias de distribuição para os tecidos ainda não são claras (MANACH et al., 2004). Algumas antocianinas não absorvidas no estômago são degradadas pelo pH encontrado no duodeno (YI et al., 2006). As resistentes a baixa acidez são clivadas pela microbiota colônica, produzindo ácidos fenólicos que são facilmente absorvidos (KAUME et al., 2011), no entanto, esses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos.

A biodisponibilidade das antocianinas é de aproximadamente 0,1% da quantidade ingerida. A limitação da absorção está associada com a alta polaridade e presença de múltiplos grupos hidroxila em sua estrutura (CARDONA et al., 2015). No entanto, os efeitos protetores à saúde, *in vitro* e *in vivo*, indicam que esses polifenóis são bioeficazes, visto que, em baixas concentrações, fornecem bons efeitos protetores contra o estresse oxidativo, indução à apoptose, inibição do crescimento e alterações na resposta inflamatória (SAXENA et al., 2013). Para aumentar a biodisponibilidade, compostos lipofílicos têm sido utilizados

para protegê-las contra degradação na barreira intestinal e aumentar sua absorção (McCLEMENTES, 2015).

Evidências anteriores sugerem que o mecanismo de transporte das antocianinas seja por difusão passiva, enquanto outros relatam que os flavonoides são absorvidos por ação de transportadores de glicose dependente de sódio (GEE et al., 1998; MANACH et al., 2005). Esses mecanismos de transporte que ocorrem no estômago e intestino delgado, não são considerados na simulação da digestão *in vitro* (BERMUDEZ-SOTO et al., 2007). Por este motivo, outros métodos devem ser desenvolvidos.

2.4.3 Taninos e ácido elágico

As proantocianidinas, devido ao alto peso molecular, são pobremente absorvidas, devendo ser clivadas em monômeros e dímeros antes da absorção (HACKMAN et al., 2008). Estudo com animais, demonstrou que após 48 h de incubação com microbiota colônica, proantocianidinas de 6 unidades foram degradadas em ácidos aromáticos de baixo peso molecular. Ácidos fenólicos com grupo m-hidroxifenil e ácidos não hidroxilados aromáticos atingiram valores estáveis após 24 h de incubação. Enquanto, os ácidos fenólicos com grupo p-hidroxifenil atingiram o máximo após 6 h de incubação e diminuíram para valores próximos de zero depois de 24 a 48 h (DEPREZ et al., 2000).

Os elagitaninos, por sua vez, são metabolizados pela microbiota intestinal e por enzimas digestivas, resultando em ácido elágico livre, dibenzopiranonas, urolitina A e análogos monohidroxilados de urolitina B, C e D, produzidos a partir do jejuno à parte distal do intestino (SHARMA et al., 2010). Isso sugere que as formas que alcançam a corrente sanguínea e tecidos sejam diferentes das presentes na alimentação, e qualquer benefício à saúde é mais provável que envolva os metabólitos em vez dos polifenóis originais, embora, estejam presentes em baixas concentrações (CARBONELL-CAPELLA, et al., 2014).

No fígado e intestino, o ácido elágico é metabolizado pelas vias de conjugação da urolitina A, vias de descarboxilação e dehidroxilação que clivam o anel lactona presente na estrutura, facilitando a absorção. No entanto, esses polifenóis são mais absorvidos quando aumentam sua lipofilicidade (McCLEMENTES, 2015).

2.5 Espécies reativas, radicais livres e estresse oxidativo/nitrosativo

Radicais livres são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons não-pareados nos orbitais externos. Esta configuração eletrônica os torna altamente instáveis e reativos, capazes de promover reações de óxido-redução e, atuar como receptores (redutores) ou doadores (oxidantes) de elétrons (LUSHCHAK, 2014). Além de reagir com outros radicais próximos à sua órbita externa, reagem com biomoléculas, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, produzindo espécies reativas radicalares e não radicalares (LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DIAZ, 2017).

As principais espécies reativas formadas são as que possuem reatividade centrada nos átomos de oxigênio e nitrogênio (ERON's). Essas espécies são geradas continuamente durante os processos fisiológicos e, em moderadas concentrações, atuam em vias de transdução de sinais em diversas reações bioquímicas; geração de ATP (energia) por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização de óvulos; ativação de genes; e participação em mecanismos de defesa durante processos de infecção (BARBOSA et al., 2010).

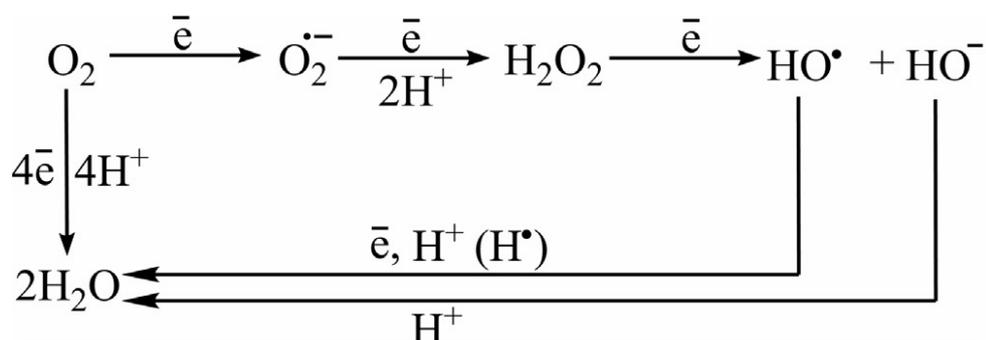
Os efeitos nocivos das ERON's são consequência da sua superprodução, diminuição da defesa antioxidante ou excesso de prooxidantes. Cada célula apresenta níveis específicos de oxidantes e antioxidantes e, o equilíbrio entre as taxas de produção de ERON's e de remoção determina a homeostase celular (PINGITORE et al., 2015). O desequilíbrio conduz à oxidação de biomoléculas, com consequente perda das funções biológicas, ocasionando dano potencial às células e tecidos. A cronicidade desse processo tem relevantes implicações sobre a etiologia de numerosas patologias não-transmissíveis (NOVO; PAROLA, 2012).

2.5.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são produzidas por diferentes fontes, como ionização, radiação UV, metabolismo de fármacos, íons metálicos e ação de enzimas oxidativas. No entanto, a principal via de formação dessas espécies ocorre na respiração mitocondrial (POLJSAK; DAHMANE; GODIC, 2012). Durante o processo de obtenção de energia, a enzima citocromo oxidase oxida quatro moléculas de citocromo *c*, presente em sua cadeia terminal, removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados à molécula de oxigênio, reduzindo-a a água (Figura 5). A ação da citocromo oxidase controla a

produção de radicais livres, impedindo o excesso, no entanto, aproximadamente 2% a 5% do oxigênio consumido são desviados para outra via metabólica e reduzidos de forma univalente, dando origem a espécies reativas como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LUSHCHAK, 2014).

Figura 5 - Redução tetravalente e univalente do oxigênio molecular



Fonte: Adaptada de Lushchak (2014).

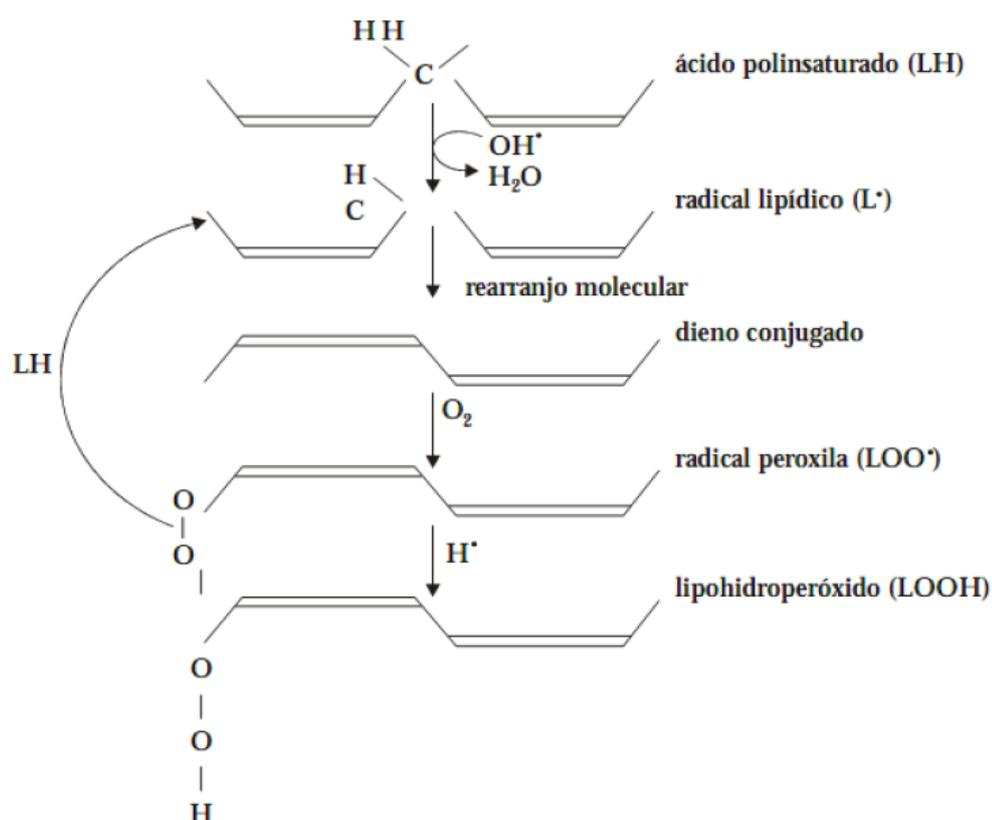
A produção das ERO's pode ser intensificada pela presença dos íons metálicos, que são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores dessas reações. A participação dos metais de transição ocorre nas reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à formação do radical HO^{\cdot} , por meio da reação do H_2O_2 com ferro, cobre, cromo, zinco, entre outros; na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical $O_2^{\cdot-}$, formando, também o HO^{\cdot} (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Sob condições fisiológicas, o organismo dispõe de eficiente sistema de proteínas plasmáticas e intracelulares, como transferrina, ferritina e ceruloplasmina, que mantêm o ferro e o cobre complexados, inibindo a oxidação de biomoléculas mediada por estes elementos. Entretanto, circunstâncias de elevada acidose tecidual podem levar à dissociação do composto proteína-ferro, favorecendo a formação de radicais reativos (BARBOSA et al., 2010).

O radical HO^{\cdot} é extremamente instável e considerado um dos mais deletérios ao organismo, com meia-vida de 10^{-9} s. Este radical é capaz de modificar bases purínicas e pirimidínicas, com conseqüente mutação do DNA. Além disso, pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e, iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DIAZ, 2017). Este é um fenômeno complexo, iniciado pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno posicionado entre duas bandas insaturadas na

molécula lipídica, formando os radicais livres alcoxila (LO^\bullet), peroxila (LOO^\bullet) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (Figura 6) (CAMPOS; YOSHIDA, 2004). Vale ressaltar que os íons férricos ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais livres, que por serem potencialmente reativos, iniciam nova cadeia de reações, podendo ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Figura 6 - Peroxidação lipídica dos ácidos graxos presentes na membrana celular



Fonte: Adaptada de Campos; Yoshida (2004).

Outra importante fonte geradora de ERO's são as enzimas NADPH oxidases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases). Essas se referem a proteínas transmembrana que possuem a função de transferir elétrons por meio das membranas celulares. Geralmente, o aceptor de elétrons é o oxigênio e, em decorrência do processo, gera-se o radical O_2^\bullet (STEINBACHER; ECKL, 2015).

2.5.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

As ERN's compreendem espécies químicas derivadas do óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), como óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Essas espécies, quando em excesso, atuam com as ERO's danificando a célula e causando estresse nitrosativo (RIBEIRO et al., 2015).

O $\cdot\text{NO}$ é produzido em tecidos biológicos por enzimas óxido nítrico sintases, que metabolizam arginina em citrulina, por meio de reação oxidativa de cinco elétrons. É um radical livre com meia-vida de apenas alguns segundos em ambiente aquoso; estável quando em baixas concentrações de oxigênio; e difunde-se facilmente pelo citoplasma e membranas plasmáticas. Esse radical é reativo, com importante função de sinalização biológica oxidativa em processos de neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento muscular liso e regulação do sistema imune (VALKO et al., 2007).

Apesar de reativo, o $\cdot\text{NO}$ não ataca o DNA diretamente, porém, ao reagir com o ânion superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, gera os peroxinitritos ONOO^- , que sofrem reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e bases nitrogenadas do DNA. As reações do óxido nítrico para a nitração de biomoléculas podem ser catalisadas por metais de transição e presença do tampão CO_2/HCO_3 (RIBEIRO et al., 2015).

Outras biotransformações do $\cdot\text{NO}$ formam NO_3^- e NO_2^- . Os nitritos reagem com ácidos gástricos gerando HNO_2 , que também pode ser formado pela reação de N_2O_3 com a água. O HNO_2 promove a desaminação das bases nitrogenadas do DNA que contêm grupo $\cdot\text{NH}_2$ livre, como citosina, adenina e guanina, transformando-as em uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

2.5.3 Mecanismos de proteção contra as ERON's

Sob condições fisiológicas, o organismo dispõe de um integrado sistema de defesa antioxidante, que inclui elementos enzimáticos e não enzimáticos, para proteger células e tecidos dos efeitos deletérios de diferentes espécies reativas (LUSHCHAK, 2014). Esse sistema de defesa antioxidante é classificado como preventivo, *scavenging* e reparador. Na ação preventiva, evita-se a formação de espécies reativas; na ação *scavenging* ou de "limpeza", removem-se essas espécies, antes que as mesmas ataquem moléculas biológicas; e na reparadora, atuam na reparação dos danos causados, neutralizando resíduos e auxiliando na

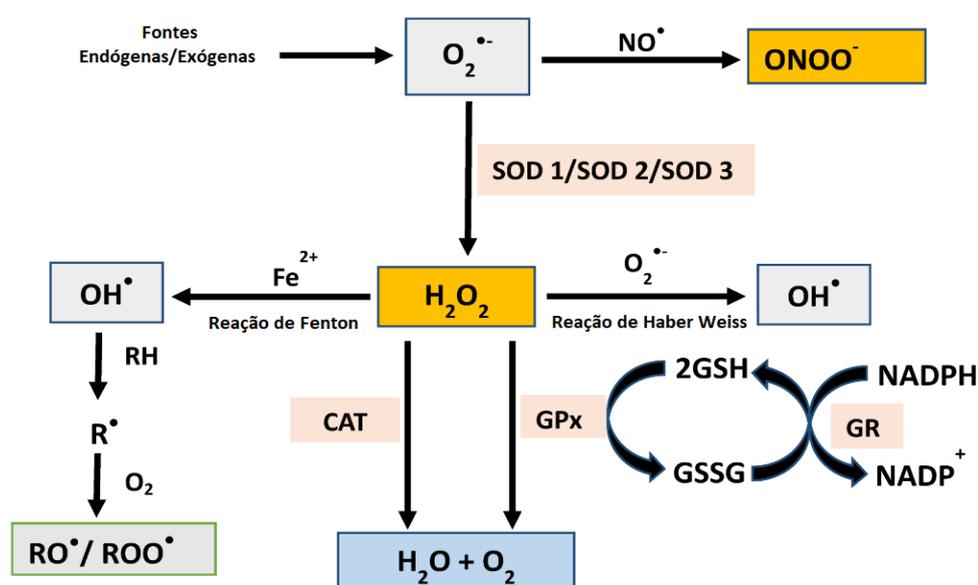
recuperação das funções biológicas (NIKI, 2010).

Vale ressaltar que o potencial antioxidante desse sistema de defesa depende da estrutura química dos compostos, capacidade de deslocamento do radical formado; habilidade em quelar metais de transição implicados no processo oxidativo, biodisponibilidade, concentração ingerida, concentração plasmática ideal e acesso ao local de ação, dependendo de sua polaridade, de seu coeficiente de partição e da (MANACH et al., 2004).

2.5.3.1 Enzimas antioxidantes

O sistema de defesa enzimático inclui várias enzimas, entre elas destacam-se superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 7). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de espécies reativas envolvidas com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010).

Figura 7 - Sistema enzimático de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio



Fonte: Adaptada de Ajuwon et al. (2015).

A SOD apresenta-se nas células eucariotas nas isoformas cobre/zinco-dependente (Cu/Zn-SOD) e manganês-dependente (Mn-SOD). Embora Cu/Zn-SOD seja encontrada nos fluidos extracelulares, sua maior atividade é no citosol celular, sendo sua atividade inalterada pelo estresse oxidativo. A Mn-SOD localiza-se estrategicamente no interior da mitocôndria, sítio de ativação da produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), devido a isso, sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. Ambas as isoformas de SOD catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LUSHCHAK, 2014).

A decomposição do $O_2^{\cdot-}$ ocorre naturalmente, porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$, de forma que há necessidade de maior concentração desse radical. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação da enzima permite a eliminação do $O_2^{\cdot-}$, mesmo em baixas concentrações (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. A catalase decompõe H_2O_2 a oxigênio molecular e água. Está presente abundantemente no corpo, porém, possui maior atividade ocorre no fígado, eritrócitos e pulmões. Por meio da eliminação do H_2O_2 , previne a formação do radical hidroxila, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (STEINBACHER; ECKL, 2015).

A GPx é uma seleno proteína que catalisa a decomposição de H_2O_2 ou um hidroperóxido (ROOH) à água, em um processo dependente da oxidação da glutathiona. Sua ação envolve a adição de dois elétrons, reduzindo os peróxidos e formando selenois (Se-OH). Dessa forma, eliminam-se os peróxidos, potenciais substratos para reação de Fenton (VALKO et al., 2007).

A glutathiona oxidase (GSSG) possui ação oxidante devido à ligação dissulfeto de sua estrutura. Assim a glutathiona redutase (GR) é de extrema importância para o sistema de defesa antioxidante, já que catalisa a redução da GSSG à glutathiona reduzida (GSH) (BARBOSA et al., 2010).

2.5.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui compostos provenientes da dieta como vitaminas, carotenoides, minerais e polifenóis e, antioxidantes biológicos como

bilirrubina, ubiquinona e ácido úrico (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Esses compostos reagem com radicais livres, formando radicais estáveis e incapazes de propagar reações oxidativas, ou modulam as enzimas antioxidantes.

O α -tocoferol, precursor da vitamina E, é o principal antioxidante lipossolúvel presente em membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas. Atua na interrupção de reações em cadeia de peroxidação lipídica e reage diretamente com o ânion superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete (FENG et al., 2010). A função antioxidante do α -tocoferol é exercida por meio da transferência do hidrogênio fenólico à espécie reativa; o composto oxidado, o α -tocoferoxil, pode funcionar como agente pró-oxidante, porém de fraca reatividade. O tocoferol é capaz de reagir com dois radicais peroxila, desativando-o. A sua regeneração sinérgica ocorre com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

O ácido ascórbico (vitamina C), amplamente distribuído nos meios intra e extracelular na forma ascobarto, consiste em importante antioxidante citosólico. Reage diretamente com os radicais superóxido, hidroxila e oxigênio singlete, interrompendo a propagação do processo peroxidativo e eliminando produtos de peroxidação genotóxicos (McCUSKER et al., 2016). O potencial antioxidante da vitamina C ocorre por meio da doação de átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas ligados a seu anel. Entretanto, a presença de metais de transição, possibilita sua ação oxidante, produzindo espécies reativas como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (BARBOSA et al., 2010).

O β -caroteno, precursor da vitamina A, está presente nas membranas celulares, devido sua característica lipofílica e, representa o mais eficaz neutralizador de oxigênio singlete em condições de hipóxia tecidual. Esse carotenóide também é capaz de reagir diretamente com os radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e moléculas lipídicas (ROEHRS et al., 2017).

A participação dos minerais cobre, zinco, manganês e selênio no sistema de proteção antioxidante ocorre de maneira indireta, uma vez que, esses minerais não são ativos em reações de óxido-redução. Porém, são elementos essenciais e cofatores das enzimas SOD e GPx, sem os quais não desempenham suas atividades de dismutação e conversão de espécies reativas (SAHIN et al., 2017).

A glutationa (δ -glutamil-cistenil-glicina, GSH) é o tiol protéico encontrado em muitos tecidos, compartimentos celulares e subcelulares. Protege contra o dano oxidativo por reagir com espécies reativas; restaurar moléculas lesadas, cedendo-lhes hidrogênio; estabilizar a estrutura das membranas, pela eliminação dos peróxidos formados; e, manter os grupos tiois

das proteínas em sua forma reduzida. Além disso, a GSH atua como substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras, como GPx e glutathione transferase e, como agente redutor, reciclando o ácido ascórbico de sua forma oxidada à sua forma reduzida, reação essa mediada pela enzima desidroascorbato redutase (NAHT et al., 2016).

A bilirrubina atua protegendo a peroxidação dos ácidos graxos ligados à albumina. A ubiquinona (Coenzima Q) em sua forma reduzida, ubiquinol, é antioxidante efetivo em membranas extramitocondriais. Outra importante função da ubiquinona é a regeneração do α -tocoferol na membrana mitocondrial, onde exerce a mesma função regenerativa que o ascorbato na membrana celular (SOHAL; FORSTER, 2007).

O ácido úrico, produto final do metabolismo de nucleotídeos em seres humanos, apresenta-se, em pH fisiológico, como urato. Esse metabólito, pode se unir a íons metálicos, inibindo a reação de Fenton e, agir como antioxidante seletivo contra radical hidroxila, ácido hipocloroso, radical peroxila e óxido nítrico. O urato também é capaz de recuperar estruturas já atacadas, que se tornaram radicais livres, através da doação de um elétron e um próton e, responsável pela estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Ceruloplasmina, lactoferrina, ferritina, transferrina e albumina são substâncias que exercem sua ação antioxidante, inviabilizando a participação dos metais de transição em reações que resultam na formação de radicais livres. Estes compostos atuam como quelantes desses metais, não permitindo a participação dos mesmos na produção dessas espécies reativas (BARBOSA et al., 2010).

Os polifenóis, cuja principal característica é a presença de vários grupos hidroxilas ligados a anéis aromáticos, também atuam como antioxidantes. Compreendem milhares de compostos, que são classificados segundo a composição em anéis fenólicos e os elementos estruturais que unem estes anéis uns aos outros. Entre as classes de polifenóis estão as lignanas, os ácidos fenólicos e os flavonóides. Consistem em potenciais agentes redutores, cujas propriedades antioxidantes estão essencialmente envolvidas com o número e o padrão de disposição de seus grupamentos hidroxila, além de outras características estruturais de seus anéis (MANACH et al., 2004).

O jamelão é rico em compostos fenólicos, em especial antocianinas, que proporcionam ação antidiabética, antioxidante, anti-hiperlipidêmica, antiulcerativa, hepatoprotetora, antialérgica, neuroprotetora, antipirética, anti-inflamatória, antiartrítica, antibacteriana, radioprotetora, entre outras (SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013). Dentre essas propriedades,

destaca-se a capacidade antioxidante, pois as demais ações farmacológicas estão correlacionadas com a capacidade de sequestro de radicais livres ou quelação de metais.

A capacidade antioxidante dos frutos do jamelão tem sido avaliada pelos ensaios DPPH, ABTS, FRAP, atividade sobre o radical hidroxila e ânion superóxido e, branqueamento do β -caroteno. Os resultados demonstraram que o fruto exerce efeito *scavenger* sobre todos os radicais livres, inibe a oxidação do β -caroteno e reduz o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}). A capacidade de neutralizar os radicais livres e reduzir Fe^{3+} ocorre pela doação do átomo hidrogênio do grupo hidroxila do polifenol, que converte os grupos fenólicos em radicais livres estáveis, impedindo o início ou propagação da oxidação lipídica (AFIFY et al., 2011).

Além disso, os polifenóis do fruto melhoram o sistema antioxidante sanguíneo por sequestrar radicais hidroxila ($r=0,098$) e ânion superóxido ($r=0,099$), e modular enzimas antioxidantes, minimizando o estresse oxidativo (BANERJEE et al., 2005). O extrato aquoso da polpa é capaz de recuperar o conteúdo de GSH e GPx em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (REKHA; BALAJI; DEECARAMAN, 2008). O extrato etanólico da polpa, além de recuperar GSH, aumenta a atividade da SOD em ratos com hepatotoxicidade induzida por paracetamol (DAS; SHARMA, 2009).

Com base nesse referencial teórico, acredita-se que as antocianinas e demais polifenóis, presentes no jamelão, possam minimizar o estresse oxidativo, prevenindo-o, reparando danos e reduzindo espécies reativas formadas durante processos fisiológicos, com importante potencial de aplicação na saúde humana.

Referências

- AFIFY, A. E. M. R.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A.; EL-SHEMY, H. A. *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5, 948-958, 2011.
- AJUWON, O. R.; MARNEWICK, J. L.; DAVIDS, L. M. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and its major flavonoids – potential against oxidative stress-induced conditions, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress, Dr. Sivakumar Joghi Thatha Gowder (Ed.), 2015. InTech, DOI: 10.5772/61614. Available from: <https://www.intechopen.com/books/basic-principles-and-clinical-significance-of-oxidative-stress/rooibos-aspalathus-linearis-and-its-major-flavonoids-potential-against-oxidative-stress-induced-cond>. Acesso em: 25/05/2017.
- ALI, R. F. M. Antioxidative effects of pomposia extract, on lipid oxidation and quality of ground beef during refrigerated storage. **American Journal of Food Technology**, 6, 52-62, 2011.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1-9, 2007.
- ATALE, N.; GUPTA, K.; RANI, V. Protective effect of *Syzygium cumini* against pesticide-induced cardiotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 7956–7972, 2014.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUO, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426-436, 2013.
- BACHIR BEY, M.; MEZIAN, L.; BENCHIKH, Y.; LOUAILECHE, H. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dried dark fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. **International Food Research Journal**, 21, 1477-1482.
- BALIGA, M. S. Anticancer, Chemopreventive and Radioprotective Potential of Black Plum (*Eugenia Jambolana* Lam.). **Asian pacific journal of cancer prevention**, 12, 3-15, 2011.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N. DE, B. *In vivo* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, 90, 727-733, 2005.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23, 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.
- BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 87, 2560-2569, 2007.
- BERMÚDEZ-SOTO, M. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M. J. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, 102, 865-74, 2007.

- BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; SPERONI, C. S.; GIUSTI, M. M.; GODOY, H. T. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, 164, 347-354, 2014.
- BORGES, K. C.; AZEVEDO, J. C.; MEDEIROS, M. D. E. F.; CORREIA, R. T. P. Physicochemical characterization and bioactive value of tropical berry pomaces after spouted bed drying. **Journal of Food Quality**, 39, 192-200, 2016.
- BRANDÃO, T. S. O.; SENA, A. R.; TESHIMA, E.; DAVID, J. M.; ASSIS, S. A. Changes in enzymes, phenolic compounds, tannins, and vitamin C in various stages of jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) development. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 849-855, 2011.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Commentary: oxidative stress reconsidered. **Genes Nutrition**, 4, 161-163, 2009.
- CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, 3, 357-366, 2004.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13, 155-171, 2014.
- CARDINALI, A.; ROTONDO, F.; MINERVINI, F.; LINSALATA, V.; D'ANTUONO, I.; DEBELLIS, L.; FERRUZZI, M. G. Assessment of verbascoside absorption in human colonic tissues using the ussing chamber model. **Food Research International**, 54, 132-138, 2013.
- CARDONA, J. A.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; TALCOTT, S. T. Phospholipids and terpenes modulate Caco-2 transport of açai anthocyanins. **Food Chemistry**, 175, 267-272, 2015.
- CHIANG, C. J.; KADOUH, H.; ZHOU, K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. **LWT – Food Science and Technology**, 51, 417-422, 2013.
- COELHO, E. M.; AZEVÊDO, L. C. D. E.; CORRÊA, L. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; DOS, M.; LIMA, S. Phenolic profile, organic acids and antioxidant activity of frozen pulp and juic of the jambolan (*Syzygium cumini*). **Journal of Food Biochemistry**, 40, 211-219, 2016.
- CORREIA, R. T. P.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, 18, 539-547, 2011.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, 26, 1001-1043, 2009.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Istituto Super Sanità**, 43, 348-361, 2007.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, 11, 1321-1342, 2010.

- DAS, S.; SHARMA, G. Study of the hepatoprotective activity of the ethanolic extract of the pulp of *Eugenia jambolana* (Jamun) in albino rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 3, 1466-1474, 2009.
- DÉPREZ, S.; BREZILLON, C.; RABOT, S.; PHILIPPE, C.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; SCALBERT, A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. **Journal of Nutrition**, 130, 2733–2738, 2000.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571-1578, 2011.
- FJAERAA, C.; NÅNBERG, E. Effect of ellagic acid on proliferation, cell adhesion and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Biomedical Pharmacotherapy**, 63, 254-261, 2009.
- FRAUCHES, N. S.; AMARAL, T. O.; LARGUEZA, C. B. D. L.; TEODORO, J. T. Brazilian *Myrtaceae* fruits: A review of anticancer proprieties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, 12, 2231-2919, 2016.
- GARCIA-ALONSO, M.; MINIHANE, A. M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J. C.; DE PASCUAL-TERESA, S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 20, 521-529, 2009.
- GEE, J. M.; DUPONT, M. S.; RHODES, M. J. C.; JOHNSON, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, 25, 19-25, 1998.
- HACKMAN, R. M.; POLAGRUTO, J. A.; YANZHU, Q.; SUN, B.; FUJII, H.; KEEN, C. L. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, 7, 195-208, 2008.
- HERCULANO, E. A.; COSTA, C. D. F.; RODRIGUES, A. K. B. F.; ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; SANTANA, A. E. G.; FRANÇA, P. H. B.; GOMES, E. A.; SALVADOR, M. J.; MOURA, F. B. P.; RIBEIRO, E. A. N. Evaluation of cardiovascular effects of edible fruits of *Syzygium cumini* Myrtaceae (L) Skeels in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 13, 1853-1861, 2014.
- INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVOREDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, A. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.
- JAISSWAL, S. G.; PATEL, M.; NAIK, S. N. Physico-chemical properties of *Syzygium cumini* (L.) Skeels jam and comparative antioxidant study with other fruit jams. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 6, 9-15, 2015.
- KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 5716-5727, 2011.
- LESTARIO, L. N.; HOWARD, L. R.; BROWNMILLER, C.; STEBBINS, N. B.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). **Food Research International**, 100, 385-391, 2017.

- LOPES, T. F.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira de Agrociência*, 13, 291-297, 2007.
- LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: the redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 133, 379-402, 2017.
- LUSHCHAK, V. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175, 2014.
- MACIEJ, J.; SCHAFF, C. T.; KANITZ, E.; TUCHSCHERER, A.; BRUCKMAIER, R. M.; WOLFFRAM, S.; HAMMON, H. M. Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin. *Journal of Dairy Science*, 98, 3906-3917, 2015.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747, 2004.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉS, Y. C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230-242, 2005.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruits pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1938-1946, 2014.
- MARÍN, L.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015, 1-19, 2015.
- MARTIN, K. R.; APPEL, C. L. Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 1-12, 2010.
- McCLEMENTES, D. J. Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. *Journal of Food Science*, 80, 1602-1611, 2015.
- McCUSKER, M. M.; DURRANI, K.; PAYETTE, M. J.; SUCHECKI, J. An eye on nutrition: The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clinics in Dermatology*, 34, 276-285, 2016.
- MUSSI, L. P.; GUIMARÃES, A. O.; FERREIRA, K. S.; PEREIRA, N. R. Spouted bed drying of jambolão (*Syzygium cumini*) residue: drying kinetics and effect on the antioxidant activity, anthocyanins and nutrients contents. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 80-88, 2015.
- NATH, M.; BHATT, D.; PRASAD, R.; GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-arbuscular mycorrhizal and *piriformospora indica* interaction under stress condition. *Frontier in Plant Science*, 7, 1-7, 2016.
- NDYOMUGYENYI, E. K.; OKOT, M. W.; MUTETIKKA, D. Production and availability of Jack fruit (*Artocarpus heterophyllus*) and Java Plum (*Syzygium cumini*) beans for livestock

- feeding in Eastern and Central Regions of Uganda. **Livestock Research for Rural Development**, 26, 1-11, 2014.
- NIKI, E. Assesment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free radical Biology and medicine**, 49, 503-515, 2010.
- NOOMRIO, M. H.; DAHOTO, M. U. Nutritive value of *Eugenia jambosa* fruit. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, 9, 9–12, 1996.
- NOVO, E.; PAROLA, M. The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis and Tissue Repair**, 5, (Suppl 1):S4, 2012.
- OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, 34, 1051-1056, 2013.
- OLIVEIRA, É. R.; CALIARI, M.; SOARES, M.; JÚNIOR, S.; VALÉRIO, E.; VILAS, D. B. Bioactive composition and sensory evaluation of blended jambolan (*Syzygium cumini*) and sugarcane alcoholic fermented beverages. **Institute of Brewing and Distilling**, 122, 719-728, 2016.
- PAUL, D. K.; SHAHA, R. K. Nutrients, vitamins and mineral content in common citrus fruits in the northern region of Bangladesh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 7, 232-242, 2004.
- PINGITORE, A.; LIMA, G. P. P.; MASTORCI, F.; QUINONES, A.; LERVASI, G.; VASSALE, G. Exercise and oxidative stress: potencial effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, 31, 916-922, 2015.
- POLJSKAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIC, A. Intrinsic skin agins: the role of oxidative stress. **Acta Dermatovenerologica**, 21, 1-4, 2012.
- PRIYADARSHANI, A. M. B. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, 1710-1717, 2017.
- REKHA, N.; BALAJI, R.; DEECARAMAN, M. Effect of aqueous extract of *Syzygium cumini* Pulp on antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, 7, 137-145, 2008.
- RIBEIRO, A. B.; BERTO, A.; CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M. VISENTAINER, J. V.; FERNANDES, E. Bioactives compounds and scavenging capacity of extracts from different parts of *Vismia cauliflora* against reactive oxygen and nitrogen species. **Pharmaceutical Biology**, 1, 1-10, 2015.
- ROEHRS, M.; CONTE, L.; DA SILVA, D. T. DUARTE, T.; MAURER, L. H.; DE CARVALHO, J. A. M.; MORESCO, R. N.; SOMACAL, S.; EMANUELLI, T. Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**, 100, 771-779, 2017.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 121, 996-1002, 2010.
- RYDLEWSKI, A. A.; MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; CLAUS, T.; VAGULA, J. M.; SILVA, M. C.; SANTOS JUNIOR, O. O.; VISENTAINER, J. V. Bioactive compounds, antioxidant capacity, and fatty acids in different parts of four unexplored fruits. **Journal of Food Quality**, 2017, 1-10, 2017.

