

Mayara Schulz

**BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
ATIVIDADE NEUROPROTETORA DOS FRUTOS DA
PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^{sa}. Dr^a. Roseane Fett

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schulz, Mayara

Bioacessibilidade de compostos fenólicos e
atividade neuroprotetora dos frutos da palmeira
juçara (*Euterpe edulis* Martius) / Mayara Schulz ;
orientador, Roseane Fett, 2019.
164 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Frutos. 3.
Compostos fenólicos. 4. Bioacessibilidade . 5.
Neuroproteção. I. Fett, Roseane. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos. III. Título.

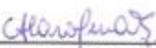
BIOACCESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENOLICOS E
ATIVIDADE NEUROPROTETORA DOS FRUTOS DA
PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius)

Por

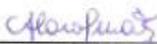
Mayara Schulz

Esta Defesa de Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de "Doutora em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

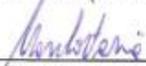
Florianópolis, 26 de fevereiro de 2019

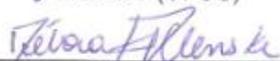

Prof.(a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina de Oliveira Costa,
Presidente (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Maria Beatriz de Abreu Gloria,
Membro (UFMG)


Prof.(a)/Dr.(a). Marcelo Farina,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Débora Kurrle Rieger Venske,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos diárias e pela oportunidade de concluir mais esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, Vitor Schulz e Rosane Rohling, por todo amor, por estarem sempre ao meu lado me incentivando a alcançar meus objetivos e principalmente por terem me ensinado a persistir diante das dificuldades.

À minha irmã, Franciéli Schulz, por todo amor, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao Rafael Bach Gonçalves, meu amor, meu companheiro, por todo amor e incentivo desde o início da minha jornada na pós-graduação.

À professora Dr^a. Roseane Fett, minha orientadora, por confiar no meu trabalho e me apoiar durante esta caminhada.

Ao Luciano Valdemiro Gonzaga por todo apoio recebido, por partilhar seu conhecimento de forma tão generosa e pelas inúmeras contribuições na realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa e aos demais membros do Grupo de Pesquisa em Antioxidantes Naturais/Laboratório de Química de Alimentos, pelos auxílios, carinho e amizade.

Ao professor Dr. Luciano Vitalli pela grande ajuda com as análises dos compostos fenólicos.

Ao professor Dr. Marcelo Farina por disponibilizar o Laboratório de Experimentação em Neuropatologias e à mestra Viviane de Souza, pelos ensinamentos para o estudo com cultura de células.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Ao Sr. Júlio Carvalho Machado e à empresa Alicon pela doação das amostras.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, aos docentes e demais funcionários pela dedicação e oportunidade para adquirir novos conhecimentos durante a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a concretização deste trabalho.

RESUMO

A espécie *Euterpe edulis* Martius, popularmente conhecida como palmeira juçara, é nativa do bioma Mata Atlântica e encontrada principalmente nos estados das regiões sul e sudeste do Brasil. Estudos têm demonstrado que os frutos da palmeira juçara contêm excelentes características nutricionais e bioativas, com destaque para os compostos fenólicos. Entretanto, para determinar se um alimento é uma possível fonte de determinado composto, é necessário investigar a concentração do mesmo que é liberada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal, ou seja, a sua bioacessibilidade. Além disso, estudos de possíveis efeitos biológicos são necessários para se conhecer a influência da composição dos alimentos sobre a saúde. Nesse contexto, este estudo avaliou a bioacessibilidade de compostos fenólicos individuais e da capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de juçara durante o ciclo de maturação a partir de simulação da digestão gastrointestinal. Foram também avaliados o efeito protetor em linhagem de células neuronais HT22 frente à oxitose induzida por glutamato, a composição fenólica e a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica obtidos da porção comestível dos frutos de juçara. Após a simulação da digestão gastrointestinal, a maioria dos compostos fenólicos estudados, bem como a capacidade antioxidante apresentaram valores inferiores aos obtidos por extração química. Este estudo demonstrou que a maturação influenciou na bioacessibilidade dos compostos fenólicos e na capacidade antioxidante e indicou que os frutos de juçara devem ser coletados a partir do estágio de maturação 4 (30 a 69 dias após o aparecimento dos frutos vermelhos no cacho). Os resultados também demonstraram que as frações hexânica e diclorometânica foram capazes de proteger as células do dano celular induzido pelo glutamato, resultado possivelmente relacionado à composição fenólica das frações. Os resultados deste trabalho mostraram que os frutos de juçara podem fornecer concentrações bioacessíveis relevantes de compostos fenólicos e sugerem que os compostos presentes nesses frutos são promissores para a redução do risco de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Ácidos fenólicos. Flavonóides. Antioxidante. HT22. Maturação. Açai.

ABSTRACT

Euterpe edulis Martius species, popularly known as juçara palm, is native to the Atlantic Forest biome and found mainly in the southern and southeastern Brazilian states. Studies demonstrate that the fruits of the juçara palm contain excellent nutritional and bioactive characteristics, with emphasis on phenolic compounds. However, in order to determine whether a food is a possible source of a particular compound, it is necessary to investigate the concentration thereof that is released from the food matrix during gastrointestinal digestion, i.e., its bioaccessibility. In addition, studies of possible biological effects are necessary to know the influence of food composition on health. In this context, this study evaluated the bioaccessibility of individual phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant capacity of juçara fruits during the ripening cycle from the gastrointestinal digestion simulation. The protective effect in HT22 neuronal cell line against glutamate-induced oxytosis, phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of the crude extract and the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions obtained from the edible portion of the juçara fruits were also evaluated. After gastrointestinal digestion simulation, the majority of the phenolic compounds studied, as well as the antioxidant capacity presented lower values than those obtained by chemical extraction. This study demonstrated that ripening influenced the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity and indicated that juçara fruits should be collected from ripening stage 4 (30 to 69 days after appearance of the red fruits in the bunch). The results also demonstrated that the hexane and dichloromethane fractions were able to protect the cells from death induced by glutamate, a result possibly related to the phenolic composition of the fractions. The results of this work showed that juçara fruits can provide relevant bioaccessible concentrations of phenolic compounds and suggest that the compounds present in these fruits are promising for reducing the risk of neurodegenerative diseases.

Keywords: Phenolic acids. Flavonoids. Antioxidant. HT22. Ripening. Açai.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Palmeiras *Euterpe edulis* Martius (A), *Euterpe oleracea* Martius (B) e *Euterpe precatoria* Martius (C) 27
- Figura 2.** Locais de ocorrência das palmeiras *Euterpe edulis* Martius, *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius 28
- Figura 3.** Fruto de juçara (A) e cacho (B) de frutos de juçara 30
- Figura 4.** Processamento dos frutos de juçara 31
- Figura 5.** Classificação dos compostos fenólicos e exemplos 40
- Figura 6.** Esquema simplificado da biossíntese de compostos fenólicos 41
- Figura 7.** Procedimento comumente empregado para avaliação da bioacessibilidade 55

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Compostos fenólicos de maior concentração encontrados nos frutos de juçara 69
- Figura 2.** Concentração fenólica total ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ em matéria seca desengordurada) antes e após a simulação da digestão gastrointestinal dos frutos de juçara em diferentes estádios de maturação 73
- Figura 3.** Capacidade antioxidante determinada pelos ensaios (A) DPPH (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} de matéria seca desengordurada) e FRAP expresso em (B) mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} de matéria seca desengordurada e (C) $\mu\text{mol Fe II } 100 \text{ g}^{-1}$ de matéria seca desengordurada antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* dos frutos de juçara em diferentes estádios de maturação 77
- Figura 4.** Coeficientes de correlação entre a capacidade antioxidante determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP e as concentrações bioacessíveis dos compostos fenólicos individuais dos frutos de juçara 79
- Figura 5.** Análise das componentes principais para os compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante dos frutos de juçara de diferentes estádios de maturação 81

CAPÍTULO 3

Figura 1. Processo de extração e fracionamento dos compostos fenólicos dos frutos de juçara.....	93
Figura 2. Desenho experimental para avaliação da toxicidade do extrato bruto e das frações de frutos de juçara.....	95
Figura 3. Desenho experimental para avaliação da toxicidade do glutamato	95
Figura 4. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato bruto e das frações de frutos de juçara frente à toxicidade glutamatérica (pré-tratamento).....	96
Figura 5. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato bruto e das frações de frutos de juçara frente à toxicidade glutamatérica (co-tratamento).....	96
Figura 6. Capacidade antioxidante (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g ⁻¹ em matéria seca) determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP do extrato bruto e frações obtidos de frutos de juçara de Florianópolis, SC	107
Figura 7. Capacidade antioxidante (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g ⁻¹ em matéria seca) determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP do extrato bruto e frações obtidos de frutos de juçara de Pomerode, SC	108
Figura 8. Efeito do extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	111
Figura 9. Efeito da fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	112
Figura 10. Efeito da fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	113
Figura 11. Efeito da fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	114
Figura 12. Efeito da fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	115
Figura 13. Efeito de diferentes concentrações de glutamato sobre a viabilidade de células HT22.....	116

Figura 14. Efeito do pré-tratamento com extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	117
Figura 15. Efeito do pré-tratamento com a fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	118
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com a fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	119
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com a fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	120
Figura 18. Efeito do pré-tratamento com a fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	121
Figura 19. Efeito do co-tratamento com extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22	122
Figura 20. Efeito do co-tratamento com a fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	123
Figura 21. Efeito do co-tratamento com a fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	124
Figura 22. Efeito do co-tratamento com a fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	125
Figura 23. Efeito do co-tratamento com a fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.....	126

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Lista comparativa da composição nutricional de *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria* 35
- Tabela 2.** Estrutura química básica dos flavonoides e exemplos..... 43
- Tabela 3.** Estrutura química básica dos ácidos fenólicos e exemplos .. 44
- Tabela 4.** Compostos fenólicos identificados em frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) 47

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Concentração (mg 100 g⁻¹ em matéria seca desengordurada) e bioacessibilidade (B%) de compostos fenólicos na porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara em diferentes estádios de maturação..... 70
- Tabela 2.** Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos compostos fenólicos identificados nas amostras de frutos de juçara..... 72
- Tabela 3.** Pesos das variáveis para cada componente principal (PC) dos compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação 82

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Florianópolis, SC 100
- Tabela 2.** Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Pomerode, SC 102
- Tabela 3.** Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção e limites de detecção e quantificação dos compostos fenólicos quantificados no extrato bruto e frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica obtidos dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT	Antocianinas monoméricas totais
ANOVA	Análise de variância
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FAE	Fração acetato de etila
FB	Fração butanólica
FD	Fração diclorometânica
FH	Fração hexânica
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i>
GPx	Glutathiona peroxidase
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MTT	Brometo 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil-tetrazolium
PC	<i>Principal component</i>
PCA	<i>Principal components analysis</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TPTZ	2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS	23
Objetivo geral	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1. Palmeiras do gênero <i>Euterpe</i>	27
2. Exploração dos frutos da palmeira juçara.....	29
3. Composição dos frutos de juçara.....	32
3.1. Características físico-químicas.....	32
3.2. Nutrientes	33
4. Compostos fenólicos.....	39
4.1. Compostos fenólicos em frutos de juçara.....	45
5. Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes	49
5.1. Estresse oxidativo e neurodegeneração.....	51
6. Bioacessibilidade	53
CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i> SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE JUÇARA (<i>Euterpe edulis</i> Martius) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.....	57
Resumo	59
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1. Reagentes e soluções.....	62
2.2. Amostragem	63
2.3. Preparo da amostra.....	63
2.4. Preparo dos extratos	64
2.5. Determinação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS	64
2.6. Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	65
2.7. Bioacessibilidade.....	66
2.8. Análise estatística.....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1. Compostos fenólicos	68
3.2. Capacidade antioxidante	75
3.3. Análise de Componentes Principais.....	80
4. CONCLUSÃO.....	82

CAPÍTULO 3 - EFEITO NEUROPROTETOR DE EXTRATOS DE FRUTOS DE JUÇARA (<i>Euterpe edulis</i> Martius) FRENTE À OXITOSE INDUZIDA POR GLUTAMATO EM CÉLULAS NEURONAI HT22	85
.....	85
Resumo.....	87
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1. Reagentes e soluções.....	91
2.2. Amostras	91
2.3. Procedimentos de extração e fracionamento.....	92
2.4. Determinação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS	93
2.5. Determinação das antocianinas monoméricas totais.....	93
2.6. Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	94
2.7. Avaliação do efeito neuroprotetor.....	94
2.8. Análise estatística.....	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1. Compostos fenólicos do extrato bruto e das frações obtidas de frutos de juçara.....	97
3.2. Capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações obtidas de frutos de juçara.....	106
3.3. Toxicidade dos extratos de frutos de juçara em células HT22	110
3.4. Efeito neuroprotetor dos extratos de frutos de juçara em células HT22	116
4. CONCLUSÃO.....	129
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
APÊNDICE A - Parâmetros do espectrômetro de massas obtidos para os compostos fenólicos testados em frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> Martius).....	157
APÊNDICE B - Estrutura dos compostos fenólicos quantificados no extrato bruto e frações de frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> Martius).....	159
ANEXO A - Publicações geradas a partir desta tese.....	161

INTRODUÇÃO

Devido à sua riqueza em nutrientes, o consumo regular de frutas é amplamente recomendado em diretrizes alimentares em todo o mundo (RODRIGUES *et al.*, 2006; USA, 2010; BRASIL, 2014). Além disso, estudos mostram que esse consumo pode prevenir várias doenças e distúrbios devido, principalmente, à presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (SLAVIN; LLOYD, 2012; NILE; PARK, 2014; WHO, 2018).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, visto que apresenta características adequadas para o cultivo. No entanto, apesar desta abundância de frutas tropicais, há ainda um grande número de espécies frutíferas nativas e exóticas subexploradas (SCHRECKINGER *et al.*, 2010; CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A espécie *Euterpe edulis* Martius, popularmente conhecida como palmeira juçara ou palmito, é nativa do bioma Mata Atlântica e encontrada principalmente nos estados das regiões sul e sudeste do Brasil (LORENZI *et al.*, 2010). No entanto, a conservação desta espécie foi seriamente prejudicada pelo desmatamento e pela intensa extração de palmito. Desta forma, com o objetivo de diminuir o processo predatório, organizações sem fins lucrativos e agências governamentais têm encorajado outras opções para a exploração sustentável da espécie, principalmente o uso de seus frutos na alimentação humana (SANTOS; CORREA JÚNIOR; NEVES, 2008; DA SILVA *et al.*, 2014; TREVISAN *et al.*, 2015).

A experiência consolidada com o açaí das espécies *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria* cultivados na região norte e nordeste do país tem servido como um guia para o uso dos frutos da palmeira juçara (*E. edulis*) para o consumo humano (TIBERIO *et al.*, 2012). Apesar da grande similaridade sensorial entre os frutos de juçara e os frutos das palmeiras *E. oleracea* e *E. precatoria*, nutrientes e compostos bioativos, na maioria das vezes, são superiores nos frutos de juçara (SCHULZ *et al.*, 2016).

Muitas publicações demonstram que os frutos de juçara contêm excelentes características nutricionais e bioativas, visto que sua composição inclui concentrações importantes de ácidos graxos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas, além de antocianinas, outros flavonoides e ácidos fenólicos, os quais são relacionados ao potencial antioxidante

desses frutos descrito em estudos *in vitro* (RUFINO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015; BARROSO *et al.*, 2018) em células Vero (BORGES *et al.*, 2013), em modelos animais (CARDOSO *et al.*, 2015b; OYAMA *et al.*, 2016) e em humanos (CARDOSO *et al.*, 2015a).

A ingestão de alimentos que contêm compostos com efeitos benéficos é imprescindível à saúde. Entretanto, sabe-se que o conteúdo de componentes com relevância nutricional presente nos alimentos pode não estar totalmente disponível para a absorção pelo organismo. Desta forma, para determinar se um alimento é uma possível fonte de determinado nutriente ou composto, é necessário investigar a concentração do mesmo que é liberada da matriz alimentar para a absorção, ou seja, a sua bioacessibilidade (FERNANDEZ-GARCIA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; SWIECA, 2016).

O uso de técnicas *in vitro*, como a simulação da digestão gastrointestinal para determinação da bioacessibilidade e o uso de cultura de células para avaliação de possíveis efeitos biológicos, são de grande importância para se conhecer o efeito da composição dos alimentos sobre a saúde humana (KARLSEN *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-TOMAZ *et al.*, 2012). A abordagem *in vitro* é uma alternativa aos estudos *in vivo*, os quais apresentam restrições analíticas e éticas, são mais demorados e requerem grandes recursos para um controle experimental adequado (CARDOSO *et al.*, 2014).

Estudos relacionados à caracterização química, identificação e quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante *in vitro* em frutos de juçara já foram realizados pelo Grupo de Pesquisa em Antioxidantes Naturais/Laboratório de Química de Alimentos da UFSC e por outros pesquisadores, entretanto, estudos sobre a bioacessibilidade de compostos bioativos, além de estudos de atividade biológica, como a neuroproteção, ainda não estão descritos na literatura.

Nesse contexto, esta tese está estruturada nos seguintes capítulos: Capítulo 1: que apresenta uma revisão bibliográfica sobre os principais tópicos abordados neste trabalho; Capítulo 2: que trata da bioacessibilidade de compostos fenólicos e do potencial antioxidante dos frutos de juçara em diferentes estádios de maturação a partir da utilização de metodologia de simulação da digestão gastrointestinal; e Capítulo 3: que apresenta o efeito neuroprotetor de extratos obtidos dos frutos de juçara frente à oxitose induzida por glutamato em células neuronais HT22.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a bioacessibilidade de compostos fenólicos a partir da simulação da digestão gastrointestinal e os efeitos protetores dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em células neuronais HT22 frente ao estresse oxidativo induzido pelo glutamato.

Objetivos específicos

- Avaliar a bioacessibilidade de compostos fenólicos individuais da porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara durante o ciclo de maturação a partir de simulação da digestão gastrointestinal.
- Determinar a capacidade antioxidante da porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara durante o ciclo de maturação antes e depois da simulação da digestão gastrointestinal pelos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro (FRAP).
- Realizar o fracionamento dos compostos fenólicos da porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara utilizando solventes com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol).
- Determinar os compostos fenólicos do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica por cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS).
- Determinar a concentração de antocianinas monoméricas totais do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica pelo método de diferença de pH.

- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica pelos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro (FRAP).
- Avaliar o efeito protetor do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica em linhagem de células neuronais hipocâmpais HT22 frente à toxicidade glutamatérica a partir de ensaio de viabilidade celular.

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Parte das informações deste capítulo foram publicadas em:

SCHULZ, M. *et al.* Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>.

SCHULZ, M.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. *Euterpe* fruits: High potential for food, nutrition, and health. In: Pieri, F. A.; Todorov, S. (Org.). **Tropical Fruits: From cultivation to consumption and health benefits, fruits from the Amazon**. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 2017.

1. Palmeiras do gênero *Euterpe*

As palmeiras, plantas da família Arecaceae (Palmae), são representadas por mais de 2.600 espécies e 180 gêneros (BALSLEV; BERNAL; FAY, 2016). O gênero *Euterpe* é constituído por 28 espécies distribuídas na América Central, Caribe e América do Sul, principalmente nas regiões de florestas tropicais. No Brasil, cinco espécies são encontradas: *Euterpe edulis* Martius, *Euterpe oleracea* Martius, *Euterpe precatória* Martius, *Euterpe catinga* Wallace e *Euterpe longibracteata* Barbosa Rodrigues (LORENZI, 2010; SCHIRMANN *et al.*, 2013). Destas, as três primeiras são as mais frequentes e mais importantes do ponto de vista agroindustrial (CLEMENT; LLERAS PÉREZ; VAN LEEUWEN, 2005; TREVISAN *et al.*, 2015; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as três principais espécies do gênero *Euterpe* e os locais de crescimento das mesmas.