- SAHIN, Z.; OZKAYA, A.; YILMAZ, O.; YUCE, A.; GUNES, M. Investigation of the role of α -lipoic acid on fatty acids profile, some minerals (zinc, copper, iron) and antioxidant activity against aluminum-induced oxidative stress in the liver of male rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 28, 355-361, 2017.
- SANTANA, R. F.; OLIVEIRA NETO, E. R.; SANTOS, A. V.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; CARDOSO, J. C. Water sorption isotherm and glass transition temperature of freeze-dried *Syzygium cumini* fruit (jambolan). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 120, 519-524, 2015.
- SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A. C. M. S.; PEIXOTO, F. M.; BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M.; NOGUEIRA, R. I. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. **Fruits**, 71, 3-8, 2016.
- SARI, P.; WIJAYA, C. H.; SAJUTHI, D.; SUPRATMAN, U. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, 132, 1908-1914, 2012.
- SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Comparative evaluation of antimutagenicity of commonly consumed fruits and activity-guided identification of bioactive principles from the most potente fruit, java plum (*Syzygium cumini*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 10033-10042, 2013.
- SHAD, A. A.; AHMAD, S.; ULLAH, R.; ABDEL-SALAM, N. M.; FOUAD, H.; REHMAN, N. U.; HUSSAIN, H.; SAEED, W. Phytochemical and biological activities of four wild medicinal plants. **The Scientific World Journal**, 2014, 1-7, 2014.
- SHAHNAWAZ, M.; SHEIKH, S. A.; NIZAMANI, S. M. A Study on the determination of mineral elements in jamun fruit (*Eugenia jambolana*) products. **Pakistan Journal of Nutrition**, 11, 181-186, 2012.
- SHAHNAWAZ, M.; SHEIKH, S. A.; NIZAMANI, S. M. Determination of nutritive values of jamun fruit (*Eugenia jambolana*) Products. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, p. 1275–1280, 2009.
- SHARMA, M.; LI, L.; CELVER, J.; KILLIAN, C.; KOVOOR, A. SEERAM, N. P. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 3965-3969, 2010.
- SINGH, J. P.; KAUR, A.; SHEVKANI, K.; SINGH, N. Influence of jambolan (*Syzygium cumini*) and xanthan gum incorporation on the physicochemical, antioxidant and sensory properties of gluten-free eggless rice muffins. **International Journal of Food Science and Technology**, 50, 1190-1197, 2015.
- SOHAL, R. S.; FORSTER, M. J. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. **Mitochondrion**, 7, 103-111, 2007.
- SOUSA, M. M. **Bioacessibilidade, capacidade antioxidantes e efeitos toxicogénicos de polifenóis do jamelão e aplicação biotecnológica do fruto**. Teresina, 2018. 177 p. Tese – Universidade Federal do Piauí.
- SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; SILVA, T. L. T.; OLIVEIRA, L.; PIO, R. QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of

Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food chemistry**, 156, 362-368, 2014.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93, 2084-2093, 2013.

STEINBACHER, P.; ECKL, P. Impacto f oxidative stress on exercising skeletal muscle. **Biomolecules**, 5, 356-377, 2015.

TAVARES, I. M. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉR, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, 82, 1-13, 2016.

U.S. Department of Agriculture (USDA) national nutrient database for standard reference. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em: 23/01/2018.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D. MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 39, 44-84, 2007.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* skeels. **Food Chemistry**, 105, 619-627, 2007.

WEICHSELBAUM, E.; BUTTRISS, J. L. Polyphenols in the diet. **Nutrition Bulletin**, 35, 157-164, 2010.

YI, W.; AKOH C. C.; FISCHER, J.; KREWER, G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5651-5658, 2006.

ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **African Journal of Biotechnology**, 8, 2301-2309, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a bioacessibilidade, ação antioxidante e efeitos toxicogénicos de polifenóis do jamelão e aplicação biotecnológica do fruto.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o estado da arte sobre a aplicação do jamelão no desenvolvimento de novos produtos.
- Otimizar método de extração de polifenóis e atividade antioxidante no jamelão.
- Identificar os principais polifenóis no extrato otimizado do jamelão.
- Avaliar a toxicogénica dos polifenóis do jamelão, em *Artemia salina* e em raízes meristemáticas de *Allium cepa*.
- Analisar a bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos no jamelão e verificar a ação antioxidante em cada etapa do processo digestivo.
- Identificar os principais polifenóis nas diferentes fases da simulação da digestão *in vitro*.
- Avaliar a resposta ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio em linhagens proficientes e mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Desenvolver um novo produto à base do jamelão que agregue benefícios à saúde e valor de mercado ao fruto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta tese estão apresentados na forma de capítulos, conforme discriminado abaixo:

- **Capítulo 1:** Utilização do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) na indústria de alimentos: Uma revisão sobre aplicações tecnológicas.
- **Capítulo 2:** Otimização multi-resposta do sistema de solventes para extração de polifenóis e atividade antioxidante na polpa do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).
- **Capítulo 3:** Atividade antioxidante e efeitos toxicogénicos de biopolifenóis do extrato aquoso do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).
- **Capítulo 4:** Polifenóis bioacessíveis do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels): Identificação por HPLC-MS, ação antioxidante e modulação da atividade de enzimas em modelos com *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Capítulo 5:** Processo de extração e fabricação do suco tropical de jamelão utilizando polissacarídeos para redução da adstringência.

Capítulo 1

Utilização do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) na indústria de alimentos: Uma revisão sobre aplicações tecnológicas

**Utilização do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) na indústria de alimentos: Uma
revisão sobre aplicações tecnológicas**

Mariana de Moraes Sousa^a, Alessandro de Lima^a, Nadir do Nascimento Nogueira^{b*}

*^aDepartamento de Hospitalidade, lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí,
Teresina Zona Sul Campus, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: mariana@ifpi.edu.br;
alessandro@ifpi.edu.br*

*^eDepartamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio
Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: nadirn@uol.com.br*

*Autor correspondente

Rua São Pedro, 3274, Apto 704, Ed. Palazzo Poty

CEP: 64001-260, Teresina, Piauí, Brasil

Phone: + 55 86 3222 6923 / + 55 86 99986 0648

Fax: + 55 86 3215 5690

E-mail: nadirn@uol.com.br

RESUMO

O Brasil possui frutos exóticos com potencial para aplicação na agroindústria, porém ainda subaproveitados quanto a esse aspecto, e na sua utilização com vistas ao desenvolvimento econômico e social. Dentre os frutos, destaca-se o jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), rico em nutrientes essenciais e em compostos bioativos com ação antioxidante. A pesquisa objetivou avaliar aspectos tecnológicos de conservação e aplicação do fruto no desenvolvimento de novos produtos. Para revisão científica, Web of Science, Medline/PUBMED, Cochrane Library, Scopus, Science Direct e Scielo foram analisadas, de janeiro/2006 à dezembro/2017, empregando os termos “*Syzygium cumini*”, “*Eugenia jambolana*”, “*jambolan*”, “*jamun*” or “*java plum*”. Para revisão tecnológica, as bases de dados analisadas foram WIPO, Espacenet, USPTO e INPI. A partir desse levantamento, 23 artigos e 20 patentes foram selecionados para construção da revisão. As características químicas, nutricionais e fitoquímicas do fruto favorecem o consumo *in natura*, bem como a elaboração de sucos, néctares, geléias, bebidas alcoólicas e especiarias. Assim, ações que busquem inovações tecnológicas capazes de minimizar perdas pós-colheita e favorecer o aproveitamento do fruto, preservando nutrientes e biopolifenóis devem ser estimuladas na perspectiva do consumo e benefícios à saúde.

Palavras-chave:

Jamelão
Processamento
Bebidas alcoólicas e não alcoólicas
Especiarias.

1. Introdução

Frutos tropicais são reconhecidos pelo seu valor nutricional e propriedades terapêuticas em diversas patologias. Os benefícios à saúde têm sido relacionados à presença de polifenóis com reconhecida ação antioxidante, capazes de neutralizar radicais livres, minimizando o estresse oxidativo (SAIDANI et al., 2017). Devido a essas propriedades, frutos nativos e exóticos da América do Sul têm sido pesquisados nos últimos anos (BORGES et al., 2016).

Syzygium cumini (L.) Skeels, popularmente conhecido como jamelão ou azeitona roxa, é nativo da Índia, mas largamente cultivado na região tropical e subtropical do Brasil (SEHWAG; DAS, 2016). O fruto contém excelentes características nutricionais, sendo fonte de vitaminas, com destaque para vitamina C, carboidratos e ácidos graxos essenciais (COELHO et al., 2016; RYDLEWSKI et al., 2017). É rico em polifenóis, como flavonoides e ácidos fenólicos (TAVARES et al., 2016). Também possui taninos hidrolisáveis e condensados, responsáveis pela adstringência, e antocianinas 3,5-diglicosiladas, responsáveis pelas propriedades antioxidante e anti-carcinogênica (BRANCO et al., 2016).

Os efeitos antioxidantes e propriedades farmacológicas do fruto do jamelão têm sido demonstrados *in vitro* (RYDLEWSKI et al., 2017), *in vivo* (LI et al., 2017) e em cultura de células (EL-ANANY; ALI, 2013). Devido à capacidade antioxidante elevada e seus benefícios à saúde, o fruto, além do seu consumo *in natura*, tem sido empregado na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos. Apesar do seu potencial comercial, no Brasil, os frutos são subaproveitados para esses fins (SANTIAGO et al., 2016).

A pesquisa objetivou avaliar o potencial tecnológico para o desenvolvimento de novos produtos à base do jamelão. Para isso, reuniu informações disponíveis na literatura sobre aspectos tecnológicos de conservação e aplicação do fruto em bases científicas e tecnológicas.

2. Métodos

2.1 Estratégia de pesquisa

A revisão científica foi elaborada segundo diretrizes propostas por Moher et al. (2009). Web of Science, Medline/PUBMED, Cochrane Library, Scopus, Science Direct e Scielo foram pesquisadas, usando os termos de pesquisa em títulos e resumos: “*Syzygium cumini*”

OR “*Eugenia jambolana*” OR “*jambolan*” OR “*jamun*” OR “*java plum*”. A busca foi limitada a estudos com frutos, no período de janeiro de 2006 à dezembro de 2017. Os artigos selecionados foram detalhadamente examinados para fins de identificação de outros estudos relevantes.

Para a revisão tecnológica, as patentes foram pesquisadas em bases de dados da *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *European Patent Office* (Espacenet), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Para a análise de patentes empregou-se os indexadores supracitados, sendo que para a base do INPI, pesquisou-se, além dos nomes científicos, termos em português “jamelão” OU “jambolão”.

2.2 Seleção de estudos e extração de dados

2.2.1 Critérios de inclusão, exclusão e avaliação do risco de parcialidade dos estudos incluídos

Estudos originais e patentes foram selecionados, segundo os seguintes critérios de inclusão: (1) aplicação do fruto do jamelão em novos produtos, e (2) artigo ou patente completo(a) e acessível. Foram excluídas pesquisas e patentes que reportassem (1) estudos somente com sementes, folhas, raízes do jamelão ou formulações farmacêuticas/cosméticas; (2) estudos de revisões, editoriais, carta ao editor, capítulos de livro, pesquisa qualitativa e comunicação curta.

2.2.2 Extração dos dados

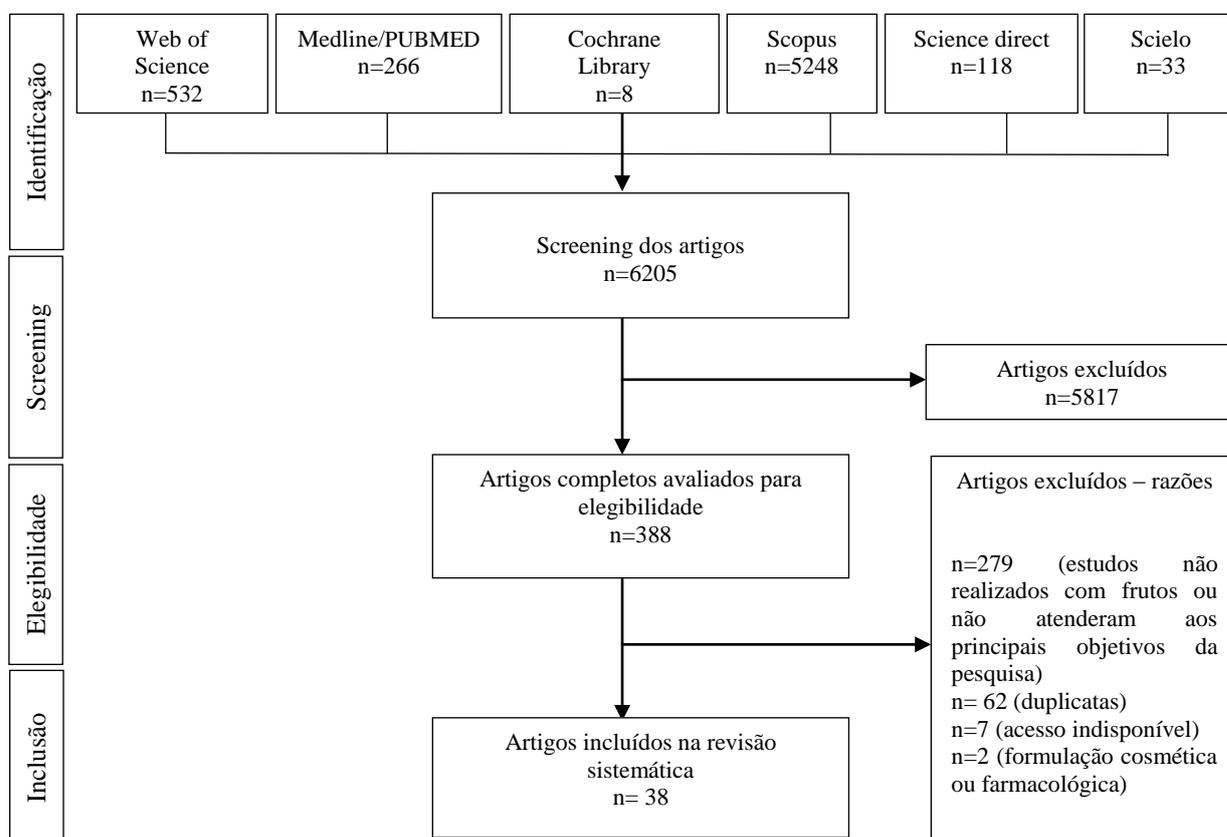
Os estudos selecionados foram revisados, e os seguintes dados extraídos: (1) primeiro nome do autor; (2) ano de publicação; (3) localização de estudo; (4) produto que foi elaborado ou avaliado e (5) inovação do estudo.

3. Resultados e discussão

3.1 Pesquisa de artigos e fluxo de triagem

A triagem preliminar descartou artigos cujos títulos e resumos estavam em desacordo com o objetivo da pesquisa. Após avaliação completa dos artigos, 23 preencheram os critérios de inclusão e foram submetidos à revisão sistemática. As etapas de seleção dos artigos estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Etapas de identificação, seleção e inclusão dos artigos na revisão sistemática



Fonte: Sousa (2018).

3.2 Cadeia tecnológica de produção

Dados sobre produção e exportação do jmelão são inexistentes no Brasil e escassos no mercado externo, embora haja plantações comerciais da espécie. Na Índia, país de origem nativa do fruto, ainda não há informações consolidadas disponíveis sobre área e produção (RAI et al., 2011).

A exploração tecnológica do fruto pode ocorrer na forma *in natura* ou processada. Porém, sua alta perecibilidade, e o fato de não poder ser estocado por longo tempo, o torna subaproveitado (BARAIYA et al., 2015). Visando minimizar perdas pós-colheita, estudos foram realizados com o intuito de aumentar a vida de prateleira dos frutos *in natura*, bem como verificar a viabilidade de aplicação do jmelão em novos produtos (Tabela 1).

3.2.1 Frutos *in natura*

Estudos iniciais para conservação dos frutos foram realizados por Rai et al. (2011), que empregaram atmosfera modificada nas embalagens visando aumentar sua vida útil. As embalagens de polipropileno, com 35 µm de espessura, coeficiente de permeabilidade de $1,54 \times 10^{-6} \text{ mL}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{h}^{-2}\cdot\text{Kpa}^{-1}$ para O₂ e $5,96 \times 10^{-6} \text{ mL}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{h}^{-2}\cdot\text{Kpa}^{-1}$ para CO₂, contendo 1 perfuração (0,3 mm), prolongaram o armazenamento (5 °C, 75% de umidade relativa) dos frutos para 23 dias, sem alterar o conteúdo de ácido ascórbico, antocianinas, flavonoides, e atividade antioxidante.

Para aumentar ainda mais o período de armazenamento pós-colheita, Ayar et al. (2011) sugeriram a imersão dos frutos, por 2 minutos, em cloreto de cálcio (CaCl₂) a 1,5%. A aplicação de CaCl₂ mantém a firmeza da membrana celular dos frutos, minimiza taxa de respiração, produção de etileno, atividade da β-galactosidase, degradação de proteínas e incidência de podridão e, aumenta o conteúdo de hemicelulose, pectina e cálcio.

Além dessas técnicas de conservação, o uso de filmes comestíveis, à base de zeína a 2%, tem prolongado a vida útil dos frutos, com redução da perda de água, senescência e atividade enzimática, e aumento da síntese de compostos bioativos (BARAIYA et al., 2015), demonstrando viabilidade de comercialização dos frutos *in natura* do jmelão.

Tabela 1 - Descrição dos estudos que atenderam aos critérios de inclusão para produtos com o fruto do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Autores/Ano	País do estudo	Produtos estudados	Inovação
Lago et al. (2006)	Brasil	Geleias	Desenvolveram geleias de jamelão com características físico-químicas de acordo com a legislação brasileira e com boa aceitação sensorial pelo consumidor.
Chowdhory; Ray (2007)	Índia	Vinho	Elaborou vinhos de jamelão, no entanto ao compará-los com os de uva, a aceitação foi inferior.
Nuengchamnong; Ingkaninan (2009)	Tailândia	Vinhos comercializados na Tailândia	Detectaram a presença de ácidos orgânicos e fenólicos com ação antioxidante nos vinhos e, caracterizaram, pela primeira vez, malvidina-3-O- <i>p</i> -cumaroilnos produtos avaliados.
Shahnawaz et al. (2009)	Paquistão	Geleias, suco concentrado, sucos e pó do fruto	Avaliaram a qualidade nutricional dos produtos elaborados e armazenados em diferentes materiais de embalagens e temperatura. As embalagens de vidro e armazenamento sob refrigeração retardaram a perda da qualidade nutritiva e aumentaram a vida de prateleira desses alimentos.
Ayar et al. (2011)	Índia	Frutos <i>in natura</i>	Aplicaram ácido giberélico e cloreto de cálcio aos frutos em concentrações distintas. CaCl ₂ a 1,5% preservou a qualidade nutricional e minimizou as perdas em 75% quando comparado aos frutos sem adição de compostos químicos.
Rai et al. (2011)	Índia	Frutos <i>in natura</i>	Armazenaram os frutos em embalagens com atmosfera modificada e os acondicionaram a 5 °C por 23 dias. Clorofila, ácido ascórbico e antocianinas reduziram, enquanto polifenóis e flavonoides foram acumulados no período de armazenamento. As embalagens aplicadas controlaram o crescimento microbiano.
Lago-Vanzela et al. (2011)	Brasil	Geleias light	Desenvolveram geleias light de jamelão com misturas de edulcorantes (ciclamato:sacarina; sucralose:sacarina; acessulfame-k:ciclamato:sacarina; acessulfame-k:sacarina), de acordo com a legislação brasileira. A geleia com clicamato:sacarina apresentou melhores características sensoriais e aceitação.
Sayuti et al. (2011)	Indonésia	Sucos em pó instantâneo	Desidrataram suco de jamelão a pó instantâneo empregando diferentes temperaturas e tempo de secagem. A temperatura teve maior efeito na cinética de degradação de antocianinas, e, quando acima de 60 °C.3h ⁻¹ , modificou a cor dos pós de roxo a rosa,

			devido as etapas de conversão do cátion <i>flavilliumem</i> chalcona.
Chakraborty; Saha (2011)	Índia	Néctar	Desenvolveram néctar de jamelão com lichia (2:1, v.v ⁻¹) e avaliaram o tempo de armazenamento em temperatura ambiente e de refrigeração. A vida útil do néctar foi de 11 meses, armazenamento refrigerado (8-10 °C), e 6 meses, temperatura ambiente. O néctar apresentou efeito antibacteriano, porém a aceitabilidade foi limitada.
Selwal et al. (2011)	Índia	Vinho	Extraíram tanase a partir das folhas do jamelão e aplicaram no vinho do fruto para minimizar a turbidez.
Shahnawaz et al. (2012)	Paquistão	Geleias, suco concentrado, sucos e polpa em pó	Identificaram os minerais Cr, Cu, Mn, Zn, Fe, Mg, Ca, Na e K em todos os produtos. Geleias e sucos apresentaram maiores concentrações desses minerais.
Tobal et al. (2012)	Brasil	Suco	Adicionaram extrato de jamelão em suco de laranja e detectaram que as antocianinas presentes no extrato inibiam a formação de substâncias voláteis indesejáveis do suco de laranja.
Shaheer et al. (2014)	Índia	Sucos	Aplicaram processamentos térmicos, não-térmicos e combinação dos processos em sucos de jamelão para verificar a estabilidade de antocianinas e ácido ascórbico. O processamento por radiação ultrassônica proporcionou degradação mínima dos compostos avaliados, enquanto pasteurização e esterilização reduziram as antocianinas e ácido ascórbico em aproximadamente 50%.
Singh et al. (2015)	Índia	Muffins de arroz	Incorporaram jamelão e goma xantana aos muffins de arroz, isentos de glúten, o que proporcionou propriedades reológicas semelhantes aos muffins com glúten. Além disso, os produtos tornaram-se enriquecidos com fibra e polifenóis antioxidantes, resultados atribuídos ao jamelão.
Jaiswal et al. (2015)	Índia	Geleias	Reportou as propriedades antioxidantes e reológicas das geleias de jamelão e as comparou com geleias disponíveis no mercado. As geleias do jamelão apresentaram qualidade superior.
Bezerra et al. (2015)	Brasil	Frozen iogurte	Desenvolveram frozen iogurte probiótico com leite caprino, polpa fresca e em pó. <i>Streptococcus thermophilus</i> foram inibidas após adição de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07 ao frozen iogurte. Os autores relatam que a inibição é devida a sensibilidade desse microorganismo a extratos ricos em polifenóis. Os escores da avaliação do aroma e <i>flavor</i> dos produtos elaborados foram baixos, resultados atribuídos à <i>B. animalis</i> por produzir ácidos orgânicos e etanol que podem

Priyanka et al. (2015)	Índia	Sucos	causar modificações no <i>flavor</i> . Utilizaram suco de jamelão em <i>blends</i> com sucos de uva, manga e abacaxi para mascarar o sabor adstringente. A adição de 75% de suco de jamelão e 25% de suco de uva proporcionou maior escore de aceitação.
Jana et al. (2015)	Índia	Suco	Imobilizaram tanase com resíduo de quitina, tornando-a mais eficaz na destanização de sucos de jamelão.
Baraiya et al. (2015)	Índia	Frutos <i>in natura</i>	Desenvolveram filmes comestíveis com Zein e cisteína ou ácido ascórbico ou extrato das folhas de jamelão, que prolongaram o tempo de armazenamento em 10 dias a temperatura de 10 °C. Os biofilmes retardaram a perda de água, a senescência e atividade enzimática e, melhoraram o conteúdo dos polifenóis e atividade antioxidante.
Oliveira et al. (2016)	Brasil	Bebidas alcoólicas fermentadas	Desenvolveram <i>blend</i> de jamelão e caldo de cana-de-açúcar em bebidas fermentadas alcoólicas, similares ao vinho, com alto teor de polifenóis e flavonoides, com ação antioxidante semelhante aos vinhos de uva.
Sehwag; Das (2016)	Índia	Alimento funcional	Produziram e otimizaram um alimento funcional com pele, polpa e sementes do jamelão, rico em fibras e com potencial terapêutico sobre o diabetes, pois controlou a difusão da glicose e atividade da α -amilase em ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , proporcionando baixo nível glicêmico no sangue.
Coelho et al. (2016)	Brasil	Polpa congelada e suco pasteurizado resfriado	Caracterizaram o perfil fitoquímico e atividade antioxidante dos produtos estudados. Os compostos majoritários foram ácido gálico, ácido clorogênico, cianidina-3-glicosídeo, catequina e procianidina B1, sendo esta a principal responsável pela ação antioxidante. Os principais ácidos orgânicos encontrados foram málico e láctico.
Branco et al. (2016)	Brasil	Polpa pasteurizada	Estudaram efeitos antioxidante e anti-proliferativo da polpa de jamelão pós-pasteurização. O processo térmico concentrou sólidos solúveis, polifenóis e flavonoides, porém reduziu o conteúdo de antocianinas. Apesar da degradação dos pigmentos, a polpa pasteurizada apresentou robusta atividade antioxidante e efeitos anti-proliferativos sobre células dos rins e ovários, sem afetar células normais.
Borges et al. (2016)	Brasil	Polpa desidratada	Desidrataram polpa de jamelão por leite de jorro. O pó obtido, apresentou parâmetros físico-químicos relevantes, polifenóis e antocianinas com propriedades antioxidantes, capazes de modular, <i>in vitro</i> , a ação de α -amilase e α -glucosidase.
Santiago et al. (2016)	Brasil	Corante natural	Desidrataram a polpa de jamelão por método convencional de secagem convectiva com

			circulação de ar e analisaram a cor do pó durante o período de armazenamento em temperatura ambiente. Apesar da degradação das antocianinas, o pó ainda apresentou boa coloração.
Patra et al. (2016)	Índia	Sucos	Desenvolveram sucos fermentados com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para obtenção de um produto com elevada atividade antioxidante e fins terapêuticos.
Saikia et al. (2016)	Índia	Suco	Aplicaram distintas formas de conservação aos sucos elaborados, entre elas a sonicação, considerada mais eficaz nos aspectos microbiológicos e na manutenção dos polifenóis antioxidantes.
Kapoo; Ranote (2016)	Índia	Polpa em pó	Inclusão do pó do jamelão na elaboração do suco de pêra visando melhoria nos aspectos sensoriais, químicos e nutricionais.
Srikanta et al. (2016) Kumar; Kumar (2016)	Índia Índia	Vinho de jamelão Iogurte	Desenvolveram vinhos hipoglicêmicos ideais para diabéticos. Suplementaram iogurtes probióticos com jamelão para aumentar a atividade antioxidante e melhorar os aspectos sensoriais.
D'Souza et al. (2017)	Índia	Suco	Desenvolveram sucos fermentados ricos em minerais e compostos antioxidantes.
<u>Sayuti</u> et al. (2017)	Japão	Corante	Aplicaram corantes naturais, extraídos da pele do jamelão, em geléias de outros frutos.
Sharma et al. (2017)	Indonésia	Suco	Desenvolveram <i>blend</i> de jamelão com manga e avaliaram a estabilidade por 6 meses. Após esse período, os sucos apresentarem características sensoriais aceitáveis, pois aumentou o teor de sólidos solúveis totais, com conseqüente redução da acidez.
Yenrina et al. (2017)	Japão	Geleia	Identificaram cianidina, malvidina e perlagonidina em geleias de jamelão.
Gosh et al. (2017)	Índia	Suco	Adicionaram pectinases para melhorar rendimento de extração, clarificação e filtração do suco de jamelão. As condições otimizadas foram: temperatura de incubação a 33,5 °C com 75 min e concentração enzimática de 0,09% (p.v ⁻¹).
Tavares et al. (2017)	Brasil	Suco	Desidratou o suco de jamelão em esteiras de espumas (<i>foam mat</i>) visando preservar compostos bioativos, no entanto, esse processo promoveu perdas dos biopolifenóis por elevação da temperatura e tempo de oxidação.
Venugopal; Anu-Appaiah (2017)	Índia	Vinho	Desenvolveu vinho de jamelão com adição de suas próprias sementes para reduzir a adstringência; no entanto, os escores de aceitação diminuíram, assim como a

Venugopal et al. (2018)	Índia	Vinho	estabilidade das antocianinas. Adicionou sementes de uvas durante a fermentação dos vinhos de jamelão. Como resultado melhorou características sensoriais e estabilizou a cor dos vinhos elaborados.
-------------------------	-------	-------	---

3.2.2 Polpa

A polpa do jamelão é constituída por água, epicarpo e mesocarpo, cujo rendimento representa 79,8% do peso bruto (SANTIAGO et al., 2016). A polpa tem sido consumida na forma de sucos, néctares, geleias, bebidas fermentadas, produtos panificáveis e de confeitaria e/ou usada como corante natural.

O congelamento da polpa do jamelão é uma alternativa para seu aproveitamento durante a safra, o que permite estocagem fora da época de produção, com manutenção da qualidade nutritiva e fitoquímica (COELHO et al., 2016). Além do congelamento, a polpa do fruto tem sido submetida à pasteurização ($70\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot 5\text{ min}^{-1}$). Porém, temperatura e tempo empregados reduziram o conteúdo de antocianinas e atividade antioxidante, pois temperaturas acima de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, por tempo prolongado, degradam esses pigmentos. No entanto, esse processo térmico concentrou polifenóis e outros flavonoides (BRANCO et al., 2016).

A desidratação também é uma técnica viável para conservação das polpas do jamelão. A obtenção da polpa em pó aumenta suas possibilidades de uso pela indústria devido ao menor custo de transporte, embalagem e armazenamento. Além disso, o pó apresenta atributos de qualidade microbiológica e físico-química; é solúvel em água, ideal para inserção em alimentos, por ser de fácil homogeneização e, substituir corantes sintéticos da cor roxa e vermelha, que são tóxicos e proibidos em muitos países, como ponceau (E124.1) e bordeaux (E123) (BORGES et al., 2016).

Estudos de estabilidade dos compostos nutritivos e bioativos durante a estocagem da polpa em pó devem ser avaliados. Até o momento, sabe-se que após o quinto mês de armazenamento, há redução de 36% das antocianinas. As perdas ocorrem devido à oxidação ou reações de polimerização, ocasionadas pela formação de poros durante o processo de secagem, que permitem a difusão de oxigênio e umidade (SANTIAGO et al., 2016). Dessa forma, a técnica adequada de desidratação e o uso de embalagens a vácuo, laminadas e com controle da umidade podem minimizar essas alterações indesejáveis.

3.2.3 Sucos, néctares e refrescos

O processamento do suco do jamelão envolve operações que visam proporcionar qualidade ao produto final. Entre elas, destaca-se o branqueamento ($60\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot 60\text{ min}^{-1}$), que inativa as polifenoloxidasas e promove a desaeração durante a extração do suco (COELHO et

al., 2016). Embora haja redução inicial do teor de polifenóis, o tratamento auxilia na manutenção desses compostos durante o armazenamento.

Sucos, néctares e refrescos do jamelão podem ser submetidos a outros tratamentos térmicos. Tratamentos convencionais, como pasteurização e esterilização, degradam os compostos bioativos, principalmente antocianinas. Os não convencionais, como radiação ultrassônica, em baixa intensidade, minimiza essa perda em até 30% (SHAHEER et al., 2014).

Além do controle dos pigmentos antociânicos, é necessário melhorar o sabor ácido e adstringente do suco do jamelão, que têm proporcionado baixos escores de aceitação, podendo ser uma limitação para indústria (COELHO et al., 2016). Para aumentar o escore de aceitabilidade, pesquisadores têm elaborado sucos em pó instantâneo adoçado (SAYUTI, 2011) e, *blends* de jamelão com outros frutos, como manga, uva, abacaxi e lichia (PRIYANKA; DORAJEERAO; SUDHAVANI, 2015). O *blend* contendo 75% de jamelão e 25% de uva obteve escore elevado (8,68 em uma escala de 0 a 10), sendo uma opção de produto a ser lançado no mercado.

Os sucos do jamelão e derivados, quando adicionados de acidulante e conservante químico, como ácido cítrico (0,3%) e benzoato de sódio (100 ppm), respectivamente, podem ser armazenados por 6 meses em temperatura ambiente (25° C a 37 °C) e, 11 meses sob refrigeração (8° a 10 °C) (CHAKRABORTY; CHAURASIYA; SAHA, 2011). Para manutenção da qualidade nutricional e fitoquímica, os produtos podem ser envasados em garrafas de vidro âmbar ou embalagens cartonadas como Tetra Pack (SHAHNAWAZ; SHEIKH; NIZAMANI, 2009).

3.2.4 Geleias

Os parâmetros físicos e físico-químicos do jamelão o tornam ideal para elaboração de geleias, por dispensarem o uso de corantes e aromatizantes artificiais e acidulantes em quantidades expressivas (LAGO; GOMES; SILVA, 2006). Além disso, o conteúdo de açúcares redutores no fruto, e os convertidos pelo ácido cítrico no produto final, diminuem a adição de açúcares durante o processamento (PRIYANKA et al., 2015). Esses fatores reduzem gastos energéticos, resultando em processos mais econômicos, com aumento do rendimento do produto, e consequente valorização das características química, sensorial e nutricional da geleia à base do fruto (BRANCO et al., 2016).

Em relação ao teor de pectina presente no fruto, é necessário ajuste, pois a relação adequada de ácidos orgânicos, pectina e açúcar proporciona consistência adequada aos produtos, evitando cristalização e sinérese (LAGO et al., 2006). Nas geleias com edulcorantes, a formação do gel é auxiliada também pela adição de cloreto de cálcio. Essas geleias, além do reduzido valor calórico, são similares às convencionais, principalmente as que são elaboradas com a associação de ciclamato e sacarina, 0,65:0,35, respectivamente (LAGO-VANZELA et al., 2011).

Estudos têm buscado avaliar a qualidade nutricional, fitoquímica, antioxidante e reológica das geleias de jamelão (JAISWAL; PATEL; NAIK, 2015; SHAHNAWAZ et al., 2009; SHAHNAWAZ; SHEIKH; NIZAMANI, 2012). Esses parâmetros, quando comparados a geleias de outros frutos disponíveis no mercado, apresentaram qualidade superior, demonstrando o forte potencial de competitividade do produto.

3.2.5 *Bebidas fermentadas alcoólicas*

O uso do jamelão na vinificação é rotineiro no continente asiático. Na Tailândia e na Índia os vinhos à base do fruto são comercializados e reconhecidos por seu potencial antioxidante (NUENGCHAMNONG; INGKANINAN, 2009). Os polifenóis, responsáveis por essa propriedade, são originários do fruto ou biotransformados durante a fermentação e envelhecimento das bebidas. Em alguns casos, o conteúdo de polifenóis, antocianinas e taninos são superiores a vinhos elaborados com algumas espécies de uva (OLIVEIRA et al., 2016), no entanto, os escores dos atributos sensoriais são inferiores (CHOWDHURY; RAY, 2007).

Estudos recentes têm buscado minimizar esses fatores indesejáveis na elaboração de vinhos, e os resultados promissores estão relacionados com a adição de proantocianidinas presentes nas sementes de frutos durante o processamento. A semente do jamelão foi testada, no entanto, os resultados foram insatisfatórios tanto para o aspecto sensorial, pois aumentou a adstringência, quanto para a estabilidade das antocianinas (VENUGOPAL; ANU-APPAIAH, 2017). As sementes de uva, por sua vez, conseguiram equilibrar a amargura e adstringência, aumentando a aceitação do produto (VENUGOPAL et al., 2018).

3.2.6 Outros produtos

O jamelão tem sido empregado na elaboração de produtos para pessoas com restrições alimentares ou àquelas que possuam interesse em alimentos especiais. Dentre os alimentos elaborados destacam-se frozen iogurte à base de leite caprino e com propriedades probióticas (BEZERRA et al., 2015); muffins de arroz, sem ovos, enriquecidos com o fruto (SINGH et al., 2015); e alimento funcional elaborado com polpa, semente e pele, com atividade prebiótica e antidiabética *in vitro* comprovada (SEHWAG; DAS, 2016), entre outros.

3.3 Patentes relacionadas ao uso do jamelão no desenvolvimento de novos produtos

A análise preliminar dos bancos de dados resultou no total de 433 patentes (Figura 2). Destas, foram excluídas 398 que estavam em desacordo com o objetivo da pesquisa, e 15 patentes duplicadas. Foram selecionadas para esta revisão 20 patentes sobre aplicação do fruto do jamelão no desenvolvimento de novos produtos. As patentes foram depositadas, predominantemente, em três países: China (70%), Brasil (15%) e Índia (5%) (Tabela 2). As principais reivindicações são referentes à melhoria dos aspectos sensoriais e nutricionais das bebidas alcoólicas e não alcoólicas à base do fruto, e de especiarias.

Figura 2 - Diagrama de pesquisa e triagem das patentes analisadas

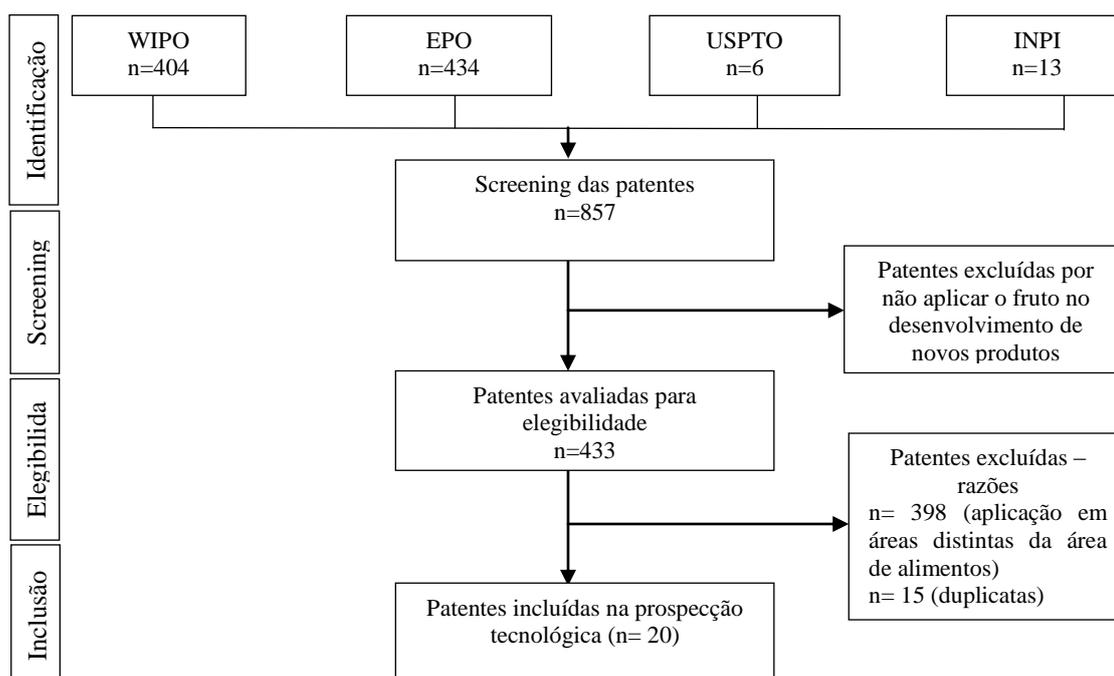


Tabela 2 - Patentes de aplicação do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) na indústria de alimentos

Número da patente/ano de publicação	Inventores/ empresa	País de proteção	CIP	Título	Invenção
EP0571653/1993	Wiesenberger, A.; Kolb, E.; Simson, I.	EPO	A23L 2/52 A23L 33/15 A23L 33/16 A23L 2/26	Fruit and fruit-vegetable juices enriched with minerals and vitamins.	Adição de minerais aos sucos de frutos de diversas espécies, entre elas a <i>Syzygium cumini</i> , família <i>Myrtaceae</i> .
PI 9703727-3/1999	Pereira, J. E.	Brasil	C12G 1/022 C12G 1/06 C12G 1/02 C12G 3/04 A23L 1/068 A23L 1/222 A61K 35/78	Processo para fabricação de vinho licoroso, seco, suave, espumante, vinagre, geleia, licor e extratos derivados de jamelão.	Desenvolveu técnicas de fabricação para bebidas fermentadas e não fermentadas do jamelão distintas do processo de fabricação dessas bebidas a base de uva.
WO/2004/084642/2004	Ramakrishna, C.; Reddy, Y.; Reddy, S./ Council of Scientific and Industrial Research	PCT	A23G 3/00	A synergistic sugar-free syrup composition and a process for preparing the same.	Desenvolveu xarope à base do jamelão, sem açúcar e com baixo índice glicêmico adequado para inserção em doces/sobremesas.
CN101077203/2007	He, R.; Huang, G.; Wang, Z. / Liuzhou Mingchao Beverage Co., Ltd.	China	A23L 2/02 A23L 2/72 A23L 2/52	Process for manufacturing <i>Passiflora edulis</i> * fruit juice beverage.	Estabeleceu etapas adequadas para o processo de fabricação do suco de jamelão, incluindo a esterilização UHT e aditivos estabilizadores.
CN101317656/2008	Liu, L.; Li, P.; Liu, Y.; Feng, T. / Jilin Hongjiu Biotech Co., Ltd.	China	A23L 1/29 A61K 36/258 A61P 25/20 A61P 25/28 A61P 39/06 A61P 39/02 A61P 35/00 A61P 29/00 A61P 1/00	Charge mixture for ginseng soup and preparation thereof.	Incluiu a polpa do jamelão na composição de sopa de ginseng e outros ingredientes, proporcionando sopa líquida concentrada ou em pó, rica em nutrientes e aspectos sensoriais melhorados.

CN101292747/2008	Deng, G.;	China	A61P 9/00 A23L 1/31 A23L 1/311 A23L A/312 A23L 1/313 A23L 1/29 A23L 1/01	Nourishing beef with skin and preparation method thereof.	Elaborou um mix de especiarias e frutos medicinais, como o jamelão, e aplicou sobre a carne bovina, proporcionando um produto com aroma perfumado, sabor suave, de fácil digestão e absorção nutricional, rico em cálcio e capaz de atuar como tonificante cerebral.
CN102389096/2008	Liu, Q.	China	A23L 27/20	Flavoring for rice noodles	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias aromatizantes para macarrão de arroz. O produto elaborado proporcionou maciez, aroma, e sabor agradável.
CN103636896/2014	Xiaohua, Y.	China	<u>A23G3/48</u> <u>A23G3/54</u>	Luscious walnut chip containing preserved fruit	Desenvolvimento de chips de nozes com massa de arroz e frutos em conserva, como jamelão. O novo chip desenvolvido agrega valor nutricional e características excelentes de cor, aroma e sabor.
CN103876174/2014	Hao, Y.	China	A23L 1/315 A23L 1/314 A23L 1/318	Preparation method of smoked chicken.	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias para aplicar em frangos que serão submetidos à defumação. Os frangos defumados são ricos em nutrientes, apresentam cor e brilho agradáveis e remove o sabor original do frango.
CN103478750/2014	Liang, X.	China	A23L 1/315 A23L 1/318 A23L 1/29	Processing method of barbecue and spices thereof.	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias para uso em churrasco. Além de sabor e aroma suaves, as especiarias reduzem o teor de gordura das carnes.
CN103907985/2014	Zhang, J.	China	A23L 2/02 A23L 1/29	Making method of <i>Syzygium cumini</i> drinks.	Desenvolveu método de fabricação de drinks a base de jamelão, em que há etapas de desativação enzimática, enzimólise e similares, visando separar nutrientes importantes para as bebidas, assim, os drinks elaborados induzem a diurese para

					reduzir o edema, atuam como tónicos, e fortalecem tendões e ossos, entre outros.
CN104366539/2015	Liangliang, S./ Wuhe County Xinwang Halal Food CO., LTD.	China	A23L 1/315	Nutritional spicy roasted duck with egg and preparation method thereof.	Incluiu o jamelão em pó no desenvolvimento de especiarias medicinais para uso em pato assado. O produto elaborado é ansiolítico, minimiza sintomas reumáticos, tonifica fígado e rins e fortalece ossos e músculos.
CN104286890/2015	Zhang, H.	China	A23L 1/311 A23L 1/30	Appetizing sauce spiced beef and preparation method thereof.	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias medicinais para uso em carnes bovinas. O produto elaborado é capaz de reduzir o risco de início de câncer de mama e doenças cardiovasculares. Além disso, melhora a visão e desintoxica o fígado.
CN104256292/2015	Zhang, L.; Zhao, J./ Anhui Luoluo Rice Industry CO., LTD.	China	A23L 1/10 A23L 1/29	Calcium-rich bone-building nutritious health rice and preparation method thereof.	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias que são empregadas no preparo de arroz rico em cálcio, benéfico a saúde de idosos por fortalecer os ossos.
IN 8.945.656/2015	Kumar; A. N.; Kumar; U. N.	Índia	A23L 2/02	Jamun juice composition and a process thereof.	Preparou suco de jamelão com suco concentrado de maçã e pêra, e homogeneizou sob alta pressão para minimizar a turbidez e adstringência.
CN105614730/2016	Zhang, C. / Quanzhou Haodidao Food CO., LTD.	China	A23L 13/50 A23L 13/40	Preparation method of vanilla marinated goose.	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias para uso em ganso marinado, substituindo aditivos cancerígenos empregados.
CN105325995/2016	Zhizhong, T.	China	A23L 27/00 A23L 27/10 A23L 33/00	Hotpot seasoning of fried shrimp in hot spicy sauce and preparation method of hotpot seasoning	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de especiarias medicinais para uso em camarões. O produto elaborado possui boa qualidade nutricional, e é capaz de estimular o apetite.
CN105410835/2016	Zongyan, P.	China	A23L 27/00	Chafing dish rice noodle	Incluiu o jamelão no desenvolvimento de

			A23L 33/00 A23L 7/10	seasoning and chafing dish rice noodle making method	especiarias para elaboração de macarrão de arroz. O produto elaborado apresentou características sensoriais aceitáveis.
BR10 2014027806-0/2017	Lima, M. S.; Coelho, E. M.; SÁ, A. S. C.	Brasil	A23L 2/02	Processo de obtenção de suco integral de jambolão e sua utilização como ingrediente na formulação de néctar e néctar misto com uva.	Adicionou enzimas pectolíticas ao suco integral de jambolão para reduzir a turbidez e adstringência.
BR 102015001163-6/2017	Ssena, A. R.; Assis, S. A.; Moreira, K. A.	Brasil	A23L 2/02 A23L 3/3463	Suco de jambolão e processo para a fabricação de suco de jambolão utilizando extrato enzimático a base de tanase.	Adicionou extrato enzimático à base de tanase ao suco integral de jambolão para reduzir a turbidez e adstringência.

EPO: European Patent Office. PCT: Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes.

*Embora o título se refira a *Passiflora edulis*, o corpo da patente trata sobre *Syzygium cumini*.

No desenvolvimento de novas técnicas que buscam melhorar produtos como sucos, néctares, bebidas fermentadas/destiladas e drinks do jamelão, o maior entrave encontra-se no controle de taninos, pois seu elevado conteúdo altera viscosidade, turbidez e sabor, tornando-os ponto crítico de controle. Visando minimizar esses efeitos indesejáveis no suco de jamelão, a invenção IN 8.945.656 aplicou processo de homogeneização sob pressão, proporcionando suco menos viscoso e turvo (KUMAR; KUMAR, 2015). Homogeneizadores de pressão, devido à força de cisalhamento, rompem partículas dispersas, evitando que as partes de menor peso se separem do restante dos componentes e subam para a superfície (FELLOWS, 2016).

Além dessa técnica, a adição de enzimas tem se mostrado eficaz no controle dessas propriedades. A invenção BR 102015001163-6 demonstrou que a adição de extrato enzimático contendo tanase proporcionou suco límpido e sabor palatável. Isso ocorre porque as tanases clivam as ligações éster e depsídica dos taninos hidrolisáveis, melhorando aparência e adstringência do produto final. Apesar de sua alta eficiência catalítica, a utilização de tanase livre é inviável devido ao alto custo da enzima purificada e baixa estabilidade, tornando a produção dispendiosa (JANA et al., 2015).

Para superar essas deficiências, a imobilização das tanases em substância biocompatível como a quitina, tem sido uma das melhores alternativas, pois aumenta as propriedades catalíticas da enzima e permite sua reutilização, sendo economicamente viável para aplicações industriais (JANA et al., 2015). Além disso, para reduzir custos com a aquisição da enzima, a indústria pode extraí-la a partir das folhas do jamelãozeiro (SELWAL et al., 2011).

Enzimas pectolíticas, constituídas principalmente por celulasas e pectinases, também proporcionam melhoria nesses aspectos sensoriais por clivarem taninos, e principalmente por degradarem pectina (BR 102014027806-0). Durante a hidrólise enzimática são formados complexos pectina-proteína, melhorando clarificação, viscosidade, rendimento e filtração (GOSH et al., 2017).

Além dos produtos citados acima, outra forma de aplicação do jamelão, bastante estudada pelos inventores, é a inclusão do fruto *in natura* ou em pó no desenvolvimento de especiarias, para fins alimentícios e com propriedades medicinais, representando 50% das patentes selecionadas. As especiarias contendo diversas ervas e frutos, como o jamelão, são utilizadas na gastronomia, no preparo de aves (CN105614730; CN103876174; CN104366539), camarões (CN105325995), macarrões (CN105410835; CN102389096),

carnes para churrasco (CN101292747; CN103478750; CN104286890) e preparo de arroz (CN104256292).

As especiarias desenvolvidas são ricas em compostos antioxidantes que evitam a formação de radicais livres, os removem, reparam dano oxidativo e eliminam moléculas danificadas. Dessa forma, essas especiarias são capazes de reduzir o processo inflamatório, atuar como analgésico, ansiolítico, hipoglicêmico, hipolipemiantes, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças reumáticas, cardiovasculares, neurodegenerativas, cânceres e diabetes tipo 2.

4. Considerações finais e perspectivas

A partir dessa revisão, evidencia-se que o jamelão é um fruto com expressivo potencial para o processamento industrial, por dispensar tratamentos térmicos intensos, e reduzir a adição de ingredientes e aditivos químicos, minimizando custos dos processos. Quanto às patentes, vale destacar as invenções que empregam o tratamento enzimático, reduzindo os efeitos indesejáveis de taninos, melhorando às características sensoriais de sucos e outras bebidas, além da adição do jamelão em especiarias com fins alimentícios e propriedades medicinais.

Para esses produtos à base do fruto alcançarem mercados nacionais e internacionais práticas inovadoras na indústria de alimentos devem ser implementadas minimizando perdas pós-colheita, favorecendo seu aproveitamento, e preservando compostos bioativos de importante apelo mercadológico e com perspectivas de aplicação na saúde.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (número de concessão 83151320325) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI (número de concessão 006/2016), pela concessão de bolsa de pesquisa e

financiamento do projeto, respectivamente.

Referências

AYAR, K.; SINGH, S.; CHAVDA, J. C. Effect of post harvest treatments on quality of jamun (*Syzygium cumini* Skeels) fruits during storage. **The Asian Journal of Horticulture**, 6, 297–299, 2011.

BARAIYA, N. S.; VENKATA, T.; RAO, R.; THAKKAR, V. R. Improvement of postharvest quality and storability of jamun fruit (*Syzygium cumini* L. var. Paras) by zein coating enriched with antioxidants. **Food Bioprocess and Technology**, 8, 2225–2234, 2015.

BEZERRA, M.; ARAUJO, A.; SANTOS, K.; CORREIA, R. LWT - Food Science and Technology Caprine frozen yoghurt produced with fresh and spray dried jambolan fruit pulp (*Eugenia jambolana* Lam) and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BI-07. **LWT - Food Science and Technology**, 62, 1099–1104, 2015.

BORGES, K. C.; AZEVEDO, J. C.; MEDEIROS, M. D. E. F.; CORREIA, R. T. P. Physicochemical characterization and bioactive value of tropical berry pomaces after spouted bed drying. **Journal of Food Quality**, 39, 192–200, 2016.

BRANCO, I. G.; MORAES, I. C. F.; ARGANDOÑA, E. J. S.; MADRONA, G. S.; SANTOS, C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; HAMINIUK, C. W. I. Influence of pasteurization on antioxidant and in vitro anti-proliferative effects of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit pulp. **Industrial Crops and Products**, 89, 225-230, 2016.

CHAKRABORTY, I.; CHAURASIYA, A. K.; SAHA, J. Quality of diversified value addition from some minor fruits. **Journal of Food Science and Technology**, 48, 750–754, 2011.

CHOWDHURY, P.; RAY, R. C. Fermentation of jamun (*Syzygium cumini* L.) fruits to form red wine. **International Food Research Journal**, 14, 15-23, 2007.

COELHO, E. M.; AZEVÊDO, L. C. D. E.; CORRÊA, L. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; DOS, M.; LIMA, S. Phenolic profile, organic acids and antioxidant activity of frozen pulp and juice of the jambolan (*Syzygium cumini*). **Journal of Food Biochemistry**, 40, 211–219, 2016.

DENG, G. Nourishing beef with skin and preparation method thereof. **CN101292747**, 2008.

D'SOUZA, P. A.; NAIK, P. A.; RAO, S. C.; VYAS, S.; PALAN, A. M.; CORNELIO, B.; SHET, V. B.; RAO, C.V. Fermented fruit juice production using unconventional seasonal fruits through batch fermentation. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, 6, 1305-1308, 2017.

EL-ANANY, A. M.; ALI, R. F. M. Biochemical and histopathological effects of administration various levels of pomposia (*Syzygium cumini*) fruit juice as natural antioxidant on rat health. **Journal of Ethnopharmacology**, 50, 487–495, 2013.

FELLOWS, P. J. Food processing technology: principles and practices. 4ed. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2016.

GOSH, Y.; PRADHAN, R. C.; MISHRA, S. Low-Temperature Extraction of Jamun Juice

- (Indian Black Berry) and Optimization of Enzymatic Clarification Using Box-Behnken Design. **Journal of Food Process Engineering**, 40, e12603, 2017.
- HAO, Y. Preparation method of smoked chicken. **CN103876174**, 2014.
- HE, R.; HUANG, G.; WANG, Z. Process for manufacturing *Passiflora edulis* fruit juice beverage. **CN101077203**, 2007.
- JAISWAL, S. G.; PATEL, M.; NAIK, S. N. Physico-chemical properties of *Syzygium cumini* (L.) Skeels jam and comparative antioxidant study with other fruit jams. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 6, 9-15, 2015.
- JANA, A.; HALDER, S. K.; GHOSH, K.; PAUL, T.; VÁGVÖLGYI, C.; MONDAL, K. C.; MOHAPATR, K. D. Tannase Immobilization by Chitin-Alginate Based Adsorption-Entrapment Technique and Its Exploitation in Fruit Juice Clarification. **Food and Bioprocess Technology**, 8, 2319-2329, 2015.
- KAPOOR, S.; RANOTE, P. S. Antioxidant components and physico-chemical characteristics of jamun powder supplemented pear juice. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, 5, 2307-2316, 2016.
- KUMAR, A., KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* culture. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, 53, 667-675, 2016.
- KUMAR, A. N.; KUMAR, U. N. Jamun juice composition and a process thereof. **IN 8.945.656**, 2015.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of jambolan (*Syzygium cumini* Lamarck) jelly: processing, physical-chemical parameters and sensory evaluation. **Food Science and Technology**, 26, 847-852, 2006.
- LAGO-VANZELA, E. S.; VIEIRA, G.; LIMA, F. A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Physical-chemical, caloric and sensory characterization of light jambolan (*Syzygium cumini* Lamarck) jelly. **Food Science and Technology**, 31, 666-673, 2011.
- LESTARIO, L. N.; HOWARD, L. R.; BROWNMILLER, C.; STEBBINS, N. B.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). **Food Research International**, 100, 385-391, 2017.
- LI, Y.; XU, J.; YUAN, C.; MA, H.; LIU, T.; LIU, F.; SEERAM, N. P.; MU, Y.; HUANG, X.; LI, L. Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract. **Journal of Functional Foods**, 28, 1-10, 2017.
- LIANG, X. Processing method of barbecue and spices thereof. **CN103478750**, 2014.
- LIANGLIANG, S. Nutritional spicy roasted duck with egg and preparation method thereof. **CN104366539**, 2015.
- LIMA, M. S.; COELHO, E. M.; SÁ, A. S. C. Processo de obtenção de suco integral de jambolão e sua utilização como ingrediente na formulação de néctar e néctar misto com uva. **BR10 2014027806-0**, 2017.
- LIU, L.; LI, P.; LIU, Y.; FENG, T. Charge mixture for ginseng soup and preparation thereof. **CN101317656**, 2008.

- LIU, Q. Flavoring for rice noodles. **CN102389096**, 2008.
- MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; PRISMA, G. The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **Annals of Internal Medicine**, 151, 264-269, 2009.
- NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family *Myrtaceae* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 297-302, 2009.
- OLIVEIRA, É. R.; CALIARI, M.; SOARES, M.; JÚNIOR, S.; VALÉRIO, E.; VILAS, D. B. Bioactive composition and sensory evaluation of blended jambolan (*Syzygium cumini*) and sugarcane alcoholic fermented beverages. **Institute of Brewing and Distilling**, 122, 719-728, 2016.
- PATRA, J. K.; SINGDEVSACHAN, S. K.; SWAIN, M. R. Biochemical composition and antioxidant potential of fermented tropical fruits juices Antioxidant potential of fermented fruits juices, **Agro food industry Hi-Tech**, 27, 29-33, 2016.
- PEREIRA, J. E. Processo para fabricação de vinho licoroso, seco, suave, espumante, vinagre, geleia, licor e extratos derivados de jamelão. **PI 9703727-3**, 1999.
- PRIYANKA, N.; DORAJEERAO, A. V. D.; SUDHAVANI, V. Utilisation of jamun juice by making blended rts beverages. **Plant Archives**, 15, 1083–1088, 2015.
- RAI, D. R.; CHADHA, S.; KAUR, M. P.; JAISWAL, P.; PATIL, R. T. Biochemical, microbiological and physiological changes in jamun (*Syzygium cumini* L.) kept for long term storage under modified atmosphere packaging. **Journal of Ethnopharmacology**, 48, 357–365, 2011.
- RAMAKRISHNA, C.; REDDY, Y.; REDDY, S. A synergistic sugar-free syrup composition and a process for preparing the same. **WO/2004/084642**, 2004.
- RYDLEWSKI, A. A.; MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; CLAUS, T.; VAGULA, J. M.; SILVA, M. C.; SANTOS JUNIOR, O. O.; VISENTAINER, J. V. Bioactive compounds, antioxidant capacity, and fatty acids in different parts of four unexplored fruits. **Journal of Food Quality**, 2017, 1-10, 2017.
- SAIDANI, F.; GIMÉNEZ, R.; AUBERT, C.; CHALOT, G.; BETRÁN, J. A.; GOGORCENA, Y. Phenolic, sugar and acid profiles and the antioxidant composition in the peel and pulp of peach fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, 62, 126-133, 2017.
- SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. **Food Science and Technology International**, 22, 288-301, 2016.
- SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A. C. M. S.; PEIXOTO, F. M.; BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M.; NOGUEIRA, R. I. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. **Fruits**, 71, 3-8, 2016.
- SAYUTI, K.; HAMZAH, N.; ANGGRAINI, T.; ANDESTA, N. The effect of temperature and drying time on the characteristic of reddish grey fruit instant powder (*Syzygium cumini*).

Pakistan Journal of Nutrition, 10, 846–850, 2011.

SAYUTI, K.; YENRINA, R.; ANGGRAINI, T. Characteristics of “Kolang-kaling” (Sugar palm fruit jam) with added natural colorants. **Pakistan Journal of Nutrition**, 16, 69-76, 2017.

SEHWAG, S.; DAS, M. Composition and functionality of whole jamun based functional confection. **Journal of Food Science and Technology**, 53, 2569–2579, 2016.

SELWAL, M. K.; YADAV, A.; SELWAL, K. K.; AGGARWAL, N. K.; GUPTA, R.; GAUTAM, S. K. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42, 374–387, 2011.

SHAHEER, C. A.; HAFEEDA, P.; KUMAR, R.; KATHIRAVAN, T.; KUMAR, D.; NADANASABAPATHI, S. Effect of thermal and thermosonication on anthocyanin stability in jamun (*Eugenia jambolana*) fruit juice. **International Food Research Journal**, 21, 2189–2194, 2014.

SHAHNAWAZ, M.; SHEIKH, S. A.; NIZAMANI, S. M. Determination of nutritive values of jamun fruit (*Eugenia jambolana*) products. **Pakistan Journal of Nutrition**, 8, 1275-1280, 2009.

SHAHNAWAZ, M.; SHEIKH, S. A.; NIZAMANI, S. M. A Study on the determination of mineral elements in jamun fruit (*Eugenia jambolana*) products. **Pakistan Journal of Nutrition**, 11, 181-186, 2012.

SHARMA, D. S.; KAUL, R. K.; BHAT, A.; SINGH, J. Quality evaluation and storage stability of jamun-mango blended squash. **Indian Journal of Horticulture**, 73, 153-156, 2016.

SINGH, J. P.; KAUR, A.; SHEVKANI, K.; SINGH, N. Influence of jambolan (*Syzygium cumini*) and xanthan gum incorporation on the physicochemical, antioxidant and sensory properties of gluten-free eggless rice muffins. **International Journal of Food Science and Technology**, 50, 1190–1197, 2015.

SRIKANTA, A. H.; KUMAR, A.; SUKHDEO, S. V.; PEDDHA, M. S.; GOVINDASWAMY, V. The antioxidant effect of mulberry and jamun fruit wines by ameliorating oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Food & Function**, 7, 4422-4431, 2016.

SSENA, A. R.; ASSIS, S. A.; MOREIRA, K. A. Suco de jamelão e processo para a fabricação de suco de jamelão utilizando extrato enzimático a base de tanase. **BR 102015001163-6**, 2017.

TAVARES, I. M. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, 82, 1-13, 2016.

TAVARES, I. M. C.; NOGUEIRA T. Y. K.; MAURO M. A.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; LAGO-VANZELA, E. S. Dehydration of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) juice during foam mat drying: Quantitative and qualitative changes of the phenolic compounds. **Food Research International**, 102, 32-

42, 2017.

TOBAL, T. M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOLINI, H. M. A., BOSCOLO, M. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact additive in orange juice and its sensorial impact. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 63, 273–277, 2012.

VENUGOPAL, K. S.; ANU-APPAIAH, K. A. Seed incorporation during vinification and its impact on chemical and organoleptic properties in *Syzygium cumini* wine. **Food Chemistry**, 237, 693-700, 2017.

VENUGOPAL, K. S.; CHERITA, C.; ANU-APPAIAH, K. A. Augmentation of chemical and organoleptic properties in *Syzygium cumini* wine by incorporation of grape seeds during vinification. **Food Chemistry**, 242, 98-105, 2018.

WIESENBERGER, A.; KOLB, E.; SIMSON, I. Fruit and fruit-vegetable juices enriched with minerals and vitamins. **EP0571653**, 1993.

XIAOHUA, Y. Luscious walnut chip containing preserved fruit. **CN103636896**, 2014.

YENRINA, R.; SAYUTI, K.; NAKANO, K.; THAMMAWONG, M.; ANGGRAINE, T.; FAHMY, K.; SYUKRI, D. Cyanidin, malvidin and pelargonidin content of “kolang-kaling” jams made with juices from asian melastome (*Melastoma malabathricum*) fruit, java plum (*Syzygium cumini*) fruit rind or mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit rind. **Pakistan Journal of Nutrition**, 16, 850-856, 2017.

ZHANG, C. Preparation method of vanilla marinated goose. **CN105614730**, 2016.

ZHANG, H. Appetizing sauce spiced beef and preparation method thereof. **CN104286890**, 2015.

ZHANG, J. Making method of *Syzygium cumini* drinks. **CN103907985**, 2014.

ZHANG, L.; ZHAO, J. Calcium-rich bone-building nutritious health rice and preparation method thereof. **CN104256292**, 2015.

ZHIZHONG, T. Hotpot seasoning of fried shrimp in hot spicy sauce and preparation method of hotpot seasoning. **CN105325995**, 2016.

ZONGYAN, P. Chafing dish rice noodle seasoning and chafing dish rice noodle making method. **CN105410835**, 2016.

Capítulo 2

Otimização multi-resposta do sistema de solventes para extração de polifenóis e atividade antioxidante na polpa do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Otimização multi-resposta do sistema de solventes para extração de polifenóis e atividade antioxidante na polpa do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Mariana de Moraes Sousa^a, Alessandro de Lima^a, Bruno Quirino Araújo^b, Márcio dos Santos Rocha^b, Evaldo dos Santos Monção Filho^b, Renato Pinto de Sousa^b, Antônia Maria das Graças Lopes Citó^b, José Augusto Gasparotto Sattler^c, Lígia Bicudo de Almeida-Muradian^c, Jorge Mancini Filho^c, Nadir do Nascimento Nogueira^{d*}

^a*Departamento de Hospitalidade, lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina Zona Sul Campus, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: mariana@ifpi.edu.br; alessandro@ifpi.edu.br*

^b*Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: bquirinoa@gmail.com; farmrocha@gmail.com; gracacito@gmail.com; evaldo_filhoo@hotmail.com; renatopintto@hotmail.com*

^c*Departamento de alimentos e nutrição experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: jagasparotto@gmail.com; ligiabi@usp.br; jmancini@usp.br.*

^d*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: nadirn@uol.com.br*

* Autor correspondente

Rua São Pedro, 3274, Apto 704, Ed. Palazzo Poty

CEP: 64001-260, Teresina, Piauí, Brasil

Phone: + 55 86 3222 6923 / + 55 86 99986 0648

Fax: + 55 86 3215 5690

E-mail: nadirn@uol.com.br

RESUMO

A extração de antioxidantes do jamelão é de grande interesse no âmbito tecnológico e quanto a sua utilização, requerendo condições de processamento que preservem a bioatividade desses compostos. Nesse sentido, a otimização do sistema solvente de extração foi aplicada objetivando resposta máxima de rendimento de polifenóis e ação antioxidante. A análise multivariada avaliou várias proporções de solventes (água, etanol e acetona), para quantificação do conteúdo total de classes polifenólicas e atividade antioxidante. Os polifenóis do extrato otimizado foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao massas. Os melhores resultados foram obtidos com mistura binária água:acetona, 0,5:0,5 (v.v⁻¹), que produziu resultados superiores a 90% dos valores máximos de multi-respostas. A identificação dos biopolifenóis demonstrou que ácidos fenólicos, quercetina deoxihexosídeo e trímero de epigalocatequina foram os principais responsáveis pela ação antioxidante. O estudo conclui que a mistura binária água:acetona em proporções iguais, foi eficaz na extração de polifenóis com ação antioxidante, estabelecendo o jamelão como fonte alternativa de compostos bioativos.

Palavras-chave:

Syzygium cumini (L.) Skeels

Mixture design

Compostos fenólicos

Antocianinas

Capacidade antioxidante.

1. Introdução

Evidências científicas têm demonstrado que o consumo de alimentos fontes de compostos bioativos reduzem o estresse oxidativo, com expressivo impacto na diminuição da incidência de doenças crônicas não transmissíveis. Nesse contexto, destaca-se o jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), fruto rico em polifenóis, principalmente antocianinas, responsáveis pela ação antioxidante, e outras propriedades farmacológicas (TAVARES et al., 2016).

Diferentes solventes, absolutos ou em misturas aquosas, têm sido empregados na extração de polifenóis no jamelão. No entanto, para que haja rendimento máximo, o solvente e o método de extração devem permitir a separação total dos compostos de interesse da matriz complexa, sem modificações em sua estrutura química. Além disso, nessa etapa, devem ser considerados fatores que determinem o tipo e a eficiência de atividade, assim como o meio e estrutura celular em que esses compostos possam atuar (MUSSI et al., 2015).

Apesar dos esforços empregados por pesquisadores de todo o mundo, ainda não foi possível estabelecer um método/solvente oficial pela AOAC para extração de compostos bioativos. Esse fato decorre do elevado número, e complexidade estrutural desses compostos. Dessa forma, fica evidente a necessidade do desenvolvimento, validação e otimização de novos métodos de extração de polifenóis, como etapa prévia à sua caracterização de forma precisa, e obtenção de resultados confiáveis (AZMIR et al., 2013).

Vários estudos investigaram diferentes processos de extração, com ênfase nas relações massa-solvente, solvente-solvente, tempo de extração, temperatura e pressão, bem como formas de otimizar a extração de fenólicos na polpa do jamelão (MARAN et al., 2014; MIGLIATO et al., 2011). No entanto, os resultados obtidos não foram capazes de estabelecer o sistema solvente adequado para o processo de extração de diversas classes polifenólicas do fruto, concomitantemente.

Nesse sentido, técnicas de estatística multivariada para otimização de misturas, como simplex centroid design (SCD) com pontos axiais, têm sido empregadas para analisar diferentes proporções, com reduzido número de experimentos, além de examinar possíveis interações sinérgicas ou antagônicas entre variáveis (BOCHI et al., 2014). Assim, essa ferramenta pode proporcionar o sistema solvente adequado para extração e caracterização de polifenóis do jamelão.

Esse estudo objetivou otimizar o sistema solvente de extração de biopolifenóis na

polpa do jamelão, para obtenção da resposta máxima do rendimento de polifenóis e atividade antioxidante, utilizando desenho experimental de multivariáveis, simplex centroid design.

2. Material e Métodos

2.1 Colheita e preparo da amostra

Os frutos maduros (15,20 °Brix) foram colhidos em novembro de 2014, na cidade de Teresina, Nordeste do Brasil (5°03'17.2''S 42°47'28.0''O). A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob voucher 30.573. Os frutos foram higienizados com hipoclorito de sódio a 100 ppm.10 min⁻¹. A parte comestível (polpa + pele) foi separada manualmente da semente, ainda congelada (-20 °C), para minimizar a degradação enzimática e perda de suco. A polpa foi liofilizada (30.10⁻³ mmHg; -50 °C; 72 h), triturada em ultraprocessador de alimentos, peneirada a 50 “*Mesh Tyler*”.10 min⁻¹, acondicionada em embalagem plástica laminada, termosselada, e armazenada a -20 °C, até o momento das análises.

2.2 Reagentes e padrões

Os compostos químicos (S)-(-)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), sal de diamônio 2,2'-azino-bis(ácido 3-ethylbenzotiazolina-6'-sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), cloreto férrico, Folin-Ciocalteu, ácido gálico, persulfato de potássio, catequina, cloreto de cianidina, p-dimetilaminocinmaldeído (DMACA), 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cloretos de delphinidina-3-O-β-D-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e os reagentes de grau CLAE da Merck® (Darmstadt, Alemanha).

2.3 Extração de compostos bioativos

O pó liofilizado (0,5 g) foi misturado ao solvente extrator (25 mL), homogeneizado em agitador magnético (25 °C.60 min⁻¹), sonificado (80 kHz/20W.20 min⁻¹), centrifugado (1200 g.s⁻¹/15 minutos), filtrado à vácuo, e reextraído nas mesmas condições. Os sobrenadantes

foram completados com o mesmo solvente extrator, até 50 mL, atingindo a proporção de 1:100 (m.v¹) (BOCHI et al., 2014).