Figura 1. Palmeiras *Euterpe edulis* Martius (A), *Euterpe oleracea* Martius (B) e *Euterpe precatória* Martius (C).



Fonte: Lorenzi (2010).

Figura 2. Locais de ocorrência das palmeiras *Euterpe edulis* Martius, *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius.



Fonte: Adaptado de Lorenzi (2010) e Yamaguchi *et al.* (2015).

Euterpe edulis Martius, popularmente conhecida como palmeira juçara, ocorre no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, é encontrada desde locais em nível do mar até 1000 m de altitude na Mata Atlântica do sul da Bahia e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e nas matas ciliares da bacia do rio Paraná nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (SANTOS; CORREA JUNIOR; NEVES, 2008; LORENZI, 2010; CAXAMBÚ *et al.*, 2015). É uma planta monocaule que

atinge de 5 a 15 metros de altura e de 10 a 15 cm de diâmetro (LORENZI, 2010; BOURSCHEID *et al.*, 2011).

A espécie *Euterpe precatoria* Martius, popularmente conhecida como açai-do-Amazonas, ocorre geralmente junto aos rios em locais periodicamente inundados nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, sendo que também é encontrada em outros países como Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guiana, Equador, Peru e Bolívia (ROGEZ, 2000; LORENZI, 2010; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). Assim como *E. edulis*, a palmeira *E. precatoria* é monocaule, no entanto atinge altura de 3 a 20 metros e diâmetro de 4 a 23 cm (LORENZI, 2010).

A palmeira *Euterpe oleracea* Martius, popularmente chamada de açai-do-Pará, ocorre em planícies e áreas sujeitas a inundações nos estados do Amapá, Maranhão, Tocantins e Pará, além de Venezuela e Guiana, principalmente no estuário do rio Amazonas (LORENZI, 2010; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). Esta palmeira é multicaule, sendo que cada estipe pode atingir de 15 a 20 metros de altura e de 12 a 18 cm de diâmetro (NOGUEIRA, 2006).

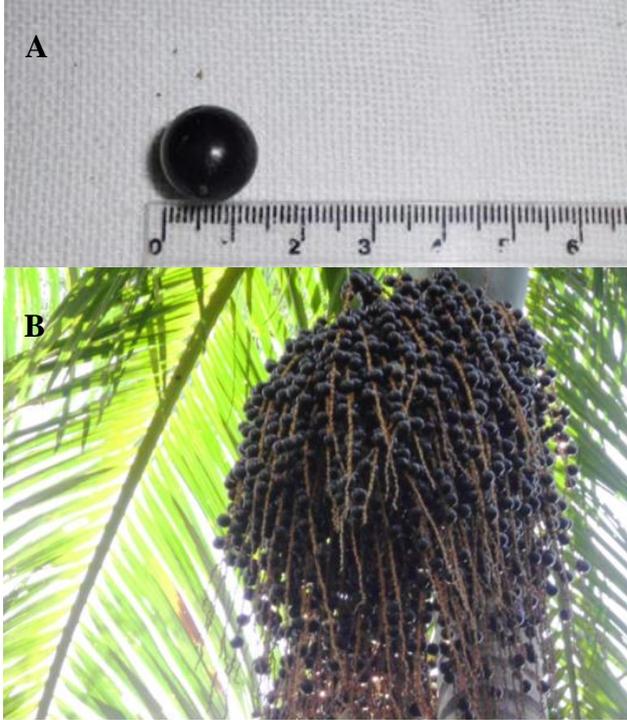
2. Exploração dos frutos da palmeira juçara

Tradicionalmente, a palmeira juçara era utilizada apenas para a produção de palmito, que nesta espécie apresenta excelente sabor e qualidade, sendo muito apreciado pela culinária nacional e internacional (AGUIAR *et al.*, 2002; CURSI; CICERO, 2014). No entanto, a exploração extrativista contínua e desordenada levou a palmeira juçara à lista oficial das espécies brasileiras ameaçadas de extinção, já que o corte para retirada do palmito culmina na morte da planta (BRASIL, 2008; CURSI; CICERO, 2014). Dessa forma, com o objetivo de diminuir o processo predatório, organizações sem fins lucrativos e agências governamentais têm encorajado outras opções para a exploração sustentável de *E. edulis*, sendo que maior atenção tem sido dada ao potencial de exploração de seus frutos de forma similar a dos frutos *E. oleracea* e *E. precatoria* usados para a alimentação humana (CURSI; CICERO, 2014).

Assim como os frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria*, a espécie *E. edulis* forma cachos de frutos sésseis, arredondados, drupáceos, de cor violáceo-púrpura a negra quando maduros, os quais, em média, pesam 1 grama e possuem de 1 a 1,5 cm de diâmetro (Figura 3). Os frutos apresentam um endocarpo lenhoso soldado a parte interna do mesocarpo que é fibrosa e uma fina camada de polpa, que corresponde a cerca de

15% da massa do fruto, e é constituída pelo epicarpo e pela parte externa do mesocarpo (SCHIRMANN *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014). A frutificação ocorre principalmente nos meses de março a junho e cada cacho produz de 3 a 5 kg de frutos (LORENZI, 2010; BOURSCHEID *et al.*, 2011).

Figura 3. Fruto de juçara (A) e cacho (B) de frutos de juçara.



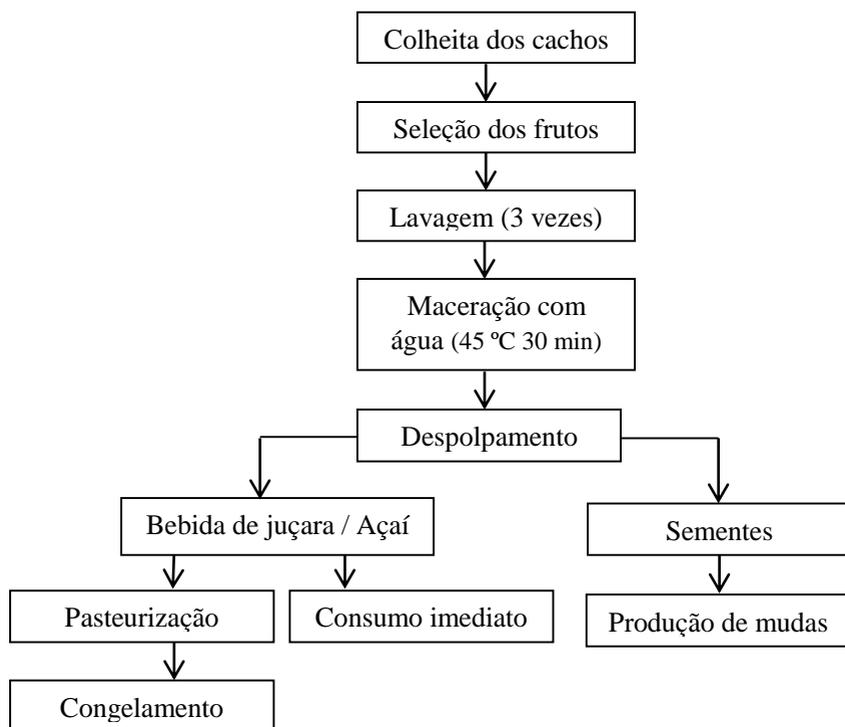
Fonte: Schulz *et al.* (2016).

A exploração comercial dos frutos de juçara é semelhante aos frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria*. Por possuírem uma pequena porção comestível, os frutos não são comercializados para consumo *in natura*. Estes são então processados para produção de uma bebida cremosa de cor púrpura intensa e sabor característico, comumente chamada de bebida de juçara ou açai, a qual é constituída por água (80 a 90 %) e epicarpo e mesocarpo dos frutos (ROGEZ, 2000; BORGES *et al.*, 2011; SCHIRMANN *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014). As etapas de

processamento dos frutos para produção de bebida estão mostradas na Figura 4.

Após colheita dos cachos, os frutos são debulhados e selecionados para retirada dos frutos verdes, vermelhos, secos e machucados. Em seguida, os frutos são lavados três vezes em água potável corrente e, embebidos em água morna (45 °C) durante 30 minutos, ou até soltarem a casca facilmente. Após o descarte da água de maceração, é realizado o despulpamento em despulpadeira elétrica, na qual a bebida é obtida a partir do atrito dos frutos e da adição progressiva de água, o que resulta em um líquido cremoso. Para garantir as qualidades sanitárias e sensoriais do produto, a bebida pode ser consumida imediatamente ou submetida à pasteurização e congelamento até a comercialização. O rendimento é de cerca de 1 litro de produto para cada 2 kg de frutos (SCHIRMANN *et al.*, 2013).

Figura 4. Processamento dos frutos de juçara.



Fonte: Adaptado de Schulz *et al.* (2016).

Até os anos 2003/2004, o mercado de açaí no sul e sudeste do Brasil era alimentado exclusivamente pelo açaí da Amazônia. No entanto, em 2004, a primeira agroindústria para processamento de frutos de juçara foi implementada no sul do Brasil, no município de Garuva, Santa Catarina, com aumento da produção local. No entanto, esse não é o único município que produz bebida de juçara, outros municípios de Santa Catarina como Ibirama, Rio do Sul, Ilhota e Águas Mornas também se destacam (BOURSCHEID *et al.*, 2011). Os dados mais recentes sobre a produção de frutos de juçara mostram que em 2012 foram produzidas 193 toneladas de frutos, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor, o qual foi responsável por 84% da produção nacional (CONAB, 2013).

A regulamentação legislativa para a juçara foi publicada no ano de 2018 pela Instrução Normativa (IN) n° 37 (BRASIL, 2018). Essa IN define os Padrões de Identidade e Qualidade e classifica a bebida de juçara (*E. edulis*) como fina, média e grossa, de acordo com os respectivos teores de sólidos totais: de 8 a 11 %, >11 a 14 % e >14 %. Além disso, valores mínimos de proteínas, lipídios e carboidratos também estão estabelecidos (5, 20 e 51 % em matéria seca, respectivamente).

3. Composição dos frutos de juçara

3.1. Características físico-químicas

Os teores de umidade descritos para os frutos de juçara são de 34,9 a 60,6 %, os quais variam de acordo com a região de crescimento e estágio de maturação (BORGES *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2015). Devido à adição de água durante o processamento dos frutos, os teores de umidade são maiores na bebida de juçara, variam de 88,4 a 89,4 % (DA SILVA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2016), valores semelhantes ao açaí de *E. oleracea* e *E. precatória* (85 a 86 %) (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008; TONON *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2015).

O pH nos frutos e na bebida de juçara varia de 4,5 a 5,6 (BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2013; INADA *et al.*, 2015), valores superiores a maioria das frutas (< 4,4) (HUI *et al.*, 2010) e semelhantes ao açaí de *E. oleracea* e *E. precatória* (5,2) (NEVES *et al.*, 2015).

Os teores de sólidos solúveis em frutos de juçara variam de 12 a 23 %, enquanto que em frutos do açazeiro (*E. oleracea*) são encontrados valores de 16 a 22 % (CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2016) e 15 % em outras *berries* (NILE; PARK, 2014).

3.2. Nutrientes

Os frutos de palmeiras *Euterpe* se destacam pelo seu alto teor lipídico. Os frutos de juçara apresentam teores de 18 a 47% em matéria seca, os quais são até vinte vezes maiores do que aqueles descritos para outras frutas tropicais (BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015). Durante o ciclo de maturação, Schulz *et al.* (2015) encontraram teores lipídicos de até 59 % em matéria seca, sendo que os valores mais elevados foram observados nos frutos de juçara mais maduros.

Em relação ao perfil de ácidos graxos, Borges *et al.* (2011) identificaram 16 ácidos graxos em frutos de juçara, com predominância de ácidos graxos monoinsaturados (45 a 57 %), principalmente ácido oleico, o que representou 35,9 % do total de lipídios. Os ácidos graxos polinsaturados representam de 19 a 26 % do conteúdo total de lipídios, e os principais constituintes são os ácidos linoleico (18 a 25 %) (BORGES *et al.*, 2011) e linolênico (0,6 a 1,5 %) (BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2013; SCHULZ *et al.*, 2015). Os ácidos graxos saturados representam de 24 a 29 % do conteúdo total de lipídios, principalmente ácido palmítico (20 a 25 %) (BORGES *et al.*, 2011). Comparando o fruto de juçara com os frutos de *E. oleracea* e *E. precatória*, os dois últimos têm maior teor de ácido oleico, no entanto, os frutos de juçara têm maiores concentrações de ácidos linolênico e linoleico (Tabela 1).

Em relação aos teores de proteína, os frutos de juçara apresentam de 5 a 8 % em matéria seca (BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015). Esses valores demonstram que os frutos de juçara representam uma importante fonte vegetal de proteína dietética, visto que possuem até três vezes mais proteína do que frutas mais comuns, tais como maçãs, uvas, pêras, melões e mangas, as quais apresentam valores em torno de 3 % em matéria seca (HUI, 2006).

Os teores de carboidratos em frutos de juçara descritos na literatura variam de 28 a 42 % em matéria seca (DA SILVA *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015), sendo a frutose e a glicose os principais açúcares encontrados. Os frutos de juçara são considerados mais doces do que os

frutos de *E. oleracea*, visto que a concentração de frutose em juçara (1 %) é superior ao açaí (0,4 %) (SCHAUSS *et al.*, 2006; INADA *et al.*, 2015). A fibra dietética corresponde a mais de 64 % do total de carboidratos em frutos de *E. edulis* e seu consumo pode fornecer uma boa ingestão de fibra alimentar, uma vez que possuem 27 % em matéria seca. Uma porção de 100 g pode fornecer cerca de 20 % da ingestão diária recomendada (INADA *et al.*, 2015).

Os frutos de juçara também apresentam concentrações relevantes de micronutrientes. Existem muitos minerais presentes nesses frutos, pelo menos 17 elementos químicos são encontrados. Os principais macrominerais são potássio, cálcio e magnésio, enquanto ferro, manganês e zinco são os microminerais predominantes (DA SILVA *et al.*, 2013; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015; PUPIN *et al.*, 2018). De acordo com os dados publicados, o consumo de 200 mL de bebida de juçara por um homem adulto seria responsável por até 64 % da ingestão diária recomendada para o manganês, 17 % para o ferro, 10 % para o cálcio, 8 % para o potássio, 7 % para o magnésio e 2,5 % para o zinco (IOM, 2006). Como mostra a Tabela 1, os teores de potássio, cálcio e de magnésio em frutos de juçara são superiores ao açaí de *E. oleracea* e *E. precatoria*, no entanto, manganês e zinco estão em maiores concentrações em *E. oleracea*.

O consumo de frutos de juçara é também significativo para a ingestão diária recomendada de vitaminas. Uma porção de 100 g contém 147 mg de ácido ascórbico (RUFINO *et al.*, 2010). Esse valor é superior a ingestão diária recomendada para todas as idades e sexos, a qual varia de 15 a 120 mg/dia (IOM, 2006). Para a vitamina E, uma ingestão de 100 g de bebida de juçara pode contribuir com cerca de 2,5 % da ingestão diária recomendada para adultos, visto que esta porção apresenta 0,66 mg de tocoferóis totais (INADA *et al.*, 2015). Além disso, o teor de carotenoides nos frutos de juçara também é significativo (0,7 a 1,9 mg 100 g⁻¹ em matéria fresca) (DA SILVA *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015; RUFINO *et al.*, 2010) (Tabela 1). Um total de 13 carotenoides foram identificados nos frutos de *E. edulis* por Da Silva *et al.* (2014), incluindo 9-*cis*-beta-caroteno, *all-trans*-β-caroteno, *all-trans*-α-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno, 15-*cis*-β-caroteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína e 9-*cis*-neoxantina.

Tabela 1. Lista comparativa da composição nutricional de *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*.
(continua)

Nutriente	Espécie	Material analisado	Concentração	Referência
Lipídios totais (% em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	25,2 – 34,2	Schirmann <i>et al.</i> (2013)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	18,4 – 44,1	Borges <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	19,9 – 58,9	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	48	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	20,8	Rufino <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	39,6	Yuyama <i>et al.</i> (2011)
Ácido oleico (% da fração lipídica)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	29,3 – 39,3	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	44,1 – 55,6	Borges <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	54,4	Sanabria e Sangronis (2007)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	52,7	Menezes, Torres e Srur (2008)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	68,2	Yuyama <i>et al.</i> (2011)
Ácido linoleico (% da fração lipídica)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	28,9 – 30,9	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	18,2 – 25,3	Borges <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	12,5	Schauss <i>et al.</i> (2006)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	16	Sanabria e Sangronis (2007)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	7,5	Yuyama <i>et al.</i> (2011)
Ácido linolênico (% da fração lipídica)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	0,7 – 1,5	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	0,5 – 0,7	Borges <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	0,9	da Silva <i>et al.</i> (2013)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	0,8	Schauss <i>et al.</i> (2006)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	0,8	Sanabria e Sangronis (2007)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	1,0	Yuyama <i>et al.</i> (2011)
Ácido palmítico (% da fração lipídica)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	34,4	da Silva <i>et al.</i> (2013)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	20,3 – 25	Borges <i>et al.</i> (2011)

Tabela 1. Lista comparativa da composição nutricional de *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*.
(continuação)

Nutriente	Espécie	Material analisado	Concentração	Referência
Ácido palmítico (% da fração lipídica)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	25,9 – 33,4	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	23	Sanabria e Sangronis (2007)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	25,6	Menezes, Torres e Srur (2008)
Proteína (% em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	7,5	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	6,6 - 7	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	9,2	Carvalho <i>et al.</i> (2016)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	5,1 – 8,2	Borges <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	6,3	Rufino <i>et al.</i> (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	12	Gordon <i>et al.</i> (2012)
Fibra dietética (% em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	27	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	20,9	Sangronis e Sanabria (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	20 – 30,9	Sanabria e Sangronis (2007)
Potássio (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	1051 – 1291	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	1090,8	da Silva <i>et al.</i> (2013)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	930	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	697	Sangronis e Sanabria (2011)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	1006	Yuyama <i>et al.</i> (2011)
Cálcio (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	349,4 – 596,7	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	1040,6	da Silva <i>et al.</i> (2013)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	423	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	373	Sangronis e Sanabria (2011)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Bebida	224	Yuyama <i>et al.</i> (2011)

Tabela 1. Lista comparativa da composição nutricional de *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*.
(continuação)

Nutriente	Espécie	Material analisado	Concentração	Referência
Magnésio (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	162,4 – 188,7	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	172	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	124,4	Menezes, Torres e Srur (2008)
Ferro (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	4,3	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	4,6 – 7,3	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	7,8	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	4,4	Schauss <i>et al.</i> (2006)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	4,5	Menezes, Torres e Srur (2008)
Manganês (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	4,8 – 8,5	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	3	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	13,3	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	9	Sangronis e Sanabria (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	10,7	Menezes, Torres e Srur (2008)
Zinco (mg 100g ⁻¹ em matéria seca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	0,9	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	2,4 – 3	Schulz <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	2,1	Gordon <i>et al.</i> (2012)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	6	Sangronis e Sanabria (2011)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	2,8	Menezes, Torres e Srur (2008)
Vitamina C (mg 100g ⁻¹ matéria fresca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	186	Rufino <i>et al.</i> (2010)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	84	Rufino <i>et al.</i> (2010)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	45,6 – 80,8	de Souza <i>et al.</i> (2009)
	<i>Euterpe precatoria</i>	Fruto	68,5	Neves <i>et al.</i> (2015)

Tabela 1. Lista comparativa da composição nutricional de *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*.
(conclusão)

Nutriente	Espécie	Material analisado	Concentração	Referência
Vitamina E (mg 100g ⁻¹ matéria fresca)	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	0,7	Inada <i>et al.</i> (2015)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Fruto	147	da Costa <i>et al.</i> (2010)
Carotenoides totais (mg 100g ⁻¹ matéria fresca)	<i>Euterpe edulis</i>	Fruto	1,9	Rufino <i>et al.</i> (2010)
	<i>Euterpe edulis</i>	Bebida	0,7	da Silva <i>et al.</i> (2014)
	<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	0,5	Ribeiro <i>et al.</i> (2010)

Fruto: porção comestível (epicarpo e mesocarpo); Bebida/Açaí: porção comestível e água.