A extração dos compostos bioativos seguiu o desenho experimental simplex centroid design, com pontos axiais, que corresponde a três solventes puros (x_1 = água, x_2 = acetona e x_3 = etanol), três misturas binárias (1:1), uma ternária (1:1:1) e três pontos axiais (2/3 de cada solvente e 1/6 dos demais). As respostas avaliadas consistiram no conteúdo total de polifenóis (Y_1), flavonoides (Y_2), flavanois (Y_3), antocianinas monoméricas (Y_4), proantocianidinas (Y_5) e, os ensaios DPPH (Y_6), ABTS (Y_7) e FRAP (Y_8). Com base nos resultados obtidos, o sistema solvente otimizado foi validado. A solução extraída foi concentrada com auxílio de evaporador rotativo (40 °C), liofilizada (30.10⁻³ mmHg; -50 °C; 24 h), submetida à identificação dos compostos por CLAE-MS.

2.4 Análise de compostos bioativos

2.4.1 Conteúdo total de polifenóis

Os polifenóis totais foram analisados por *Folin Ciocalteu* em meio alcalino, medido a 720 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra (SWAIN; HILLS, 1959). O cálculo do teor total de fenólicos foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de ácido gálico ($y = 0,0047x - 0,004$; $r = 0,9998$), preparada nas concentrações de 5 a 180 µg.mL⁻¹ em função da densidade óptica para essas concentrações.

2.4.2 Conteúdo total de flavonoides

Os flavonoides totais foram quantificados pelo método do tricloreto de alumínio (AlCl₃), medidos a 510 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de catequina.g⁻¹ de amostra (ZHISHEN et al., 1999). O cálculo do conteúdo total de flavonoides foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de catequina ($y = 3,575x - 0,0079$; $r = 0,9983$), preparada nas concentrações de 0,02 a 0,12 mg.mL⁻¹ em função da densidade óptica para essas concentrações.

2.4.3 Conteúdo total de antocianinas monoméricas

As antocianinas monoméricas foram quantificadas pelo método de diferença de pH e mensuradas a 510 nm e 700 nm em espectrofotômetro UV-VIS, em tampões com pH 1,0 e 4,5 (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). A absorvância das diluições foi calculada por meio da Equação 1.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

Os resultados da concentração de antocianinas monoméricas foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo.g⁻¹ de amostra. Valores de 449,2 e 26900 foram considerados como peso molecular (PM) e absorvância molar (ϵ) de cianidina-3-glicosídeo, respectivamente (Equação 2)

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg.L}^{-1}\text{)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) \cdot (\epsilon \times 1)^{-1} \quad (2)$$

2.4.4 Conteúdo total de flavanois

Os flavanois totais foram analisados por DMACA 0,1% em HCl 1N em metanol, mensurados a 640 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de equivalente de catequina.g⁻¹ de amostra (ARNOUS et al., 2002). O cálculo do teor total de flavanois foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de catequina ($y = 0,0731x + 0,0708$; $r = 0,999$), preparada nas concentrações de 2 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em função da densidade óptica para essas concentrações.

2.4.5 Conteúdo total de proantocianidinas

O teor total de proantocianidinas, pelo ensaio ácido-butanol, foi mensurado a 550 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expresso em mg de cloreto de cianidina.g⁻¹ de amostra (PORTER et al., 1986). O cálculo do conteúdo total de proantocianidinas foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de cloreto de cianidina ($y = 0,0139x + 0,0262$; $r = 0,9993$), preparada nas concentrações de 5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em função da densidade óptica para essas concentrações.

2.5 Avaliação da atividade antioxidante

2.5.1 Atividade scavenger do radical DPPH·

A capacidade antioxidante, pelo método de sequestro do radical DPPH· foi realizada segundo Kim et al. (2002), mensurada a 517 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 30 minutos do início da reação. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de trolox ($y = 0,0007x - 0,0031$; $r=0,9999$), preparada nas concentrações de 40 a 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, em função da densidade óptica para essas concentrações. Os resultados foram expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

2.5.2 Atividade scavenger do radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante, pelo método de sequestro do radical ABTS^{•+}, foi executada de acordo com Re et al. (1999), mensurada a 734 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 6 minutos do início da reação. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de trolox ($y = 0,0009x - 0,0722$; $r=0,9985$), preparada nas concentrações de 25 a 700 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, em função da densidade óptica para essas concentrações. Os resultados foram expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

2.5.3 Potencial de redução do Fe^{3+} (FRAP)

A capacidade redutora do ferro foi avaliada segundo método proposto por Arnous et al. (2002). As amostras reagiram por 30 minutos com solução de cloreto de ferro (3 mM), em banho-maria a 37 °C. Adicionadas à solução ácida de TPTZ e mensuradas a 620 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 10 minutos. O cálculo do potencial redutor foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de trolox ($y = 0,0023x + 0,1699$; $r=0,9999$), preparada nas concentrações de 30 a 625 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, em função da densidade óptica para essas concentrações. Os resultados foram expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

2.6 Determinação de polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas - CLAE-MS

A separação dos polifenóis pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi realizada conforme procedimentos descritos por De-Melo et al. (2018) e Martínez-Villalba et al. (2013), com modificações. Foi utilizada coluna de fase reversa

LiChroCART C₁₈ (Merck, Darmstadt, Alemanha) (250 mm × 4 mm, 4,5 μm) mantida a 25 °C. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu Proeminence (modelo LC-20ADX – Quioto, Japão) (Software LabSolutions), equipado com duas bombas de alta pressão e detector com arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), termostato (modelo CTO-20A), acoplado ao espectrômetro de massas. A fase móvel foi constituída por: (a) ácido fórmico 0,1% e (b) acetonitrila; e o gradiente de eluição adotado foi 3 min – 10% (b), 22 min – 20% (b), 42 min – 35% (b), 65 min – 8% (b). A taxa de fluxo executada foi de 0,8 mL.min⁻¹.

Para identificação dos compostos foi empregada técnica de espectrometria de massas (MS). Para isso, foi utilizado espectrômetro de massa Bruker modelo Amazon Speed (Billerica, MA, EUA) com analisador tipo íon trap, com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo e positivo, controlados pelo software HyStar, seguindo as seguintes condições: temperatura e voltagem do capilar de ionização foram ajustadas em 230 °C e 3,5 kv; fluxo de gás de desolvatação (N₂) de 360 L/h. Os espectros foram obtidos na faixa de 100-1000 *m/z*. As amostras foram injetadas em triplicatas e os compostos fenólicos identificados correlacionando seus íons moleculares (*m/z*) e fragmentos principais com padrões comerciais ou dados da literatura.

2.7 Análise estatística

Todos os experimentos do simplex centroid design foram executados em ordem randômica, em replicata genuína, para minimizar erros sistemáticos. Esse desenho experimental permite avaliação linear (β_1 , β_2 e β_3), quadrática (β_{12} , β_{13} e β_{23}) e cúbico especial (β_{123}) (Equação 3) para cada resposta em estudo (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (3)$$

Os modelos matemáticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e de regressões, usando o software Statistica 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). A otimização simultânea das variáveis resposta foi baseada na resposta máxima desejada para todas as variáveis. Os modelos foram validados usando o teste t-student ($\alpha = 0,05$; 95% de confiança), em que a média dos valores experimentais ($n = 3$) foi comparada com as respostas estimadas ($n = 3$) do modelo.

3. Resultados e discussão

3.1 Efeitos do sistema solvente sobre o conteúdo total de compostos bioativos e atividade antioxidante

Os resultados obtidos com os experimentos de otimização do sistema solvente por SCD, estão dispostos na Tabela 1. Os modelos apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 83% a 99% e R^2 ajustado de 77% a 99% (Tabela 2).

Conforme demonstrado na Tabela 1, os menores rendimentos da extração de compostos bioativos foram obtidos com solventes puros ou misturas binárias sem a presença de água. A extração com a água mostrou-se mais eficiente do que com etanol e acetona puros, resultado atribuído à formação de pontes de hidrogênio com os polifenóis e presença de açúcares na estrutura química desses compostos, que aumenta a sua solubilidade (MARAN et al., 2014). A acetona pura, por ser um solvente polar aprótico, não é capaz de formar pontes de hidrogênio, o que reduz a solubilidade dos polifenóis, sendo, portanto, o solvente que menos extraiu esses compostos (BHEBHE et al., 2016). No entanto, ao solubilizar a acetona em água, mistura binária 0,5:0,5 (v/v), obteve-se maior eficácia na extração de polifenóis e flavanóis; enquanto para o teor total de flavonoides, antocianinas monoméricas e proantocianidinas, a mistura ternária, 0,33:0,33:0,33 (v/v/v, água:acetona:etanol), foi a que proporcionou melhor resultado. Esses achados foram contrários aos obtidos por Chanda; Kaneria (2012).

Com base nesses resultados, fica evidente que a eficácia da extração, com obtenção de maior teor de compostos bioativos, decorre do aumento do índice de polaridade e constante dielétrica dos solventes orgânicos, com consequente diminuição desses parâmetros da água. A redução da polaridade do sistema solvente aumenta a capacidade de dissolução dos polifenóis, incluindo os de média polaridade, como os flavonoides ligados a radicais metila e acetila. Por esse mesmo motivo, soluções aquosas de acetona possuem rendimento de extração maior que soluções hidroetanólicas (BRAVO et al., 2012).

Tabela 1 - Proporções de solventes extratores de polifenóis do jamelão de acordo com SCD* e, respostas observadas.

Corridas	Variáveis independentes			Respostas							
	Água (X ₁)	Acetona (X ₂)	Etanol (X ₃)	PT	FT	FIT	AM	PrT	DPPH	ABTS	FRAP
1	1,00	0,00	0,00	6,06	0,77	0,00	2,36	0,88	48,63	27,61	10,54
2	0,00	1,00	0,00	3,29	0,91	0,00	0,37	0,36	31,69	14,87	2,67
3	0,00	0,00	1,00	4,84	1,32	0,00	1,85	1,14	41,82	23,09	0,56
4	0,50	0,50	0,00	11,63	1,58	0,29	2,79	1,93	80,36	54,57	22,39
5	0,50	0,00	0,50	8,75	1,24	0,09	2,71	1,71	63,88	42,98	4,18
6	0,00	0,50	0,50	5,96	1,30	0,00	2,10	1,38	48,91	25,96	1,38
7	0,33	0,33	0,33	7,85	1,80	0,23	3,08	2,03	76,50	48,19	9,86
8	0,67	0,17	0,17	9,43	1,46	0,16	2,79	1,09	70,37	47,60	13,20
9	0,17	0,67	0,17	9,76	1,58	0,17	2,85	1,51	69,91	40,30	8,45
10	0,17	0,17	0,67	7,72	1,44	0,05	2,75	1,74	59,06	36,60	1,51
11	1,00	0,00	0,00	5,96	0,74	0,00	2,44	0,90	48,49	27,94	10,24
12	0,00	1,00	0,00	3,33	0,88	0,00	0,40	0,39	31,13	14,65	2,41
13	0,00	0,00	1,00	4,88	1,24	0,00	1,85	1,13	42,11	23,53	0,65
14	0,50	0,50	0,00	11,67	1,63	0,29	2,85	1,92	80,21	53,36	22,26
15	0,50	0,00	0,50	8,82	1,41	0,09	2,69	1,72	64,59	42,65	4,53
16	0,00	0,50	0,50	5,94	1,44	0,00	2,13	1,38	48,21	25,63	1,64
17	0,33	0,33	0,33	7,83	1,85	0,24	3,14	2,05	76,65	47,86	10,50
18	0,67	0,17	0,17	9,51	1,55	0,16	2,86	1,11	69,80	48,48	13,72
19	0,17	0,67	0,17	9,78	1,63	0,17	2,87	1,55	70,20	45,25	10,12
20	0,17	0,17	0,67	7,68	1,49	0,06	2,81	1,75	59,48	37,37	1,59

Resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico.g⁻¹ da amostra liofilizada para polifenóis totais (PT); mg de equivalente de catequina.g⁻¹ da amostra liofilizada para flavonoides totais (FT); mg de equivalente de catequina.g⁻¹ da amostra liofilizada para flavanois totais (FIT); mg de equivalente de cianidina-3-glicosídeo.g⁻¹ da amostra liofilizada para antocianinas monoméricas (AM); mg de equivalente de cloreto de cianidina.g⁻¹ da amostra liofilizada para proantocianidinas (PrT); µmol de equivalente de Trolox.g⁻¹ da amostra liofilizada para DPPH, ABTS e FRAP.

* SDC: Simplex Centroid Design.

Tabela 2 - Resultados ANOVA dos modelos de regressão estimados por SCD para otimização do sistema solvente de extração dos polifenóis do jamelão e adequação da proposta.

ANOVA	SS	GL	F	p	R ²
Fonte de Variação					
PT					
Linear	17,9933	2	1,58548	0,233689	0,157204
Quadrático	83,3877	3	29,75806	0,000002	0,885749
Cúbico	3,2660	1	4,32758	0,057844	0,914284
FT					
Linear	0,098739	2	0,45625	0,641191	0,050942
Quadrático	1,701704	3	57,62289	0,000000	0,928898
Cúbico	0,069660	1	13,28730	0,002965	0,964837
FIT					
Linear	0,028626	2	1,3617	0,282788	0,138082
Quadrático	0,170925	3	102,7996	0,000000	0,962572
Cúbico	0,003148	1	8,8732	0,010665	0,977755
AM					
Linear	3,53846	2	3,80513	0,043085	0,309231
Quadrático	6,99369	3	35,84107	0,000001	0,920420
Cúbico	0,14886	1	2,54040	0,134980	0,933429
PrT					
Linear	0,388077	2	0,75202	0,486464	0,081281
Quadrático	3,594461	3	21,18085	0,000018	0,834129
Cúbico	0,007380	1	0,12228	0,732177	0,835675
DPPH					
Linear	626,700	2	1,3377	0,288705	0,135979
Quadrático	3844,277	3	130,1784	0,000000	0,970098
Cúbico	25,989	1	3,0215	0,105782	0,975737
ABTS					
Linear	516,925	2	1,7772	0,199129	0,172924
Quadrático	2423,601	3	231,8309	0,000000	0,983680
Cúbico	3,772	1	1,0894	0,315635	0,984942
FRAP					
Linear	458,3817	2	9,7984	0,001478	0,535478
Quadrático	388,1981	3	191,8461	0,000000	0,988969
Cúbico	2,6099	1	4,9655	0,044136	0,992018

Adequação da proposta para modelo quadrático para o total de compostos bioativos

Fonte de variação	SS	GL	QM	F-valor	p-valor	R ² ajustado
PT						
Modelo	101,3810	5	20,27620	21,708	0,000004	0,844946
Erro total	13,0769	14	0,93406			
Falta de ajuste	13,0616	4	3,26540	2134,901	0,000000	
Erro puro	0,0153	10	0,00153			
FT						
Modelo	1,800443	5	0,360089	36,57983	0,000000	0,903504
Erro total	0,137815	14	0,009844			
Falta de ajuste	0,100622	4	0,025156	6,76362	0,006657	
Erro puro	0,037192	10	0,003719			
FIT						
Modelo	0,199551	5	0,039910	72,0097	0,000000	0,949204
Erro total	0,007759	14	0,000554			
Falta de ajuste	0,007713	4	0,001928	420,7840	0,000000	
Erro puro	0,000046	10	0,000005			

AM						
Modelo	10,53216	5	2,106431	32,3849	0,000000	0,891999
Erro total	0,91061	14	0,065044			
Falta de ajuste	0,89821	4	0,224553	181,1234	0,000000	
Erro puro	0,01240	10	0,001240			
PrT						
Modelo	3,982538	5	0,796508	14,0806	0,000049	0,774889
Erro total	0,791949	14	0,056568			
Falta de ajuste	0,789946	4	0,197486	985,9867	0,000000	
Erro puro	0,002003	10	0,000200			
DPPH						
Modelo	4470,978	5	894,1955	90,8401	0,000000	0,959419
Erro total	137,811	14	9,8436			
Falta de ajuste	136,791	4	34,1977	335,3544	0,000000	
Erro puro	1,020	10	0,1020			
ABTS						
Modelo	2940,526	5	588,1052	168,7666	0,000000	0,977851
Erro total	48,786	14	3,4847			
Falta de ajuste	34,767	4	8,6918	6,2001	0,008940	
Erro puro	14,019	10	1,4019			
FRAP						
Modelo	846,5799	5	169,3160	251,0260	0,000000	0,985029
Erro total	9,4429	14	0,6745			
Falta de ajuste	7,5039	4	1,8760	9,6750	0,001816	
Erro puro	1,9390	10	0,1939			

Simplex centroid design.

PT = Polifenóis totais; FT = Flavonoides totais; FIT = Flavanois totais; AM = Antocianinas monoméricas; PrT = Proantocianidinas; DPPH = atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH·, ABTS = atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS·+, FRAP = capacidade redutora do íon férrico Fe³⁺.

*F-valor calculado em nível de significância de 95%.

Com relação à ação antioxidante dos solventes extratores, o estudo mostrou que a solução aquosa de acetona, 0,5:0,5 (v/v), também proporcionou os melhores resultados. Essa ação antioxidante é atribuída aos polifenóis, principalmente, aos flavanois e antocianinas, devido à forte correlação positiva entre esses compostos e os ensaios DPPH ($r_{flavanois} = 0,92$; $r_{antocianinas} = 0,87$; $p < 0,05$) e ABTS ($r_{flavanois} = 0,91$; $r_{antocianinas} = 0,86$; $p < 0,05$) (Tabela 3). No ensaio FRAP, ao contrário dos flavanois ($r_{flavanois} = 0,81$; $p < 0,05$), as antocianinas, apresentaram baixa correlação ($r_{antocianinas} = 0,48$; $p < 0,05$), sugerindo que a redução do íon férrico (Fe³⁺) é independente da concentração de antocianinas. Esses resultados são corroborados por Slatnar et al. (2012), que atribuem maior ação antioxidante aos flavanois, em comparação às antocianinas, devido à sua estrutura molecular, com presença da estrutura O-di-hidroxi no anel B, insaturação no anel C e, grupos 3 e 5-OH com função 4-oxo nos anéis A e C, necessários para máxima eliminação de radicais/íons.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson's (*r*) entre compostos bioativos e atividade antioxidante do jamelão

Variáveis	PT	FT	FIT	AM	PrT	DPPH	ABTS
Flavonoides	0,675612*						
Flavanois	0,850071*	0,767937*					
Antocianinas monoméricas	0,807108*	0,681689*	0,641595*				
Proantocianidinas	0,715955*	0,818205*	0,681092*	0,820442*			
DPPH	0,937507*	0,800991*	0,923896*	0,874053*	0,817324*		
ABTS	0,947966*	0,761889*	0,910244*	0,855712*	0,779182*	0,987433*	
FRAP	0,747220*	0,333214	0,814963*	0,478831*	0,328146	0,721903*	0,733698*

As correlações de Pearson's entre as classes polifenólicas foram realizadas a 95% de significância.

Analisando-se ainda a Tabela 2, observa-se que os modelos quadráticos foram significativos para todas as respostas. O conteúdo de flavonoides, flavanois e atividade antioxidante pelo ensaio FRAP, também apresentaram modelo cúbico significativo. Com base nesses resultados, o melhor modelo foi definido por meio um novo teste F, em que comparou-se a redução nos resíduos causada pela ampliação do modelo com a média quadrática residual do modelo mais extenso, com 95% de confiança. Assim, o modelo quadrático foi o que apresentou melhores interações entre solventes e respostas estudadas, demonstrando não haver necessidade de utilizar mais que dois solventes para extração de polifenóis do fruto. Os solventes que mostraram significativo efeito sinérgico em todas as interações foram água e acetona (Tabela 4), corroborando com os demais resultados apresentados nesse estudo.

Tabela 4 - Coeficientes de regressão para modelos quadráticos

Variáveis resposta	Coeficientes de regressão					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃
PT	5,97*	3,85*	4,96*	26,11*	10,65*	5,87
FT	0,75*	0,90*	1,24*	3,53*	1,54*	1,45*
FIT	-0,007	0,002	-0,01	1,23*	0,42*	0,07
AM	2,28*	0,51*	1,83*	6,31*	2,60*	4,82*
PrT	0,74*	0,42*	1,18*	4,81*	2,49*	2,55*
DPPH	47,15*	32,97*	41,09*	169,59*	79,40*	56,96*
ABTS	27,39*	15,66*	22,87*	134,91*	70,49*	31,07*
FRAP	10,60*	2,59*	0,35	61,35*	-7,23*	-3,25

x₁ = água, x₂ = acetona, x₃ = etanol.

PT = polifenóis totais, FT = flavonoides totais, FIT = flavanois totais, AM = antocianinas monoméricas, PrT = proantocianidinas totais, DPPH = atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH, ABTS = atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS⁺, FRAP = capacidade redutora do íon férrico Fe³⁺. A interação entre os solventes extratores e a extração das diferentes classes polifenólicas foi avaliada a 95% de significância.

A otimização conjunta dos teores dos compostos bioativos e atividade antioxidante da polpa liofilizada do jamelão (Figura 1), revela que as respostas máximas seriam estimadas nas proporções de solventes de 0,5:0,5:0 (v/v/v, água:acetona:etanol). A escolha desse sistema de solventes decorre da obtenção de resultados superiores a 90% dos valores máximos de multi-resposta. Assim, adotou-se esse modelo para validação dos métodos testados e caracterização do perfil fenólico. Esse modelo foi considerado satisfatório, por apresentar valores experimentais que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) dos estimados, conforme Tabela 5.

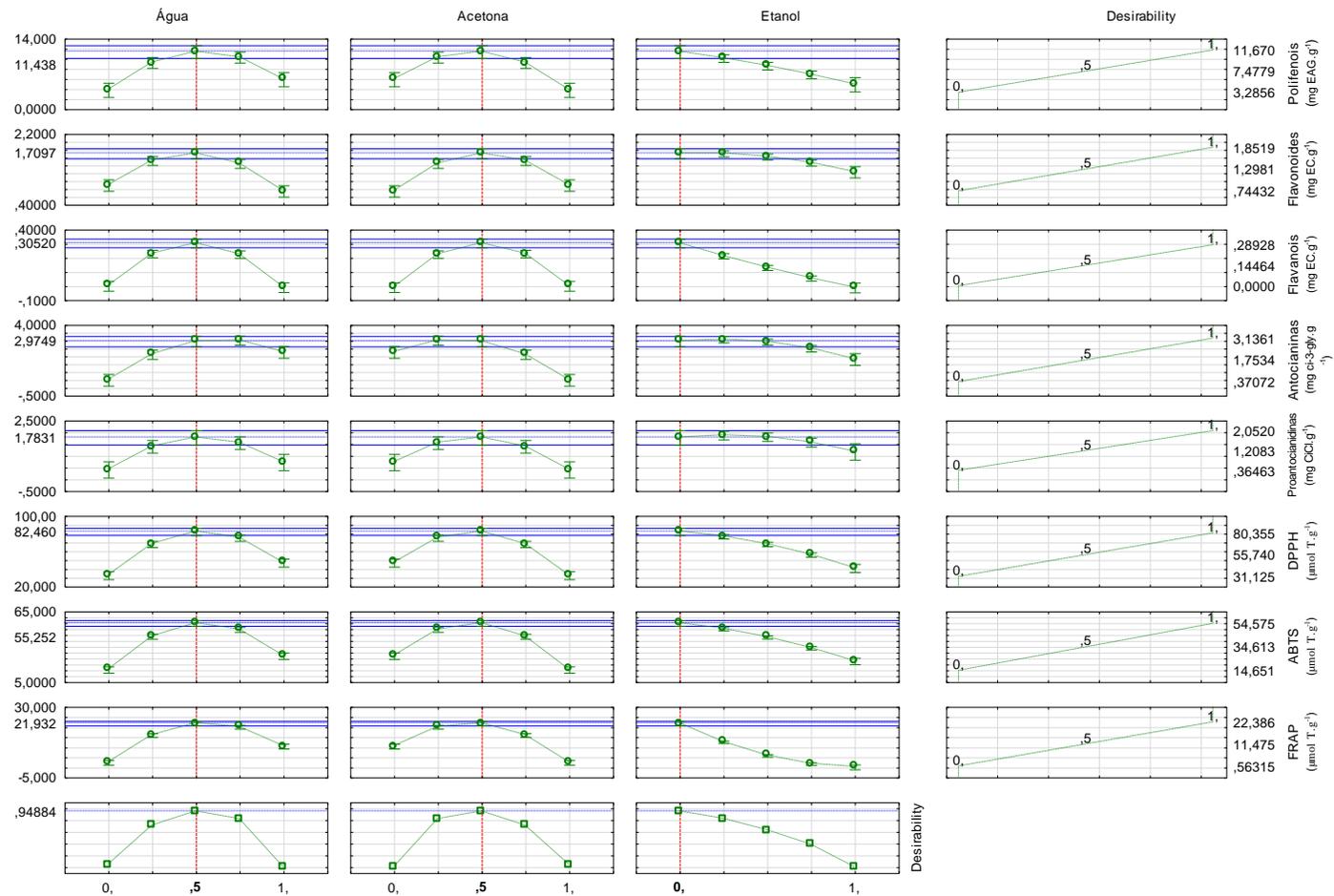
Tabela 5 - Conteúdo total de polifenóis, flavonoides, flavanois, antocianinas monoméricas, proantocianidinas e atividades antioxidante que foram obtidos usando a mistura ótima de solventes (acetona:água, 0,5:0,5, v.v⁻¹)

Funções resposta	Valores preditos	Valores observados	p-valor
PT (mg EAG.g ⁻¹)	11,67	11,88 ± 0,10	0,19
FT (mg EC.g ⁻¹)	1,85	1,74 ± 0,04	0,14
FIT (mg EC.g ⁻¹)	0,29	0,33 ± 0,02	0,13
AM (mg Ci-3-gly.g ⁻¹)	3,14	2,95 ± 0,05	0,06
PrT (mg CiCl.g ⁻¹)	2,05	1,97 ± 0,01	0,06
DPPH (μmol T.g ⁻¹)	80,36	80,76 ± 1,02	0,76
ABTS (μmol T.g ⁻¹)	54,57	53,63 ± 0,33	0,13
FRAP (μmol T.g ⁻¹)	22,37	22,73 ± 0,61	0,65

Resultados expresso como média (n = 3) ± desvio padrão. Teste t-student (p < 0,05).

PT = polifenóis totais, FT = flavonoides totais, FIT = flavanois totais, AM = antocianinas monoméricas, PrT = proantocianidinas totais, DPPH = atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH, ABTS = atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS⁺, FRAP = capacidade redutora do íon férrico Fe³⁺.

Figura 1 - Perfis para valores preditos de resposta máxima em função do sistema solvente para compostos bioativos e atividade antioxidante

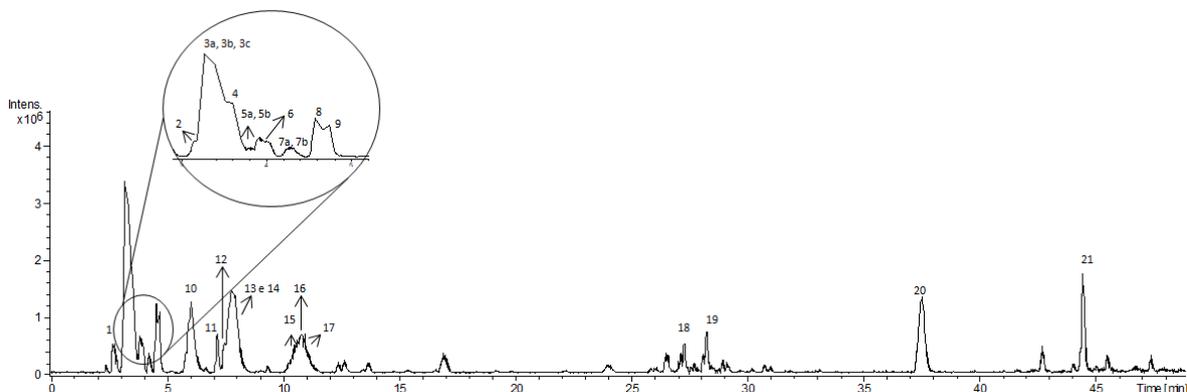


*EAG: equivalente de ácido gálico. EC: equivalente de catequina. Ci-3-gli: cianidina-3-glicosídeo. CiCl: cloreto de cianidina. µmolT = equivalente de µmol de Trolox.

3.2 Perfil fenólico

As características cromatográficas e espectrométricas dos polifenóis do extrato otimizado do jamelão (acetona:água, 0,5:0,5, v.v⁻¹) estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7. As detecções por ESI-MS nos modos de ionização negativa e positiva foram empregadas de forma complementar. Um total de 41 compostos foi encontrado nesse extrato, sendo 24 polifenóis não antociânicos e 17 antociânicos. Dentre os compostos não antociânicos foram identificados, isômeros de dihidromiricetina e suas formas metiladas (picos 10 a 17) que representaram 37,25% dos compostos presentes no fruto, e ácido cafeico (pico 3c, *m/z* 179) e seus derivados que estavam presentes em 34,27% (Tabela 6). Isso demonstra forte prevalência de ácidos hidroxicinâmicos e flavanonois no jamelão, confirmando os resultados obtidos por Tavares et al. (2016) e Lestario et al. (2017). O cromatograma obtido para esses compostos está demonstrado na Figuras 2.

Figura 2 - Cromatograma de polifenóis do extrato acetona:água (0,5:0,5, v.v⁻¹) do jamelão, obtido por CLAE-MS, modo de ionização negativa



Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam estrutura C6-C3, com uma dupla ligação na cadeia lateral, em configuração *cis* ou *trans*, que proporciona a perda do grupamento CO₂ [M-H-44] (HERAS et al., 2016). Entretanto, isso não foi observado nesse estudo, pois os ácidos hidroxicinâmicos identificados foram caracterizados por típica perda de uma molécula de H₂O (18 u). Ácido cafeico liberou o fragmento *m/z* 161, e o ácido quínico (pico 7b, *m/z* 191), o fragmento *m/z* 173. O mesmo comportamento foi observado para os derivados desses ácidos. Isso decorre da presença de água na solução extratora, que proporciona a formação de pontes de hidrogênio inter e intramolecular, facilitando a liberação dessa molécula.

Tabela 6 - Identificação de polifenóis na mistura binária acetona:água (0,5:0,5, v.v⁻¹) por CLAE-MS no modo de ionização negativa

Pico	t _R (min)	MS [M-H] ⁻ / [M-H-H ₂ O] ⁻	MS ²	MS ³	Identificação proposta	Referência	Abundância relativa (%) [*]
1	2,8	412	366	203, 179, 142	Derivado do ácido caféico	Wu et al. (2009)	0,94
2	3,2	488	341, 146, 179	179, 161	Cafeoil hexose-deoxyhexosideo	Riviera-Pastrana et al. (2010)	0,55
3a	3,3	359	179, 161	161, 119, 142	Dímero do ácido cafeico	Wu et al. (2009)	10,89
3b	3,3	341	179, 161	161, 143, 113, 131	Cafeoil hexosídeo	Wu et al. (2009)	10,89
3c	3,3	179	161, 143	161, 143, 119, 131	Ácido cafeico	Wu et al. (2009)	10,89
4	3,4	295	179, 133, 161	161, 143, 113, 89	Éster de ácido cafeico	Falcão et al. (2010)	0,07
5a	3,6	393	295	179, 133, 161	Derivado do ácido cafeico	Wu et al. (2009)	0,04
5b	3,6	333	241, 171, 153	153, 223, 97	Aduto de ácido protocatéquico-hexosídeo com H ₂ O	Lambert et al. (2015)	0,03
6	3,9	289	271, 133	115	Aduto de apigenina com H ₂ O	Ferreres et al. (2003)	0,66
7a	4,6	405	387, 191	111, 173, 129	Derivado de ácido quínico	Bastos et al. (2007)	1,84
7b	4,6	191	111, 173	111	Ácido quínico	Bastos et al. (2007)	1,84
8	4,8	331	271, 169	125, 211, 169	Ácido gálico 4-O-hexosídeo	Heras et al. (2016)	3,37
9	4,9	169	125		Ácido gálico	Faria et al. (2011)	0,42
10	6,1	643	463, 481, 355, 505	301, 283, 355, 319, 337, 256	Dihidromiricetina-1	Tavares et al. (2016)	11,15
11	7,2	643	481, 319, 463, 355, 301, 283	319, 301, 355, 329, 257, 233	Dihidromiricetina-2	Tavares et al. (2016)	2,29
12	7,6	657	495, 477, 355	333, 315, 369, 495,	Metil dihidromiricetina-1	Tavares et al. (2016)	0,38

				297, 282, 257			
13	7,7	657	495, 477, 519, 355	333, 369, 333, 315, 271	Metil dihidromiricetina-2	Tavares et al. (2016)	9,65
14	7,8	657	495, 477, 355, 319	315, 297, 333, 369, 315, 282	Metil dihidromiricetina-3	Tavares et al. (2016)	9,65
15	10,7	671	509	347, 261, 371, 261, 189	Dimetil dihidromiricetina-1	Tavares et al. (2016)	3,27
16	10,8	657	495, 333, 355	333, 369, 167, 193, 271, 125	Metil dihidromiricetina-4	Tavares et al. (2016)	0,65
17	11	671	509	347, 371, 329, 401, 303, 261, 189	Dimetil dihidromiricetina-2	Tavares et al. (2016)	0,21
18	27,3	757	549, 491, 653	491, 329, 531, 387	Derivado de malvidina 3,5-diglicosídeo	Lestario et al. (2017)	1,55
19	28,8	479	461, 317	271, 287, 179, 244, 151	Miricetina 3-glicosídeo	Sun et al. (2007)	0,32
20	37,5	447	301	179, 151, 271, 229, 273, 107	Quercetina deoxihexosídeo	Gordon et al. (2011)	11,30
21	44,4	949	904	338, 451, 564, 677, 790, 885	Trímero de epigallocatequina ligado a 2H ₂ O	Costa et al. (2016)	7,13

NI: não identificado.

* Cálculo efetuado a partir do percentual da área.

Os ácidos hidroxibenzoicos encontrados no extrato otimizado do jamelão foram o aduto de ácido protocatéquico-hexosídeo com H₂O (pico 5b, *m/z* 333), ácido gálico 4-O-hexosídeo (pico 8, *m/z* 331) e ácido gálico (pico 9, *m/z* 169). Esses ácidos, embora apresentem estrutura química diferente (C6-C1) da dos hidroxicnâmicos, apresentam perda similar [M-H-44]⁻ em MS₂ (QUIFER-RADA et al., 2015). Entretanto, para o ácido gálico monoglicosilado, essa perda só ocorreu em MS₃, onde foi exibido o íon *m/z* 125. Essa alteração, na etapa de fragmentação, foi atribuída à liberação inicial do grupo glicosídico em MS₂, gerando *m/z* 169, postergando a liberação da molécula de CO₂. Esses achados foram semelhantes aos obtidos por Faria et al. (2011).

Além dos ácidos citados anteriormente, foram observados nove flavanonois, isômeros da dihidromiricetina. Esses isômeros são caracterizados pela perda de um fragmento de 162 u, que é atribuível à perda neutra de uma hexose desidratada. A perda de uma molécula inteira de hexose (180 u) só é possível se a mesma estiver ligada à posição C3 do anel C de um flavanonol, resultando na formação de uma ligação dupla entre as posições C2 e C3, nesse anel. Em contraste, se a hexose for ligada a um dos grupos hidroxílicos dos anéis A e B do flavanonol, a perda de hexose só é possível por meio da sua desidratação. Portanto, segundo Tavares et al. (2016), a detecção do fragmento [M-hexose-H]⁻ como sinal principal no espectro MS/MS sugere que as hexoses estão ligadas às posições C5 e C7 do anel A, ou a um dos grupos hidroxílicos do anel B.

Nesse estudo, identificou-se ainda presença de quercetina deoxihexosídeo (pico 20, *m/z* 447) e do trímero de epigallocatequina ligado a duas moléculas de H₂O (pico 21, *m/z* 949). A confirmação dessas moléculas foi baseada nas características de fragmentação MS₂ e MS₃. Em MS₂ essas moléculas liberam *m/z* 301 e *m/z* 904, respectivamente. A liberação de *m/z* 301 em MS₂ pode ser confundida com a liberação de ácido elágico, porém quaisquer dúvidas existentes são esclarecidas com a fragmentação MS₃. Nessa fragmentação, quercetina libera os fragmentos *m/z* 271, *m/z* 255, *m/z* 179 e *m/z* 155; enquanto ácido elágico libera apenas o *m/z* 257 (GORDON et al., 2011; COSTA et al., 2016). Portanto, as características encontradas para esse fragmento são referentes à quercetina. Esses dois compostos encontram-se abundantemente no extrato otimizado do jamelão, e são os possíveis responsáveis pela ação antioxidante do fruto, uma vez que essa ação apresentou forte correlação positiva com flavanóis e proantocianidinas.

A identificação de antocianinas presentes no extrato otimizado do jamelão, está apresentada na Tabela 7. Entre os compostos antociânicos encontrados, destacam-se: delphinidina (m/z 303), cianidina (m/z 287), petunidina (m/z 317), peonidina (m/z 301) e malvidina (m/z 331), em suas formas mono ou diglicosiladas e, seus derivados. As antocianinas glicosiladas também foram identificadas por Santiago et al. (2016) e Tavares et al. (2017). No entanto, esses estudos não foram capazes de detectar a presença de antocianinas derivadas de petunidina (m/z 353), peonidina (m/z 413) e cianidina (m/z 697), encontradas nesse estudo e confirmadas por co-cromatografia com os padrões respectivos.

Tabela 7 - Identificação de antocianinas no jamelão (mistura binária acetona:água, 0,5:0,5, v.v⁻¹), por CLAE-MS no modo de ionização positiva.

Composto	MS [M] ⁺	MS ²	Identificação proposta	Referência
1	353	335, 317, 232	Derivado de petunidina	Padrão
2	413	301	Derivado de peonidina	Padrão
3	449	287, 278	Cianidina 3-O-glicosídeo	Flamini et al. (2015)
4	451	436, 357	NI	
5	463	425, 301	Peonidina 3-O-glicosídeo	Flamini et al. (2015)
6	465	425, 303	Delfinidina 3-O-glicosídeo	Flamini et al. (2015)
7	479	419, 317	Petunidina 3-O-glicosídeo	Flamini et al. (2015)
8	493	331	Malvidina 3-O-glicosídeo	Flamini et al. (2015)
9	611	355, 285	Cianidina 3,5-diglicosídeo	Faria et al. (2011)
10	627	465, 457, 303	Delfinidina 3,5-diglicosídeo	Faria et al. (2011)
11	639	301	Derivado de peonidina	Padrão
12	641	597, 479, 317, 301	Petunidina 3,5-diglicosídeo	Faria et al. (2011)
13	655	491, 339, 331	Malvidina 3,5-diglicosídeo	Faria et al. (2011)
14	697	535, 360, 338	Derivado de cianidina malonilglicosídeo	Schutz et al. (2006)
15	773	724, 423, 395, 387	NI	
16	787	616, 447	NI	

NI: não identificado.

Agliconas em suas formas livres foram reportadas anteriormente (SANTOS et al., 2013), no entanto, as mesmas não foram detectadas nesse estudo. Para que haja liberação das agliconas antociânicas, a hidrólise de glicosídeos deve ocorrer em condições drásticas com ácidos, calor e tempo elevado de extração (MARAN et al., 2014). Esses parâmetros não foram empregados na extração de bioativos nesse estudo, devido à degradação de outros polifenóis.

4. Conclusões

A obtenção dos rendimentos máximos de compostos bioativos e a capacidade antioxidante do jamelão foram otimizados com a mistura binária água:acetona, em iguais proporções. O estudo também mostra que o extrato otimizado do fruto consegue extrair as principais classes polifenólicas com ação antioxidante, como ácidos fenólicos, flavanonois, flavanois, proantocianidinas e antocianinas. Assim, essas informações definem o jamelão como uma fonte alternativa de compostos bioativos, especialmente devido ao alto conteúdo de polifenóis e antocianinas, que implica na sua potencial aplicação comercial como corante alimentar, produção de nutracêuticos, fármacos e cosméticos com benefícios para a saúde humana.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (número de concessão 83151320325) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI (número de concessão 006/2016), pela concessão de bolsa de pesquisa e financiamento do projeto, respectivamente.

Referências

- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, 15, 655-665, 2002.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUO, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426-436, 2013.
- BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12, 423-432, 2007.
- BHEBHE, M.; FÜLLER, T. N.; CHIPURURA, B.; MUCHUWETI, M. Effect of Solvent Type on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of Black Tea and Herbal Infusions. **Food Analytical Methods**, 9, 1060-1067, 2016.
- BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; SPERONI, C. S.; GIUSTI, M. M.; GODOY, H. T. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, 164, 347-354, 2014.
- BRAVO, J. et al. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 12565–12573, 2012.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statística**. Rio de Janeiro: E-papers serviços editoriais, 2003.
- CHANDA, S. V.; KANERIA, M. J. Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from leaves of *Syzygium cumini* L. using different solvents. **Food Analytical Methods**, 5, 332-338, 2012.
- COSTA, M. F.; GALAVERNA, R. S.; PUDENZI, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C. Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical Methods**, 8, 6056-6063, 2016.
- DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, L. M.; MOREIRA, M. M.; DELERUE-MATOS, C.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Phenolic profile by CLAE-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: monofloral bee pollen. **Journal of Food Biochemistry**, 1-21, 2018. e12536.
- FALCÃO, S. I.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L. M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M. R. M.; CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 396, 887-897, 2010.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571–1578, 2011.
- FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap CLAE-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochemical Analysis**, 14, 352-359, 2003.

- FLAMINI, R.; ROSSO, M.; BAVARESCO, L. Study of Grape Polyphenols by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (UCLAE/QTOF) and Suspect Screening Analysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2015, 1-10, 2015.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.
- GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, F. G. S.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59,7688-7699, 2011.
- HERAS, R. M. L.; QUIFER-RADA, P.; ANDRÉS, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, 23, 370-377, 2016.
- KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 50, 3713-3717, 2002.
- LAMBERT, M.; MEUDEEC, E.; VERBAERE, A.; MAZEROLLES, G.; WIRTH, J.; MASSON, G.; CHEYNIER, V.; SOMMERER, N. A High-Throughput UCLAE-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. **Molecules**, 20, 7890-7914, 2015.
- LESTARIO, L. N.; HOWARD, L. R.; BROWNMILLER, C.; STEBBINS, N. B.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). **Food Research International**, 100, 385-391, 2017.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruits pulp. **Journal of Food Science and Technology**, 51, 1938-1946, 2014.
- MARTÍNEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Ultra-high performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1313, 119-131, 2013.
- MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M.; ALMEIDA, A. M. F. A.; PIZZOLITTO, A. C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, 34, 695-699, 2011.
- MUSSI, L. P.; GUIMARÃES, A. O.; FERREIRA, K. S.; PEREIRA, N. R. Spouted bed drying of jambolão (*Syzygium cumini*) residue: drying kinetics and effect on the antioxidant activity, anthocyanins and nutrients contents. **LWT - Food Science and Technology**, 61, 80-88, 2015.
- PORTER, L. J.; HIRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, 25, 223–230, 1986.
- QUIFER-RADA, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; CHIVA-BLANCH, G.; JÁUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, 169, 336-343, 2015.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1231-1237, 1999.
- RIVERA-PASTRANA, D. M.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90, 2358-2365, 2010.
- SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A. C. M. S.; PEIXOTO, BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M.; NOGUEIRA, R. I. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. **Fruits**, 71, 3-8, 2016.
- SANTOS, D. T.; CAVALCANTI, R. N.; ROSTAGNO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of polyphenols and anthocyanins from the jambul (*Syzygium cumini*) fruits peels. **Food and Public Health**, 3, 12-20, 2013.
- SCHUTZ, K.; PERSIKE, M.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by CLAE-DAD-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 384, 1511-1517, 2006.
- SLATNAR, A.; JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; JAMNIK, P. The effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. **Plos One**, 7, 2012.
- SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, 12, 679-693, 2007.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I-quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.
- TAVARES, I. M. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, 82, 1-13, 2016.
- TAVARES, I. M. C.; NOGUEIRA, T. Y. K.; MAURO, M. A.; GOMEZ-ALONSO, S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; LAGO-VANZELA. Dehydration of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) juice during foam mat drying: quantitative and qualitative changes of the phenolics compounds. **Food Research International**, 102, 32-42, 2017.
- WU, Z. J.; MA, X. L.; FANG, D. M.; QI, H. Y.; REN, W. J.; ZHANG, G. L. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus Yunnanensis* using electrospray ionization Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, 15, 415-429, 2009.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64, 555-559, 1999.

Material Suplementar

S1 - Equações provenientes da otimização dos compostos bioativos do fruto do jamelão

$$\mathbf{PT} = 5,97x_1 + 3,85x_2 + 4,96x_3 + 26,11x_1x_2 + 10,65x_1x_3$$

$$(\pm 0,66) (\pm 0,66) (\pm 0,66) (\pm 3,04)(\pm 3,04)$$

$$\mathbf{FT} = 0,75x_1 + 0,90x_2 + 1,24x_3 + 3,53x_1x_2 + 1,54x_1x_3 + 1,45x_2x_3$$

$$(\pm 0,07) (\pm 0,07) (\pm 0,07) (\pm 0,31)(\pm 0,31) (\pm 0,31)$$

$$\mathbf{FIT} = 1,23x_1x_2 + 0,42x_1x_3$$

$$(\pm 0,07) (\pm 0,07)$$

$$\mathbf{AM} = 2,28x_1 + 0,51x_2 + 1,83x_3 + 6,31x_1x_2 + 2,6x_1x_3 + 4,82x_2x_3$$

$$(\pm 0,17) (\pm 0,17) (\pm 0,17) (\pm 0,80)(\pm 0,80) (\pm 0,80)$$

$$\mathbf{PrT} = 0,74x_1 + 0,42x_2 + 1,18x_3 + 4,81x_1x_2 + 2,49x_1x_3 + 2,55x_2x_3$$

$$(\pm 0,16) (\pm 0,16) (\pm 0,16) (\pm 0,75)(\pm 0,75) (\pm 0,75)$$

$$\mathbf{DPPH} = 47,15x_1 + 32,97x_2 + 41,09x_3 + 169,59x_1x_2 + 79,40x_1x_3 + 56,96x_2x_3$$

$$(\pm 2,14) (\pm 2,14) (\pm 2,14) (\pm 9,86)(\pm 9,86) (\pm 9,86)$$

$$\mathbf{ABTS} = 27,39x_1 + 15,66x_2 + 22,87x_3 + 134,91x_1x_2 + 70,49x_1x_3 + 31,07x_2x_3$$

$$(\pm 1,27) (\pm 1,27) (\pm 1,27) (\pm 5,87)(\pm 5,87) (\pm 5,87)$$

$$\mathbf{FRAP} = 10,60x_1 + 2,59x_2 + 61,35x_1x_2 - 7,23x_1x_3$$

$$(\pm 0,56) (\pm 0,56) (\pm 2,58)(\pm 2,58)$$

Capítulo 3

Efeitos toxicogenéticos de biopolifenois antioxidantes do extrato aquoso do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) em *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn

**Efeitos toxicogênicos de biopolifenóis antioxidantes do extrato aquoso do jamelão
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels) em *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn**

Mariana de Moraes Sousa^a, Rosália Maria Tôrres de Lima^a, Alessandro de Lima^a, Antonielly Campinho Reis^b, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^b, José Augusto Gasparotto Sattler^c, Lígia Bicudo de Almeida-Muradian^c, Jorge Mancini Filho^c, Geni Rodrigues Sampaio^d, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres^d, Nadir do Nascimento Nogueira^e

^a*Departamento de Hospitalidade, lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina Zona Sul Campus, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: mariana@ifpi.edu.br; rosaliatlima@gmail.com; alessandro@ifpi.edu.br*

^b*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: antonielyreis@gmail.com; anameliamelocavalcante@gmail.com*

^c*Departamento de alimentos e nutrição experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: jagasparotto@gmail.com; ligiabi@usp.br; jmancini@usp.br.*

^d*Departamento de Nutrição. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: genirs@usp.br; etorres@usp.br.*

^e*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: nadirn@uol.com.br*

* Autor correspondente

Rua São Pedro, 3274, Apto 704, Ed. Palazzo Poty

CEP: 64001-260, Teresina, Piauí, Brasil

Phone: + 55 86 3222 6923 / + 55 86 99986 0648

Fax: + 55 86 3215 5690

E-mail: nadirn@uol.com.br

RESUMO

O jamelão possui importante atividade biológica devido aos seus biopolifenois antioxidantes. Entretanto, o consumo excessivo desses compostos pode ocasionar danos a nível genético. O estudo objetivou avaliar possíveis efeitos citogenotóxicos do fruto, bem como determinar os componentes da mistura complexa e ação antioxidante. A identificação dos biopolifenois foi realizada por CLAE-MS. A atividade *scavenger* do radical peroxil e inibição da oxidação lipídica foram mensuradas pelos ensaios ORAC e rancimat, respectivamente. O teste de citotoxicidade foi realizado em *Artemia salina*, enquanto citogenotoxicidade em *Allium cepa* em concentrações de 100 a 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram a presença de 15 compostos no EAJ, entre eles ácidos hidroxicinâmicos, hidroxibenzoicos, antocianinas 3,5 diglicosiladas e flavanonois. Esses compostos podem ser os responsáveis pela ação antioxidante do fruto, demonstrada pelos ensaios ORAC ($112,31 \pm 12,56 \mu\text{molTrolox.g}^{-1}$) e inibição da oxidação lipídica (53,66%). Em relação aos efeitos toxicogenéticos, observou-se que concentrações inferiores a 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não exibiram efeito citotóxicos pelos métodos analisados. O estudo demonstrou ainda que o extrato aquoso do fruto não apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos significativos ($p>0,05$) em nenhuma das concentrações testadas nas raízes de *A. cepa*. O estudo conclui que o jamelão possui biopolifenois com ação antioxidante, que não ocasionam riscos de instabilidade genética, se consumido nas concentrações adequadas.

Palavras-chave:

Syzygium cumini (L.) Skeels

Compostos bioativos

Efeitos citogenotóxicos

1. Introdução

O jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels, Família Myrtaceae) tem demonstrado várias propriedades biológicas por atuar como antioxidante, antibacteriano, anti-inflamatório, antiproliferativo contra células de câncer de pulmão humano A549 e, inibidor de crescimento e indução de apoptose de câncer de mama humano (LI et al., 2009; PAVAN et al., 2010; AQIL et al., 2012; SHARMA et al., 2017). As bioatividades mencionadas são atribuídas aos seus polifenóis, principalmente às antocianinas (RUFINO et al., 2011; MUSSI et al., 2015).

Devido a essas propriedades, o jamelão tem sido empregado na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (SHEIKH et al., 2011; TOBAL et al., 2012; SANTIAGO et al., 2016). Entretanto, os efeitos citogenotóxicos do fruto e de seus produtos elaborados devem ser avaliados, pois concentrações elevadas de antocianinas, taninos e outros flavonoides podem ocasionar danos a biomoléculas como o DNA (TEDESCO et al., 2015).

No Brasil, pesquisas realizadas para avaliar o uso seguro de frutos, plantas e ervas com propriedades farmacológicas ainda estão em estágio inicial (KUHN et al., 2015). Essa avaliação inclui caracterização da atividade biológica, investigação de mecanismos atribuídos aos constituintes químicos, determinação da concentração ativa e do potencial tóxico (ARAÚJO et al., 2014). O grau de toxicidade desses produtos depende de fatores como: parte e idade da planta; grau de maturação do fruto; sensibilização do indivíduo aos compostos químicos; assim como a quantidade ingerida e a forma de ingestão (SANTOS et al., 2011).

Para o emprego seguro de espécies vegetais, nas formas *in natura* ou processada, são necessárias pesquisas que enfatizem a eficiência terapêutica e a segurança dessa prática. Dessa forma, o estudo da toxicidade torna-se indispensável, devido à complexidade e diversidade dos compostos químicos, que reduzem ainda mais o limite estreito entre o terapêutico e o tóxico, especialmente ao material genético (MARIZ et al., 2012).

Na perspectiva do consumo *in natura* e desenvolvimento de novos produtos à base do jamelão, além da determinação de seus biopolifenóis, é de fundamental importância a realização de ensaios citogenotóxicos, a fim de verificar o grau de segurança em relação aos riscos de instabilidade genética. Nesse sentido, os bioensaios *in vivo* com *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn são apropriados para a determinação da concentração mínima capaz de ocasionar efeitos tóxicos e citotóxicos ao material genético (OZKARA et al., 2015; ROSA et al., 2016).

Diante do exposto, o estudo objetivou avaliar possíveis efeitos citogenotóxicos do

extrato aquoso do jamelão, usando os bioensaios *A. salina* Leach e *A. cepa* Linn, bem como determinar os componentes da mistura complexa e avaliar sua ação antioxidante frente ao radical peroxil e a oxidação lipídica.

2. Material e Métodos

2.1 Colheita e preparo da amostra

Os frutos maduros (15,20 °Brix) foram colhidos em novembro de 2014, na cidade de Teresina, Nordeste do Brasil (5°03'17.2''S 42°47'28.0''O). A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob voucher 30.573. Os frutos foram higienizados com hipoclorito de sódio a 100 ppm.10 min⁻¹. A parte comestível (polpa + pele) foi separada manualmente da semente, ainda congelada (-20 °C), para minimizar a degradação enzimática e perda de suco. A polpa foi liofilizada (30.10⁻³ mmHg; -50 °C; 72 h), triturada em ultraprocessador de alimentos, peneirada a 50 “Mesh Tyler”.10 min⁻¹, acondicionada em embalagem plástica laminada, termosselada, e armazenada a -20 °C, até o momento das análises. A banha de suíno, os náuplios de *A. salina* Leach e os bulbos de cebolas foram obtidos no comércio local.

2.2 Reagentes e padrões

Os compostos químicos (S)-(-)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), fluoresceína - (3'',6''- dihidroxi[isoben''zofuran-1[3H],9''[9H]-xanten]-3-ona), AAPH [dicloreto de 2,2''-azobis (2-amidinopropano)], BHT (hidroxi-butil-tolueno), dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) e sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co[®] (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes de grau CLAE (ácido fórmico, metanol e acetonitrila) foram obtidos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha).

2.3 Extração de polifenóis bioativos

A polpa do fruto liofilizada (0,5 g) foi misturado à água deionizada (25 mL), homogeneizado em agitador magnético (25 °C.60 min⁻¹), sonicado (80 kHz/20W.20 min⁻¹),

centrifugado ($1200 \text{ g.s}^{-1}/15$ minutos), filtrado à vácuo, e reextraído nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram completados com o solvente extrator, até 50 mL, atingindo a proporção de 1:100 (m.v⁻¹) (BOCHI et al., 2014). O extrato aquoso do jamelão (EAJ) obtido foi concentrado com auxílio de evaporador rotativo (40 °C), liofilizado (30.10^{-3} mmHg; -50 °C; 24 h), ressuscitado em água deionizada, submetido à identificação dos compostos por CLAE-MS e, empregado nas análises de citogenotoxicidade com *A. salina* Leach e *A. cepa* Linn.

2.4 Determinação de polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas - CLAE-MS

A separação dos polifenóis pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi realizada conforme procedimentos descritos por De-Melo et al. (2018) e Martínez-Villalba et al. (2013), com modificações. Foi utilizada coluna de fase reversa LiChroCART C₁₈ (Merck, Darmstadt, Alemanha) (250 mm × 4 mm, 4,5 μm) mantida a 25 °C. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu Proeminence (modelo LC-20ADX – Quioto, Japão) (Software LabSolutions), equipado com duas bombas de alta pressão e detector com arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), termostato (modelo CTO-20A), acoplado ao espectrômetro de massas. A fase móvel foi constituída por: (a) ácido fórmico 0,1% e (b) acetonitrila; e o gradiente de eluição adotado foi 3 min – 10% (b), 22 min – 20% (b), 42 min – 35% (b), 65 min – 8% (b). A taxa de fluxo executada foi de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$.

Para identificação dos compostos foi empregada técnica de espectrometria de massas (MS). Para isso, foi utilizado espectrômetro de massa Bruker modelo Amazon Speed (Billerica, MA, EUA) com analisador tipo íon trap, com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo, controlados pelo software HyStar, seguindo as seguintes condições: temperatura e voltagem do capilar de ionização foram ajustadas em 230 °C e 3,5 kv; fluxo de gás de desolvatação (N₂) de 360 L/h. Os espectros foram obtidos na faixa de 100-1000 *m/z*. As amostras foram injetadas em triplicatas e os compostos fenólicos identificados correlacionando seus íons moleculares (*m/z*) e fragmentos principais com padrões comerciais ou dados da literatura.

2.5 Atividade antioxidante pelo método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

A atividade *scavenger* do radical peroxil pelo EAJ foi avaliada pelo método ORAC segundo Ou et al. (2001) e Prior et al. (2003). Este método baseia-se na proteção de sonda fluorescente de fluoresceína contra o ataque do radical peroxil, gerado pela reação do AAPH com oxigênio atmosférico. Em microplaca FLUOTRAC 200 com 96 cavidades (fundo plano, preta, Greiner BIO-one Brasil), adicionou-se 50 µL de amostra diluída, 150 µL de fluoresceína (93,54 nmol.L⁻¹) e 50 µL de AAPH (221 mmol.L⁻¹). Para o branco e diluições foi empregado o tampão fosfato (75 mmol.L⁻¹, pH 7,4). A fluorescência foi mensurada a 37 °C, com excitação de 493 nm e emissão de 515 nm, durante 60 minutos, e a cada 1 minuto, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). A área sob a curva (AUC) para as soluções testadas foi determinada pela expressão:

$$AUC = (0,5 + F_5/ F_0 + F_{10}/ F_0 + F_{15}/ F_0 + \dots + F_{60}/ F_0) \times 5$$

Onde:

F_{5,10,15...60} = fluorescência em 5, 10, 15...60 minutos

F₀ = fluorescência no tempo 0

O cálculo da capacidade antioxidante foi realizado por meio da curva padrão de trolox nas concentrações de 0 a 50 µM (r² = 0,9968). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (µM).g⁻¹ de amostra.

2.6 Inibição da oxidação lipídica

Para avaliar a capacidade protetora do EAJ utilizou-se o aparelho Rancimat® 743, marca *Metrohm*, conectado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0, no qual foi medido o período de indução da oxidação lipídica da banha de suíno. Os extratos foram colocados nos tubos do Rancimat® e evaporados sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, 3 g de banha de suíno, sem conservantes, foram adicionados em cada tubo. A temperatura empregada foi de 110 °C, ΔT = 1,5 °C e, fluxo de ar de 20 L.h⁻¹. Os tubos foram acoplados ao aparelho Rancimat® até a finalização da curva de condutividade em relação ao tempo de indução (TI) e cálculo do

Índice de Atividade Antioxidante (IAA). Os controles negativo e positivo foram banha de porco, sem antioxidantes, e BHT ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), respectivamente. Os resultados foram expressos como IAA, obtidos de acordo com a Equação 1:

$$\text{IAA} = (\text{TI amostra})/\text{TI controle negativo} \quad (1)$$

Onde:

TI amostra = tempo de indução (h) da banha de porco + amostra.

TI controle negativo = tempo de indução (h) da banha de porco sem antioxidante.

2.7 Teste de citotoxicidade em *A. salina* Leach

Os ovos de *A. salina* Leach foram incubados em água salina artificial (39,35 mM de NaCl, 18,66 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 28,16 mM de Na_2SO_4 , 8,84 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 9,38 mM de KCl em 1000 mL de água) a 25-30 °C. Bicarbonato de sódio (Na_2CO_3) foi utilizado como tampão para atingir o pH 9,0 da solução de salmoura. Após 48 h de incubação, 10 náuplios vivos foram transferidos para tubos de ensaio, contendo o EAJ nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MEYER et al., 1982). O volume final de cada amostra foi ajustado para 5 mL com solução salina artificial e água mineralizada (1:1, v.v⁻¹). As amostras foram mantidas sob a mesma condição de incubação por 24 h adicionais. Náuplios vivos foram contados para determinar o número de mortes por amostra. Água salina artificial e dicromato de potássio a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram utilizados como controles negativos (CN) e positivos (CP), respectivamente. Os tratamentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem da mortalidade.

2.8 Avaliação dos efeitos tóxicos e citogenotóxicos em *A. cepa* Linn

O bioensaio com *A. cepa* Linn foi realizado conforme Fiskesjo (1997). As camadas externas e o parênquima de brotação da coroa central das cebolas foram cuidadosamente removidos com o auxílio de lâmina cirúrgica, perfazendo uma pequena incisão circular para facilitar o crescimento da raiz (CR), sem que a área radicular fosse danificada. Os bulbos foram lavados com água desclorificada por 20 minutos e submetidos ao pré-tratamento, no qual os bulbos foram germinados em recipientes apropriados, com a parte inferior mergulhada

em água desclorificada durante 48 h à 25 ± 1 °C, em ambiente ausente de luz. Os bulbos com CR satisfatório tiveram as raízes medidas com auxílio de paquímetro, e encaminhados para o tratamento. Cada concentração teste contendo 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do EAJ, constou de cinco bulbos, além de controle negativo (água desclorificada) e controle positivo, utilizando solução de sulfato de cobre ($2,4\cdot 10^{-3}$ mM). O volume de solução absorvida foi reposta diariamente, a fim de manter as raízes mergulhadas nas concentrações. Após 72 h de exposição, as raízes foram medidas, sendo desprezadas as menores de 10 mm ou maiores que 30 mm. Em seguida, as raízes foram cortadas, fixadas em solução de carnoy (etanol:ácido acético glacial, 3:1, v.v⁻¹) durante 24 h a 4 °C e estocadas em etanol 70%. Para a preparação das lâminas, as raízes foram submetidas a três banhos com água destilada, durante 5 min, hidrolisadas com ácido clorídrico 1 M (HCl) em 25 °C por 11 min, e tratadas com corante de Schiff por aproximadamente 2 h em recipiente âmbar. O corante foi removido com água destilada corrente e a região meristemática foi seccionada, seguindo o tratamento com 2% de solução de ácido acético e, observação fotomicroscópica com ampliação de 40x. Mil células foram contadas para cada concentração de teste. Para análise das atividades tóxicas e citotóxicas, o CR e a fase da divisão celular foram calculados, assim como a ocorrência de aberrações celulares.

2.9 Análise estatística

Os resultados da atividade antioxidante e dos ensaios citogenotóxicos foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) one-way ou two-way, seguidos pelo teste de Tukey. Esses dados, assim como correlações e determinações da concentração efetiva e letal foram efetuados usando GraphPad Prism (versão 6.0), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1 Identificação de polifenóis no EAJ

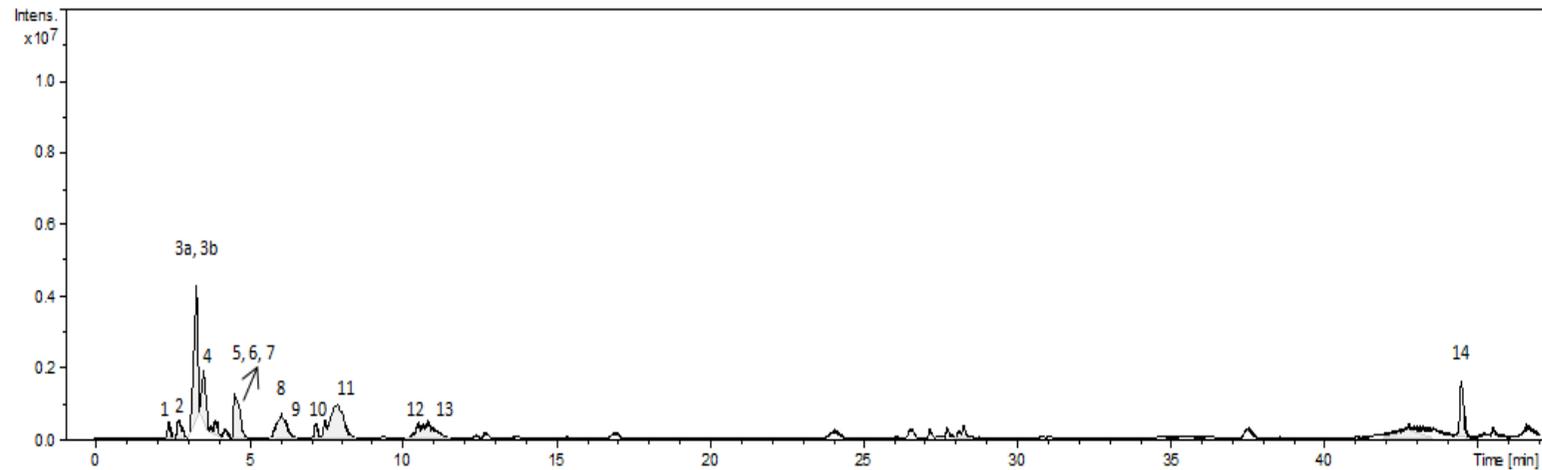
As características cromatográficas e espectrométricas dos polifenóis do EAJ estão apresentadas na Tabela 1. O cromatograma obtido para esses compostos está demonstrado na Figura 1.

Tabela 1 - Identificação de polifenóis no EAJ por CLAE-MS no modo de ionização negativa

Pico	t _R (min)	MS [M-H] ⁻ / [M-H-H ₂ O] ⁻	MS ²	MS ³	Identificação proposta	Referência	Abundância relativa (%)
1	2,5	273	159, 245	131, 201, 173, 246	NI		1,63
2	3,1	293	203, 131	131, 113, 185	NI		2,88
3a	3,5	371	353, 323, 191	173, 161	Aduto de ácido clorogênico com H ₂ O	Heras et al. (2016)	18,53
3b	3,5	311	149, 221, 179, 251, 293	179	Ácido caftárico	Nuengchamnong; Ingkaninan (2009)	1,12
4	3,6	333	241, 153	153	Aduto de ácido protocatéquico-3-glicosídeo com H ₂ O	Lambert et al. (2015)	6,15
5	4,6	405	191, 387	191, 213, 111	Derivado do ácido quínico	Bastos et al. (2007)	2,23
6	4,7	191	173, 111	111	Ácido quínico	Bastos et al. (2007)	2,21
7	4,8	331	169, 271	125, 211	Ácido gálico 4-O-hexosídeo	Heras et al. (2016)	4,47
8	6,0	625	463, 455, 301	301	Delfinidina 3,5-diglicosídeo	Lestario et al. (2017)	8,74
9	6,1	643	463, 355, 481, 283, 505, 625, 193	283, 301, 319	Dihidromiricetina	Tavares et al. (2016)	2,48
10	7,7	657	495, 477, 315, 519	315, 297, 282, 315	Metil-dihidromiricetina-dihexosídeo-1	Tavares et al. (2016)	2,17
11	7,8	639	477, 315	315	Petunidina 3,5-diglicosídeo	Lestario et al. (2017)	8,49
12	10,8	653	489, 337, 329	329	Malvidina 3,5-diglicosídeo	Lestario et al. (2017)	3,35
13	10,9	657	495, 333	333, 315, 369, 167	Metil-dihidromiricetina-dihexosídeo-2	Tavares et al. (2016)	3,29
14	44,4	949	904	886, 564, 451, 338, 677, 790	Trímero de epigallocatequina ligado a 2H ₂ O	Costa et al. (2016)	8,35

NI: não identificado.

Figura 1 - Cromatograma de CLAE-MS obtido em 200-600 nm de compostos fenólicos do EAJ. Picos: 1 e 2: Não identificados. 3a: Ácido clorogênico monohidratado. 3b: Ácido caftarico. 4: Ácido protocatéquico monohidratado. 5: Derivado de ácido quínico. 6: Ácido quínico. 7: Ácido gálico 4-O-hexosídeo. 8: Delfinidina-3,5-diglicosídeo. 9: Dihidromiricetina-5. 10: Metil-dihidromiricetina-4. 11: Petunidina-3,5-diglicosídeo. 12: malvidina-3,5-diglicosídeo. 13: Metil-dihidromiricetina-5. 14: Não identificado



Um total de 15 polifenóis foi encontrado no EAJ. Dentre os polifenóis identificados, o aduto de ácido clorogênico com H₂O (pico 3a, *m/z* 371) foi o mais abundante, seguido por delphinidina-3,5-diglicosídeo (pico 8, *m/z* 625), petunidina-3,5-diglicosídeo (pico 11, *m/z* 639) and e trímero de epigallocatequina ligado a 2H₂O (pico 14, *m/z* 949). Esses compostos, quando aliados a outros biopolifenóis tornam-se responsáveis por diversas propriedades farmacológicas do fruto (FARIA et al., 2011; SHARMA et al., 2017).

Nesse estudo, foram identificados ácidos hidroxicinâmicos, hidroxibenzoicos, flavanonois, antocianinas e proantocianidinas. Entre os hidroxicinâmicos, destacam-se os ácidos clorogênico, caftárico (pico 3b, *m/z* 311), quínico (pico 6, *m/z* 191) e derivado do ácido quínico (pico 5, *m/z* 405), caracterizados por típica perda de uma molécula de H₂O (18 u). O ácido clorogênico monohidratado, além dessa fragmentação, apresentou perda de ácido quínico e de uma hexose (162 u), semelhante à fragmentação descrita por Heras et al. (2016). Esses ácidos foram reportados anteriormente em uvas e, em vinhos à base do jamelão, por contribuir com a atividade *scavenger* de radicais livres e de quelação de íons metálicos (SOUQUET et al., 2000; NUENGCHAMNONG; INGKANINAN, 2009).

Os ácidos hidroxibenzoicos encontrados no EAJ foram o aduto de ácido protocatéquico-hexosídeo (pico 4, *m/z* 333) e gálico 4-O-hexosídeo (pico 7, *m/z* 331). Esses ácidos apresentam perda característica de CO₂ [M-H-44]⁻ em MS₂ (QUIFER-RADA et al., 2015). Entretanto, para o ácido gálico monoglicosilado, essa perda só ocorreu em MS₃, onde exibiu-se o íon *m/z* 125. Essa alteração, na etapa de fragmentação, foi atribuída à liberação inicial do grupo glicosídico em MS₂, gerando *m/z* 169 (ácido gálico), postergando a liberação da molécula de CO₂. Esses achados foram semelhantes aos obtidos por Faria et al. (2011).