Fonte: Adaptado de Schulz *et al.* (2016).

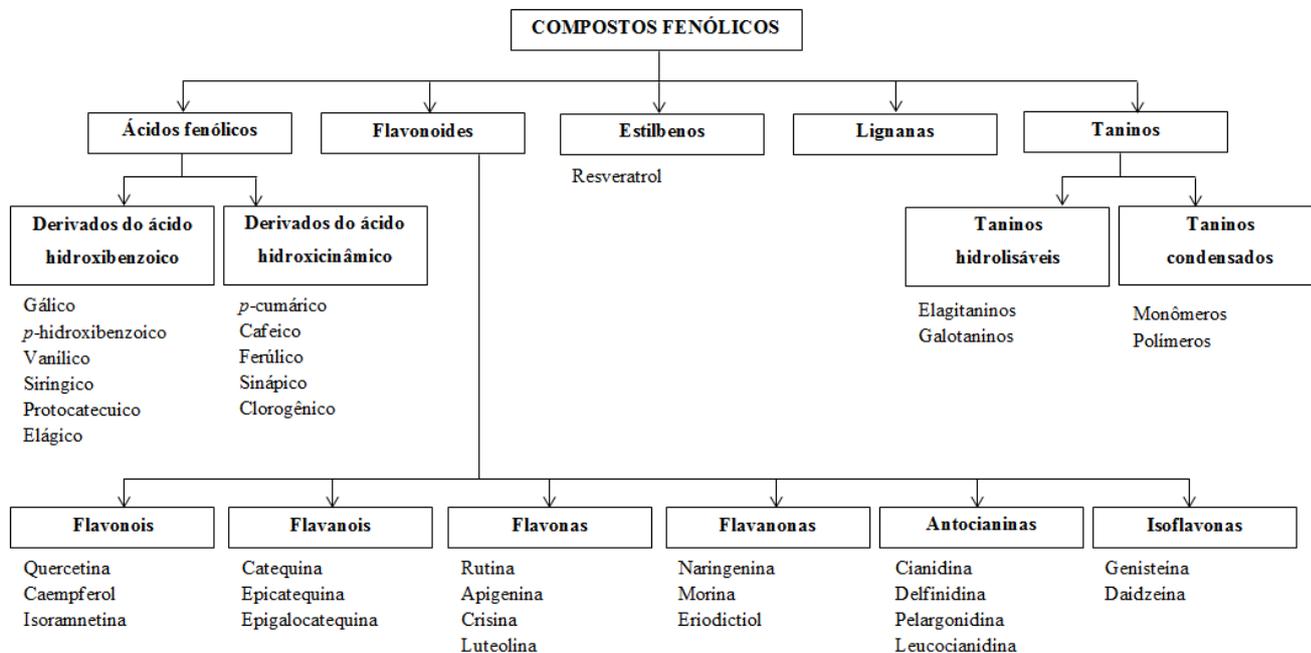
4. Compostos fenólicos

As plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil lipídios) apresentam funções diretas no crescimento e desenvolvimento de todas as plantas. Em contrapartida, os metabólitos secundários possuem distribuição mais restrita no reino vegetal e são mais específicos a uma espécie ou grupo de espécies relacionadas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Suas funções estão relacionadas principalmente com a capacidade de competição e sobrevivência das plantas e incluem: proteção contra herbívoros e patógenos, agem como atrativos (odor, cor e sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes e atuam como agentes de competição planta-planta e planta-microorganismos (SHAHIDI; NACZK, 2004; NACZK; SHAHIDI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais quimicamente distintos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os últimos fazem parte de um grande grupo com mais de 8000 compostos, os quais contêm um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (HUI, 2010; ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010).

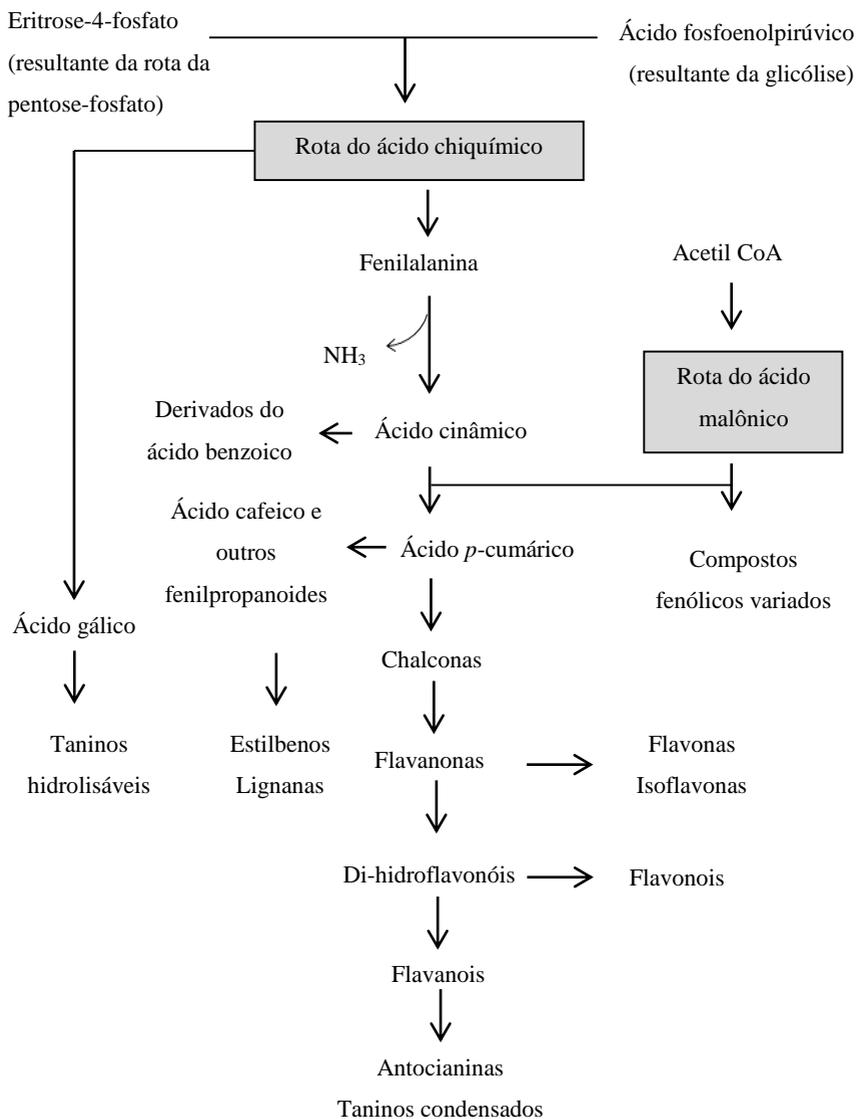
De acordo com sua estrutura química básica, os compostos fenólicos podem ser classificados como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas e taninos (Figura 5) (HAMINIUK *et al.*, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Esses compostos são biossintetizados por duas rotas metabólicas básicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. No entanto, a última apesar de ser uma fonte importante de compostos fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009; HUI, 2010). A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos. Destes, a fenilalanina, a partir da eliminação de uma molécula de amônia e formação do ácido cinâmico, é o principal aminoácido que dá origem às classes mais abundantes de compostos fenólicos (TIWARI; CUMMINS, 2013; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Um esquema da biossíntese de compostos fenólicos está apresentado na Figura 6.

Figura 5. Classificação dos compostos fenólicos e exemplos.



Fonte: Adaptado de Shahidi e Ambigaipalan (2015).

Figura 6. Esquema simplificado da biossíntese de compostos fenólicos.

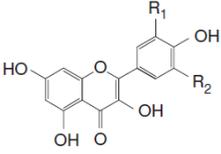
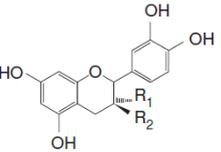
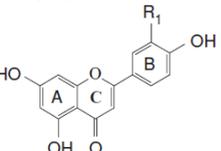
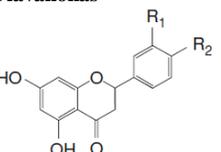
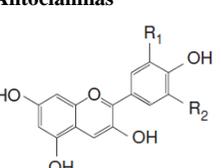
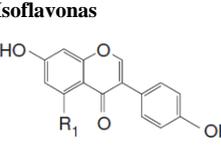


Fonte: Adaptado de Naczk e Shahidi (2004); Taiz e Zeiger (2009); Tiwari e Cummins (2013).

Em frutas, os flavonoides e os ácidos fenólicos são os compostos fenólicos mais abundantes (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; HAMINIUK *et al.*, 2012). Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais com cerca de 5000 compostos, sendo responsáveis por cerca de dois terços dos fenólicos dietéticos (HUI, 2006; HAMINIUK *et al.*, 2012). Sua estrutura básica contém 15 carbonos organizados na configuração C6–C3–C6. No entanto, o esqueleto básico pode ter vários substituintes, os quais influenciam na solubilidade dos flavonoides. Os grupos hidroxila e açúcares aumentam a solubilidade em água desses compostos, enquanto que outros substituintes como éter metílico ou unidades isopentil modificadas tornam os flavonoides hidrofóbicos (SHAHIDI; NACZK, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Como mostrado anteriormente na Figura 5, os flavonoides são classificados em flavanois, flavonois, antocianinas, flavonas, flavanonas e isoflavonas (ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010; WIGHTMAN; HEUBERGER, 2015). Essa classificação tem como base a ligação do anel aromático com o anel heterocíclico, o grau de oxidação da cadeia de três carbonos e os grupos funcionais ligados ao anel heterocíclico (WIGHTMAN; HEUBERGER, 2015). Na Tabela 2 estão apresentadas as estruturas químicas básicas das subclasses dos flavonoides.

Tabela 2. Estrutura química básica dos flavonoides e exemplos.

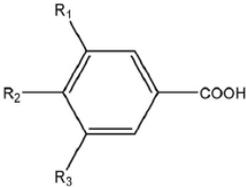
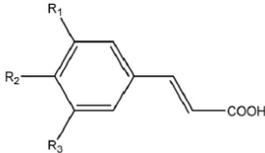
Estrutura básica	Exemplos		
	Composto	R1	R2
	Camferol	H	H
	Quercetina	OH	H
	Miricetina	OH	OH
	Catequina	H	OH
	Epicatequina	OH	H
	Apigenina	H	
	Luteolina	OH	
	Naringenina	H	OH
	Hesperetina	OH	OCH ₃
	Cianidina	OH	H
	Pelargonidina	H	H
	Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
	Daidzeína	H	
	Genisteína	OH	

Fonte: Adaptado de Hui (2006).

O segundo grupo de compostos fenólicos de maior importância são os ácidos fenólicos, o qual corresponde a quase toda a terça parte restante dos fenólicos dietéticos (HAMINIUK *et al.*, 2012). Sua estrutura básica é constituída por um anel benzênico, um grupamento carboxílico funcional e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila (SOARES, 2002; ANGELO; JORGE, 2007).

Devido à característica das estruturas carbônicas, os ácidos fenólicos são agrupados em duas subclasses: ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos, sendo que os últimos são os mais abundantes em alimentos (HAMINIUK *et al.*, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Os ácidos hidroxibenzoicos apresentam sete átomos de carbono ($C_6 - C_1$), enquanto que os ácidos hidroxicinâmicos apresentam nove átomos de carbono ($C_6 - C_3$), ambos com variação nas hidroxilações e metilações do anel aromático (ANGELO; JORGE, 2007). Na Tabela 3 estão apresentadas as estruturas químicas básicas das duas subclasses dos ácidos fenólicos.

Tabela 3. Estrutura química básica dos ácidos fenólicos e exemplos.

Estrutura básica	Exemplos			
	Ácido	R1	R2	R3
	<i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	OH	H
	Protocatecuico	OH	OH	H
	Vanílico	OCH ₃	OH	H
	Siríngico	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Gálico	OH	OH	OH
	<i>p</i> -Cumárico	H	OH	H
	Cafeico	OH	OH	H
	Ferúlico	OCH ₃	OH	H
	Sinápico	OCH ₃	OH	OCH ₃

Fonte: Adaptado de Shahidi e Ambigaipalan (2015).

4.1. Compostos fenólicos em frutos de juçara

Estudos mostram que os frutos de juçara são excelentes fontes de compostos fenólicos, visto que o teor de fenólicos totais é de 5672 a 7500 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) 100 g⁻¹ de matéria seca (RUFINO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2013; INADA *et al.*, 2015). Esses valores são maiores do que os encontrados para frutos das espécies *E. oleracea* (3268 – 3437 mg EAG 100 g⁻¹ de matéria seca) (RUFINO *et al.*, 2010; GORDON *et al.*, 2012) e *E. precatoria* (4067 mg EAG 100 g⁻¹ de matéria seca) (NEVES *et al.*, 2015), além de outras 14 frutas tropicais brasileiras (< 3584 mg EAG 100 g⁻¹ de matéria seca) (RUFINO *et al.*, 2010), framboesa, mirtilo e cereja (3138, 2482 e 2317 mg EAG 100 g⁻¹ de matéria seca, respectivamente) (DE SOUZA *et al.*, 2014).

Em relação aos compostos fenólicos individuais, a Tabela 4 mostra os 39 fenólicos já descritos em estudos realizados com frutos de juçara: 12 ácidos fenólicos, 26 flavonoides e um estilbeno.

Estudos que descrevem compostos fenólicos individuais em frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria* são parcialmente consistentes com os resultados descritos na literatura para os frutos de juçara. Orientina, homoorientina, luteolina, vitexina e isovitexina são os flavonoides descritos somente para os frutos da região norte e nordeste do país, enquanto que rutina, aromadendrina, hispidulina e miricetina são relatados apenas para os frutos de juçara. Em relação aos ácidos fenólicos, nos frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria* se destacam os ácidos vanílico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico e clorogênico, todos descritos também para os frutos de juçara (PACHECO-PALENCIA; HAWKEN; TALCOTT, 2007; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; BORGES *et al.*, 2011; GORDON *et al.*, 2012; BICUDO *et al.*, 2014; BATAGLION *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015).

A coloração violeta escura a negra desses frutos é devido à presença de antocianinas, as quais são os fenólicos de maior concentração. Em frutos de juçara, as concentrações de antocianinas monoméricas totais variam de 409,8 a 634,3 mg de equivalentes de cianidina 3-glicosídeo 100 g⁻¹ de matéria fresca (BORGES *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2015), enquanto que os frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria* apresentam valores de 205,6 e 422,7 mg de equivalentes a cianidina 3-glicosídeo 100 g⁻¹ de matéria fresca, respectivamente (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009), sendo que as antocianinas predominantes nas três espécies são cianidina 3-rutinosídeo

e cianidina 3-glicosídeo (DE BRITO *et al.*, 2007; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; GORDON *et al.*, 2012).

Bicudo *et al.* (2014) e Schulz *et al.* (2015) avaliaram as mudanças nas concentrações de diferentes compostos fenólicos ao longo do ciclo de maturação dos frutos de juçara. Em ambos os estudos, a maior parte dos ácidos fenólicos e flavonoides apresentou maiores concentrações nos estádios iniciais de maturação. As antocianinas, entretanto, apresentaram maiores concentrações nos frutos mais maduros, com redução dos teores no período de senescência.

Considerando a elevada concentração de antocianinas nos frutos de juçara e a instabilidade desses compostos, estudos vêm sendo realizados buscando aproveitar as propriedades funcionais e aumentar a estabilidade desses pigmentos. Bicudo *et al.* (2015), Carvalho *et al.* (2016) e Santana *et al.* (2016) investigaram diferentes condições e agentes carreadores na produção de micropartículas de bebida de juçara por secagem em *spray dryer*, buscando um produto para ser aplicado como corante natural e também para enriquecimento nutricional.

Tabela 4. Compostos fenólicos identificados em frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius).

(continua)

	Referências													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ácido ferúlico		X	X	X		X		X				X		
Ácido gálico		X		X	X	X		X		X		X		
Ácido protocatecuico		X	X	X		X				X		X		X
Ácido <i>p</i> -cumárico		X	X	X		X		X		X	X	X		
Ácido benzoico			X											
Ácido cafeico			X	X								X		
Ácido clorogênico			X	X								X		
Ácido siríngico			X	X		X						X		X
Ácido vanílico			X	X		X						X		
Ácido 4-hidróxibenzoico				X				X						
Ácido sinapínico				X								X		
Ácido elágico												X	X	
Catequina		X										X	X	
Epicatequina		X										X		
Quercetina		X	X							X	X	X	X	
Rutina			X							X	X	X	X	X
Apigenina					X							X	X	
Luteolina					X								X	
Taxifolina					X					X		X		
Kaempferol					X					X		X	X	X
Resveratrol										X		X		
Miricetina										X		X	X	
Aromadendrina										X		X		
Hispidulina										X				

Tabela 4. Compostos fenólicos identificados em frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius).

	(conclusão)													
	Referências													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Isoquercetrina												X		
Orientina														X
Vanilina												X		
Cianidina 3-glicosídeo	X			X	X	X	X	X	X		X		X	
Cianidina 3-rutinosídeo	X			X	X	X	X	X	X		X		X	X
Cianidina 3-ramnosídeo	X				X									
Cianidina 3,5-diglicosídeo				X										
Cianidina 3-sambubiosídeo	X						X		X					
Cianidina 3,5-hexose pentose					X									
Delfinidina 3-glicosídeo							X		X					
Pelargonidina 3-glicosídeo	X				X		X		X		X		X	
Pelargonidina 3-rutinosídeo	X			X	X						X			
Peonidina 3-glicosídeo				X										
Peonidina 3-rutinosídeo				X	X		X		X					
Malvidina 3-glicosídeo											X			X

1 - De Brito *et al.* (2007); 2- Borges *et al.* (2011); 3 - Borges *et al.* (2013); 4 - Bicudo *et al.* (2014); 5 - Da Silva *et al.* (2014); 6 - Cardoso *et al.* (2015a); 7- Cardoso *et al.* (2015b); 8 - Inada *et al.* (2015); 9 - Novello *et al.* (2015); 10 - Schulz *et al.* (2015); 11 - Guergoleto *et al.* (2016); 12 - Schulz *et al.* (2017); 13 – Vieira *et al.* (2017); 14 – Barroso *et al.* (2018).

Fonte: Próprio autor (2019).

5. Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico. O número ímpar de elétrons de um radical livre o faz instável, de curta duração e altamente reativo (LOBO *et al.*, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

As principais ERO são superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}). No entanto, ERO é um termo que inclui também algumas espécies não radicais que derivam do O_2 capazes de gerar radicais livres, como o oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO). As ERN incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) como espécies radicalares e óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) como as principais espécies não-radicalares (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

As ERO e ERN podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas incluem as reações enzimáticas envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas e no sistema do citocromo P-450. Também são fontes os processos não enzimáticos como reações catalíticas de íons metálicos, processos fisiológicos que envolvem oxigênio e sistemas de transporte de elétrons. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem estresse como traumas, infecções, radiações, exercícios intensos, tabagismo, pesticidas, poluição, certos medicamentos e estresse emocional (LOBO *et al.*, 2010; SIES; BERNDT; JONES, 2017; UMENO; BIJU; YOSHIDA, 2017).

As ERO e ERN, quando em baixas/moderadas concentrações, estão envolvidas em funções fisiológicas, como por exemplo, são importantes sinalizadores celulares, estão envolvidos na regulação redox no interior das células do sistema imune, bem como na indução de resposta mitogênica (VALKO *et al.*, 2007). No entanto, em situações onde ocorre um desequilíbrio entre a produção de ERO e ERN e a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, se tem o que é denominado de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014; HAYASHI; CORTOPASSI, 2015). Essa condição pode ocorrer por diferentes fatores:

(a) aumento da produção de ERO/ERN; (b) esgotamento das reservas de antioxidantes; (c) inativação das enzimas antioxidantes; (d) diminuição na produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes endógenos; e, finalmente, (e) combinações de dois ou mais dos fatores (LUSHCHAK, 2014).