Flavanonois, também denominados dihidroflavonois, são encontrados em todas as partes comestíveis do jamelão (GORDON et al., 2011). Nesse estudo, além da dihidromiricetina (pico 9, *m/z* 643), observou-se a presença de isômeros de metil-dihidromiricetina (picos 10 e 13, *m/z* 657), possíveis responsáveis pela ação antioxidante do fruto. Esses resultados são consistentes com os relatados anteriormente para o fruto (TAVARES et al., 2016; LESTARIO et al., 2017).

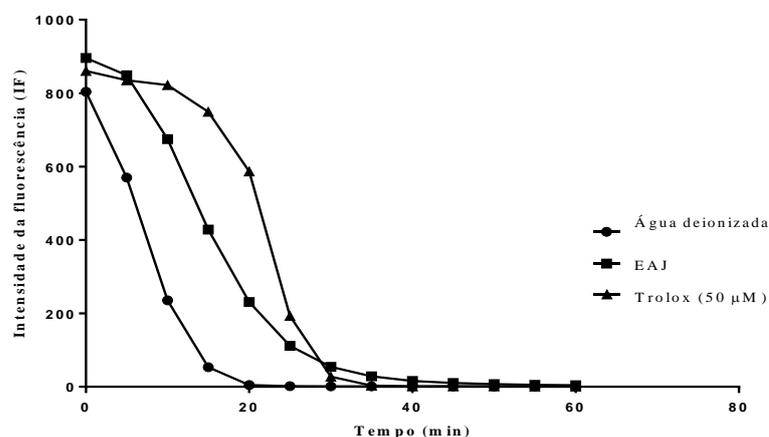
O perfil antociânico do EAJ foi composto por delphinidina, petunidina e malvidina (pico 12, *m/z* 639) 3,5-diglicosiladas. Além dessas antocianinas, a literatura reporta a presença de outras antocianinas mono e diglicosiladas, sendo que estas não foram detectadas nesse estudo (BRITO et al., 2007; GORDON et al., 2011). Isso pode ser atribuído ao solvente

utilizado durante a extração, visto que solventes aquosos puros, sem acidificação, são menos específicos para extração de flavonoides (AZMIR et al., 2013).

3.2 Atividade antioxidante do EAJ

A atividade antioxidante do EAJ mensurada pelo método de sequestro do radical peroxil está representada na Figura 2. Observa-se nos minutos iniciais, que a ação antioxidante do extrato do fruto é semelhante à ação do Trolox a 50 μM ($p > 0,05$). No entanto, essa ação diminui, com o aumento no tempo da reação. Nesse estudo, os valores ORAC obtidos para o EAJ ($112,31 \pm 12,56 \mu\text{molTrolox.g}^{-1}$) foram considerados elevados, quando comparados aos encontrados por Azima et al. (2017) e Faria et al. (2011), para o mesmo fruto. Isso é atribuído às condições edafoclimáticas adversas da região Nordeste do Brasil, que proporcionam aumento na síntese de metabólitos secundários com ação antioxidante, como ácidos fenólicos e flavonoides, em especial flavanois e antocianinas (SQUID et al., 2018).

Figura 2 - Atividade *scavenger* do radical peroxil pelo EAJ, água deionizada e Trolox (50 μM) avaliada pelo ensaio ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*)



A atividade antioxidante desses flavonoides depende da disposição de seus grupos funcionais, sendo que configuração, substituição e número total dos grupos hidroxilas influenciam nos mecanismos dessa atividade. Esses mecanismos de ação estão relacionados com a inibição das enzimas envolvidas na produção dos radicais livres (monooxigenase microsossomal, glutathione S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase); redução

dos radicais livres altamente oxidantes, como superóxido, peroxil, alcoxil e hidroxil, por doação de átomos de hidrogênio; e, quelação de íons metálicos (SOUZA et al., 2017).

Devido à ação antioxidante do jamelão *in vitro* e visando uma possível substituição de antioxidantes sintéticos na indústria, avaliou-se a inibição da oxidação lipídica pelo método Rancimat®. O efeito do EAJ e do BHT sobre a inibição da oxidação lipídica da banha de suíno encontra-se demonstrado na Tabela 2. Observa-se que o BHT inibiu eficazmente o processo oxidativo na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Na mesma concentração, o EAJ conseguiu inibir essa oxidação em 53,66%, percentual de inibição satisfatório para polpa de fruta, e confirmado por Santos et al. (2017) ao empregar o extrato do fruto em estudo, na conservação de óleos. A redução na inibição da atividade oxidante observada no ensaio, em relação ao BHT, pode ser atribuída ao emprego de elevadas temperaturas no sistema, provocando destruição de compostos antioxidantes termolábeis e, dessa forma, requerendo maior concentração dos extratos para inibição da oxidação lipídica.

Tabela 2 - Índice de atividade antioxidante (IAA) pelo sistema lipídico Rancimat®

Amostras	IAA (Mean ± DS)
EAJ	1,76 ± 0,10 ^a
BHT	3,28 ± 0,03 ^b

ANOVA one way seguida do pós-teste Tukey (p<0,05, diferença significativa no mesmo tempo de exposição do BHT). EAJ: extrato aquoso do jamelão. BHT: hidroxil-butil-tolueno.

3.3 Efeitos citotóxicos do EAJ em *A. salina* Leach

Os efeitos do EAJ sobre a mortalidade de *A. salina* Leach estão apresentados na Tabela 3. As concentrações inferiores a 1500 µg.mL⁻¹, não exibiram efeito citotóxico sobre o microcrustáceo analisado (<50% de mortalidade). No entanto, observou-se aumento no percentual de mortalidade à medida que as concentrações do EAJ foram aumentadas. Portanto, as concentrações acima de 2000 µg.mL⁻¹ apresentaram efeitos citotóxicos. Isso decorre do aumento da saturação da solução salina com os compostos químicos presentes no extrato do fruto, que se agregam à superfície do corpo da *A. salina* Leach dificultando sua respiração cutânea e absorção de íons, reduzindo o pH citoplasmático, e afetando a bomba de prótons e o ciclo de adenosina trifosfato-difosfato (CHANG; THIEL, 2015). A mudança na

fluidez da membrana resulta nos fenômenos associados ao estresse oxidativo, como permeabilidade da membrana anormal e liberação de radicais livres, citocromo c, íons de cálcio e proteínas, levando à morte celular por apoptose e necrose (ISLAM et al., 2017). Apesar disso, ressalta-se que o controle positivo exibiu maior letalidade ($p < 0,05$), que pode ser justificado pela forte ação oxidante do dicromato de potássio, que inibe a absorção de aminoácidos, com consequente bloqueio da síntese de macromoléculas observadas em *A. salina* Leach, levando-as à morte.

Tabela 3 - Efeitos citotóxicos do EAJ e controles em ensaios com *A. salina* Leach

Tratamentos	Mortalidade (%)	CL ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Limite inferior IC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Limite superior IC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R ²
CN	-	0			
CP	100				
EAJ	3,33	1420	1317	1531	0,95
	6,66				
	20,00				
	46,66				
	80,00				
	93,33				

Percentuais (%) de mortalidade de *A. salina* Leach após 24 h (n = 3, 10 náuplios vivos/tubo). CN: controle negativo - solução salina. CP: controle positivo - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. EAJ: extrato aquoso do jamelão. CL₅₀: concentração letal média para 50% dos náuplios. IC: intervalo de confiança; R²: coeficiente de determinação.

O estudo ainda mostrou que a CL₅₀ do EAJ em *A. salina* Leach foi superior a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3). De acordo com Nguta et al. (2011), amostras com valores de CL₅₀ inferiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são consideradas altamente tóxicas; valores entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são moderadamente tóxicas; entre 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são suavemente tóxicas, e acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são atóxicas. Portanto, nesse ensaio toxicológico, o EAJ não apresentou riscos de consumo nas concentrações inferiores a 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar disso, vale ressaltar que a ingestão de alimentos ricos em antocianinas, a exemplo do jamelão, não deve ser superior a 2,5 mg/Kg de peso corporal/dia. Isso é atribuído a alterações citotóxicas, mutagênicas e teratogênicas, que ocorrem devido ao consumo excessivo de antocianinas, por longos prazos (CLIFFORD, 2000; SEHWAG; DAS, 2016).

3.4 Efeitos citogenotóxicos do EAJ em *A. cepa* Linn

Os efeitos do EAJ sobre o crescimento radicular de *A. cepa* Linn estão apresentados na Tabela 4. Observa-se que a inibição do crescimento radicular pelo EAJ foi dependente das

concentrações testadas, e que as concentrações inferiores a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram-se atóxicas quando comparadas ao controle positivo ($p < 0,05$). As concentrações acima de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, embora não tenham apresentado diferenças significativas do controle positivo ($p < 0,05$), demonstraram elevada inibição do crescimento das raízes. Esse comportamento decorre do acúmulo excessivo de taninos e antocianinas nas células meristemáticas da região apical, atuando como pró-oxidantes, prolongando o ciclo celular durante a diferenciação, inibindo a síntese proteica, além de ocasionar danos às biomoléculas (SETH et al., 2007; OYEYEMI; BAKARE, 2013). Esses resultados foram similares aos encontrados para outras espécies de plantas com propriedades medicinais (AKINBORO; BAKARE 2007; OYEDARE et al. 2009; SULTAN; CELIK, 2009; PASTORI et al., 2013).

Tabela 4 - Efeitos do EAJ sobre o crescimento radicular de *A. cepa* Linn

Tratamentos	Comprimento médio da raiz (mm)	Redução do crescimento das raízes (%)	CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC _i – IC _s	R ²	
CN	-	$19,15 \pm 0,80^a$	0,00	2161	2048 a 2281	0,99
CP	$2,4.10^{-3}$ mM	$2,90 \pm 0,21^b$	84,86			
EAJ	$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$16,66 \pm 1,08^{ac}$	13,00			
	$1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$14,49 \pm 0,99^{cd}$	24,33			
	$1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$12,34 \pm 0,71^{de}$	35,56			
	$2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$9,17 \pm 0,79^{ef}$	52,11			
	$2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$6,68 \pm 0,52^f$	65,12			

Médias \pm desvio padrão (n = 5 bulbos de cebolas/concentração). ANOVA one way seguida do pós-teste Tukey ($p < 0,05$, diferença significativa no mesmo tempo de exposição do CN, CP e diferentes concentrações do EAJ). CN: controle negativo – água salina. CP: controle positivo - sulfato de cobre. EAJ: extrato aquoso do jamelão. EC₅₀: concentração efetiva na redução de 50% do crescimento radicular de *A. cepa* Linn. IC_i: intervalo de confiança inferior. IC_s: intervalo de confiança superior. R²: coeficiente de determinação.

A Tabela 5 demonstra que as concentrações do EAJ aumentaram o número de células na intérfase, de forma dependente, reduzindo-o nos processos posteriores de divisão celular, especialmente nas concentrações de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). Isso ocasionou diminuição no índice mitótico, que foi correlacionado positivamente ao comprimento radicular ($r = 0,98$), sugerindo que raízes retardadas no crescimento sejam citotóxicas (YILDIZ et al., 2009).

Tabela 5 - Perfil citotóxico de diferentes concentrações do EAJ sobre espécimes de *A. cepa*

Linn

Tratamentos	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM(%)
CN -	165,53±3,64 ^a	227,57±8,16 ^a	196,26±8,04 ^a	220,55±6,21 ^a	192,45±3,79 ^a	83,49 ±0,36 ^a
CP 2,4.10 ⁻³ mM	845,10±6,12 ^b	83,30±1,51 ^b	40,36±4,21 ^b	20,62±3,66 ^b	12,6±4,16 ^b	15,66±0,63 ^b
EAJ 500 µg.mL ⁻¹	240,31±11,89 ^c	324,72±13,23 ^c	243,23±14,48 ^c	114,80±1,92 ^c	80,20±4,09 ^c	76,05±1,17 ^a
1000 µg.mL ⁻¹	358,22±8,17 ^d	282,81±6,50 ^d	205,62±4,21 ^a	84,46±6,09 ^d	69,71±8,04 ^d	64,20±0,78 ^c
1500 µg.mL ⁻¹	446,94±5,38 ^e	239,41±4,30 ^e	194,48±2,97 ^a	74,44±2,88 ^d	47,4±3,51 ^e	55,45±0,54 ^{c,d}
2000 µg.mL ⁻¹	508,03±3,54 ^f	236,49±4,72 ^{ac}	173,00±5,24 ^d	55,89±2,39 ^e	28,02±4,48 ^f	49,26±0,29 ^{de}
2500 µg.mL ⁻¹	560,28±4,60 ^g	227,84±2,59 ^a	144,95±3,39 ^e	46,40±3,91 ^e	23,32±1,92 ^f	44,07±0,36 ^e

Médias ± desvio padrão (n = 5 bulbos de cebolas, 1000 células/grupo). ANOVA two way seguida do pós-teste Tukey (p<0,05). Diferença significativa no mesmo tempo de exposição do CN, CP e diferentes concentrações do EAJ. CN: controle negativo - solução salina. CP: controle positivo - sulfato de cobre. EAJ: extrato aquoso do jamelão. IM: índice mitótico.

O efeito mitodepressivo em *A. cepa* Linn das concentrações do EAJ acima de 2000 µg.mL⁻¹ pode ser ocasionado pela alteração ou bloqueio dos períodos G₁, S e G₂ na intérfase, com inibição da síntese ou supressão de DNA, diminuição na formação de microtúbulos e síntese nucleoproteica (MAJEWSKA et al., 2003). Além desses efeitos, alguns compostos químicos presentes em plantas podem inibir a prometáfase e metáfase, devido a interações com microtúbulos (PANDEY, 2008). Vale ressaltar que uma redução de 50% no índice mitótico quando comparado ao controle negativo é valor limitante: redução <50% induz efeito sub-letal e <22% causa efeito letal (MESI; KOPLIKU, 2013). Dessa forma, as concentrações do EAJ inferiores a 1500 µg.mL⁻¹, não apresentaram efeitos citotóxicos, enquanto as superiores a 2000 µg.mL⁻¹ demonstraram efeitos sub-letais. Resultados contrários aos encontrados por Kuhn et al. (2015).

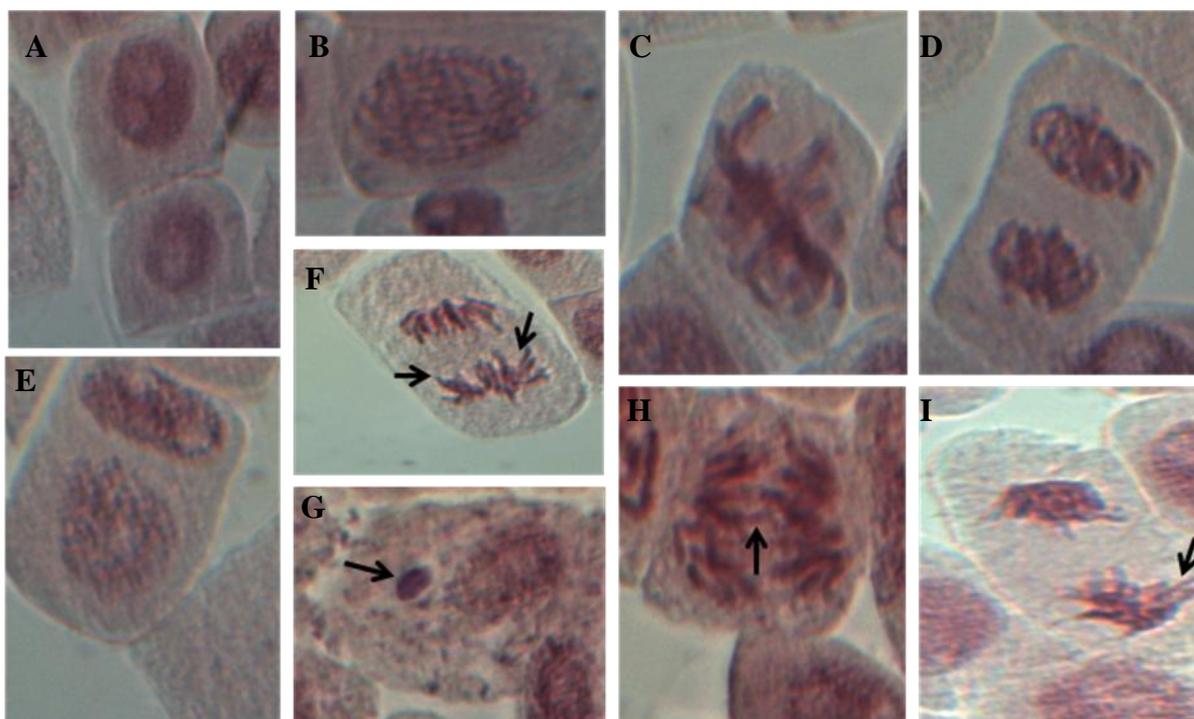
A avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade revelou dados não significativos (p>0,05) nas raízes de *A. cepa* Linn, quando tratadas com EAJ nas concentrações de 500 a 2500 µg.mL⁻¹ (Tabela 6). Embora a genotoxicidade do EAJ não tenha sido demonstrada de forma significativa, verifica-se uma tendência de aumento das aberrações cromossômicas e de micronúcleo, à medida que se eleva a concentração do extrato. As anormalidades cromossômicas observadas incluíram pontes e atrasos anafásicos, fragmentos cromossômicos e cromossomos soltos (Figura 3). A inibição celular e a aparência de aberrações cromossômicas, em elevadas concentrações do EAJ, são atribuídas principalmente aos flavonoides e ácidos fenólicos presentes no fruto (TEDESCO et al., 2015).

Tabela 6 - Aberrações cromossômicas e micronúcleo de espécimes de *A. cepa* Linn expostos a diferentes concentrações de EAJ

Tratamentos	Pontes anafásicas	Fragmentos cromossômicos	Cromossomos soltos	Atrasos anafásicos	Células micronucleadas
CN -	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
CP 2,4.10 ⁻³ mM	5,00 ± 1,34 ^b	4,80 ± 0,83 ^b	10,20 ± 0,83 ^b	10,00 ± 1,58 ^b	3,40 ± 1,14 ^b
EAJ 500 µg.mL ⁻¹	1,00 ± 0,71 ^a	0,60 ± 0,89 ^a	0,40 ± 0,89 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
1000 µg.mL ⁻¹	1,60 ± 1,14 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	0,80 ± 1,30 ^a	0,40 ± 0,54 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
1500 µg.mL ⁻¹	0,80 ± 0,45 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	0,6 ± 0,89 ^{ac}	0,60 ± 0,89 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
2000 µg.mL ⁻¹	0,60 ± 0,54 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	1,80 ± 0,45 ^c	0,80 ± 0,45 ^a	0,4 ± 0,55 ^a
2500 µg.mL ⁻¹	1,00 ± 0,83 ^a	1,80 ± 0,84 ^c	0,6 ± 0,89 ^{ac}	0,60 ± 0,54 ^a	0,8 ± 0,45 ^a

Médias ± desvio padrão (n = 5 bulbos de cebolas, 1000 células/grupo). ANOVA two way seguida do pós-teste Tukey (p<0,05, diferença significativa no mesmo tempo de exposição do CN, CP e diferentes concentrações do EAJ). CN: controle negativo - solução salina. CP: controle positivo - sulfato de cobre. EAJ: extrato aquoso do jamelão.

Figura 3 - Fases da divisão celular: Intérfase (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E). Anormalidades cromossômicas: atrasos cromossômicos (F), micronúcleo (G), pontes cromossômicas (H) e cromossomos soltos (I)



Estudos de genotoxicidade são projetados para determinar agentes que podem danificar DNA causando mutações genéticas ou cromossômicas. Em geral, os resultados do teste de genotoxicidade são considerados indicadores de efeitos clastogênicos, aneugênicos e

mutagênicos (ADEYEMO; FARINMADE, 2013). Portanto, pelo ensaio de genotoxicidade em *A. Cepa* Linn, o EAJ não apresentou nenhum dos efeitos supracitados significativos, independente da concentração analisada. Resultados contrários aos obtidos por Chukwujekwu; Staden (2014) e Prajitha; Thoppil (2016). Esses achados, assim como os de *A. salina* Leach, são fundamentais para garantir a segurança do uso do jamelão nas formas *in natura* e processada. Aliado a isso, estudo com camundongos também demonstrou ausência de toxicidade aguda e crônica do fruto, o que reforça a segurança do seu consumo nas concentrações apropriadas (SILVA et al., 2012).

4. Conclusões

O EAJ apresenta ácidos fenólicos e flavonoides, com destaque para os isômeros de diidromiricetina e antocianinas, capazes de capturar o radical peroxil e inibir a oxidação lipídica. Em concentrações adequadas, esses compostos não exibem efeitos toxicogênicos. Isso demonstra que o jamelão possui biopolifenois com expressiva ação antioxidante, e não ocasionam riscos de instabilidade genética.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (número de concessão 83151320325) pela concessão de bolsa de pesquisa, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI (número de concessão 006/2016), pelo financiamento do projeto.

Referências

ADEYEMO, O. A.; FARINMADE, A. E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**, 12, 1459-1466, 2013.

- AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* (Linn.). **Journal Ethnopharmacology**, 112, 470–475, 2007.
- AQIL, F.; GUPTA, A.; MUNAGALA, R.; JEYABALAN, J.; KAUSAR, H. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanins/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun the Indian blackberry). **Nutrition and Cancer an International Journal**, 64, 428–438, 2012.
- ARAÚJO, E. J. A.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 35, 355-361, 2014.
- AZIMA, A. M. S.; NORIHAM, A.; MANSHOOR, N. Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. **Journal of Functional Foods**, 38, 232-241, 2017.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426–436, 2013.
- BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. 2007. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12, 423-432, 2007.
- BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; SPERONI, C. S.; GIUSTI, M. M.; GODOY, H. T. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, 164, 347-354, 2014.
- BRITO, E. S.; ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 9389-9394, 2007.
- CHANG, E. S.; THIEL, M. **Physiology**. 4^a. ed. Oxford University Press: New York, 2015.
- CHUKWJEKWU, J. C.; STADEN, J. V. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. **South African Journal of Botany**, 92, 147-150, 2014.
- CLIFFORD, M. N. Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80,1063–1072, 2000.
- COSTA, M. F.; GALAVERNA, R. S.; PUDENZI, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C. Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical Methods**, 8, 6056-6063, 2016.
- DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, L. M.; MOREIRA, M. M.; DELERUE-MATOS, C.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Phenolic profile by CLAE-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: monofloral bee polle. **Journal of Food Biochemistry**, 1-21, 2018. e12536.

- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571–1578, 2011.
- FISKESJÖ, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytologic parameters. In: WANG, W.; GORSUCH, J. W.; HUGHES, J. S. Plants for Environmental Studies. Boca Raton, New York: CRC Lewis Publishers, 308–333, 1997.
- GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, F. G. S.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 7688–7699, 2011.
- HERAS, R. M. L.; QUIFER-RADA, P.; ANDRÉS, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, 23, 370–377, 2016.
- ISLAM, M. T.; STRECK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K. C.; MACHADO K. C.; GOMES JUNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; MATA, A. M. O. F.; SOUSA, J. M. C.; COSTA JUNIOR, J. S.; ROLIM, H. M. L.; SILVA-JUNIOR, A. A.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phyto and its nanoemulsion. **Chemosphere**, 177, 93–101, 2017.
- KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 68, 25–30, 2015.
- LAMBERT, M.; MEUDEC, E.; VERBAERE, A.; MAZEROLLES, G.; WIRTH, J.; MASSON, G.; CHEYNIER, V.; SOMMERER, N. A High-Throughput UCLAE-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. **Molecules**, 20, 7890–7914, 2015.
- LESTARIO, L. N.; HOWARD, L. R.; BROWNMILLER, C.; STEBBINS, N. B.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Changes in Polyphenolics during Maturation of Java Plum (*Syzygium Cumini* Lam.). **Food Research International**, 100, 385–391, 2017.
- LI, L.; ADAMS, L. S.; CHEN, S.; KILLIAN, C.; AHMED, A.; SEERAM, N. P. *Eugenia jambolana* Lam. berry extracts inhibit growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 1084–1096, 2009.
- MAJEWSKA, A. E.; WOLSKA, E.; SLIWINSKA, M.; FURMANOWA, N.; URBANSKA, A.; PIETROSIUK, A.; ZOBEL, A.; KURAN, M. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 56, 337–351, 2003.
- MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; PALOMARO, T. V.; DUARTE, J. C.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; ARAÚJO, M. S. T.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22, 663–668, 2012.
- MARTÍNEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Ultra-high performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – tandem mass

spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1313, 119-131, 2013.

MESI, D. A.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L. **Processing Technology**, 8, 19-26, 2013.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, 45, 31-34, 1982.

MUSSI, L. P.; GUIMARÃES, A. O.; FERREIRA, K. S.; PEREIRA. Spouted bed drying of jambolão (*Syzygium cumini*) residue: drying kinetics and effect on the antioxidant activity, anthocyanins and nutrients contents. **Food science and technology**, 61, 80-88, 2015.

NGUTA, J.; MBARIA, J. .; GAKUYA, D.; KIAMA, S. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, 2, 458-478, 2011.

NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 297–302, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49, 4619-4626, 2001.

OYEDARE, B. M.; BAKARE, A. A.; AKINBORO, A. Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay. **BLACPMA**, 8, 97–103, 2009.

OYEYEMI, I. T.; BAKARE, A. A. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 66, 360-367, 2013.

OZKARA, A.; AKYIL, D.; YASIN EREN, Y.; ERDOGMUS, S. F. Potential cytotoxic effect of *Anilofos* by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, 67, 783-791, 2015.

PANDEY, R. M. Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. **Cytology and genetics**, 42, 373-377, 2008.

PASTORI, T.; FLORES, F. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, C. D. E. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. **Pharmaceutical Biology**, 51, 1249–1255, 2013.

PAVAN KUMAR, K.; PRASHAD, P. D.; RAO, A. N.; REDDY, P. D.; ABHINAY, G. Antiinflammatory activity of *Eugenia jambolana* in albino rats. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1, 435–438, 2010.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, 102, 18–25, 2016.

- PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X. BACCHIOCCA M, HOWARD, L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51, 3273-3279, 2003.
- QUIFER-RADA, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; CHIVA-BLANCH, G.; JÁUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, 169, 336-343, 2015.
- ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18, 1-9, 2016.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food research international**, 44, 2072-2075, 2011.
- SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A. C. M. S.; PEIXOTO, BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M.; NOGUEIRA, R. I. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. **Fruits**, 71, 3-8, 2016.
- SANTOS, A. C.; BORSATO, D.; GALÃO, O. F. Tephrosia Vogelii oil use in biodiesel production and its conservation with *Syzygium jambolanum* DC (jambul) extract. **Semina: Exact and technological sciences**, 38, 28-35, 2017.
- SANTOS, S. A. O.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Characterization of phenolic components in polar extract of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 9386-9393, 2011.
- SEHWAG, S.; DAS, M. Composition and functionality of whole jamun based functional confection. **Journal of Food Science and Technology**, 53, 2569-2579, 2016.
- SETH, C. S.; CHATURVEDI, P. K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental Toxicology**, 22, 539-549, 2007.
- SHARMA, Y.; MEHROTRA, A.; KUNDU, N.; SRIVASTAVA, N. P. A study of antibacterial, antioxidant and neuroprotective effect of stem of *Syzygium cumini*. **International Journal of Green Pharmacy**, 4, 236-246, 2017.
- SHEIKH, S. A.; SHAHNAWAZ, M.; NIZAMANI, S. M.; BHANGER, M. I.; AHMED, E. Phenolic contents and antioxidants activities in jamman fruit (*Eugenia jambolana*) products. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, 1, 41-47, 2011.
- SILVA, S. N.; ABREU, I.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S. L.; CARTAGENES, M. S. S.; FREIRE, S. M. F. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22, 102-108, 2012.

- SOUID, A.; BELLANI, L.; MAGNÉ, C.; ZORRIG, W.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C.; LONGO, V.; HAMED, K. B. Physiological and antioxidant responses of the sabkha biotope halophyte *Limonium delicatulum* to seasonal changes in environmental conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 123, 180-191, 2018.
- SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; GUERNEVÉ, C. L.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 1076-1080, 2000.
- SOUZA, B. V. C.; ARAÚJO, R. S. R. M.; SILVA, O. A.; FAUSTINO, L. C.; GONÇALVES, M. F. B.; SANTOS, M. L.; SOUZA, G. R.; ROCHA, L. M.; CARDOSO, M. L. S.; NUNES, L. C. C. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 28, 129-138, 2017.
- SULTAN, A. O.; CELIK, T. A. Genotoxic and antimutagenic effects of *Capparis spinosa* L. on the *Allium cepa* L. root tip meristem cells. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 62, 114–123, 2009.
- TAVARES, I. M. D. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GOMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E.; DA SILVA, R.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) skeels). **Food Research International**, 82, 1–13, 2016.
- TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; BOLIGON, A. A.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) osbeck on the *Allium cepa* L. teste system. **Bioscience Journal**, 31, 1213-1221, 2015.
- TOBAL, T. M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOLINI, H. M. A., BOSCOLO, M. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact additive in orange juice and its sensorial impact. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 63, 273–277, 2012.
- YILDIZ, M.; CI-GERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, 75, 934-938, 2009.

Capítulo 4

Perfil polifenólico bioacessível do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e modulação da atividade de enzimas em modelos com *Saccharomyces cerevisiae*

Perfil polifenólico bioacessível do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e modulação da atividade de enzimas em modelos com *Saccharomyces cerevisiae*

Mariana de Moraes Sousa^a, Rosália Maria Tôrres de Lima^a, Alessandro de Lima^a, Antonielly Campinho Reis^b, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^b, José Augusto Gasparotto Sattler^c, Lígia Bicudo de Almeida-Muradian^c, Jorge Mancini Filho^c, José de Sousa Lima Neto^d, Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araujo^e, Nadir do Nascimento Nogueira^e

^a*Departamento de Hospitalidade, Lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina Zona Sul Campus, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: mariana@ifpi.edu.br; rosaliatlima@gmail.com; alessandro@ifpi.edu.br*

^b*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: antonielyreis@gmail.com; anameliamelocavalcante@gmail.com*

^c*Departamento de alimentos e nutrição experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: jagasparotto@gmail.com; ligiabi@usp.br; jmancini@usp.br.*

^d*Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: limaneto@ufpi.edu.br.*

^e*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: regilda@ufpi.edu.br; nadirn@uol.com.br*

*Autor correspondente

Rua São Pedro, 3274, Apto 704, Ed. Palazzo Poty

CEP: 64001-260, Teresina, Piauí, Brazil

Phone: + 55 86 3222 6923 / + 55 86 99986 0648

Fax: + 55 86 3215 5690

E-mail: nadirn@uol.com.br

RESUMO

O jamelão é um fruto rico em polifenóis com ação antioxidante. No entanto, estudos sobre a bioatividade desses compostos são escassos. A pesquisa objetivou analisar alterações nos polifenóis e na capacidade antioxidante da polpa do jamelão durante a digestão *in vitro*, em relação à extração química, bem como seus efeitos na resposta ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*. Na digestão *in vitro*, empregou-se soluções de enzimas fisiológicas, nos diferentes estágios do processo digestivo. A extração química foi realizada com água, e acetona a 50% (v.v⁻¹). O teste *in vivo* foi avaliado em leveduras proficientes e mutadas, quanto ao sistema enzimático. Os resultados demonstraram aumentos significativos ($p < 0,05$) dos biopolifenóis durante a digestão gástrica. Na digestão duodenal, flavonoides e proantocianidinas foram estáveis às mudanças de pH, enquanto antocianinas sofreram degradação ao entrar em contato com o pH neutro. A atividade antioxidante das frações bioacessíveis está correlacionada às elevadas concentrações de flavonoides e proantocianidinas, refletindo na modulação de enzimas antioxidantes em *S. cerevisiae*. Conclui-se que o processo de digestão do fruto do jamelão favorece a liberação de flavonoides, com ação antioxidante preventiva, *scavenger* e reparadora, além de modular a atividade da superóxido dismutase e catalase.

Palavras-chave:

Digestão *in vitro*

Compostos bioativos

Capacidade antioxidante

Superóxido dismutase

Catalase

1. Introdução

A ingestão elevada de frutas e vegetais tem sido associada à menor incidência de estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis. Essa proteção decorre da presença de compostos antioxidantes, especialmente, os polifenóis, que são capazes de quelar íons metálicos, capturar radicais livres, e inibir a síntese radicalar (SOUZA et al., 2017). No entanto, é importante destacar que os benefícios proporcionados à saúde humana, dependem do estado bioquímico em que esses compostos se encontram quando atingem à corrente sanguínea e os tecidos (HERAS et al., 2017).

O perfil polifenólico do jamelão tem sido bem elucidado em estudos anteriores (TAVARES et al., 2016; LESTARIO et al., 2017). A polpa e a pele do fruto contêm flavonoides e ácidos fenólicos com excelentes características antioxidantes. Também possui taninos hidrolisáveis e condensados, que conferem adstringência, e antocianinas 3,5-diglicosiladas, responsáveis por diversas propriedades terapêuticas (BRANCO et al., 2016). Entretanto, há escassez de estudos sobre a bioatividade dos compostos bioacessíveis do fruto e a minimização de danos ocasionado pelo estresse oxidativo.

A biodisponibilidade de fitoquímicos depende da estabilidade do composto no trato gastrointestinal, da liberação da matriz alimentar, e de sua eficiência na passagem transepitelial (OLIVEIRA; BASTOS, 2013). Um dos métodos empregados para avaliar os benefícios da biodisponibilidade de nutrientes no organismo é o método *in vivo*. Entretanto, ensaios utilizando essa metodologia são caros e requerem longos períodos de observação, especialmente em amostras humanas. Além disso, envolvem implicações médicas e éticas. Devido a essas limitações, evidências científicas apoiam, positivamente, o emprego de modelos *in vitro* por reproduzir, com precisão, as condições bioquímicas de diferentes fases envolvidas no processo de digestão (MINEKUS et al., 2014), além de possibilitar a análise da biotransformação de compostos em diferentes momentos do processo digestivo, e minimizar os efeitos da variabilidade interpessoal.

Nesse contexto, torna-se fundamental investigações sobre polifenóis bioacessíveis/biodisponíveis do jamelão e, seus efeitos sobre o estresse oxidativo. Um dos modelos fundamentais para avaliação do estresse oxidativo, é o ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que possui maquinaria apoptótica nuclear bastante conservada e metabolismo similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação

metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (MENG et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioacessibilidade de polifenóis, flavonoides, flavanois, antocianinas e proantocianidinas, bem como a capacidade antioxidante da polpa do jamelão, durante a digestão *in vitro*, em relação à extração química. Avaliou-se ainda os efeitos antioxidantes dos polifenóis bioacessíveis do fruto sobre o estresse oxidativo em linhagens de *S. cerevisiae*.

2. Material e Métodos

2.1 Amostra

Os frutos maduros (15,20 °Brix) foram colhidos em novembro de 2014, na cidade de Teresina, Nordeste do Brasil (5°03'17.2''S 42°47'28.0''O). A exsiccata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob voucher 30.573. Os frutos foram higienizados com hipoclorito de sódio a 100 ppm.10 min⁻¹. A parte comestível (polpa + pele) foi separada manualmente da semente, ainda congelada (-20 °C), para minimizar a degradação enzimática e perda de suco. A polpa foi liofilizada (30.10⁻³ mmHg; -50 °C; 72 h), triturada em ultraprocessador de alimentos, peneirada a 50 “Mesh Tyler”.10 min⁻¹, acondicionada em embalagem plástica laminada, termosselada e armazenada a -20 °C, até o momento das análises.