Como consequência do estresse oxidativo, biomoléculas (DNA, RNA, lipídios, proteínas) são oxidadas e, quando não reparadas, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte por apoptose ou necrose, o que está associado ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas e suas complicações (SCHAUSS, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2017; UMENO; BIJU; YOSHIDA, 2017).

A fim de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalares, o sistema antioxidante presente no organismo atua a partir de diferentes mecanismos: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicalares (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstrução das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (LOBO *et al.*, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT) e o sistema glutatona (glutatona redutase, glutatona peroxidases e glutatona S-transferases), as quais atuam impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares, ou seja, são capazes de bloquear a iniciação da oxidação (LOBO *et al.*, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). No sistema de defesa não enzimático as moléculas interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação, além disso, alguns antioxidantes atuam sequestrando metais de transição, reduzindo assim a ocorrência de reações como a de Fenton (JENSEN, 2003). Nesta classificação, incluem-se, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam o ácido ascórbico, a vitamina E, os carotenoides e os compostos fenólicos (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

A atuação das enzimas antioxidantes visa a manutenção de baixas concentrações de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, desta maneira, evitando a formação do radical hidroxil, altamente reativo e deletério às células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). No entanto, apesar de as defesas antioxidantes endógenas serem efetivas, ocorre constantemente a formação de ERO e ERN. Sendo assim, as ações dos

antioxidantes obtidos a partir da dieta somam-se às dos antioxidantes endógenos formando uma defesa apropriada contra as reações de oxidação e, portanto, realizando um importante papel na manutenção da saúde (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; LOBO *et al.*, 2010). Estudos com humanos têm mostrado que a oxidação de biomoléculas pode ser reduzida pelo consumo de concentrações apropriadas de compostos antioxidantes (PRASAD *et al.*, 2007; ROBERTS *et al.*, 2007; JACOB *et al.*, 2008; MARIANI *et al.*, 2008; DI GIACOMO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-TOMÁS *et al.*, 2012; RANGEL-HUERTA *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Cardoso *et al.* (2015a) com humanos saudáveis avaliou o efeito do consumo agudo de suco de juçara (*E. edulis*) sobre marcadores antioxidantes endógenos e peroxidação lipídica. Os resultados mostraram um efeito positivo com aumento do potencial antioxidante redutor de ferro e da enzima glutatona peroxidase (GPx), além da redução da peroxidação lipídica.

Em modelos animais, Cardoso *et al.* (2015b), Novello *et al.* (2015) e Oyama *et al.* (2016) demonstraram aumento do potencial antioxidante em camundongos que receberam dietas contendo extratos de frutos de juçara. Os autores sugerem que a atividade de enzimas como a CAT e SOD foi suprimida pela presença de antioxidantes naturais desses frutos.

Estudo de Schulz *et al.* (2015) que avaliou compostos fenólicos individuais demonstrou que quercetina, rutina e antocianinas foram os compostos que apresentaram correlação positiva significativa com a capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de juçara. As antocianinas também foram os principais compostos associados com o efeito citoprotetor do extrato de frutos de juçara contra o dano oxidativo em cultura de células Vero (BORGES *et al.*, 2013).

5.1. Estresse oxidativo e neurodegeneração

Os neurônios consistem de um corpo celular, dendritos, um axônio alongado e terminais nervosos que formam parte de uma sinapse, que é a comunicação entre neurônios mediada por neurotransmissores (MARTIN, 2013), sendo que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro de mamíferos (WALTON; DODD, 2007; KOEPPEN; STANTON, 2009).

Em processo fisiológico normal da transmissão sináptica, quando o neurônio é estimulado, os terminais glutamatérgicos pré-sinápticos são despolarizados e o glutamato vesicular é liberado por exocitose na fenda sináptica de forma dependente de Ca^{2+} , e então se liga aos receptores pós-

sinápticos estimulando o influxo de cátions, o que resulta na propagação do estímulo. A despolarização é terminada rapidamente pela remoção do neurotransmissor (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006; WALTON; DODD, 2007).

Concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica podem desencadear uma superestimulação dos receptores glutamatérgicos, o que pode levar a um processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica, a qual pode ocorrer em condições que incluem a insuficiência na captação de glutamato e a despolarização prolongada da terminação nervosa (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006). Essas concentrações excitotóxicas de glutamato podem resultar no aumento da concentração de cálcio (Ca^{+2}) intracelular a níveis que superativam lipases, proteases, endonucleases e outras enzimas catabólicas (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003). Os níveis elevados de Ca^{+2} também conduzem à produção de ERO, que podem ser formados a partir da ativação da óxido nítrico sintase (NOS) neuronal, levando à produção elevada de óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), com consequente oxidação de membranas e morte celular (KIM *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que as ERO, a partir da oxidação de grupos tióis na estrutura dos transportadores de glutamato, podem inibir a sua captação, o que leva ao maior acúmulo desse neurotransmissor na fenda sináptica (TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998; MIRALLES *et al.*, 2001; ASSOUS *et al.*, 2014).

Outra via de citotoxicidade causada por estresse oxidativo induzido pelo glutamato envolve a inibição do sistema “antiporter” glutamato-cistina, a qual promove o efluxo e/ou bloqueio da captação de cistina. Isto resulta em depleção de glutatona e acúmulo de ROS intracelular, e consequente morte celular (TAN; WOOD; MAHER, 1998).

O estresse oxidativo é proposto como um dos principais fatores associados à etiologia de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e a esclerose lateral amiotrófica, as quais são neuropatias que se caracterizam, na maioria dos casos, por uma diminuição no número de células de populações específicas de neurônios e podem causar perda de funções cognitivas e físicas (CHO *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2014).

O termo neuroproteção relaciona-se com mecanismos que protegem os neurônios da apoptose ou da degeneração devido à lesão cerebral aguda ou como consequência de doenças neurodegenerativas crônicas (KIM *et al.*, 2010). Muitos agentes neuroprotetores de

modulação de respostas celulares contra estímulos nocivos, como o estresse oxidativo, já foram estudados (KIM *et al.*, 2010; HWANG; SHIH; YEN, 2012; KIM *et al.*, 2013; SUBASH *et al.*, 2014).

Recentemente, tem sido demonstrado que os compostos fenólicos atuam como potenciais agentes neuroprotetores tanto em linhagens de células quanto em culturas primárias de neurônios (VYAS *et al.*, 2013; WONG *et al.*, 2013; SUBASH *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2014; AKBAR *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado efeitos de neuroproteção dos compostos fenólicos presentes em frutas cítricas (HWANG; SHIH; YEN, 2012) e outras como como mirtilo, amora e morango (FORTALEZAS *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2012; VYAS *et al.*, 2013; SUBASH *et al.*, 2014). Wong *et al.* (2013), Machado *et al.* (2016) e Torma *et al.* (2017) observaram que extratos de açaí da palmeira *Euterpe oleracea* apresentaram efeito protetor em células neuronais.

Os efeitos de neuroproteção dos compostos fenólicos, especialmente flavonoides, têm sido atribuídos à sua capacidade de inativação de radicais livres por si só, como também pela ação em vários processos biológicos, tais como quelante de ferro, ativação de genes de sobrevivência, vias de sinalização celular e regulação da função mitocondrial (DORÉ, 2005; HWANG; SHIH; YEN, 2012). Algumas características estruturais são apontadas como sendo determinantes para a atividade neuroprotetora de alguns flavonoides, como a presença do grupamento hidroxila na posição 3 do anel C, um anel C insaturado e hidrofobicidade (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001).

6. Bioacessibilidade

O termo bioacessibilidade passou a ser utilizado por pesquisadores da área de alimentos no ano 2000 e é definido como a concentração de um determinado nutriente ou composto em estudo que é libertada da matriz do alimento durante o processo digestivo e torna-se disponível para ser absorvida pelo organismo (KULKARNI *et al.*, 2007; COZZOLINO, 2009; CARDOSO *et al.*, 2014; MARZE, 2015).

Quando se trata da fração do composto que é libertada da matriz do alimento, absorvida e com potencial para suprir demandas fisiológicas, o termo utilizado é biodisponibilidade (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; CARDOSO *et al.*, 2014). Muitas vezes, utiliza-se o termo biodisponibilidade quando se trata de bioacessibilidade, sendo importante

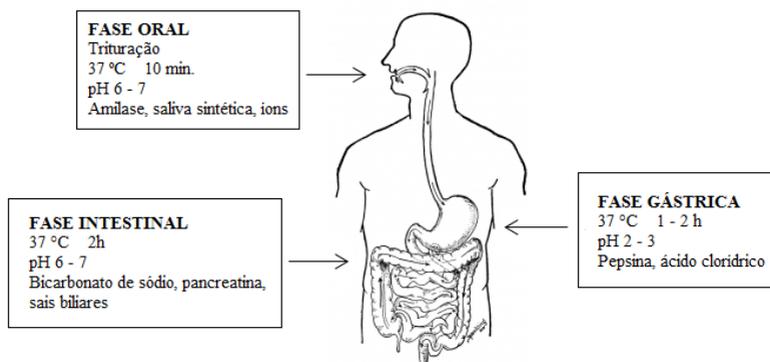
evidenciar que são dois termos distintos, embora relacionados, visto que para o nutriente ou composto se tornar biodisponível necessita, primeiramente, estar bioacessível (FERNÁNDEZ-GARCIA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Existem duas maneiras de se avaliar a bioacessibilidade de um determinado composto ou nutriente: testes *in vivo* e testes *in vitro*. Ambos os métodos possuem vantagens e desvantagens, e usar um ou outro depende principalmente dos propósitos da análise e da disponibilidade de materiais para efetuarlo. A abordagem *in vivo* exige um maior tempo e recursos específicos para um controle experimental adequado, além de possuir algumas limitações analíticas e éticas (CARDOSO *et al.*, 2014). Esses testes incluem basicamente estudos de balanço de massas e de concentração tecidual. Os primeiros determinam a quantidade de nutriente absorvida, a partir da diferença entre quantidades ingeridas e excretadas, e nos últimos monitora-se o aumento da concentração do composto de interesse no plasma sanguíneo. Ambas as abordagens são realizadas com animais experimentais ou humanos (FERNÁNDEZ-GARCIA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; CARDOSO *et al.*, 2014).

Por outro lado, os métodos *in vitro* apresentam-se como alternativa aos estudos *in vivo*, visto que são mais simples, rápidos, de menor custo e sem restrições éticas. A escolha de condições controladas e de fácil amostragem torna os modelos *in vitro* muito adequados para estudos mecanicistas e construções de hipóteses (MINEKUS *et al.*, 2014). Esta abordagem *in vitro* consiste em submeter amostras alimentares a condições que simulam a sequência de processos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal humano (HUR *et al.*, 2011; ALMINGER *et al.*, 2014). Desta forma, a composição química dos fluidos digestivos, o pH, a temperatura e o tempo de residência típico de cada compartimento devem ser semelhantes às do sistema digestivo.

A maioria dos estudos emprega enzimas digestivas, sais biliares, temperatura de 37 °C, tempo de duas horas, pH 2-3 na etapa gástrica e pH 6-7 na etapa intestinal. No entanto, em alguns casos executa-se ainda a fase oral antes dos procedimentos que compreendem a etapa gástrica e intestinal (HUR *et al.*, 2011; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; ALMINGER *et al.*, 2014; MINEKUS *et al.*, 2014). A Figura 7 mostra as condições comumente empregadas em cada fase da simulação da digestão gastrointestinal.

Figura 7. Procedimento comumente empregado para avaliação da bioacessibilidade.



Fonte: Adaptado de Etcheverry, Grusak e Fleige (2012) e Alminger *et al.* (2014).

No entanto, devido à complexidade das reações e mecanismos envolvidos nas condições fisiológicas individuais (idade, genótipo, estado nutricional, quantidade de secreção gástrica e intestinal, tipo de microbiota intestinal), a abordagem *in vitro* apresenta limitações, o que impede a simulação integral de todo o sistema gastrointestinal (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Neste contexto, a abordagem *in vitro* é considerada como uma análise prévia das alterações que ocorrem *in vivo* com os nutrientes e compostos, e constitui uma ferramenta útil para a aquisição de informações sobre influências tanto da matriz do alimento quanto do sistema gastrointestinal sobre a potencialidade dos diferentes nutrientes e compostos a serem absorvidos pelo organismo (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; ALMINGER *et al.*, 2014).

Dessa forma, levando em consideração que a bioacessibilidade pode contribuir para prever a eficácia nutricional de produtos alimentares, muitos estudos sobre essa temática tratando de diferentes compostos nas mais diversas matrizes alimentares têm sido publicados. Em frutas, estudos de bioacessibilidade de compostos fenólicos são os mais encontrados, sendo que já foram avaliados uva (TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010), maçã (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011; BOUAYED *et al.*, 2012), amora (LIANG *et al.*, 2012), ameixa (BOBRICH *et al.*, 2014), romã (SENGUL; SUREK; NILUFER-ERDIL, 2014), morango (KOSIŃSKA-CAGNAZZO *et al.*, 2015) e figo (SENEN; ESRA, 2015). A maioria dos estudos citados também apresenta dados da capacidade

antioxidante dessas frutas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal.

Em frutos do gênero *Euterpe*, dados sobre bioacessibilidade são ainda escassos. Um estudo realizado por Fernandes (2015) com bebida de juçara avaliou compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e capacidade antioxidante antes e após a simulação da digestão gastrointestinal. Após a abordagem *in vitro*, houve uma redução nos três parâmetros avaliados, o que sugere que ocorrem modificações na estrutura química de compostos fenólicos durante a transição gastrointestinal, as quais influenciam na capacidade antioxidante.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO* SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE JUÇARA (*Euterpe edulis* *Martius*) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

As informações do presente capítulo foram publicadas em:

SCHULZ, M. *et al.* Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447-454, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.038>

Resumo

Este estudo investigou os efeitos da simulação da digestão gastrointestinal sobre compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante em frutos de juçara durante sete estádios de maturação. Os compostos fenólicos foram determinados por cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS) e a capacidade antioxidante pelos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro (FRAP). Após a simulação da digestão gastrointestinal, a maioria dos compostos estudados, bem como a capacidade antioxidante apresentaram valores inferiores aos obtidos por extração química. Para os compostos fenólicos, foram encontrados valores de até 22,9 mg 100 g⁻¹ (em matéria seca) no extrato bruto, enquanto que após a digestão *in vitro* o valor máximo foi de 14,43 mg 100 g⁻¹ (em matéria seca). A capacidade antioxidante no extrato bruto foi de 43 a 123 mg equivalentes de ácido ascórbico 100 g⁻¹ para o DPPH e de 419 a 1324 μmol Fe II 100 g⁻¹ para o FRAP (em matéria seca), com uma redução de 51 a 78% após a digestão *in vitro*. As frações bioacessíveis de quercetina, e dos ácidos protocatecuico e *p*-cumárico apresentaram correlação positiva e significativa com a capacidade antioxidante. Este estudo demonstrou que os estádios de maturação dos frutos de juçara influenciaram na bioacessibilidade dos compostos fenólicos e na capacidade antioxidante. Para uma maior ingestão de compostos fenólicos bioacessíveis, os resultados obtidos indicam que os frutos de juçara devem ser coletados a partir do estágio de maturação 4 (30 a 69 dias após o aparecimento dos frutos vermelhos no cacho).

Palavras-chave: Digestão *in vitro*. Bioacessibilidade. Compostos bioativos. DPPH. FRAP. Açafá.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Euterpe edulis* Martius, nativa da Mata Atlântica e popularmente conhecida como palmeira juçara, produz frutos comestíveis que apresentam um fino mesocarpo de coloração violeta escura a negra quando maduros, os quais são muito semelhantes aos frutos das palmeiras *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius cultivados nas regiões norte e nordeste do país (DE BRITO *et al.*, 2007; SCHULZ *et al.*, 2016).

A experiência consolidada com o açaí das espécies *E. oleracea* e *E. precatoria* tem servido como um guia para o uso dos frutos da palmeira juçara (*E. edulis*) para consumo humano (TIBERIO *et al.*, 2012). O processamento desses frutos resulta em um líquido que é cremoso com uma cor púrpura escura intensa e sabor característico, que pode ser consumido na forma de bebida e como ingrediente em muitos alimentos (BORGES *et al.*, 2011; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014; SCHULZ *et al.*, 2016).

Estudos que tratam da composição de juçara mostram que esses frutos apresentam como principais nutrientes ácidos graxos insaturados, proteínas, vitaminas C e E, minerais e fibras dietéticas (RUFINO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015). Em relação aos fitoquímicos, os frutos de juçara são considerados uma fonte de polifenóis, com concentrações substanciais de ácidos fenólicos como ferúlico, gálico, protocatecuico e *p*-cumárico; e flavonóides, especialmente quercetina, rutina (BORGES *et al.*, 2013; SCHULZ *et al.*, 2015; GUERGOLETTA *et al.*, 2016) e antocianinas cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo (DA SILVA *et al.*, 2014; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014; NOVELLO *et al.*, 2015).

A composição fenólica dos frutos de juçara tem sido relacionada com efeitos antioxidantes *in vitro* (RUFINO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2013; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015), em cultura de células Vero (BORGES *et al.*, 2013), em modelos animais (CARDOSO *et al.*, 2015b; OYAMA *et al.*, 2016) e em humanos (CARDOSO *et al.*, 2015a).

Devido à sua composição e excepcional capacidade antioxidante, o fruto de juçara tem sido mencionado como um "super alimento" (FELZENSZWALB *et al.*, 2013; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2015; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2016). No entanto, a avaliação da potencial qualidade e funcionalidade de um alimento, na maioria das vezes, é realizada com base apenas em resultados de extratos químicos, que geralmente diferem

significativamente dos resultados obtidos após a digestão gastrointestinal (KULKARNI *et al.*, 2007; SWIECA, 2016). Nesse contexto, sabe-se que o teor de nutrientes presente nos alimentos pode não estar disponível totalmente para a absorção e utilização pelo organismo humano (COZZOLINO, 2009; MCCARTHY e O'BRIEN, 2013). Dessa forma, estudos sobre a bioacessibilidade de compostos em alimentos são importantes, uma vez que apenas os compostos liberados da matriz alimentar estão potencialmente disponíveis para a absorção no intestino delgado e são capazes de exercer os seus efeitos benéficos (HUR *et al.*, 2011).

Além da bioacessibilidade, a data de colheita dos frutos pode influenciar na concentração de nutrientes e de compostos que será utilizada pelo organismo humano, uma vez que o estágio de maturação influencia nas concentrações de compostos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os frutos de juçara têm um ciclo de maturação longo, visto que é possível obter frutos comestíveis visualmente semelhantes por um período superior a dois meses (BICUDO; RIBANI; BETA, 2014; SCHULZ *et al.*, 2015).

Considerando esses aspectos e a ausência de estudos sobre bioacessibilidade em frutos de juçara, o objetivo deste trabalho foi quantificar os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato bruto de amostras de frutos de juçara coletados em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, em sete estádios de maturação e paralelamente avaliar a bioacessibilidade desses compostos após a simulação da digestão gastrointestinal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica e todas as soluções foram preparadas usando água desionizada de alta pureza (18,2 M Ω .cm) obtida pelo sistema de ultra purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, EUA). Hexano, éter etílico, ácido ascórbico, cloreto férrico e sulfato ferroso foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Metanol, ácido clorídrico, ácido fórmico, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), bicarbonato de sódio, pepsina, glicodesoxicolato de sódio, taurodeoxicolato de sódio, taurocolato de sódio e pancreatina foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de fenólicos (ácido 4-

aminobenzóico, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido *p*-anísico, ácido mandélico, vanilina, ácido 4-hidroximetilbenzóico, ácido 3,4 dihidroxibenzóico, umbeliferona, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido metoxifenilacético, ácido vanílico, ácido 4-metilumbeliferona, coniferaldeído, ácido cafeico, siringaldeído, escopoletina, ácido gálico, protocatecuico, vanílico, *p*-cumárico, resveratrol, campferol, aromadendrina, hispidulina, quercetina, taxifolina, miricetina, rutina, ácido ferúlico, ácido siríngico, sinapaldeído, ácido sinápico, crisina, pinocembrina, apigenina, galangina, naringenina, eriodictiol, fustina, catequina, epicatequina, ácido elágico, carnosol, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, isoquercitrina, naringina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Fluka Chemie AG (Buchs, St. Gallen, Suíça).