2.2 Reagentes, padrões e soluções

Os compostos químicos utilizados nas determinações de substâncias bioativas, enzimas para ensaio de bioacessibilidade, bem como os kits comerciais para análises da atividade das enzimas *SOD* e *CAT* empregados nesse estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O peróxido de hidrogênio foi obtido da ISO FAR® Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, e os reagentes de grau CLAE da Merck® (Darmstadt, Alemanha). As soluções eletrolíticas, fluidos fisiológicos salivares, gástricos e intestinais e, as soluções enzimáticas foram preparadas conforme Minekus et al. (2014) e Fogliano et al. (2011).

2.3 Extração química

O pó liofilizado da polpa do jamelão (0,5 g) foi misturado a acetona aquosa (1:1, v.v⁻¹) (25 mL), homogeneizado em agitador magnético (25 °C.60 min⁻¹), sonicado (80 kHz/20W.20 min⁻¹), centrifugado (1200g.s⁻¹/15 minutos), filtrado à vácuo e, reextraído nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram completados com o solvente extrator, até 50 mL, atingindo a proporção de 1:100 (m.v⁻¹) (BOCHI et al., 2014). O extrato foi concentrado com auxílio de evaporador rotativo (40 °C), liofilizado (30.10⁻³ mmHg; -50 °C; 24 h), ressuspendido em água deionizada (100 µg.mL⁻¹), submetido à identificação dos compostos por CLAE-MS e, empregado nos ensaios com *S. cerevisiae*.

2.4 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

A digestão *in vitro* de 1 g da polpa liofilizada do jamelão, diluída em água MiliQ (1:4, m.v⁻¹), foi realizada em quatro etapas: oral, gástrica, duodenal e simulação da ação enzimática da microbiota colônica, conforme protocolos de Minekus et al. (2014) e Fogliano et al. (2011). Após cada etapa, a solução foi centrifugada a 2177,28 g, por 40 minutos, e filtrada à vácuo em papel filtro quantitativo. O sobrenadante foi coletado, o volume aferido e armazenado a -20 °C. Para todas as etapas da digestão foi preparado branco, sem adição de amostras, para evitar a superestimação na quantificação dos compostos analisados.

2.5 Determinação de compostos bioativos

Os polifenóis totais foram analisados por *Folin Ciocalteu* em meio alcalino, mensurados a 720 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra (SWAIN; HILLS, 1959). O cálculo do teor total de fenólicos foi realizado a partir da equação de regressão linear da curva padrão de ácido gálico ($y = 0,0047x - 0,004$; $r = 0,9998$), preparada nas concentrações de 5 a 180 µg.mL⁻¹.

Os flavonoides totais foram quantificados pelo método do tricloreto de alumínio (AlCl₃), mensurados a 510 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de catequina.g⁻¹ de amostra (ZHISHEN et al., 1999). O cálculo do conteúdo total de flavonoides

foi feito a partir da equação de regressão linear da curva padrão de catequina ($y = 3,575x - 0,0079$; $r = 0,9983$), preparada nas concentrações de 0,02 a 0,12 mg.mL⁻¹.

Antocianinas monoméricas foram quantificadas pelo método de diferença de pH e mensuradas a 510 nm e 700 nm em espectrofotômetro UV-VIS, em tampões com pH 1,0 e 4,5 (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Os flavanois totais foram analisados por DMACA 0,1% em HCl 1N em metanol, mensurados a 640 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de equivalente de catequina.g⁻¹ de amostra (ARNOUS et al., 2002). O cálculo do teor total de flavanois foi feito a partir da equação de regressão linear da curva padrão de catequina ($y = 0,0731x + 0,0708$; $r = 0,999$), preparada nas concentrações de 2 a 12 µg.mL⁻¹.

O teor total de proantocianidinas, pelo ensaio ácido-butanol, foi mensurado a 550 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expresso em mg de cloreto de cianidina.g⁻¹ de amostra (PORTER et al., 1986). O cálculo do conteúdo total de proantocianidinas foi feito a partir da equação de regressão linear da curva padrão de cloreto de cianidina ($y = 0,0139x + 0,0262$; $r = 0,9993$), preparada nas concentrações de 5 a 50 µg.mL⁻¹.

2.6 Avaliação do índice de bioacessibilidade dos compostos antioxidantes

Para avaliar as alterações nos compostos bioativos, ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, os índices de bioacessibilidade (IB) foram calculados de acordo com a Equação 1 (ORTEGA et al., 2011).

$$IB (\%) = 100. B/C \quad (1)$$

Onde B é o teor de polifenóis, flavonóides, flavanois, antocianinas, proantocianidinas ou atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e FRAP, quantificados no sobrenadante após processo de digestão, e C, a quantidade desses compostos antes da digestão, expressa nas mesmas unidades.

2.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das frações bioacessíveis, pelo método de sequestro do

radical ABTS⁺, foi determinada de acordo com Re et al. (1999), mensurada a 734 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 6 minutos do início da reação. O cálculo da atividade antioxidante foi feito a partir da equação de regressão linear da curva padrão de trolox ($y = 0,0009x - 0,0722$; $r=0,9985$), preparada nas concentrações de 25 a 700 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

A avaliação da capacidade redutora do ferro foi avaliada segundo Arnous et al. (2002). As amostras reagiram por 30 minutos com solução de cloreto de ferro (3 mM), em banho-maria a 37 °C. Adicionadas à solução ácida de TPTZ e, mensuradas a 620 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 10 minutos. O cálculo do potencial redutor foi feito a partir da equação de regressão linear da curva padrão de trolox ($y = 0,0023x + 0,1699$; $r=0,9999$), preparada nas concentrações de 30 a 625 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

2.8 Determinação de polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas - CLAE-MS

A separação dos polifenóis pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi realizada conforme procedimentos descritos por De-Melo et al. (2018) e Martínez-Villalba et al. (2013), com modificações. Foi utilizada coluna de fase reversa LiChroCART C₁₈ (Merck, Darmstadt, Alemanha) (250 mm × 4 mm, 4,5 μm) mantida a 25 °C. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu Proeminence (modelo LC-20ADX – Quioto, Japão) (Software LabSolutions), equipado com duas bombas de alta pressão e detector com arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), termostato (modelo CTO-20A), acoplado ao espectrômetro de massas. A fase móvel foi constituída por: (a) ácido fórmico 0,1% e (b) acetonitrila; e o gradiente de eluição adotado foi 3 min – 10% (b), 22 min – 20% (b), 42 min – 35% (b), 65 min – 8% (b). A taxa de fluxo executada foi de 0,8 mL.min^{-1} .

Para identificação dos compostos foi empregada técnica de espectrometria de massas (MS). Para isso, foi utilizado espectrômetro de massa Bruker modelo Amazon Speed (Billerica, MA, EUA) com analisador tipo íon trap, com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo, controlados pelo software HyStar, seguindo as seguintes condições: temperatura e voltagem do capilar de ionização foram ajustadas em 230 °C e 3,5 kv; fluxo de gás de desolvatação (N₂) de 360 L/h. Os espectros foram obtidos na faixa de 100-1000 m/z .

As amostras foram injetadas em triplicatas e os compostos fenólicos identificados correlacionando seus íons moleculares (m/z) e fragmentos principais com padrões comerciais ou dados da literatura.

2.9 Resposta ao estresse oxidativo em linhagens de *S. cerevisiae*

Foram utilizadas seis linhagens de leveduras da espécie *S. cerevisiae* proficiente e mutadas em suas defesas antioxidantes. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (*CuZnSOD* - produto do gene *SOD1Δ*), enquanto a EG110 apresenta mutação na *SOD* mitocondrial (*MnSOD* - produto do gene *SOD2Δ*); EG133 é o duplo mutante defectivo para *SOD1Δ* e *SOD2Δ*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*CAT1Δ*); a EG é o duplo mutante defectivo para *SOD1Δ* e *CAT1Δ*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas (Tabela S1).

Os experimentos foram realizados por meio do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras, tratadas com H_2O_2 , foram submetidas às técnicas de pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento. As linhagens foram cultivadas em meio sólido YEL, segundo Oliveira et al. (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de *Petri* em movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 μ L de cada fração da etapa digestiva simulada ou extrato acetônico. Os grupos controle utilizados foram: H_2O_2 (10 mM) como controle positivo (10 μ L); e, solução salina (0,9%) como controle negativo (Tabela S2). Após 48 h de incubação em estufa a 30 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular.

2.10 Atividade enzimática

Para quantificação da atividade da *CAT* e *SOD*, as linhagens de *S. cerevisiae* foram adicionadas ao meio líquido YEL (extrato de levedura 1%, 2% de Bacto-peptona, 2% de dextrose) em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 h. As soluções foram padronizadas quanto à densidade celular ($1,7 \cdot 10^6$) com tampão fosfato e posteriormente,

adicionou-se os sobrenadantes de cada etapa da digestão simulada ou extrato acetônico, e incubou-se por mais 24 h, nas condições supracitadas.

A concentração de proteína foi quantificada espectrofotometricamente a 550 nm, de acordo com Bradford (1976). A atividade da *CAT* foi determinada usando kit comercial, segundo o fabricante e, avaliado como diminuição da absorbância em 230 nm, devido à reação com o H₂O₂; a atividade da *SOD* foi determinada usando kit de ensaio, segundo o fabricante, e sua atividade de inibição mensurada a 440 nm (ALTERIIS et al., 2017). As atividades específicas das enzimas *CAT* e *SOD* foram expressas como μmol H₂O₂ consumido por min por mg de proteínas e U-*SOD* por mg de proteína, respectivamente.

2.11 Análise estatística

Os resultados dos compostos bioativos, da atividade antioxidante e dos ensaios com *S. cerevisiae* foram apresentados como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) two-way, seguidos pelo teste de Tukey. Esses dados, assim como as correlações e gráficos, foram analisados usando GraphPad Prism (versão 6.0), com nível de confiança de 95% (p<0,05).

3. Resultados e discussão

3.1 Bioacessibilidade *in vitro* de compostos bioativos

Os efeitos da digestão gastrointestinal simulada sobre a liberação do conteúdo total de polifenóis do jamelão, assim como suas classes e subclasses dessa matriz alimentar, estão demonstrados na Tabela 1. O conteúdo total de polifenóis do jamelão aumentou significativamente (p<0,05) da fase oral para gástrica, indicando que 58% dos polifenóis do fruto são bioacessíveis no estômago. Porém, nas demais etapas da digestão, observou-se redução significativa desses compostos (p<0,05).

Tabela 1 - Alterações no teor total de polifenóis, flavonóides, flavanois, antocianinas e proantocianidinas durante simulação da digestão *in vitro* do jamelão, comparação com método químico de extração e, índice de bioacessibilidade

Extração de compostos bioativos	Polifenóis (mg EAG.100⁻¹ g)	Flavonoides (mg EC.100⁻¹ g)	Flavanois (mg EC.100⁻¹ g)	Antocianinas monoméricas (mg Cid-3-gli.100⁻¹ g)	Proantocianidinas (mg cid-3-gli.100⁻¹ g)
<i>Etapas da digestão gastrointestinal</i>					
Oral	309,82 ± 0,80 ^e	75,25 ± 0,27 ^d	1,06 ± 0,02 ^c	137,95 ± 0,64 ^d	134,27 ± 2,95 ^d
Gástrica	677,13 ± 1,11 ^b	84,17 ± 3,32 ^c	2,52 ± 0,04 ^b	310,98 ± 1,15 ^a	214,14 ± 0,26 ^a
Duodenal	535,64 ± 1,05 ^d	192,67 ± 0,60 ^a	Nd	21,47 ± 0,06 ^e	174,46 ± 0,13 ^c
Colônica	47,87 ± 0,94 ^f	10,31 ± 0,16 ^e	Nd	11,61 ± 0,08 ^f	9,26 ± 0,07 ^f
<i>Extração química</i>					
Aquosa	597,10 ± 8,51 ^c	72,59 ± 1,60 ^d	Nd	239,13 ± 1,53 ^c	88,64 ± 1,09 ^e
Acetônica 50%	1162,81 ± 4,22 ^a	162,47 ± 1,60 ^b	28,93 ± 0,14 ^a	281,54 ± 3,01 ^b	191,86 ± 1,09 ^b
<i>Índice de bioacessibilidade (%)</i>					
Oral	26,64	46,32	3,66	48,99	69,98
Gástrica	58,23	51,81	8,71	110,11	111,61
Duodenal	28,86	118,59	-	7,62	90,93
Colônica	4,12	6,34	-	4,12	4,82

Médias ± desvio padrão (n = 3). ANOVA two way seguida do pós-teste Tukey (p<0,05). Diferença significativa na mesma classe polifenólica e, nas diferentes etapas da digestão simulada e extração química. EAG: equivalência em ácido gálico. EC: equivalência em catequina. Cid-3-glic: cianidina-3-glicosídeo. Nd: não detectado. O índice de bioacessibilidade foi calculado com base no teor de biopolifenóis com acetona a 50%.

O aumento de polifenóis na fase gástrica é atribuído à ruptura das membranas celulares dos vegetais, devido à acidez do meio e do tempo de contato do fluido gástrico com o substrato. Essa ação propicia a liberação dos metabólitos secundários, elevando a sua bioacessibilidade no lúmen intestinal (MINEKUS et al., 2014). Por outro lado, a redução desses compostos verificados no intestino delgado, pode ser atribuída à degradação ou clivagem ocorrida no estômago, com a formação de novos metabólitos, afetando sua quantificação total nessa etapa.

Observa-se ainda na Tabela 1, que os teores totais de polifenóis em todas as etapas da digestão *in vitro* foram menores, quando comparados à extração química com acetona a 50%, indicando liberação parcial da matriz alimentar. Ressalta-se que a extração química com solução aquosa de acetona aumenta a capacidade de dissolução dos polifenóis, incluindo os de média polaridade, como os flavonoides ligados a radicais metila e acetila, elevando a concentração desses compostos (AZMIR et al., 2013).

O padrão de liberação do conteúdo total dos flavonóides foi semelhante ao dos polifenóis, com exceção da digestão intestinal (fase duodenal), que foi superior à extração química com acetona a 50%. Esse comportamento demonstra que as enzimas do trato gastrointestinal proximal foram mais eficazes que os solventes químicos utilizados na extração desses compostos. Além disso, os flavonoides não antocianínicos, demonstraram estabilidade às mudanças do pH durante a simulação da digestão, não sendo degradados. Resultados semelhantes aos obtidos por Heras et al. (2017).

A Tabela 1 também revela, em relação aos flavanois, que a extração química se sobressaiu em relação à simulação gastrointestinal, em todas as etapas ($p < 0,05$). Os fluidos salivares e gástricos simulados extraíram apenas 3,66% e 8,71% dos flavanois, respectivamente, enquanto os intestinais não obtiveram êxito na liberação desses compostos, não sendo, portanto, detectados nesta etapa da digestão. Resultados apoiados em estudos de Tagliazucchi et al. (2010).

Com relação às antocianinas e proantocianidinas o estudo revelou comportamento semelhante em todas as etapas da digestão, com aumento gradativo na fase gástrica, e redução significativa ($p < 0,05$) nas fases posteriores. Vale destacar que, na fase gástrica, a ação da pepsina no meio ácido foi mais eficaz, liberando maior quantidade desses pigmentos do que a acetona a 50%.

Em relação às proantocianidinas, o alto peso molecular dificulta sua liberação da matriz celular e absorção pela corrente sanguínea. Devido a isso, devem ser clivadas em monômeros e dímeros pela microbiota colônica para exercer sua bioatividade (OLIVEIRA; BASTOS, 2013). Quanto às antocianinas, há degradação intensa na fase duodenal, decorrente do contato desses pigmentos com o pH do meio, modificando a estrutura do cátion *flavillium* para chalcona, inativando-os ou degradando-os (SHARMA et al., 2016).

A sensibilidade das antocianinas ao pH neutro ou ligeiramente alcalino já foi relatada em vários estudos (TAGLIAZUCCHI et al., 2010; BOUAYED et al., 2011). Tagliazucchi et al. (2010), destacaram que após a simulação da digestão intestinal, houve redução de 80% das antocianinas de uvas. Nesse estudo, a perda das antocianinas na fase duodenal foi de 93%, fato decorrente também da natureza não acilada das antocianinas do jamelão, aumentando a sua instabilidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Bouayed et al. (2011).

3.2 Identificação de polifenóis durante a simulação da digestão *in vitro*

Conforme demonstrado nos resultados anteriores, os polifenóis podem aumentar ou diminuir sua concentração de acordo com a etapa do processo digestivo. As alterações cromatográficas e espectrométricas observadas nesse estudo estão apresentadas na Tabela 2. Um total de 36 polifenóis foi encontrado, sendo 11 antocianinas e 25 polifenóis não-antociânicos. O perfil antociânico foi composto pelas agliconas peonidina, cianidina, petunidina, delphinidina e malvidina, em seus estados livres ou em suas formas mono e diglicosiladas. Além das antocianinas, foram identificados ácidos hidroxicinâmicos, hidroxibenzoicos, flavanois, flavanonois e proantocianidinas. Entre esses, vale destacar a presença do trímero de epigalocatequina ligado a duas moléculas de água (m/z 949), proantocianidina presente em todas as etapas da digestão simulada, sendo possivelmente uma das responsáveis pela ação antioxidante.

Conforme demonstrado na Tabela 2, os ácidos hidroxicinâmicos, hidroxibenzoicos e flavonas como catequinas, são bioacessíveis nas etapas iniciais do processo digestivo, podendo ser absorvidos facilmente pelo trato intestinal. Esses achados foram confirmados por Martin; Apple (2010). Estudos têm reportado que alguns desses ácidos, como o clorogênico e cafeico, por serem bioacessíveis no estômago, podem ser absorvidos também pela mucosa gástrica (CHIANG et al., 2013; OLIVEIRA; BASTOS, 2013). Os ácidos não absorvidos no

estômago são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal proximal, enquanto os esterificados possuem sua absorção dificultada, devido à mucosa gastrointestinal não possuir esterases capazes de hidrolisá-los, reduzindo a eficiência da absorção no lúmen gástrico e intestino delgado (MANACH et al., 2004).

Em relação às antocianinas, pode-se observar que estas estão presentes na fase oral, em suas formas mono e diglicosiladas, liberando suas agliconas na fase gástrica, devido às condições ácidas do meio (Tabela 2). Na fase intestinal, a neutralidade e/ou alcalinidade do meio ocasionou diminuição desses pigmentos, devido à modificação de sua estrutura molecular. Esses resultados foram corroborados por Peixoto et al. (2016), que relataram redução da bioacessibilidade de antocianinas do jamelão, na fase intestinal, quando analisadas em células Caco-2.

As proantocianidinas, devido ao alto peso molecular, são pobremente liberadas da matriz alimentar e pouco absorvidas, devendo ser clivadas em monômeros e dímeros antes da absorção (HACKMAN et al., 2008). Isso foi observado nesse estudo (Tabela 2), em que proantocianidinas triméricas, estiveram presentes em todas as etapas do processo de digestão simulada. A não clivagem das proantocianidinas na fase colônica é atribuída ao pouco tempo de contato das enzimas microbianas com a amostra (apenas 1 h). Em estudos com animais, a clivagem desses compostos ocorreu após 48 h de incubação, em que 6 unidades de proantocianidinas foram degradadas em ácidos aromáticos de baixo peso molecular (DÉPREZ et al., 2000).

Tabela 2 - Identificação de polifenóis nas diferentes fases da digestão *in vitro* por CLAE-MS, no modo de ionização negativa

Identificação proposta	MS [M-H] ⁻	MS ²	MS ³	Oral	Gástrica	Duodenal	Colônica
<i>Antocianinas</i>							
Cianidina (padrão)	447	285, 276	285, 145	-	+	-	-
Peonidina (padrão)	300	130, 256	199	-	+	-	-
Petunidina (padrão)	315	300, 286	299	-	+	+	-
Malvidina (padrão)	329	301, 285	301	-	+	-	-
Cianidina 3-O-glicosídeo (Tavares et al., 2017)	447	285, 276	285, 131	-	+	-	-
Peonidina 3-O-glicosídeo (Tavares et al., 2017)	461	423, 300	300, 130	+	+	-	-
Petunidina 3-O-glicosídeo (Tavares et al., 2017)	478	358	315, 145, 119	+	-	-	-
Malvidina 3-O-glicosídeo (Tavares et al., 2017)	380	329, 301	301, 285, 130	+	-	-	-
Delfinidina 3,5-diglicosídeo (Tavares et al., 2017)	625	463, 455, 301	301	+	+	+	-
Petunidina 3,5-diglicosídeo (Tavares et al., 2017)	639	477, 315, 299	315	-	+	+	-
Malvidina 3,5-diglicosídeo (Tavares et al., 2017)	653	489, 337, 329	329	+	+	-	-
<i>Polifenóis não antociânicos</i>							
NI	501	387, 273	273, 159, 189, 247	+	-	-	-
NI	387	273	159	-	+	+	-
NI	589	453, 521	317, 385, 249, 181	-	-	-	+
NI	459	391, 413	345, 271, 239	-	-	-	+
Derivado do ácido cafeico (De-Melo et al., 2018)	377	341, 179	179, 161	+	+	-	-

Ácido cafeico (Wu et al., 2009)	179	161, 143	143, 113	+	+	+	-
Derivado do ácido cafeico (Bystrom et al., 2008)	215	179, 161	161, 143, 113	+	+	+	+
Ácido coutárico (Lambert et al., 2015)	295	179, 133	161, 143, 149, 115, 119	+	-	-	-
Ácido clorogênico (Heras et al., 2016)	353	173, 111	111	+	-	-	-
Catequina (Wang et al., 2008)	289	271, 133	115, 123	+	-	-	-
Derivado de ácido clorogênico (Heras et al., 2016)	509	353, 329	155, 267, 173, 111	+	-	-	-
Derivado do ácido quínico (Bastos et al., 2007)	421	403, 191	173, 111	-	+	-	-
Derivado do ácido quínico (Bastos et al., 2007)	405	387, 191	173, 111, 191, 213	-	+	-	-
Ácido quínico (Bastos et al., 2007)	191	173, 111	111	+	+	+	-
Ácido gálico 4-O-hexosídeo (Heras et al., 2016)	331	271, 169	211, 125	+	+	-	-
Ácido gálico (Faria et al., 2011)	169	125		-	+	+	-
Dihidromiricetina-5 (Tavares et al., 2016)	643	463, 355	463, 355, 481, 283, 505, 625, 193	+	-	-	-
Metil-dihidromiricetina-dihexosídeo-4 (Tavares et al., 2016)	657	495, 477	315, 319, 296	+	+	+	+
Metil-dihidromiricetina-dihexosídeo-5 (Tavares et al., 2016)	657	495, 477, 315, 519	315, 297, 282, 315	+	+	+	+
Dimetil-dihidromiricetina-diglicosídeo (Tavares et al., 2011)	671	509	347, 371	+	+	-	-
Metil-dihidromiricetina-dihexosídeo-4 (Tavares et al., 2016)	657	495, 477	315, 319, 296	+	+	-	-
NI	465	434, 303	271, 229	+	+	-	-
NI	431	385, 179	152, 223, 89, 143	+	+	-	-
Ácido elágico (Gordon et al., 2011)	301	257	199, 169	-	+	-	-
Trímero de epigallocatequina dihidratada (Costa et al., 2016)	949	904	338, 451, 564, 677, 790, 885	+	+	+	+

NI: Não identificado. +: presença; -: ausência.

3.3 Capacidade antioxidante dos polifenóis durante a simulação da digestão *in vitro*

A influência da simulação da digestão gastrointestinal do jamelão na capacidade *scavenger* do radical ABTS, e na redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}) pelo ensaio FRAP estão apresentados na Tabela 3. O estudo demonstrou aumento significativo ($p < 0,05$) na ação antioxidante do fruto, da fase oral para duodenal, independente do ensaio avaliado. Os ensaios ABTS e FRAP também diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si, com exceção na etapa em que há simulação de enzimas da microbiota colônica ($p > 0,05$). Esse fato é atribuído à baixa concentração dos compostos bioativos nessa etapa.

Tabela 3 - Alterações na atividade antioxidante na simulação da digestão *in vitro* do jamelão, em comparação com método químico de extração e índice de bioacessibilidade da ação antioxidante

Extração de compostos bioativos	ABTS ($\mu\text{mol.Trolox.g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol.Trolox.g}^{-1}$)
<i>Etapas da digestão gastrointestinal</i>		
Oral	3,37 \pm 0,03 ^e	2,71 \pm 0,01 ^e
Gástrica	12,63 \pm 0,10 ^d	4,99 \pm 0,09 ^d
Duodenal	18,13 \pm 0,29 ^c	6,60 \pm 0,07 ^c
Colônica	1,21 \pm 0,06 ^{f*}	1,32 \pm 0,01 ^{f*}
<i>Extração química</i>		
Aquosa	27,80 \pm 0,17 ^b	10,40 \pm 0,15 ^b
Acetônica 50%	54,54 \pm 0,06 ^a	22,33 \pm 0,07 ^a
<i>Índice de bioacessibilidade da ação antioxidante (%)</i>		
Oral	6,18	12,14
Gástrica	23,16	22,35
Duodenal	33,24	29,56
Colônica	0,02	5,91

Médias \pm desvio padrão (n = 3). ANOVA two way seguida do pós-teste Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferença significativa no mesmo ensaio de atividade antioxidante e, nas diferentes etapas da digestão simulada e extração química. (*) diferença significativa entre os ensaios de atividade antioxidante, nas diferentes etapas da digestão simulada e extração química. ABTS: atividade *scavenger* do radical ABTS⁺. FRAP: capacidade redutora do íon férrico Fe^{3+} a Fe^{2+} . O índice de bioacessibilidade foi calculado com base na atividade antioxidante com acetona a 50%.

A ação antioxidante conferida pelo fruto, após a digestão *in vitro*, pode ser atribuída aos polifenóis, particularmente, aos flavonóides e proantocianidinas (Tabela 4), devido à forte correlação positiva entre esses compostos e os ensaios FRAP ($r_{polifenóis}=0,87$; $r_{proantocianidinas}=0,83$; $p<0,05$) e ABTS ($r_{polifenóis}=0,84$; $r_{proantocianidinas}=0,77$; $p<0,05$). Nesses ensaios, antocianinas apresentaram baixa correlação ($r_{ABTS}=0,16$; $r_{FRAP}=0,20$; $p<0,05$), sugerindo que a redução do Fe^{3+} e o sequestro do radical ABTS é independente da concentração das mesmas.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson's (r) entre compostos bioativos e atividade antioxidante do jamelão nas etapas do processo de digestão simulada

Variáveis	PT	FT	FIT	AM	PrT	ABTS
FT	0,668479*					
FIT	0,638992*	-0,120197				
AM	0,661857*	-0,090360	0,999386*			
PrT	0,977118*	0,676984*	0,647768*	0,669801*		
ABTS	0,838206*	0,900382*	0,132848	0,161946	0,771573*	
FRAP	0,869156*	0,926850*	0,175746	0,205368	0,829162*	0,990997*

PT = Polifenóis totais; FT = Flavonóides totais; FIT = Flavanois totais; AM = Antocianinas monoméricas; PrT = Proantocianidinas; DPPH = atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH., ABTS = atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS·+, FRAP = capacidade redutora do íon férrico Fe^{3+} .

*Interação significativa ($p<0,05$) entre as classes polifenólicas.

Na extração química, embora as antocianinas tenham sido expressivas no ensaio ABTS ($r_{flavanois}=0,91$; $r_{antocianinas}=0,86$; $p<0,05$), no ensaio FRAP os principais responsáveis pela ação antioxidante foram os flavanois ($r_{flavanois}=0,81$; $r_{antocianinas}=0,48$; $p<0,05$). Esse resultado remete à cautela necessária quando se pretende afirmar quais compostos conferem a real ação antioxidante, visto ser uma característica dependente do composto extraído; do solvente empregado; dos processos de digestão ou do processamento para o desenvolvimento de novos produtos.

Embora a capacidade antioxidante, verificada nas etapas do processo de digestão, tenha sido similar entre os dois ensaios avaliados, o ensaio FRAP apresentou valores inferiores aos do ABTS na fase gástrica e duodenal, sugerindo que a ação enzimática e mudança de pH podem gerar novos compostos, com maior ou menor atividade antioxidante,

do que os compostos originais (SAURA-CALIXTO et al., 2007). Assim, os resultados desses experimentos demonstram que a medição de atividades antioxidantes, especialmente no caso de sistemas multifásicos complexos, não podem ser avaliados satisfatoriamente por um único método.

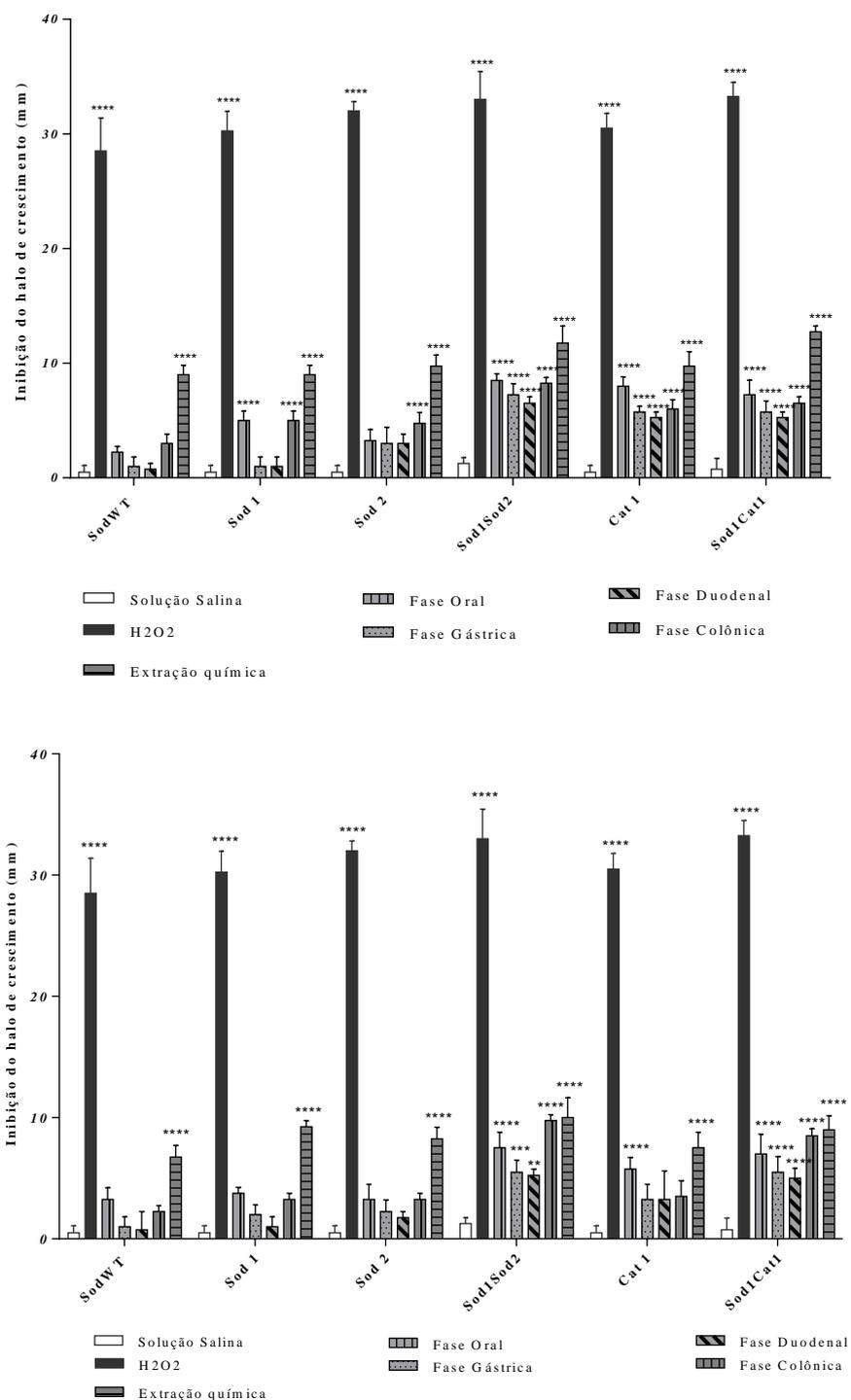
3.4 Resposta ao estresse oxidativo em linhagens de *S. cerevisiae*

Os polifenóis bioacessíveis do jamelão, assim como os do extrato acetônico a 50%, não induziram danos oxidativos significativos ao DNA nuclear e mitocondrial em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas e, em todos os tratamentos, quando comparados ao H₂O₂ (p<0,05) (Figuras 1). Além disso, ocasionaram modulação significativa dos danos causados pelo agente estressor, em todas as linhagens e tratamentos analisados (Figuras 2). Os efeitos moduladores da ação enzimática foram superiores a 60% e, em alguns casos, como na modulação da *SOD1Δ* e *SOD2Δ*, esse efeito foi superior a 90%, demonstrando forte efeito modulador sobre a *SOD* citoplasmática e mitocondrial, por esse ensaio.

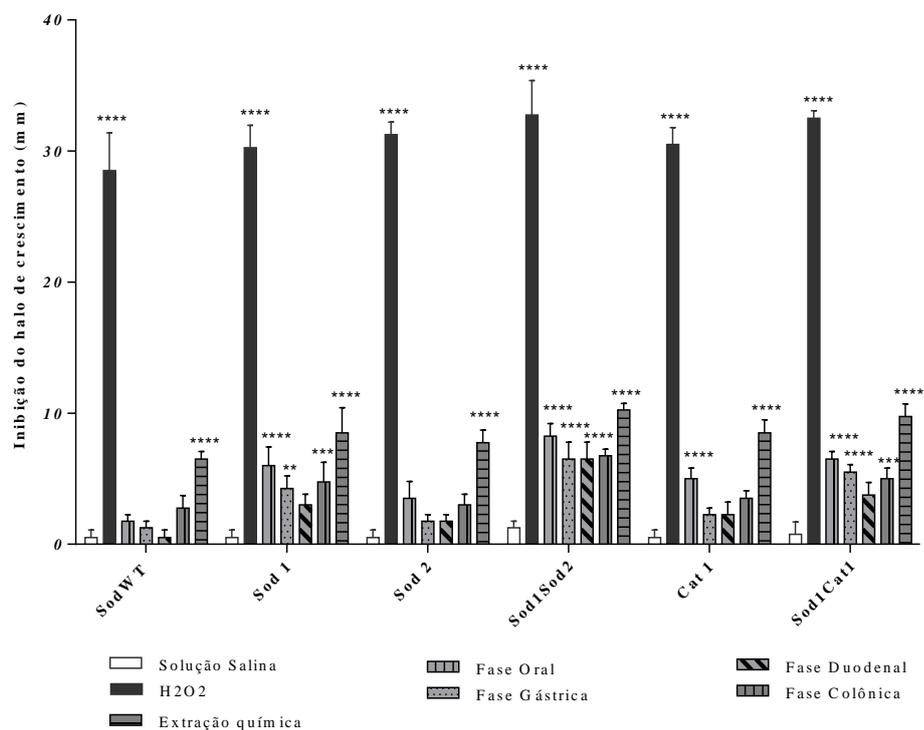
Esses efeitos decorrem da proteção proporcionada pelos compostos antioxidantes liberados da matriz alimentar, que inibem a ação deletéria do H₂O₂ em sistemas biológicos. O H₂O₂, quando em excesso, pode modificar bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA e alterações de outras biomoléculas (BARREIROS; DAVID, 2006; BLOKHINA et al., 2003). Assim, esse estudo indica que os polifenóis do jamelão, nas concentrações analisadas, minimizaram os efeitos do estresse oxidativo. Vale destacar que a redução desses efeitos foram maiores na fase gástrica e duodenal, devido à maior bioacessibilidade de flavonoides com ação antioxidante, nessas etapas.