2.2. Amostragem

As amostras dos frutos de juçara foram coletadas no bairro Costeira do Pirajubaé, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (latitude 27°35'48" S, longitude 48°32'57" O), durante os meses de agosto a novembro de 2013, totalizando sete estádios de maturação, como segue: 0 (estádio 1), 17 (estádio 2), 23 (estádio 3), 30 (estádio 4), 42 (estádio 5), 56 (estádio 6) e 69 (estádio 7) dias após o aparecimento dos frutos vermelhos nos cachos. Esses estádios foram selecionados a fim de contemplar os mesmos estádios de maturação avaliados por Schulz et al. (2015), buscando definir o melhor estágio de maturação para melhor aproveitamento nutricional e bioativo dos frutos de juçara.

Foram coletados frutos de três palmeiras sadias com frutos suficientes a possibilitar coletas de 100 g de frutos ao longo de todos os estádios de maturação. Os frutos foram colhidos preservando-se os cachos, realizando-se retirada das bagas sadias em diferentes estádios de maturação. Os frutos selecionados foram armazenados em embalagens plásticas e transportados em caixas térmicas ao Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.3. Preparo da amostra

A porção comestível dos frutos (epicarpo e mesocarpo) foi separada manualmente e passou por branqueamento por imersão a 85 ± 2 °C por 10 minutos. Na sequência, foi submetida à secagem em estufa de

ar circulante (Fabbe 170, São Paulo, Brasil) a 45 ± 2 °C por 12 horas (BORGES *et al.*, 2013), resfriada em dessecador e triturada em moinho ultra centrífugo (Retsch Z200, Haan, Alemanha) com peneira de 1 mm a uma velocidade de 11200 g. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -18 ± 2 °C.

2.4. Preparo dos extratos

As amostras foram previamente desengorduradas de acordo com Borges *et al.* (2013). Um grama de amostra desidratada e triturada foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL, adicionada de 25 mL de hexano e submetido ao banho ultrassom (Unique 1400A, São Paulo, Brasil) por 15 minutos a 25 °C, seguida de centrifugação a 1010 g (Fanem 280R, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. O sobrenadante foi então removido e o resíduo submetido a mais duas extrações com hexano.

O preparo dos extratos para quantificação dos compostos fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante foi realizado como segue: as amostras previamente desengorduradas foram adicionadas de 5 mL de metanol e 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e submetidas à hidrólise ácida a 85 °C por 30 minutos em estufa (Labor SP 400/1, São Paulo, Brasil). Em seguida, a solução foi ajustada a pH 2 e submetida a extração por partição com 10 mL de éter etílico. O extrato foi centrifugado a 1010 g por 10 minutos (Fanem 280R, São Paulo, Brasil). O resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição com éter etílico, os sobrenadantes combinados, rotaevaporados até completa secagem (Fisatom 802, São Paulo, Brasil) e o extrato residual suspenso em metanol e seu volume aferido para 1 mL (SCHULZ *et al.*, 2015). Para injeção no LC-ESI-MS/MS, os extratos suspensos foram centrifugados durante 4 minutos a 14000 g (Eppendorf 22331, Hamburgo, Alemanha) e diluídos em metanol: água (30: 70).

2.5. Determinação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos frutos de juçara foi realizada de acordo com Schulz *et al.* (2015). Quarenta e sete compostos fenólicos foram pesquisados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadropolo e ion trap linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada). Os experimentos foram

realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSpray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) em modo negativo. Os compostos foram separados em coluna Synergi™ (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, EUA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95 % e água 5 % (A) e de água com ácido fórmico 0,1 % (B). A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90 % A; 7 – 10 min, 90 % A; 10 – 17 min, 10 % A. O fluxo utilizado foi de 250 µL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. A coluna foi condicionada entre corridas com fase móvel inicial durante 5 minutos.

Os compostos foram monitorados utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos através da comparação com os respectivos padrões disponíveis comercialmente. A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de soluções contendo cada composto de interesse individualmente. A quantificação foi realizada monitorando um íon quantitativo selecionado para cada composto e utilizando curva de calibração construída em razão dos compostos previamente identificados. O software Analyst versão 1.5.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos. Os parâmetros do espectrômetro de massas obtidos para os quarenta e sete compostos fenólicos testados estão apresentados no Apêndice A. Os resultados de concentração dos compostos nas amostras foram expressos em mg por 100 g de porção comestível (epicarpo e mesocarpo) seca desengordurada.

2.6. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

2.6.1. Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Esse método consistiu em avaliar a capacidade antioxidante da amostra via atividade sequestradora do radical livre estável DPPH de acordo com a metodologia proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A solução de trabalho foi preparada com o radical DPPH a uma concentração de 0,1 mmol L⁻¹ em metanol e sua absorbância ajustada a 0,800 ± 0,02 em 515 nm em um espectrofotômetro Spectro Vision SB 1810-60 S (Pequim, China). Uma alíquota de 2,9 mL foi adicionada em cubeta de vidro e a leitura da absorbância inicial foi

realizada a 515 nm ($t_{0\text{min}}$). Na sequência, foi adicionado 0,1 mL do extrato da amostra, a mistura foi homogeneizada e mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância final ($t_{30\text{min}}$). O percentual de inibição do radical foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \frac{\text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

Uma curva padrão com ácido ascórbico foi preparada (20 – 140 mg L⁻¹) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido ascórbico por 100 g de porção comestível seca desengordurada.

2.6.2. Método de redução do ferro (FRAP)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP, o qual está baseado na capacidade dos antioxidantes da amostra em reduzir o Fe³⁺ em Fe²⁺, foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996). Um volume de 0,2 mL de solução de cloreto férrico 3 mmol L⁻¹ foi adicionado a um tubo tipo Falcon de 14 mL. Em seguida, 0,2 mL da amostra foi adicionado, a mistura homogeneizada em vórtex e acondicionada em banho de água Depron/DMB (Benfer do Brasil, São Paulo, Brasil) a 37 ± 2 °C por 30 minutos. Após, foi adicionado 3,6 mL de solução de 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine (TPTZ) e este permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi em 620 nm. Foram preparadas duas curvas padrão, uma com ácido ascórbico (40 – 700 mg L⁻¹) e outra com sulfato ferroso (10 – 1000 µmol Fe II L⁻¹) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido ascórbico (EAA) e em µmol Fe II por 100 g de porção comestível seca desengordurada.

2.7. Bioacessibilidade

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada com base no método descrito por Bertin *et al.* (2016). Foi adicionado 0,2 g de amostra seca desengordurada em tubo do tipo Falcon (50 mL) e, em seguida, adicionados 3 mL da solução de fluido gástrico (0,32 g de pepsina + 0,7 mL de HCl 12 mol L⁻¹ e avolumado com água desionizada para 100 mL). A mistura foi mantida em uma estufa com agitação modelo TE820 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) por 2 h a 37 °C. Posteriormente, para a simulação da digestão intestinal foram adicionados 3 mL de fluido

intestinal (0,08 g glicodeoxicolato de sódio + 0,05 g de taurodeoxicolato de sódio + 0,08 g de taurocolato de sódio hidrato + 0,5 g de pancreatina avolumados em 100 mL com NaHCO_3 3 % m/v), com ajuste do pH para 6,8. Novamente a mistura foi mantida em estufa com agitação por 2 h a 37 °C. Ao final, os frascos contendo as amostras foram retirados da estufa e resfriados até temperatura ambiente.

Após resfriamento, foi realizada a centrifugação das soluções a uma velocidade de 1700 g por 20 minutos em centrífuga modelo 280R (Fanem, São Paulo, Brasil). Os sobrenadantes resultantes da digestão gastrointestinal foram coletados e submetidos à extração por partição com 10 mL de éter etílico (três vezes) e os extratos foram combinados e rotaevaporados até completa secagem. O extrato residual foi suspenso em metanol e seu volume aferido para 1 mL para determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante.

Ao final da quantificação, a bioacessibilidade foi calculada como segue:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{Y}{Z} \times 100$$

Onde, Y é o teor fenólico bioacessível, ou seja, o teor do fenólico determinado após a digestão *in vitro* e Z é o teor total do fenólico na amostra (obtido a partir da extração química).

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para identificar diferenças significativas entre as médias dos diferentes estádios de maturação foi utilizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. O teste t de Student foi usado para identificar diferenças significativas entre os valores encontrados antes e após a digestão gastrointestinal em cada estágio de maturação. Correlações entre a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos individuais foram estabelecidas a partir do coeficiente de correlação de *Pearson*. A análise de componentes principais foi realizada para demonstrar agrupamentos de amostras e suas variáveis. Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA 13.0, admitindo nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

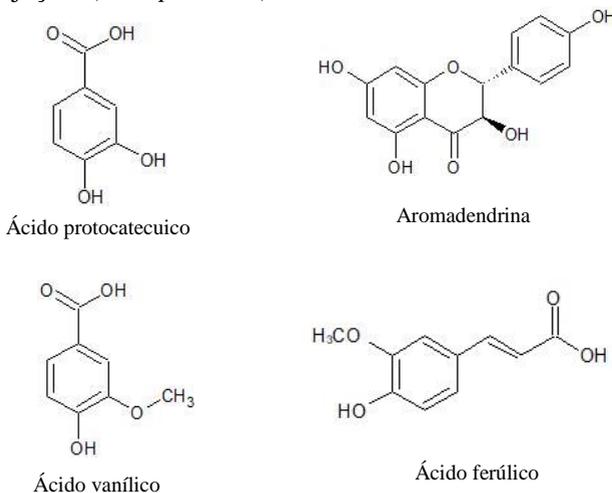
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos fenólicos

As concentrações dos compostos fenólicos individuais dos frutos de juçara obtidos pela extração química e o percentual bioacessível após a simulação da digestão gastrointestinal estão apresentados na Tabela 1. Foram identificados 22 compostos fenólicos: 10 ácidos fenólicos, 10 flavonoides, 1 estilbeno e 1 fenol aldeído. As informações obtidas nos espectros de massas, os tempos de retenção, bem como os limites de detecção e quantificação desses compostos estão apresentados na Tabela 2.

Os compostos presentes em maior concentração foram ácido protocatecuico, aromadendrina, ácido vanílico e ácido ferúlico (Figura 1), enquanto miricetina, resveratrol e apigenina foram os minoritários. Os ácidos fenólicos e a vanilina apresentaram concentrações de 0,07 a 22,94 mg 100 g⁻¹ de matéria seca, com valores mais elevados nos frutos mais imaturos (estádios 1 a 3) na maioria dos casos. Em contrapartida, os flavonoides e o resveratrol apresentaram as concentrações mais elevadas nos frutos mais maduros (estádios 4 a 7), com valores de até 16,43 mg 100 g⁻¹ de matéria seca (Tabela 1). Esse comportamento durante o ciclo de maturação foi semelhante a estudos anteriores realizados por Bicudo, Ribani e Beta (2014) e Schulz *et al.* (2015), no entanto, o presente estudo encontrou um maior número de fenólicos e as concentrações foram superiores para a maioria dos compostos.

Figura 1. Compostos fenólicos de maior concentração encontrados nos frutos de juçara (*Euterpe edulis*).



Fonte: ACD/ChemSketch versão 2.5 (2015).

Após a simulação da digestão gastrointestinal, 18 compostos fenólicos foram encontrados nos frutos de juçara (Tabela 1). Ácido gálico, resveratrol, miricetina e campferol não foram detectados após esta etapa. Em geral, os maiores valores de bioacessibilidade foram encontrados nos frutos mais maduros (estádios 4 a 7) para os compostos de todas as classes fenólicas estudadas. Os maiores percentuais bioacessíveis foram encontrados em ácido cafeico, apigenina, rutina e epicatequina.

Tabela 1. Concentração (mg 100 g⁻¹ em matéria seca desengordurada) e bioacessibilidade (B%) de compostos fenólicos na porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação. (continua)

		Estádio de maturação						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Ácidos fenólicos</i>								
Protocatecuico	Total	10,42 ± 0,27 ^{bc}	8,57 ± 0,51 ^c	12,13 ± 1,25 ^{bc}	12,34 ± 0,33 ^{bc}	14,58 ± 0,06 ^b	22,94 ± 1,99 ^a	22,51 ± 1,64 ^a
	B%	5,12	55,04	71,88	17,33	15,02	62,92	56,96
p-cumarico	Total	2,02 ± 0,05 ^a	0,53 ± 0,04 ^e	0,60 ± 0,06 ^{de}	0,60 ± 0,03 ^{de}	0,81 ± 0,07 ^b	0,78 ± 0,03 ^{bc}	0,67 ± 0,01 ^{cd}
	B%	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	10,77	13,18
Vanílico	Total	16,51 ± 0,21 ^a	10,28 ± 0,47 ^b	9,87 ± 0,23 ^b	8,64 ± 0,47 ^b	9,43 ± 0,08 ^b	9,55 ± 1,11 ^b	8,51 ± 0,31 ^b
	B%	13,31	16,27	15,43	16,75	12,91	10,99	11,23
Gálico	Total	0,48 ± 0,03 ^b	0,77 ± 0,03 ^a	0,20 ± 0,01 ^e	0,34 ± 0,02 ^{cd}	0,25 ± 0,03 ^d	0,34 ± 0,06 ^{cd}	0,37 ± 0,01 ^c
	B%	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Cafeico	Total	0,39 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,00 ^c	0,36 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,01 ^{bc}	0,15 ± 0,01 ^c	0,21 ± 0,00 ^b
	B%	NB	262,39	252,24	568,21	956,04	1088,57	532,10
Ferúlico	Total	18,12 ± 0,79 ^a	3,21 ± 0,00 ^{bc}	3,07 ± 0,37 ^{bc}	3,14 ± 0,15 ^{bc}	4,10 ± 0,69 ^b	4,57 ± 0,41 ^b	2,59 ± 0,20 ^c
	B%	0,48	6,82	7,38	9,47	6,22	4,62	6,93
Siríngico	Total	6,83 ± 0,91 ^a	3,72 ± 0,38 ^b	3,53 ± 0,18 ^{bc}	3,71 ± 0,42 ^{bc}	2,96 ± 0,03 ^c	3,47 ± 0,09 ^{bc}	3,76 ± 0,16 ^b
	B%	8,74	11,19	17,64	16,99	15,72	14,00	10,65
Sinápico	Total	2,38 ± 0,16 ^c	3,01 ± 0,07 ^c	5,29 ± 0,11 ^a	4,08 ± 0,38 ^b	4,40 ± 0,30 ^{ab}	4,29 ± 0,10 ^b	4,69 ± 0,13 ^{ab}
	B%	< LQ	< LQ	0,05	0,61	0,47	1,20	0,47
Elágico	Total	0,07 ± 0,02 ^e	0,33 ± 0,00 ^{de}	0,53 ± 0,01 ^d	4,09 ± 0,06 ^c	7,13 ± 0,01 ^a	7,15 ± 0,15 ^a	6,08 ± 0,23 ^b
	B%	488,02	13,35	3,78	1,07	NB	NB	NB
Clorogênico	Total	<LD	0,35 ± 0,02 ^b	0,33 ± 0,02 ^{bc}	0,57 ± 0,03 ^a	0,21 ± 0,01 ^d	0,27 ± 0,01 ^{cd}	0,38 ± 0,05 ^b
	B%	NB	< LD	< LD	< LD	7,94	32,09	3,51
<i>Flavonoides</i>								
Apigenina	Total	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a
	B%	76,56	87,52	NB	84,92	94,86	98,33	99,19
Campferol	Total	<LD	0,17 ± 0,01 ^e	0,20 ± 0,01 ^{de}	0,24 ± 0,01 ^d	0,62 ± 0,02 ^c	0,68 ± 0,02 ^b	0,77 ± 0,02 ^a
	B%	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Aromadendrina	Total	2,16 ± 0,51 ^e	7,83 ± 0,07 ^d	11,92 ± 0,38 ^c	15,28 ± 0,60 ^{ab}	15,09 ± 0,28 ^{ab}	13,78 ± 0,68 ^{bc}	16,43 ± 1,15 ^a
	B%	2,09	2,81	1,93	3,13	2,20	1,60	0,90

Tabela 1. Concentração (mg 100 g⁻¹ em matéria seca desengordurada) e bioacessibilidade (B%) de compostos fenólicos na porção comestível (epicarpo e mesocarpo) dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação. (conclusão)

		Estádio de maturação						
		1	2	3	4	5	6	7
Catequina	Total	< LQ	0,36 ± 0,02 ^{cd}	2,75 ± 0,23 ^a	< LQ	0,35 ± 0,03 ^{cd}	0,66 ± 0,00 ^c	2,34 ± 0,05 ^b
	B%	NB	NB	NB	NB	NB	10,98	NB
Epicatequina	Total	<LD	0,02 ± 0,00 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,01 ^{ab}	0,06 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,00 ^{bc}	0,17 ± 0,02 ^a
	B%	NB	NB	21,31	36,53	35,66	163,34	25,17
Quercetina	Total	0,17 ± 0,01 ^f	0,17 ± 0,00 ^f	0,33 ± 0,03 ^d	0,51 ± 0,02 ^{bc}	0,42 ± 0,03 ^{cd}	0,57 ± 0,03 ^b	0,82 ± 0,03 ^a
	B%	31,14	21,88	11,49	35,19	47,50	53,50	39,87
Taxifolina	Total	2,49 ± 0,01 ^d	2,57 ± 0,04 ^d	4,51 ± 0,39 ^c	5,87 ± 0,08 ^{ab}	5,60 ± 0,56 ^b	5,48 ± 0,42 ^b	6,50 ± 0,46 ^a
	B%	< LD	< LQ	1,72	3,04	3,19	2,22	1,06
Miricetina	Total	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	B%	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Isoquercitrina	Total	0,36 ± 0,00 ^d	0,74 ± 0,01 ^c	1,26 ± 0,05 ^a	0,88 ± 0,08 ^{bc}	0,96 ± 0,01 ^b	0,85 ± 0,06 ^{bc}	1,39 ± 0,02 ^a
	B%	NB	4,39	8,40	19,48	19,11	42,28	30,02
Rutina	Total	< LQ	0,13 ± 0,01 ^d	0,19 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^{cd}	0,11 ± 0,01 ^e	0,17 ± 0,01 ^{bc}
	B%	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	175,03	130,71
<i>Estilbenos</i>								
Resveratrol	Total	< LQ	< LQ	0,02 ± 0,00 ^{bc}	0,01 ± 0,00 ^{bc}	0,03 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,00 ^{bc}	0,06 ± 0,01 ^a
	B%	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
<i>Fenóis aldeídos</i>								
Vanilina	Total	3,14 ± 0,61 ^a	2,39 ± 0,33 ^{ab}	2,15 ± 0,18 ^b	2,04 ± 0,00 ^b	2,08 ± 0,07 ^{ab}	1,98 ± 0,17 ^b	1,50 ± 0,00 ^b
	B%	6,75	10,64	4,55	7,49	6,32	4,40	6,24

Estádios de maturação: 0 (estádio 1), 17 (estádio 2), 23 (estádio 3), 30 (estádio 4), 42 (estádio 5), 56 (estádio 6) and 69 (estádio 7) dias após o aparecimento dos frutos vermelhos nos cachos. Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 6$). ^{a-e} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. LD – Limite de detecção. LQ – Limite de quantificação. NB – Não bioacessível. Fonte: Schulz *et al.* (2017).

Tabela 2. Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos compostos fenólicos identificados nas amostras de frutos de juçara (*Euterpe edulis*).

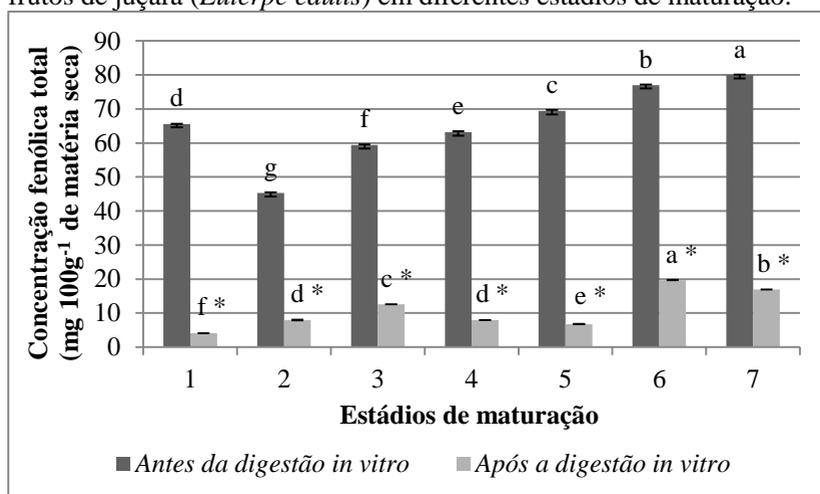
Composto	Íon precursor (<i>m/z</i>) Q1	Íon quantitativo (<i>m/z</i>) Q3	Tempo de retenção (min.)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	168,836	125	3,98	0,009	0,026
Ácido protocatecuico	153,019	109	6,95	0,006	0,018
Catequina	288,853	245,1	8,82	0,012	0,040
Ácido clorogênico	352,863	191	9,19	0,002	0,007
Epicatequina	288,948	123	9,41	0,004	0,014
Ácido cafeico	178,834	107	9,45	0,017	0,059
Ácido vanílico	166,831	123	9,65	0,018	0,062
Ácido siríngico	196,862	121	10,01	0,003	0,019
Ácido <i>p</i> -cumárico	163,04	119	10,46	0,001	0,005
Vanilina	150,892	136	10,52	0,005	0,016
Taxifolina	302,815	125	10,70	0,003	0,008
Rutina	609,147	301	10,72	0,007	0,023
Ácido ferúlico	192,856	134	10,73	0,004	0,022
Isoquercitrina	462,901	300	10,83	0,006	0,020
Quercetina	301,01	151	10,84	0,002	0,005
Ácido sinápico	222,885	164	10,87	0,005	0,02
Resveratrol	226,875	142,9	11,14	0,007	0,022
Miricetina	316,875	137,1	11,24	0,040	0,113
Aromadendrina	286,824	125	11,29	0,002	0,005
Ácido elágico	300,813	132,9	11,71	0,096	0,297
Campferol	284,808	65	12,34	0,026	0,088
Apigenina	268,794	151	12,62	0,003	0,009

Fonte: Adaptado de Schulz *et al.* (2017).

Como ilustra a Figura 2, a concentração fenólica total, obtida a partir do somatório das concentrações de todos os fenólicos quantificados neste estudo, foi superior aos teores bioacessíveis ($p < 0,05$) em todos os estádios de maturação. Valores de até 79,98 mg 100 g⁻¹ em matéria seca foram encontrados no extrato bruto dos frutos de juçara, enquanto após a simulação da digestão gastrointestinal o valor máximo foi de 19,71 mg 100 g⁻¹ em matéria seca. No entanto, como visto na Tabela 1 as frações bioacessíveis do ácido cafeico nos estádios 5 e 6 foram até dez vezes

maiores do que os valores encontrados no extrato bruto. Rutina e epicatequina também apresentaram frações bioacessíveis superiores ao extrato bruto em frutos mais maduros (130 a 175 %). Além desses, o ácido elágico mostrou 488 % de bioacessibilidade no primeiro estágio de maturação estudado. Os demais compostos estudados apresentaram valores de 0,6 a 99 % de bioacessibilidade a partir do quarto estágio de maturação.

Figura 2. Concentração fenólica total ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ em matéria seca desengordurada) antes e após a simulação da digestão gastrointestinal dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação.



Estádios de maturação: 0 (estádio 1), 17 (estádio 2), 23 (estádio 3), 30 (estádio 4), 42 (estádio 5), 56 (estádio 6) and 69 (estádio 7) dias após o aparecimento dos frutos vermelhos nos cachos.

^{a-g} Letras diferentes na mesma série indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) antes e após a digestão gastrintestinal em cada estágio de maturação.

Fonte: Schulz *et al.* (2017).

Os resultados apresentados mostram que a maturação dos frutos de juçara influenciou significativamente ($p < 0,05$) a concentração fenólica total e individual, bem como os teores bioacessíveis desses compostos. Além de alterar características físico-químicas, a maturação influencia nas etapas de biossíntese de compostos fenólicos (TIWARI e CUMMINS, 2013) e, portanto, pode também aumentar ou diminuir a

bioacessibilidade desses compostos. Além disso, as condições de digestão gastrointestinal resultam em várias alterações na estrutura fenólica tais como hidroxilação, metilação, isoprenilação, dimerização e glicosilação, assim como a formação de derivados fenólicos por degradação parcial das formas combinadas ou pela quebra das ligações entre fenóis e açúcares (CHEN *et al.*, 2016).

Essas alterações na estrutura dos compostos fenólicos justificam as maiores concentrações encontradas após a simulação da digestão gastrointestinal do que no extrato bruto para alguns compostos. A hidrólise e/ou modificações durante o processo de digestão na estrutura fenólica dos ácidos *p*-cumárico e clorogênico, por exemplo, pode ter originado ácido cafeico no extrato obtido dos frutos de juçara (CHEN *et al.*, 2016; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). No caso da epicatequina, a concentração mais elevada após a digestão gastrointestinal pode ser devido à hidrólise parcial no pH intestinal de proantocianidinas (MOSELE *et al.*, 2016), enquanto que a rutina pode ter sido gerada a partir da quercetina, uma vez que a quercetina é a estrutura aglicona da rutina (CELEP *et al.*, 2015). Em relação ao ácido elágico, o elevado teor bioacessível no primeiro estágio estudado é possivelmente relacionado com os elagitaninos, que são mais concentrados nos frutos mais imaturos (TAIZ; ZEIGER, 2009), e quando expostos a ácidos ou bases, as ligações de éster são hidrolisadas e os elagitaninos são reorganizados em ácido elágico (ALMINGER *et al.*, 2014). A diminuição nos teores dos demais compostos fenólicos estudados poderia ser explicada por interações com outros componentes da matriz, causando alterações na sua massa molecular, solubilidade e estrutura química (CHEN *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos para os frutos de juçara em comparação com dados publicados para outras frutas como arônia (*Aronia melanocarpa*) (BERMÚDEZ-SOTO; TOMÁS-BARBERAN; GARCÍA-CONESA, 2007), romã (*Punica granatum*) (SENGUL *et al.*, 2014) e maçãs (BOUAYED *et al.*, 2012) mostram que a bioacessibilidade dos compostos fenólicos pode depender do tipo de alimento, da natureza e da localização desses compostos na matriz do alimento. Em romã, os ácidos ferúlico, clorogênico e cafeico apresentaram frações bioacessíveis em torno de 15 % ao final da simulação da digestão gastrointestinal, enquanto que o ácido gálico foi totalmente bioacessível. O ácido clorogênico em arônia apresentou bioacessibilidade de 95 %, enquanto nas maçãs foi de 11 a 30 % para o clorogênico, 138 a 150 % para o *p*-cumárico e o cafeico não foi bioacessível. Para os flavonoides, rutina e quercetina

apresentaram bioacessibilidade de 58 a 70 % e de 63 a 180 % nas maçãs, respectivamente. Em contrapartida, na arônia a quercetina não foi bioacessível.

Os resultados deste estudo mostram que, mesmo após as perdas que ocorrem durante o processo de digestão gastrointestinal, os frutos de juçara se destacam por apresentarem concentrações de compostos fenólicos maiores do que aquelas encontradas em extratos brutos de outras frutas. As concentrações de alguns ácidos fenólicos como cafeico, protocatecuico, vanílico e siríngico encontradas após a simulação da digestão nos frutos de juçara foram superiores a resultados encontrados em extrato bruto de morango (*Fragaria ananassa*), framboesa (*Rubus idaeus*), banana (*Musa sapientum*), melancia (*Citrullus lanatus*), maçã (*Malus domestica*) e pêra (*Pyrus communis*) (MATTILA; HELLSTRÖM; TÖRRÖNEM, 2006). Quando comparadas aos valores obtidos do extrato bruto dos frutos do açaizeiro (*Euterpe oleracea*), as concentrações bioacessíveis dos frutos de juçara foram superiores para os ácidos protocatecuico, clorogênico, cafeico, *p*-cumárico, siríngico e ferúlico (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; GORDON *et al.*, 2012).

3.2. Capacidade antioxidante

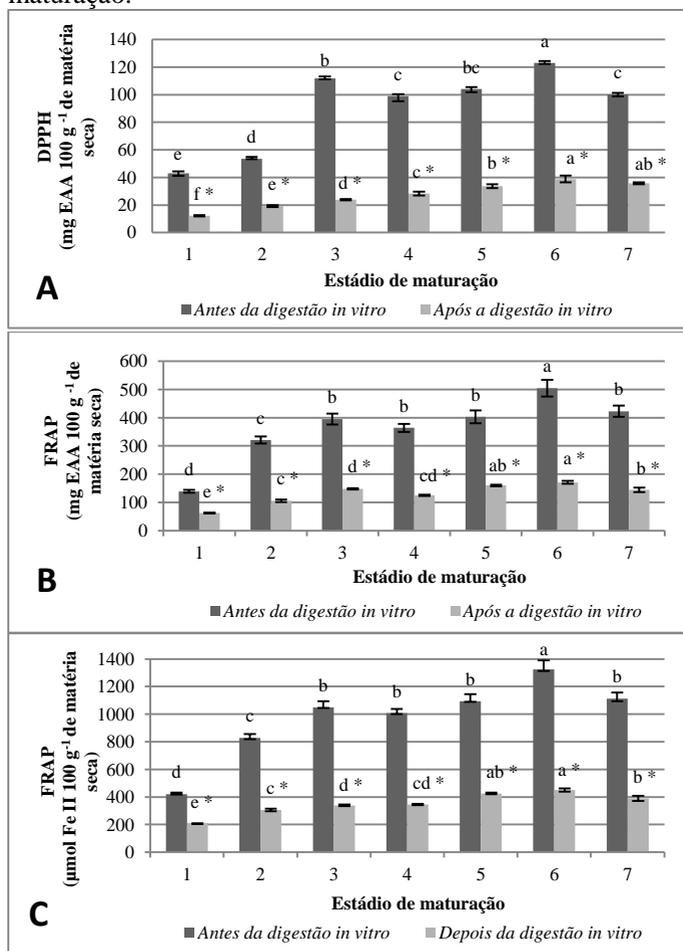
A capacidade antioxidante do extrato bruto e do extrato obtido após a simulação da digestão gastrointestinal foi avaliada utilizando os ensaios de DPPH e FRAP. A capacidade de sequestro do radical DPPH e o poder redutor do ferro foram maiores nos extratos dos frutos colhidos no estágio de maturação 6, com valores de 123,06 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA) 100 g⁻¹ de matéria seca para o DPPH e 504,60 mg EAA 100 g⁻¹ e 1324,29 µmol Fe II 100 g⁻¹ (em matéria seca) para o FRAP (Figura 3). Outras 17 frutas não tradicionais brasileiras (açaí, acerola, bacuri, cajá, caju, camu-camu, carnaúba, gurguri, jaboticaba, jambolão, mangaba, murici, murta, puçá-coroa-de-frade, puçá-preto, umbu e uvaia) estudadas por Rufino *et al.* (2010) apresentaram capacidade antioxidante superior ao presente estudo, visto que os valores foram acima de 1610 µmol Fe II 100 g⁻¹ de matéria seca no ensaio FRAP. No entanto, outras frutas mais comumente consumidas como banana (*Musa sp.*), mamão (*Carica papaya*), melão (*Cucumis melo*), melancia (*Citrullus lanatus*), maracujá (*Passiflora edulis*), abacaxi (*Ananas comosus*) e abacate (*Persea americana*) apresentaram valores de até 45 µmol Fe II 100 g⁻¹ de matéria seca (MORAIS *et al.*, 2015).

Após a simulação da digestão gastrointestinal, foi observada diminuição significativa ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante. Houve uma diminuição de 64 a 78 % na capacidade de sequestro do radical DPPH e de 51 a 67 % no poder redutor do ferro. Como ilustra a Figura 3, em ambos os ensaios a maior capacidade antioxidante após a digestão *in vitro* foi encontrada nos estádios definidos como 5, 6 e 7, com valores para DPPH de 34 a 39 mg EAA 100 g⁻¹ e para FRAP de 144 a 171 mg EAA 100 g⁻¹ e 389 a 450 μmol Fe II 100 g⁻¹ (em matéria seca). Estudos realizados com outras frutas também apresentaram redução significativa da capacidade antioxidante após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. De acordo com Bouayed, Hoffmann e Torsten (2011), diferentes variedades de maçã apresentaram uma redução em torno de 45 % da capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP. Em figos (*Ficus carica* L.), Kamiloglu e Capanoglu (2013) encontraram uma redução de 91 a 99 % pelo método FRAP e 76 a 78 % na capacidade de sequestro do radical DPPH.

O processo de digestão pode afetar a capacidade antioxidante devido à redução na concentração de compostos e/ou transformação de fenólicos em diferentes formas estruturais com outras propriedades químicas. Além disso, as mudanças de pH durante o processo de digestão podem afetar a racemização de moléculas, possivelmente criando dois enantiômeros quirais com reatividade diferente do respectivo reagente. O pH da fase intestinal torna os antioxidantes menos reativos, ou seja, após esta etapa os antioxidantes não reagem de forma eficaz ou há diminuição da sua capacidade (CHEN *et al.*, 2014; CELEP *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

Estudos que avaliaram compostos fenólicos em frutos de juçara observaram que as antocianinas são os principais contribuintes para a capacidade antioxidante nesses frutos (BORGES *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014; SCHULZ *et al.*, 2015). Estudo realizado por Fernandes (2015) com bebida de juçara mostrou que após a simulação da digestão gastrointestinal houve diminuição nos teores de antocianinas, visto que são altamente instáveis a pH intestinal. Dessa forma, a transição do meio gástrico ácido para o ambiente intestinal levemente alcalino levou à diminuição na concentração bioacessível desses compostos nos frutos de juçara, com conseqüente contribuição na diminuição da capacidade antioxidante nesses frutos.

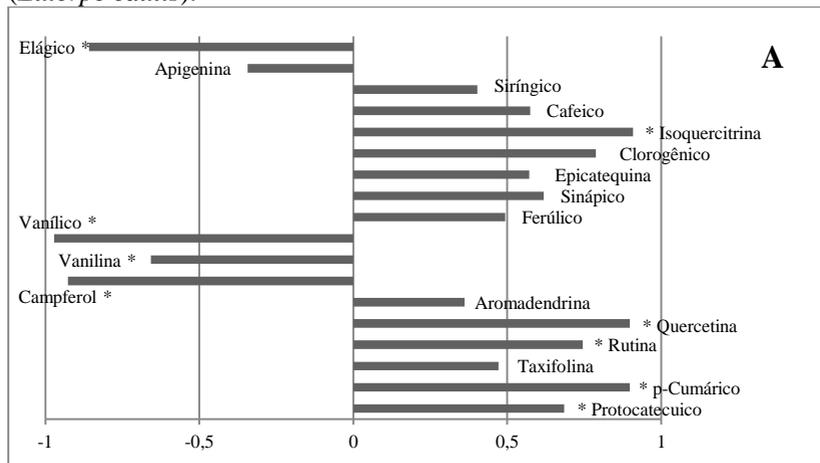
Figura 3. Capacidade antioxidante determinada pelos ensaios (A) DPPH (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} de matéria seca desengordurada) e FRAP expresso em (B) mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} de matéria seca desengordurada e (C) $\mu\text{mol Fe II } 100\text{ g}^{-1}$ de matéria seca desengordurada antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação.



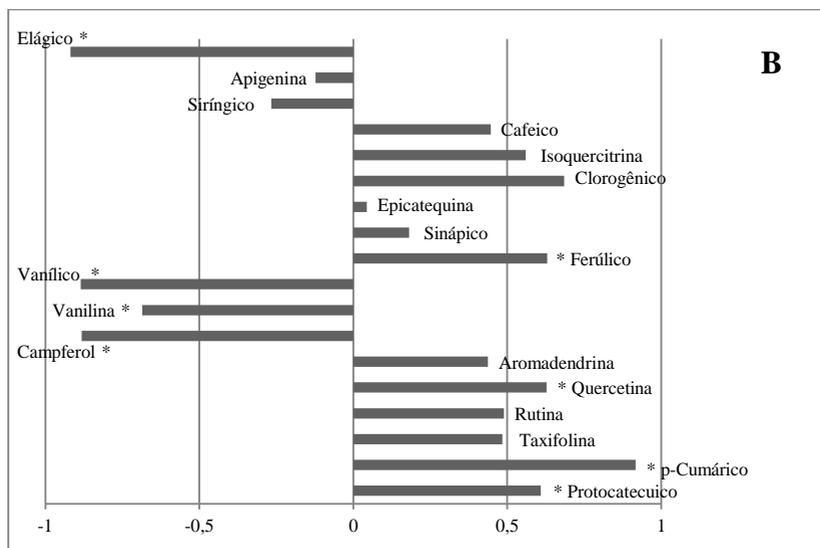
Estádios de maturação: 0 (estádio 1), 17 (estádio 2), 23 (estádio 3), 30 (estádio 4), 42 (estádio 5), 56 (estádio 6) and 69 (estádio 7) dias após o aparecimento dos frutos vermelhos nos cachos. ^{a-f} Letras diferentes na mesma série indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$). *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) antes e após a digestão gastrointestinal em cada estágio de maturação. Fonte: Adaptado de Schulz *et al.* (2017).

A Figura 4 ilustra as correlações entre a capacidade antioxidante e as concentrações bioacessíveis dos compostos fenólicos da porção comestível dos frutos de juçara. Uma correlação positiva e significativa ($r > 0,68$; $p < 0,01$) foi encontrada entre DPPH e ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico, rutina, quercetina e isoquercitrina, enquanto campferol, ácido vanílico, ácido elágico e vanilina apresentaram correlação negativa e significativa ($r > -0,85$; $p < 0,01$). Com os valores obtidos a partir do ensaio FRAP, ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e quercetina apresentaram correlação positiva e significativa ($r > 0,61$; $p < 0,01$), enquanto que o ácido vanílico, ácido elágico, campferol e vanilina foram negativamente e significativamente correlacionados ($r > -0,69$; $p < 0,05$). Essas correlações indicam os compostos fenólicos que contribuíram com a capacidade antioxidante descrita para a porção comestível dos frutos de juçara desempenhando um papel importante nos efeitos benéficos desses frutos.

Figura 4. Coeficientes de correlação entre a capacidade antioxidante determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP e as concentrações bioacessíveis dos compostos fenólicos individuais dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*).



* correlação significativa ($p < 0,01$).



* correlação significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor (2016).