A característica antioxidante do jamelão é atribuída a interação desses polifenóis com radicais livres, sequestrando-os, prevenindo a oxidação e dano ao DNA, e modulando o sistema enzimático, evitando a formação de radicais livres e promovendo aumento da atividade de enzimas como *SOD* e *CAT*. A neutralização desses radicais ocorre pela doação do átomo de hidrogênio do grupo hidroxila do polifenol, que converte os grupos fenólicos em radicais livres estáveis, que não iniciam ou propagam a oxidação lipídica (AFIFY et al., 2011).

Figura 1 - Efeito preventivo (a, pré-tratamento), *scavenger* (b, co-tratamento) e reparador (c, pós-tratamento) dos polifenóis bioacessíveis do jamelão e, comparação com a extração química, em relação aos danos induzidos pelo H₂O₂ (10mM) em linhagens de *S. cerevisiae*

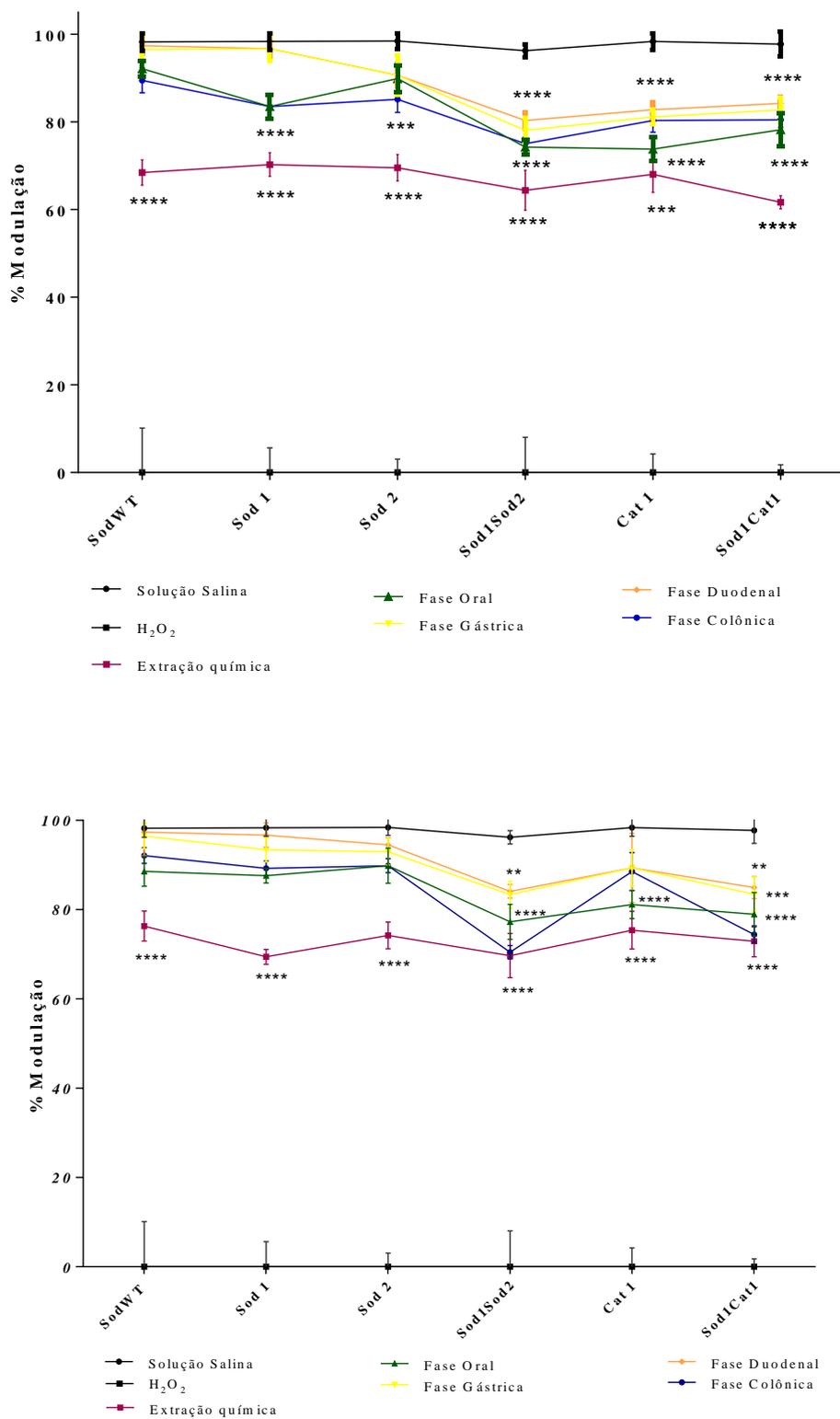


Continuação...

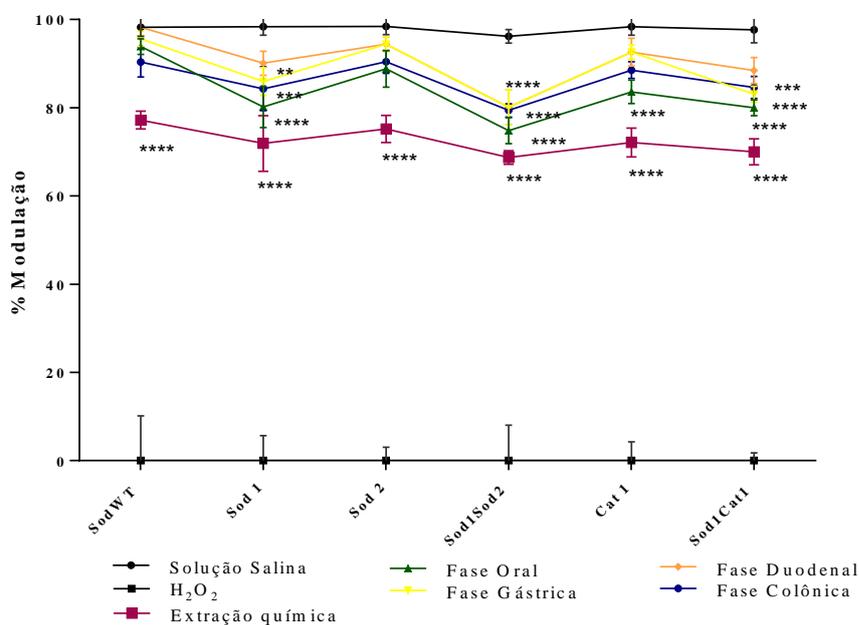


ANOVA two-way e pós-teste Tukey ($p < 0,05$), comparados ao controle negativo: solução salina. Controle positivo: H_2O_2 - peróxido de hidrogênio. Extração química com acetona aquosa a 50% ($100 \mu g \cdot mL^{-1}$).

Figura 2 - Efeitos modulatórios dos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas (**a**, pré-tratamento; **b**, co-tratamento; **c**, pós-tratamento)



Continuação...



Os dados estão apresentados como percentual de modulação (%M), calculado pela equação: $\%M = [(A-B)/A] \times 100$, onde %M representa o percentual de modulação de polifenóis bioacessíveis em cada etapa da digestão *in vitro*. A: o valor do dano oxidativo induzido pelo jamelão em cada etapa da digestão. B: o valor do dano oxidativo induzido pelo H₂O₂. O %M foi avaliado na fase de pré-tratamento, co-tratamento e pós tratamento. ANOVA two-way e pós-teste Tukey ($p < 0,05$), comparados ao controle negativo: solução salina. H₂O₂: Controle positivo: H₂O₂ - peróxido de hidrogênio. Extração química com acetona aquosa a 50% (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

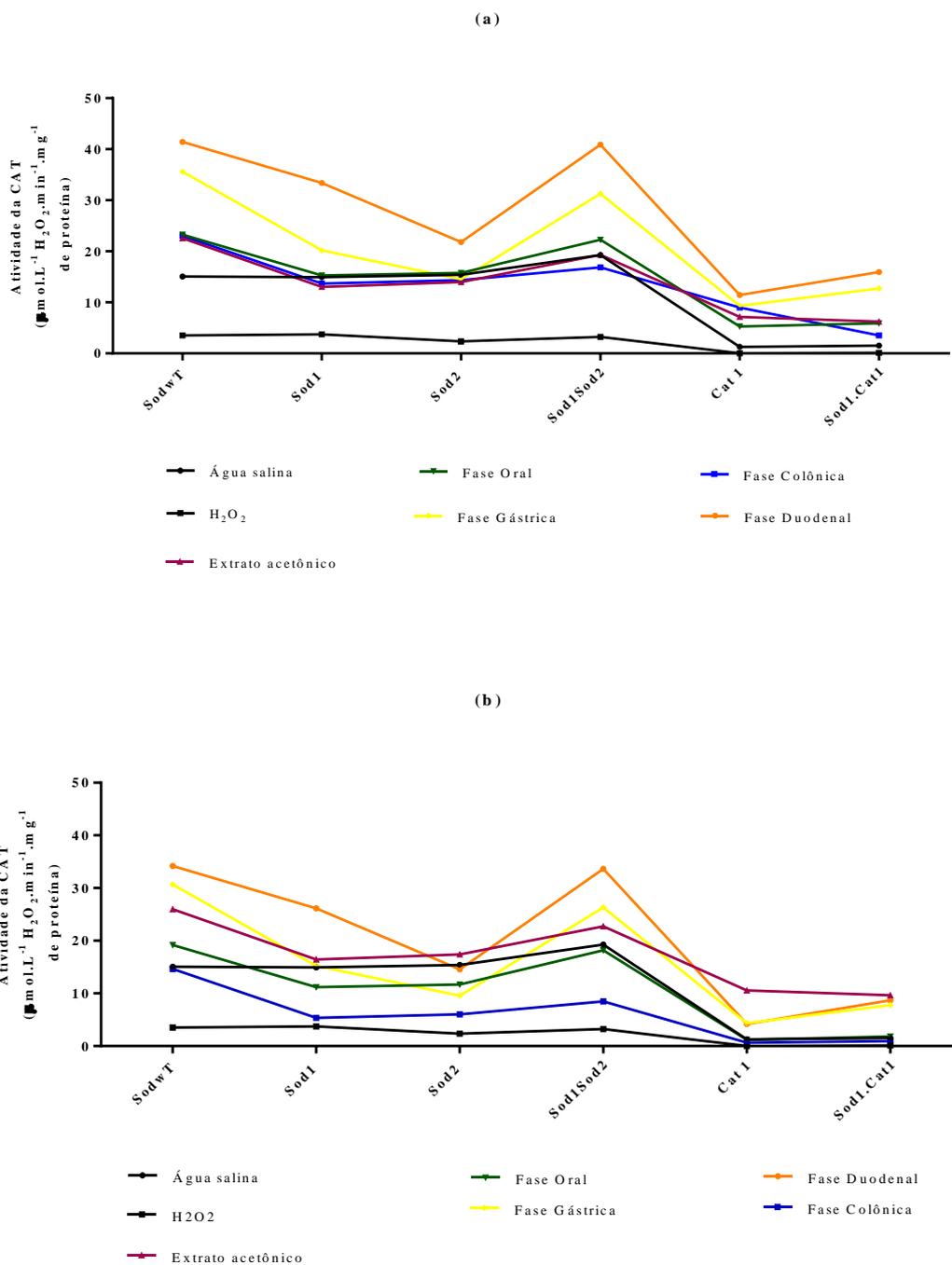
Os polifenóis que possuem estruturas *orto* e *para*, apresentam melhor atividade antioxidante devido à grande capacidade de doar átomos de hidrogênio e formar estruturas do tipo quinona que são estabilizadas por ressonância (ZHANG et al., 2017). Essas estruturas estão presentes em alguns compostos do jamelão, elevando sua capacidade antioxidante. Assim, nesse ensaio, o jamelão apresentou-se como antioxidante preventivo, *scavenger* e reparador. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Slatnar et al. (2012), ao avaliar a ação antioxidante de sucos de berries em *S. cerevisiae*.

Conforme demonstrado nas Figuras 3 e 4, a atividade das enzimas *SOD* e *CAT* foram moduladas pelos polifenóis do jamelão. A atividade dessas enzimas apresentou comportamento similar entre todos os tratamentos avaliados, embora a ação mais efetiva tenha sido no pré e co-tratamento. Observa-se ainda na Figura 3 que a atividade da *CAT* foi mais expressa na linhagem duplmutante, *SOD1ΔSOD2Δ*. Isso se justifica pela ausência da *SOD* citoplasmática e mitocondrial, requerendo maior ação da *CAT* para conversão do H_2O_2 em água e minimização dos danos oxidativos.

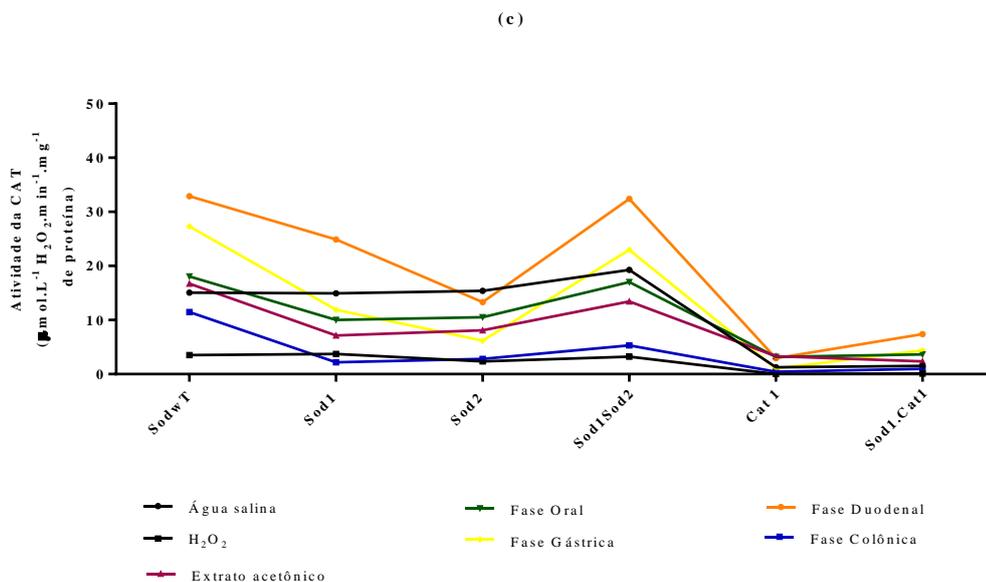
A Figura 4 demonstra que a atividade da *SOD* foi mais pronunciada nas linhagens deficientes em *SOD* mitocondrial. A *SOD* apresenta-se nas células eucariotas nas isoformas cobre/zinco-dependente (*Cu/Zn-SOD*) e manganês-dependente (*Mn-SOD*). Embora *Cu/Zn-SOD* seja encontrada nos fluidos extracelulares, sua maior ação é no citosol celular, sendo sua atividade inalterada pelo estresse oxidativo. A *Mn-SOD* localiza-se estrategicamente no interior da mitocôndria, sítio de ativação da produção do radical ânion superóxido, cuja atividade aumenta com o estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014). Isso explica a maior modulação dessa enzima pelos polifenóis do fruto em estudo.

As enzimas *SOD* e *CAT* são essenciais para a neutralização de ERO's e manutenção das células isentas de danos mediados pelo estresse oxidativo. *S. cerevisiae* tem compostos antioxidantes no citoplasma, mitocôndrias e em toda a superfície celular. Além disso, um dos seus polímeros estruturais de parede celular (1-3),(1-6)-b-D-glucano possui atividades antioxidantes e imunomoduladoras. Portanto, essa levedura pode ser usada para medir a ação antioxidante de uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas, como o jamelão (ISLAM et al., 2016).

Figura 3 - Modulação da atividade enzimática da CAT pelos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas no pré-tratamento (a), co-tratamento (b) e pós-tratamento (c)

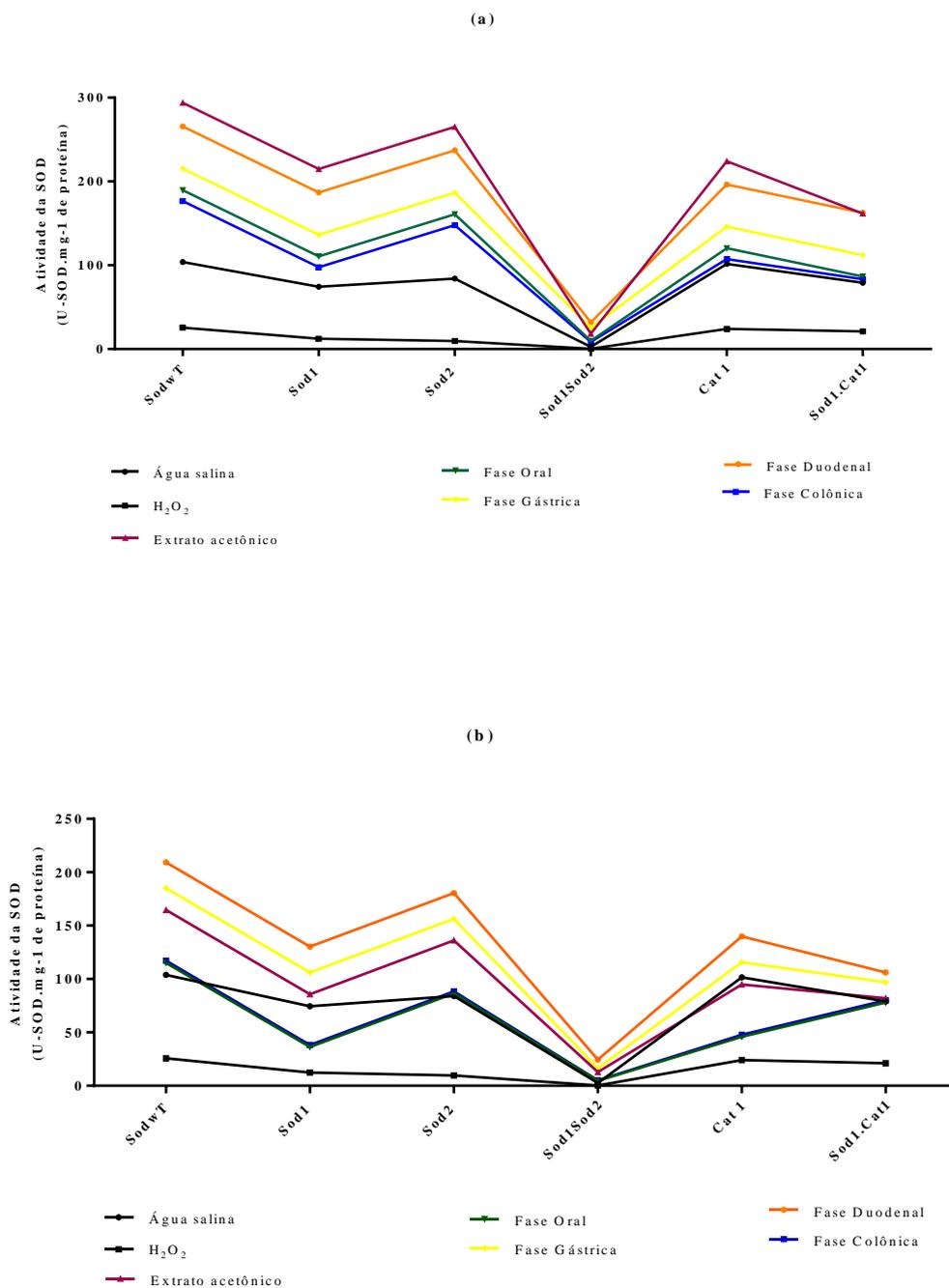


Continuação...

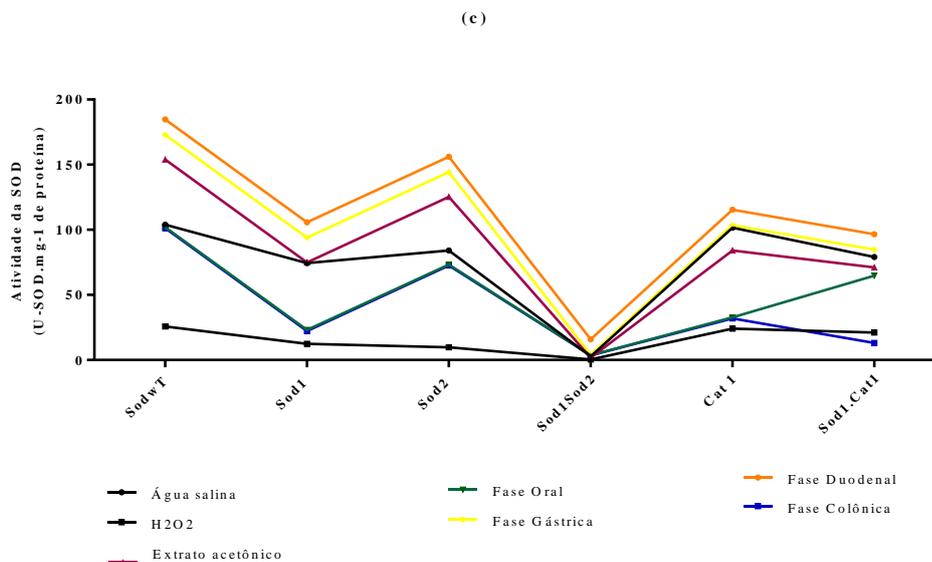


H₂O₂: peróxido de hidrogênio (controle positivo). Controle negativo: água salina. CAT: catalase. A atividade da CAT foi expressa como $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de decomposição de H₂O₂.min⁻¹. mg⁻¹ de proteína. ANOVA two-way e pós-teste Tukey ($p < 0,05$), comparado ao controle positivo. Extração química com acetona aquosa a 50% (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Figura 4 - Modulação da atividade enzimática da *SOD* pelos polifenóis bioacessíveis do jamelão frente ao H_2O_2 , em *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas enzimáticas no pré-tratamento (a), co-tratamento (b) e pós-tratamento (c)



Continuação...



H₂O₂: peróxido de hidrogênio (controle positivo). Controle negativo: água salina. SOD: superóxido dismutase. A atividade da SOD foi expressa como U-SOD.mg⁻¹ de proteína. ANOVA two-way e pós-teste Tukey (p<0,05), comparado ao controle positivo. Extração química com acetona aquosa a 50% (100 µg.mL⁻¹).

4. Conclusão

A simulação da digestão *in vitro* mostra que o trato gastrointestinal favorece a liberação de compostos antioxidantes presentes na matriz alimentar do jamelão, em comparação com a extração química, disponibilizando-os para absorção, e eventual utilização pelos tecidos, particularmente flavonoides e proantocianidinas. Esses polifenóis são capazes de reduzir a inibição do crescimento de *S. cerevisiae*, de modular os danos causados pelo H₂O₂ e estimular a produção de SOD e CAT, demonstrando ação antioxidante nos ensaios analisados.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (número

de concessão 83151320325) pela concessão de bolsa de pesquisa, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI (número de concessão 006/2016) pelo financiamento do projeto.

Referências

- AFIFY, A. E. M. R.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A.; EL-SHEMY, H. A. *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5, 948-958, 2011.
- ALTERIIS, E.; FALANGA, A.; GALDIERO, S.; GUIDA, M.; MASELLI, V.; GALDIERO, E. Genotoxicity of gold nanoparticles functionalized with indolicidin towards *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of environmental sciences**, 2017.
- ARNOUS, A.; MAKKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, 15, 655-665, 2002.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUO, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426-436, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.
- BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. 2007. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12, 423-432, 2007.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, 91, 179-194, 2003.
- BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; SPERONI, C. S.; GIUSTI, M. M.; GODOY, H. T. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, 164, 347-354, 2014.
- BOUAYED, J. HOFFMAN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, 128, 14-21, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.
- BRANCO, I. G.; MORAES, I. C. F.; ARGANDOÑA, E. J. S.; MADRONA, G. S.; SANTOS, C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; HAMINIUK, C. W. I. Influence of pasteurization on antioxidant and in vitro anti-proliferative effects of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit pulp. **Industrial Crops and Products**, 89, 225-230, 2016.

- CHIANG, C. J.; KADOUH, H.; ZHOU, K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion. **LWT – Food Science and Technology**, 51, 417–422, 2013.
- COSTA, M. F.; GALAVERNA, R. S.; PUDENZI, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C. Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical Methods**, 8, 6056-6063, 2016.
- DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, L. M.; MOREIRA, M. M.; DELERUE-MATOS, C.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Phenolic profile by CLAE-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: monofloral bee polle. **Journal of Food Biochemistry**, 1-21, 2018. e12536.
- DÉPREZ, S.; BREZILLON, C.; RABOT, S.; PHILIPPE, C.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; SCALBERT, A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. **Journal of Nutrition**, 130, 2733–2738, 2000.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571–1578, 2011.
- FOGLIANO, V.; COROLLARO, M. L.; VIATGLIONE, P.; NAPOLITANO, A.; FERRACANE, R.; TRAVAGLIA, F. ARLORIO, M. et al. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Molecular Nutrition and Food Research**, 5, 1-12, 2011.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.
- GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, F. G. S.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59,7688-7699, 2011.
- HACKMAN, R. M.; POLAGRUTO, J. A.; YANZHU, Q.; SUN, B.; FUJII, H.; KEEN, C. L. Flavonols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, 7, 195-208, 2008.
- HERAS, R. M. L.; QUIFER-RADA, P.; ANDRÉS, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, 23, 370-377, 2016.
- HERAS, R. M. L.; PINAZO, A.; HEREDIA, A.; ANDRÉS, A. Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, 214, 478-485, 2017.
- ISLAM, M. T.; STRECK, L.; PAZ, M. F. C. J.; SOUSA, J. M. C.; ALENCAR, M. V. O. B.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; SANTOS, J. V. O.; SILVA-JUNIOR, A. A.; FERREIRA, P. M. P.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, 9, 1-15, 2016.
- LAMBERT, M.; MEUDEC, E.; VERBAERE, A.; MAZEROLLES, G.; WIRTH, J.; MASSON, G.; CHEYNIER, V.; SOMMERER, N. A High-Throughput UCLAE-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. **Molecules**, 20, 7890-7914, 2015.

- LESTARIO, L. N.; HOWARD, L. R.; BROWNMILLER, C.; STEBBINS, N. B.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). **Food Research International**, 100, 385-391, 2017.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, 224, 164-175, 2014.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American journal of clinical nutrition**, 79, 727-747, 2004.
- MARTIN, K. R.; APPEL, C. L. Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, 2, 1-12, 2010.
- MARTÍNEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Ultra-high performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1313, 119-131, 2013.
- MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C. T.; ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, 38, 36-44, 2017.
- MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food and Function**, 5, 1113-1124, 2014.
- OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolymus* L. (*Asteraceae*) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 7, 136-147, 2014.
- OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, 34, 1051-1056, 2013.
- ORTEGA, N.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; REGUANT, J.; MOTILVA, M. J. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in vitro* digestion model. **Food Chemistry**, 124, 65-71, 2011.
- PEIXOTO, F. M.; FERNANDES, I.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; BORGUINI, R. G.; MATEUS, N.; FREITAS, V.; GODOY, R. L. O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Simulation of *in vitro* digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jamelão and jambo fruits. **Journal of Functional Foods**, 24, 373-381, 2016.
- PORTER, L. J.; HIRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, 25, 223-230, 1986.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1231-1237, 1999.
- SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J. GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, 101, 492-501, 2007.
- SHARMA, R. J.; GUPTA, R. C.; SINGH, S.; BANSAL, A. K.; SINGH, I. P. Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). **Food Chemistry**, 190, 808-817, 2016.
- SLATNAR, A.; JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; JAMNIK, P. The effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. **Plos One**, 7, 2012.
- SOUZA, B. V. C.; ARAÚJO, R. S. R. M.; SILVA, O. A.; FAUSTINO, L. C.; GONÇALVES, M. F. B.; SANTOS, M. L.; SOUZA, G. R.; ROCHA, L. M.; CARDOSO, M. L. S.; NUNES, L. C. C. (2017). *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 28, 129-138.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I- quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 19, 63-68, 1959.
- TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, 120, 599-606, 2010.
- TAVARES, I. M. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, 82, 1-13, 2016.
- TAVARES, I. M. C.; NOGUEIRA, T. Y. K.; MAURO, M. A.; GOMEZ-ALONSO, S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; LAGO-VANZELA. Dehydration of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) juice during foam mat drying: quantitative and qualitative changes of the phenolics compounds. **Food Research International**, 102, 32-42, 2017.
- WANG, D.; LU, J.; MIAO, A.; XIE, Z.; YANG, D. CLAE-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 361-369, 2008.
- WU, Z. J.; MA, X. L.; FANG, D. M.; QI, H. Y.; REN, W. J.; ZHANG, G. L. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus Yunnanensis* using electrospray ionization Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, 15, 415-429, 2009.
- ZHANG, Y. Y; ZHANG, F.; THAKUR, K.; CI, A. T.; WANG, H.; ZHANG, J. G.; WEI, Z. J. Effect of natural polyphenol on the oxidative stability of pecan oil. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64, 555-559, 1999.

Material suplementar

Tabela S1

Descrição das linhagens e genótipos de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (<i>SODWT</i>)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	
EG118 (<i>SOD1Δ</i>)	SOD1::URA3 all other markers as EG103	
EG110 (<i>SOD2Δ</i>)	SOD2::TRP1 all other markers as EG103	
EG133 (<i>SOD1ΔSOD2Δ</i>)	SOD1::URA3 SOD2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (<i>CAT1Δ</i>)	EG103, except CAT1:: TRP1	
EG (<i>SOD1ΔCAT1Δ</i>)	EG103, except SOD1:: URA3 and CAT1:: TRP1	

Fonte: Adaptado de De Lima, 2008.

Capítulo 5

Processo de extração e fabricação do suco tropical de jamelão utilizando polissacarídeos para redução da adstringência

RESUMO

PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FABRICAÇÃO DO SUCO TROPICAL DE JAMELÃO UTILIZANDO POLISSACARÍDEOS PARA REDUÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA

A invenção refere-se ao processo de fabricação de suco tropical de jamelão, extraído por arraste à vapor e, adicionado de polissacarídeos que minimizam a interação tanino-proteína. A técnica de extração empregada suprime a etapa de despulpamento, evitando um conteúdo maior de taninos devido à extração desses compostos presentes também nas sementes do fruto. A adição de polissacarídeos ao suco do jamelão reduz sua adstringência por vias simples e sem perda de qualidade do produto final, sendo seu uso viável economicamente. Assim, a técnica de extração/fabricação empregada reduz esse atributo sensorial indesejável, aumenta a aceitação do produto e preserva compostos bioativos bioacessíveis e com ação antioxidante, capazes de atuar como agente preventivo, *scavenger* e reparador de danos ocasionados pelo estresse oxidativo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração de suco tropical de jamelão caracterizado por processo de arraste à vapor isento de conservantes químicos e adicionado de polissacarídeos.
2. Processo de extração de suco tropical de jamelão caracterizado por extração efetuada a uma temperatura de vapor, entre 50 °C e 110 °C, com temperatura ótima a 70 °C, capaz de proporcionar boa extração de polifenóis e mínima característica de adstringência.
3. Processo de extração de suco tropical de jamelão caracterizado por tempo de extração, entre 30 e 60 minutos, com tempo ótimo em 45 minutos, capaz de proporcionar boa extração de polifenóis e mínima característica de adstringência.
4. Processo de fabricação de suco tropical de jamelão caracterizado por adição de polissacarídeos em concentrações entre 0,005 e 0,08 g.L⁻¹, com concentração ótima em 0,03 g.L⁻¹, capazes de inibir a interação tanino-proteína.
5. Suco tropical de jamelão caracterizado por apresentar menor adstringência e bom conteúdo de polifenóis bioacessíveis com ação antioxidante.
6. Suco tropical de jamelão caracterizado por ser atóxico em testes de citogenotoxicidade.
7. Suco tropical de jamelão caracterizado por atuar como agente preventivo, *scavenger* e reparador de danos ocasionados pelo estresse oxidativo.
8. Suco tropical de jamelão caracterizado por uso na elaboração de néctares e refrescos, sendo diluído em água potável e com adição de sacarose ou outros edulcorantes, em concentrações estabelecidas em decretos e instruções normativas.
9. Suco tropical de jamelão caracterizado por uso na elaboração de geléias, sorvetes, mousses, drinks alcoólicos e não alcoólicos, bebidas fermentadas e gaseificadas, licores, vinhos e, outros produtos panificáveis e de confeitaria.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que:

- O jamelão possui características químicas, nutricionais e bioativas que favorecem o seu consumo *in natura* e em produtos derivados, como sucos, néctares, geleias, bebidas alcoólicas, misturas de especiarias, entre outros.
- Um dos maiores obstáculos na industrialização do jamelão é a presença de taninos que proporcionam adstringência e turbidez, reduzindo a aceitação dos produtos à base do fruto. Tanases e pectinases têm sido empregadas para minimizar os efeitos indesejáveis, no entanto, oneram os custos de produção.
- As antocianinas também são consideradas ponto crítico de controle, pois devido sua sensibilidade térmica são facilmente degradadas.
- Na otimização da extração de biopolifenóis do jamelão, a obtenção de rendimentos máximos desses compostos e atividade antioxidante ocorreu com a mistura binária de água e acetona, em proporções iguais.
- Ácidos fenólicos, quecertina deoxihexosídeo, isômeros de dihidromiricetina e trímero de epigallocatequina são os principais responsáveis pela ação antioxidante do jamelão.
- Os polifenóis do jamelão são capazes de capturar o radical peroxil e inibir a oxidação lipídica.
- O jamelão não exhibe efeitos toxicogénicos em *Artemia salina* Leach e *Allium cepa* Linn, não ocasionando risco de instabilidade genética, quando ingeridos em concentrações adequadas.
- A digestão *in vitro* mostra que todas as etapas da digestão favorecem a liberação de compostos antioxidantes presentes na matriz alimentar do jamelão, em especial flavonoides e proantocianidinas.
- Os flavonoides foram mais extraíveis na etapa duodenal da digestão simulada do que na extração química.
- As antocianinas mono e diglicosiladas liberam suas agliconas na etapa gástrica, porém na etapa duodenal são fortemente degradadas.
- A acidez gástrica proporciona a liberação de ácidos fenólicos.
- A atividade antioxidante avaliada pela redução do íon férrico independe da

concentração de antocianinas, tanto na extração química quanto após simulação da digestão.

- Os derivados do ácido cafeico, assim como o trímero de epigallocatequina estão presentes em todas as etapas do processo de digestão, sendo possíveis responsáveis pela ação antioxidante do fruto, após processo de digestão.
- Os polifenóis bioacessíveis do jamelão, nas diversas etapas da digestão reduzem a inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, modulam os danos causados pelo peróxido de hidrogênio e estimulam a produção de SOD e CAT. Dessa forma, o fruto possui atividade preventiva, *scavanger* e reparadora.
- Conseguiu-se desenvolver um suco tropical do jamelão, com adstringência reduzida e capaz de proporcionar benefícios à saúde devido à presença de polifenóis bioacessíveis, antioxidantes e não citogenotóxicos, em concentrações adequadas.