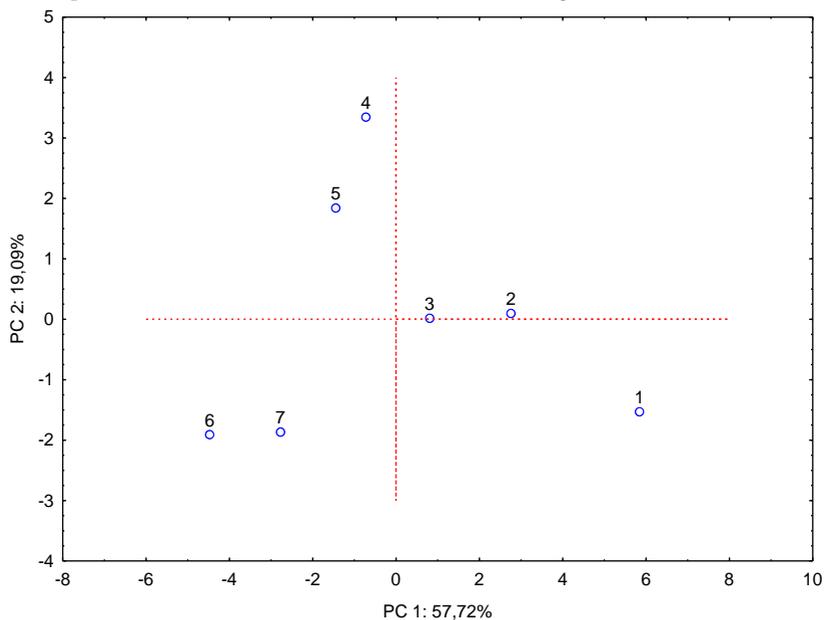
3.3. Análise de Componentes Principais

A fim de verificar tendências de agrupamentos, o conjunto de dados obtido após a simulação da digestão gastrointestinal para os compostos fenólicos e capacidade antioxidante foi submetido à Análise de Componentes Principais (PCA).

A PCA mostrou que 76,81 % das informações podem ser representadas por duas componentes principais (PCs). Observando-se a distribuição das amostras no espaço das PCs (Figura 5) nota-se que a componente principal 1 (PC1), com 57,72 % da variância, separa as amostras de juçara de acordo com os estádios de maturação. As amostras coletadas nos estádios 1, 2 e 3 foram agrupadas na parte positiva da PC1, e as amostras coletadas a partir do quarto estágio foram agrupadas na parte negativa da PC1.

Como mostra a Tabela 3, as variáveis dominantes para PC1 foram ácido vanílico ($r = 0,96$), campferol ($r = 0,93$), ácido elágico ($r = 0,81$), ácido protocatecuico ($r = -0,70$), ácido *p*-cumárico ($r = -0,91$), rutina ($r = -0,72$), quercetina ($r = -0,89$), ácido sinápico ($r = -0,81$), epicatequina ($r = -0,92$), isoquercitrina ($r = -0,90$), ácido cafeico ($r = -0,80$), DPPH ($r = -0,99$) e FRAP ($r = -0,91$). Dessa forma, as amostras coletadas a partir do quarto estágio de maturação, apresentaram concentrações superiores de ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico, rutina, quercetina, ácido sinápico, epicatequina, isoquercitrina, ácido cafeico bem como capacidade antioxidante, enquanto que as amostras coletadas até o terceiro estágio apresentaram maiores concentrações de ácido vanílico, ácido elágico e campferol. Esses dados reforçam a informação de que os frutos de juçara mais maduros apresentam maiores concentrações de compostos fenólicos bioacessíveis e consequentemente maior capacidade antioxidante.

Figura 5. Análise dos componentes principais para os compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação.



Fonte: Próprio autor (2016).

Tabela 3. Pesos das variáveis para cada componente principal (PC) dos compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*) em diferentes estádios de maturação.

Variável	PC1	PC2
Ácido protocatecuico	-0,70	-0,60
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,91	0,07
Taxifolina	-0,66	0,66
Rutina	-0,72	-0,57
Quercetina	-0,89	-0,20
Aromadendrina	-0,41	0,89
Campferol	0,93	-0,30
Vanilina	0,67	0,53
Ácido vanílico	0,96	0,10
Ácido ferúlico	-0,49	0,81
Ácido Sinápico	-0,81	-0,02
Catequina	-0,57	-0,42
Epicatequina	-0,92	0,22
Ácido clorogênico	-0,67	-0,42
Isoquercitrina	-0,90	-0,30
Ácido cafeico	-0,80	0,53
Ácido siríngico	0,44	0,31
Apigenina	0,01	0,26
Ácido elágico	0,81	-0,25
DPPH	-0,99	-0,04
FRAP	-0,91	0,08

Fonte: Próprio autor (2016).

4. CONCLUSÃO

As concentrações dos compostos fenólicos individuais e a capacidade antioxidante dos frutos de juçara foram significativamente menores após a simulação da digestão gastrointestinal em relação à extração química, o que pode ser explicado por alterações na estrutura química e solubilidade desses compostos que ocorrem durante o processo digestivo. Além disso, os resultados indicaram que o estágio de maturação do fruto influenciou na bioacessibilidade dos compostos estudados.

Este estudo sugere que os frutos de juçara coletados a partir do estágio de maturação 4 (30 a 69 dias após o aparecimento dos frutos vermelhos no cacho) apresentam maiores concentrações bioacessíveis de compostos fenólicos, ou seja, esse é o período indicado para o

processamento dos frutos visando contribuir para a maximização da ingestão diária de compostos fenólicos.

Por fim, o estudo da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* é uma ferramenta útil que permite avaliar a influência da matriz alimentar na bioacessibilidade de compostos bioativos em frutos de juçara e pode contribuir para um maior entendimento das mudanças que ocorrem na digestão *in vivo* e os possíveis metabólitos. No entanto, estudos adicionais, a fim de investigar a biodisponibilidade e a atividade biológica desses compostos são ainda necessários.

CAPÍTULO 3

EFEITO NEUROPROTETOR DE EXTRATOS DE FRUTOS DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius) FRENTE À OXITOSE INDUZIDA POR GLUTAMATO EM CÉLULAS NEURONAIS HT22

As informações do presente capítulo foram publicadas em:

SCHULZ, M. *et al.* Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. **Food Research International**, v. 120, p. 114-123, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.030>.

Resumo

Este estudo investigou a possível ação protetora de extratos de frutos de juçara coletados em Florianópolis e Pomerode (SC) contra a oxitose induzida pelo glutamato em células neuronais HT22. Os extratos metanólicos brutos foram submetidos à partição sucessiva com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Os compostos fenólicos dos extratos brutos e das frações foram determinados por cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS) e as antocianinas monoméricas totais (AMT) pelo método de diferencial de pH. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro (FRAP). O efeito protetor dos extratos brutos e das frações (1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi avaliado a partir do ensaio de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium (MTT). Experimentos com a adição dos extratos/frações 24 horas antes do glutamato (pré-tratamento) e juntamente com o glutamato (co-tratamento) foram realizados. Dos 47 compostos fenólicos avaliados, 26 foram quantificados no extrato bruto/frações obtidos dos frutos de juçara. As frações diclorometânicas foram as que apresentaram o maior número de compostos quantificados, seguidas das frações hexânicas, extratos brutos, frações acetato de etila e frações butanólicas. Foi observado maiores concentrações de AMT nas frações butanólica e acetato de etila, as quais também apresentaram maior potencial antioxidante determinado pelo método FRAP. Em contrapartida, as frações diclorometânicas apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH. Na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as frações hexânica e diclorometânica de ambas as amostras foram capazes de proteger as células do dano celular induzido pelo glutamato, tanto no pré-tratamento quanto no co-tratamento. Os resultados sugerem os extratos dos frutos de juçara como promissores para a redução do risco de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Antioxidantes. Estresse oxidativo. LC-ESI-MS/MS. DPPH. FRAP. Açai.

1. INTRODUÇÃO

Juçara é o nome popular da palmeira *Euterpe edulis* Martius, a qual é nativa do bioma Mata Atlântica e encontrada desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul. Esta palmeira produz frutos arredondados, que pesam de 1 a 2 gramas e possuem polpa fibrosa de coloração violeta escura a negra quando maduros (LORENZI *et al.*, 2010), muito semelhantes aos frutos de outras espécies do gênero (*Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius) usados para a produção de açaí (DE BRITO *et al.*, 2007; SCHULZ *et al.*, 2016).

Recentemente, os frutos da palmeira juçara têm sido muito apreciados devido ao seu elevado valor nutricional, com destaque para ácidos graxos, proteínas, fibra dietética, vitamina C, vitamina E, manganês, ferro, cálcio e potássio (BORGES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2013; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015). A composição polifenólica inclui abundância de antocianinas, especialmente cianidina-3-rutinosídeo, e de outros flavonoides como quercetina e rutina, além dos ácidos fenólicos protocatecuico, *p*-cumárico, gálico e ferúlico (BORGES *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2015a; SCHULZ *et al.*, 2015; GUERGOLETTI *et al.*, 2016).

Muitos estudos reportam efeitos benéficos do consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos contra algumas doenças crônicas, incluindo as neurodegenerativas. Esse efeito é atribuído à capacidade antioxidante desses compostos, os quais atenuam reações oxidativas e/ou nitrosativas que são induzidas por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e que estão ligadas à patogênese dessas doenças (KIM, 2010; HWANG; SHIH; YEN, 2012; CHANG *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2014; SUBASH *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016).

As células HT22, uma linhagem proveniente do hipocampo de camundongos, são consideradas um excelente modelo para avaliar neuroproteção contra estresse oxidativo induzido por glutamato (FUKUI *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2014; YANG; SONG, 2014). O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, tem sido associado a funções cerebrais essenciais, no entanto, em altas concentrações extracelulares, pode atuar como uma toxina, induzindo a morte neuronal (MELDRUM, 2000; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). Os altos níveis de glutamato levam à inibição do “antiporter” glutamato/cistina com diminuição intracelular de cistina, depleção de glutatona, acúmulo de espécies reativas e rápido influxo de Ca^{2+} que contribuem para a morte celular (TAN; WOOD; MAHER, 1998;

ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001; CHO *et al.*, 2012). Esse tipo de morte oxidativa induzida por altas concentrações de glutamato é chamada de oxitose, a qual é também conhecida como ferroptose ou toxicidade oxidativa do glutamato (TAN *et al.*, 2001).

A exposição de células HT22 a altas concentrações de glutamato induz uma cascata de eventos oxidativos celulares que se assemelham aos observados em condições neurodegenerativas (TOBABEN *et al.*, 2011). Como a oxitose induzida pelo glutamato é um fator importante na morte celular em doenças neurológicas degenerativas (MORRIS *et al.*, 2018), estudos em busca de potenciais agentes neuroprotetores são baseados nesse fenômeno. Nesse contexto, estudos recentes com células HT22 mostraram que os compostos fenólicos são capazes de proteger essas células contra o estresse oxidativo induzido pelo glutamato a partir da redução dos níveis de espécies reativas e preservação dos sistemas de defesa antioxidante (CHO *et al.*, 2012; JEONG *et al.*, 2014; YANG; SONG, 2014).

Devido a sua riqueza em compostos fenólicos, a capacidade antioxidante dos frutos de juçara tem sido amplamente avaliada. Estudos mostram que os extratos obtidos a partir desses frutos apresentam alta capacidade antioxidante observada em ensaios *in vitro* (RUFINO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2013; BICUDO *et al.*, 2014; INADA *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2015), em modelos animais (CARDOSO *et al.*, 2015b; OYAMA *et al.*, 2016) e em humanos saudáveis (CARDOSO *et al.*, 2015a). No entanto, até o momento, não foram publicados estudos sobre possíveis efeitos antioxidantes dos frutos de juçara em células neuronais.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica obtidos de frutas de juçara (*Euterpe edulis* Martius) para proteger as células HT22 contra a oxitose induzida pelo glutamato, buscando uma relação potencial entre os efeitos protetores e a composição polifenólica e o potencial antioxidante do extrato bruto e frações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica e todas as soluções foram preparadas usando água desionizada de alta pureza (18,2 MΩ.cm) obtida pelo sistema de ultra purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, EUA). Acetato de etila, butanol, ácido ascórbico, bicarbonato de sódio, tampão HEPES, glicose, cloreto férrico e sulfato ferroso foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Hexano foi obtido da Neon (São Paulo, SP, Brasil) e diclorometano da QHemis (São Paulo, SP, Brasil). Metanol, ácido fórmico, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil-tetrazolium (MTT), 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), glutamina e glutamato foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de fenólicos (ácido 4-aminobenzóico, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido *p*-anísico, ácido mandélico, vanilina, ácido 4-hidroximetilbenzóico, umbeliferona, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido metoxifenilacético, ácido vanílico, ácido 4-metilumbeliferona, coniferaldeído, ácido cafeico, siringaldeído, escopoletina, ácido gálico, protocatecuico, vanílico, *p*-cumárico, resveratrol, campferol, aromadendrina, hispidulina, quercetina, taxifolina, miricetina, rutina, ácido ferúlico, ácido sirngico, sinapaldeído, ácido sinápico, crisina, pinocenbrina, apigenina, galangina, naringenina, eriodictiol, fustina, catequina, epicatequina, ácido elágico, carnosol, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, isoquercitrina, naringina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Fluka Chemie AG (Buchs, St. Gallen, Suíça). Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), soro fetal bovino, tripsina, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da GIBCO (Carlsbad, CA, EUA).

2.2. Amostras

Para o desenvolvimento deste trabalho, no ano de 2016, foram coletadas amostras de frutos de juçara no mês de abril em Pomerode (latitude 26°44'26" S longitude 49°10'37" O) e no mês de junho em Florianópolis (latitude 27°35'48" S, longitude 48°32'57" O), ambos municípios de Santa Catarina, Brasil. Os frutos foram coletados em estágio ideal de maturação para processamento de acordo com Schulz *et al.* (2015).

Após a debulha dos cachos, os frutos foram armazenados em embalagens plásticas e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Química de Alimentos da UFSC. No laboratório, os frutos sadios foram selecionados, lavados com água potável e despulpados manualmente. A porção comestível dos frutos de juçara (epicarpo e mesocarpo) foi liofilizada (LT 1000, Terroni, São Paulo, SP) por 72 horas e armazenada a - 18 °C.

2.3. Procedimentos de extração e fracionamento

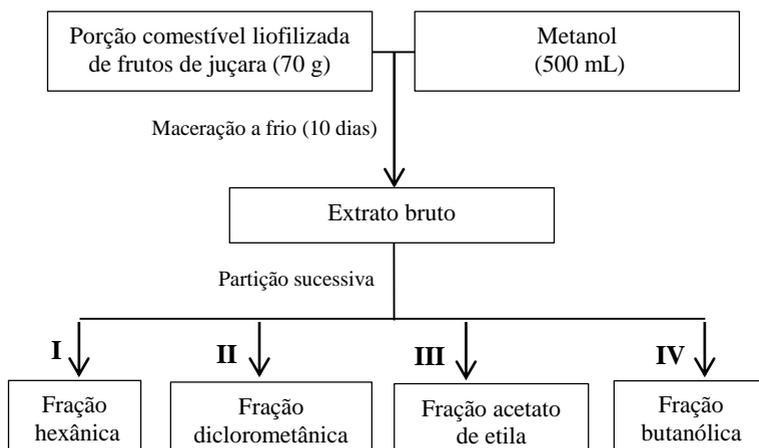
O preparo dos extratos brutos foi realizado por maceração a frio ($4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, na ausência de luz) da porção comestível liofilizada dos frutos de juçara durante 10 dias de acordo com Cechinel Filho e Yunes (1998). Foram utilizados 70 g de porção comestível liofilizada e 500 mL de metanol. Após o período de maceração, os extratos foram filtrados com papel filtro Whatman n° 1 (Millipore, MA, EUA).

Posteriormente, ao extrato metanólico bruto (10 mL) foram acrescentados 10 mL de água e então submetidos à partição sucessiva com 10 mL de solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 1). Cada fração foi centrifugada a 1010 g por 10 minutos (Fanem 280R, São Paulo, Brasil) e o resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição. Os sobrenadantes de cada fração foram combinados, rotaevaporados até completa secagem (Fisatom 802, São Paulo, Brasil) e o extrato residual suspenso em metanol, transferido para criotubos, seco com nitrogênio, liofilizado por 48 horas e armazenado a - 18 °C.

Para a determinação dos compostos fenólicos individuais, das antocianinas monoméricas totais e da capacidade antioxidante *in vitro*, 0,05 g do extrato bruto e das frações de acetato de etila e butanol foram solubilizadas em metanol. Para as frações hexânica e diclorometânica, 0,03 g das mesmas foram desengorduradas a partir de uma partição líquido-líquido com 500 µL de hexano e 600 µL de metanol:água (60:40), que consistiu em três ciclos de agitação em vórtex (3 minutos) e centrifugação ($4\text{ °C} / 3500\text{ g} / 10\text{ minutos}$). Após, a fração gordurosa foi removida e o restante submetido à secagem com nitrogênio (WANG *et al.*, 2017). Para injeção no sistema LC-ESI-MS/MS, todos os extratos foram diluídos em metanol:água (30:70).

Para a realização dos ensaios com as células HT22, 0,03 g do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, de acetato de etila e butanólica foram solubilizadas em DMSO para diluições posteriores.

Figura 1. Processo de extração e fracionamento dos compostos fenólicos dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.).



Fonte: Próprio autor (2018).

2.4. Determinação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato bruto e nas frações hexânica, diclorometânica, de acetato de etila e butanólica foram realizadas de acordo com Schulz *et al.* (2015) conforme descrito no item 2.5 do Capítulo 2. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca.

2.5. Determinação das antocianinas monoméricas totais

As antocianinas monoméricas totais (AMT) do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, de acetato de etila e butanólica foram determinadas aplicando o método diferencial de pH proposto por Giusti e Wrolstad (2001). Alíquotas de 0,2 mL dos extratos diluídos foram adicionadas de 1,8 mL de solução tampão cloreto de potássio $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) e acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5), separadamente, com absorvâncias medidas após 10 minutos em ausência de luz nos comprimentos de onda 515 e 700 nm. O conteúdo de AMT foi calculado como segue:

$$AMT = \frac{A \times MM \times FD \times 100}{\epsilon}$$

Sendo A = absorvância ($A_{515} - A_{700}$) pH 1.0 - ($A_{515} - A_{700}$) pH 4,5; MM = massa molecular da cianidina 3-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹); FD = fator de diluição; e ϵ = absorvidade molar de cianidina 3-glicosídeo (26900 mol L⁻¹). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g⁻¹ de extrato ou fração em matéria seca.

2.6. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações hexânica, diclorometânica, de acetato de etila e butanólica foi determinada pelos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro (FRAP) conforme descrito no item 2.6 do Capítulo 2. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico 100 g⁻¹ de extrato ou fração em matéria seca.

2.7. Avaliação do efeito neuroprotetor

2.7.1. Protocolo experimental

As células hipocampais derivadas de camundongos (HT22) foram cultivadas com meio de cultura DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂.

A cada vez que atingiam uma confluência de 70 a 80 %, as células eram ressuspensas e repassadas a uma nova placa de 10 mL ou semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 3500 células por poço para realização dos experimentos de viabilidade celular. Para os experimentos foram utilizadas células entre as passagens 4 e 10, sendo que após a 10^a as células eram descartadas e um novo frasco de células criopreservadas era descongelado.

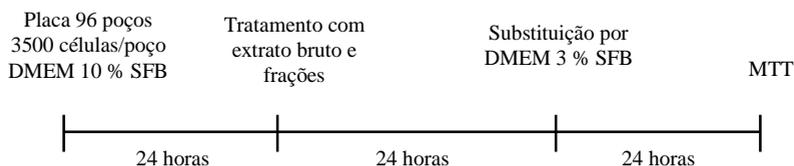
Primeiramente, a fim de verificar a toxicidade, o extrato bruto e as frações foram dissolvidos em DMSO e as células HT22 foram tratadas durante 48 horas com as concentrações de 0; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µg mL⁻¹ de extrato bruto ou fração. Nas 24 horas finais o meio foi trocado para

DMEM suplementado com 3% de SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Figura 2).

Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações de glutamato (1, 3, 5 e 10 mmol L⁻¹) para determinar a concentração do mesmo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) (Figura 3).

Para avaliação da atividade protetora, as células HT22 foram tratadas com o extrato bruto e frações nas concentrações de 0, 1 e 10 µg mL⁻¹ 24h antes da adição do glutamato (pré-tratamento) (Figura 4), e também avaliou-se a adição dos extratos e do glutamato ao mesmo tempo (co-tratamento) (Figura 5). Nas 24 horas finais de ambos os tratamentos o meio foi trocado para DMEM suplementado com 3 % de SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

Figura 2. Desenho experimental para avaliação da toxicidade do extrato bruto e das frações de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.).



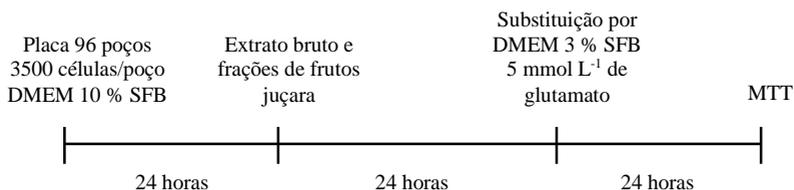
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 3. Desenho experimental para avaliação da toxicidade do glutamato.



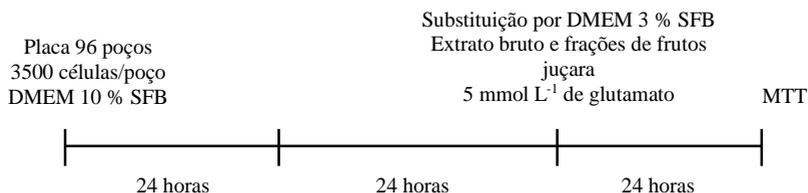
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 4. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato bruto e das frações de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) frente à toxicidade glutamatérgica (pré-tratamento).



Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 5. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor do extrato bruto e das frações de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) frente à toxicidade glutamatérgica (co-tratamento).



Fonte: Próprio autor (2018).

2.7.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células HT22 foi avaliada a partir do ensaio de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium (MTT) de acordo com Mosmann (1983). Este ensaio avalia a função mitocondrial, no qual o MTT é convertido a um sal de formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais, sendo esta reação uma medida da capacidade metabólica das frações mitocondriais. Quanto menor a capacidade metabólica, menor será a viabilidade mitocondrial.

Após a realização dos tratamentos descritos no item anterior, o meio foi removido e 100 µL de MTT 0,5 mg mL⁻¹ foram adicionados a cada poço e as placas mantidas a 37 °C por 1 h. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e foram adicionados 100 µL de DMSO e uma nova incubação foi realizada (37 °C por 30 minutos). As placas foram então submetidas à leitura espectrofotométrica a 540 nm em Multileitora

Spectramax Paradigm (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e a porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células não tratadas).

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para verificar diferenças significativas entre as médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Tukey, quando apropriado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o *software* Statistica 13.0 e os gráficos foram construídos utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos fenólicos do extrato bruto e das frações obtidas de frutos de juçara

Solventes com diferentes polaridades foram utilizados no presente trabalho visando uma semipurificação dos compostos dos frutos de juçara. O intuito é localizar princípios ativos que apresentem efeitos biológicos de interesse para posteriormente submetê-los ao isolamento e purificação de compostos (CECHINEL; YUNES, 1998).

Os compostos fenólicos encontrados no extrato bruto e nas diferentes frações obtidas dos frutos de juçara coletados nas cidades de Florianópolis e Pomerode estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Dos 47 compostos fenólicos avaliados por LC-ESI-MS/MS, foram quantificados 26 compostos, sendo 10 ácidos fenólicos, 11 flavonoides, quatro aldeídos fenólicos e um estilbeno. Informações sobre íon precursor, íon quantitativo e tempo de retenção desses compostos estão apresentadas na Tabela 3, enquanto que as estruturas químicas estão no Apêndice B.

Os compostos encontrados nas maiores concentrações foram ácido vanílico, quercetina, aromadendrina, siringaldeído e rutina. Com exceção do siringaldeído, esse resultado corrobora com outros estudos que também avaliavam a composição fenólica de frutos de juçara (SCHULZ *et al.* 2015; SCHULZ *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017).

Considerando os dados apresentados na revisão bibliográfica deste trabalho (Tabela 4, págs. 47 e 48), além do siringaldeído, são

descritos pela primeira vez para frutos de juçara os seguintes compostos fenólicos: ácido 4-aminobenzoico, ácido salicílico, ácido cinâmico, eriodictiol, naringenina, coniferaldeído e sinapaldeído. Os principais fatores relacionados às diferenças na composição fenólica dos frutos de juçara observadas entre os trabalhos são os locais e as épocas de coleta dos frutos, bem como os compostos que são investigados em cada estudo.

A fração diclorometânica foi a que apresentou o maior número de compostos quantificados (25), seguida da fração hexânica (22), extrato bruto (16), fração acetato de etila (15) e fração butanólica (7). A fração diclorometânica apresentou também o maior valor obtido pela soma dos fenólicos quantificados, enquanto que a fração hexânica apresentou o menor valor (Tabelas 1 e 2).

Alguns compostos foram encontrados apenas nas frações hexânica e diclorometânica. Os ácidos 4-aminobenzoico, salicílico e siríngico, além do siringaldeído e sinapaldeído, foram quantificados apenas na fração diclorometânica. Foram quantificados apenas nas frações hexânica e diclorometânica os ácidos cinâmico, ferúlico, *p*-cumárico; os flavonoides apigenina, eriodictiol e naringenina; e o aldeído fenólico vanilina.

De maneira geral, os compostos fenólicos estudados apresentaram as maiores concentrações nas frações diclorometânica e acetato de etila em ambas as amostras ($p < 0,05$) (Tabelas 1 e 2). O ácido vanílico foi o principal composto encontrado na fração diclorometânica (até 1147,90 $\mu\text{g g}^{-1}$ em matéria seca), seguido pelo siringaldeído (até 338,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ em matéria seca). Na fração acetato de etila, os flavonoides quercetina, aromadendrina e rutina foram destaque, os quais apresentaram concentrações de até 376,37; 358,99; e 280,63 $\mu\text{g g}^{-1}$ (em matéria seca). O extrato bruto apresentou como compostos majoritários o ácido vanílico, a quercetina e a rutina, com valores de até 1425,90; 239,90; e 317,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ (em matéria seca), respectivamente. A rutina foi também o composto majoritário na fração butanólica, na qual apresentou até 194,65 $\mu\text{g g}^{-1}$ (em matéria seca). Na fração hexânica, se destacaram o ácido vanílico e a quercetina com concentrações de até 10,69 e 6,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ (em matéria seca), respectivamente.

Em relação aos teores de antocianinas monoméricas totais (Tabelas 1 e 2), foi observado uma grande variação entre os extratos avaliados, com valores variando de 0 a 366,04 mg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo 100 g^{-1} (em matéria seca). Não foram detectadas antocianinas nas frações hexânica e diclorometânica. Em contrapartida, foi observado maiores concentrações na fração butanólica, com valores

de 258,28 mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1} (em matéria seca) para a amostra de Florianópolis e 366,04 mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1} (em matéria seca) para a amostra de Pomerode. Nos frutos de juçara coletados em Florianópolis, a fração acetato de etila não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada com a fração butanólica. Isso ocorre devido à polaridade das antocianinas, as quais são preferencialmente extraídas por solventes orgânicos mais polares (CECHINEL; YUNES, 1998). Outros estudos também avaliaram antocianinas monoméricas totais com solventes de diferentes polaridades e encontraram maiores teores na fração butanólica obtida de matrizes vegetais como uva (*Vitis rotundifolia*) (YOU *et al.*, 2012) e variedades de milho crioulo pigmentadas (KUHNNEN *et al.*, 2011).

Tabela 1. Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Florianópolis, SC. (continua)

Compostos	Extrato bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração acetato de etila	Fração butanólica
Ácidos fenólicos					
4-Aminobenzoico	<LD	<LD	$57,60 \pm 2,75^a$	<LD	<LD
Cinâmico	<LD	$0,14 \pm 0,002^b$	$2,80 \pm 0,37^a$	<LD	<LD
Clorogênico	$5,32 \pm 0,07^b$	$0,35 \pm 0,02^e$	$1,51 \pm 0,22^d$	$14,44 \pm 0,46^a$	$3,22 \pm 0,04^c$
Ferúlico	<LD	$0,37 \pm 0,01^b$	$65,26 \pm 9,06^a$	<LQ	<LD
<i>p</i> -Cumárico	<LD	$0,41 \pm 0,05^b$	$3,89 \pm 0,10^a$	<LD	<LD
Gálico	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Protocatecuico	$80,10 \pm 9,17^a$	$0,79 \pm 0,009^c$	$92,81 \pm 6,32^a$	$109,69 \pm 15,06^a$	$27,70 \pm 0,79^b$
Salicílico	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Sinápico	$40,20 \pm 1,19^b$	$0,21 \pm 0,009^c$	$97,81 \pm 6,52^a$	$5,90 \pm 0,33^c$	<LD
Siríngico	<LD	<LD	$37,58 \pm 1,67^a$	$4,03 \pm 0,40^b$	<LD
Vanílico	$1425,9 \pm 11,20^a$	$10,69 \pm 0,87^b$	$1147,90 \pm 93,48^a$	$234,27 \pm 6,68^b$	$42,19 \pm 1,86^b$
Flavonoides					
Apigenina	<LD	$0,03 \pm 0,004^b$	$1,81 \pm 0,08^a$	<LD	<LD
Aromadendrina	$49,49 \pm 2,53^b$	$1,48 \pm 0,09^c$	$50,85 \pm 2,35^b$	$174,27 \pm 4,50^a$	<LD
Catequina	$185,01 \pm 19,56^a$	$2,56 \pm 0,22^c$	$36,41 \pm 1,05^b$	<LD	$35,54 \pm 0,18^b$
Epicatequina	$41,92 \pm 5,02^b$	$0,67 \pm 0,04^c$	$5,55 \pm 0,50^c$	$188,48 \pm 9,44^a$	$5,36 \pm 0,67^c$
Eriodictiol	<LD	$0,04 \pm 0,001^b$	$0,84 \pm 0,01^a$	<LQ	<LD
Galangina	$5,27 \pm 0,23^a$	$0,05 \pm 0,001^c$	$1,91 \pm 0,13^b$	<LQ	<LD

Tabela 1. Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Florianópolis, SC. (conclusão)

Compostos	Extrato bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração acetato de etila	Fração butanólica
Isoquercetrina	2,18 ± 0,11 ^b	0,08 ± 0,003 ^c	<LD	17,77 ± 0,47 ^a	<LD
Naringenina	<LD	0,02 ± 0,0002 ^b	1,03 ± 0,05 ^a	<LD	<LD
Quercetina	239,90 ± 44,25 ^b	5,37 ± 0,44 ^c	32,45 ± 2,14 ^c	376,37 ± 20,21 ^a	<LQ
Rutina	309,51 ± 33,80 ^a	1,71 ± 0,09 ^c	2,57 ± 0,11 ^c	229,45 ± 5,92 ^b	194,65 ± 15,27 ^b
Taxifolina	9,02 ± 0,79 ^a	0,19 ± 0,01 ^c	4,24 ± 0,25 ^b	10,19 ± 1,04 ^a	<LD
Aldeídos fenólicos					
Coniferaldeído	144,10 ± 1,30 ^a	0,91 ± 0,06 ^c	53,42 ± 3,58 ^b	<LD	<LD
Sinapaldeído	<LD	<LD	0,43 ± 0,02 ^a	<LD	<LD
Siringaldeído	<LD	<LQ	220,08 ± 14,42 ^a	<LD	<LD
Vanilina	<LD	0,21 ± 0,02 ^b	74,53 ± 0,01 ^a	<LD	<LD
Estilbeno					
Resveratrol	16,23 ± 1,44 ^b	0,13 ± 0,006 ^d	3,99 ± 0,26 ^c	40,77 ± 0,42 ^a	<LD
Soma	2554,09	26,66	2022,76	1446,83	308,65
AMT*	176,79 ± 15,59 ^b	ND	ND	252,82 ± 0,84 ^a	258,28 ± 067 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). ND: não detectado. LD: limite de detecção. LQ: limite de quantificação. ^{a-e}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). AMT: Antocianinas monoméricas totais. *Valores expressos em mg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo 100 g^{-1} de extrato ou fração em matéria seca.

Fonte: Próprio autor (2018).

Tabela 2. Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Pomerode, SC. (continua)

Compostos	Extrato bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração acetato de etila	Fração butanólica
Ácidos fenólicos					
4-Aminobenzoico	<LD	<LD	59,78 \pm 6,41 ^a	<LD	<LD
Cinâmico	<LD	0,47 \pm 0,009 ^b	5,34 \pm 0,62 ^a	<LD	<LD
Clorogênico	1,28 \pm 0,008 ^b	0,05 \pm 0,007 ^b	0,90 \pm 0,07 ^b	<LQ	10,00 \pm 0,12 ^a
Ferúlico	<LD	0,26 \pm 0,02 ^c	52,56 \pm 2,05 ^a	11,27 \pm 0,75 ^b	<LD
<i>p</i> -Cumárico	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Gálico	<LD	0,28 \pm 0,02 ^{bc}	6,33 \pm 0,80 ^b	47,36 \pm 3,41 ^a	ND
Protocatecuico	66,02 \pm 4,49 ^b	0,88 \pm 0,04 ^d	11,18 \pm 0,14 ^{cd}	203,89 \pm 27,57 ^a	58,04 \pm 0,51 ^{bc}
Salicílico	<LD	<LD	2,66 \pm 0,40 ^a	<LD	<LD
Sinápico	<LD	0,18 \pm 0,01 ^c	21,23 \pm 0,11 ^a	10,29 \pm 1,82 ^b	<LD
Siríngico	<LD	<LD	32,88 \pm 1,99 ^a	<LD	<LD
Vanílico	148,04 \pm 1,21 ^c	7,58 \pm 1,27 ^d	1060,18 \pm 30,78 ^a	224,02 \pm 19,37 ^b	39,85 \pm 4,55 ^d
Flavonoides					
Apigenina	3,01 \pm 0,26 ^a	0,18 \pm 0,01 ^c	2,04 \pm 0,02 ^b	<LD	<LD
Aromadendrina	149,02 \pm 3,41 ^b	3,35 \pm 0,11 ^d	69,68 \pm 7,80 ^c	358,99 \pm 25,43 ^a	<LD
Catequina	17,79 \pm 0,65 ^b	0,14 \pm 0,01 ^c	0,46 \pm 0,05 ^c	104,5 \pm 5,86 ^a	16,98 \pm 1,77 ^b
Epicatequina	3,60 \pm 0,07 ^c	0,10 \pm 0,05 ^d	<LD	26,93 \pm 0,62 ^a	11,43 \pm 0,81 ^b
Eriodictiol	<LD	0,07 \pm 0,006 ^c	1,02 \pm 0,05 ^b	1,87 \pm 0,16 ^a	<LD
Galangina	16,12 \pm 1,26 ^a	<LD	2,31 \pm 0,14 ^c	4,01 \pm 1,57 ^b	<LD
Hispidulina	42,17 \pm 6,88 ^a	1,04 \pm 0,009 ^c	16,76 \pm 1,56 ^b	<LD	<LD

Tabela 2. Compostos fenólicos do extrato bruto e das diferentes frações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato ou fração em matéria seca) obtidos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius) de Pomerode, SC. (conclusão)

Compostos	Extrato bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração acetato de etila	Fração butanólica
Isoquercetrina	24,77 \pm 1,12 ^b	0,51 \pm 0,03 ^c	<LD	75,94 \pm 11,35 ^a	<LD
Naringenina	5,49 \pm 0,36 ^a	0,14 \pm 0,003 ^c	1,53 \pm 0,07 ^b	<LD	<LD
Quercetina	239,67 \pm 15,98 ^a	6,76 \pm 0,60 ^c	48,37 \pm 0,27 ^b	262,76 \pm 11,94 ^a	48,53 \pm 5,00 ^b
Rutina	317,20 \pm 34,81 ^a	3,18 \pm 0,32 ^c	1,41 \pm 0,14 ^c	280,63 \pm 28,65 ^a	139,76 \pm 10,69 ^b
Taxifolina	4,35 \pm 0,50 ^b	0,13 \pm 0,002 ^d	2,82 \pm 0,39 ^c	10,90 \pm 0,29 ^a	ND
Aldeídos fenólicos					
Coniferaldeído	99,77 \pm 1,86 ^a	1,30 \pm 0,15 ^c	17,32 \pm 0,36 ^b	<LD	<LD
Sinapaldeído	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Siringaldeído	<LD	<LD	338,00 \pm 19,41 ^a	<LD	<LD
Vanilina	<LD	0,56 \pm 0,04 ^b	5,36 \pm 0,16 ^a	<LD	<LD
Estilbeno					
Resveratrol	68,25 \pm 2,25 ^b	0,76 \pm 0,16 ^d	9,37 \pm 0,60 ^c	113,66 \pm 6,11 ^a	<LD
Soma	1206,55	27,92	1769,48	1737,02	324,59
AMT*	330,30 \pm 0,77 ^c	ND	ND	358,80 \pm 1,00 ^b	366,04 \pm 1,68 ^a

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). ND: não detectado. LD: limite de detecção. LQ: limite de quantificação.

^{a-d}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

AMT: Antocianinas monoméricas totais. *Valores expressos em mg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo 100 g^{-1} de extrato ou fração em matéria seca.

Fonte: Schulz *et al.* (2019).

Tabela 3. Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos compostos fenólicos quantificados no extrato bruto e frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica obtidos dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius). (continua)

Compostos	Íon precursor (m/z) Q1	Íon quantitativo (m/z) Q3	Tempo de retenção (min.)	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Ácido 4-Aminobenzoico	135,8	90,5	10,47	0,036	0,350
Ácido cinâmico	146,8	100,7	11,80	0,025	0,103
Ácido clorogênico	352,8	187,8	9,19	0,003	0,009
Ácido ferúlico	192,8	129,7	10,73	0,004	0,007
Ácido <i>p</i> -cumárico	163,0	119,0	10,46	0,002	0,006
Ácido gálico	168,8	124,1	3,98	0,041	0,069
Ácido protocatecuico	153,0	109,0	6,95	0,017	0,027
Ácido salicílico	136,9	91,1	10,99	0,005	0,014
Ácido sinápico	222,8	161,6	10,87	0,009	0,023
Ácido siríngico	196,8	119,6	10,01	0,010	0,026
Ácido vanílico	166,8	148,5	9,65	0,034	0,067
Apigenina	268,7	114,8	12,62	0,005	0,014
Aromadendrina	286,8	123,9	11,29	0,010	0,044
Catequina	288,8	120,3	8,82	0,005	0,011
Epicatequina	288,9	122,3	9,41	0,003	0,011
Eriodictiol	286,8	132,1	11,85	0,003	0,009

Tabela 3. Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos compostos fenólicos quantificados no extrato bruto e frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica obtidos dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius). (conclusão)

Compostos	Íon precursor (m/z) Q1	Íon quantitativo (m/z) Q3	Tempo de retenção (min.)	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Galangina	268,8	59,9	13,44	0,002	0,006
Hispidulina	298,8	282,7	12,12	0,002	0,012
Isoquercetrina	462,9	297,3	10,83	0,002	0,008
Naringenina	270,8	150,2	12,37	0,005	0,016
Quercetina	301,0	149,3	10,84	0,062	0,201
Rutina	609,1	301,0	10,72	0,005	0,016
Taxifolina	302,8	120,7	10,70	0,004	0,019
Coniferaldeído	176,8	160,3	11,31	0,001	0,005
Sinapaldeído	206,9	174,4	11,39	0,006	0,015
Siringaldeído	180,8	163,1	10,76	0,016	0,066
Vanilina	150,8	132,8	10,42	0,029	0,083
Resveratrol	226,8	181,6	11,14	0,008	0,029

D: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação.

Fonte: Próprio autor (2018).

3.2. Capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações obtidas de frutos de juçara

A capacidade antioxidante, avaliada pelo sequestro do radical DPPH e pelo poder redutor do ferro (FRAP), do extrato bruto e das frações obtidos de frutos de juçara de Florianópolis e Pomerode está apresentada nas Figuras 6 e 7.

Foram escolhidos dois ensaios para avaliar a capacidade antioxidante, visto que os diferentes compostos podem apresentar comportamento distinto nos diferentes ensaios, considerando que cada metodologia tem condições experimentais e mecanismos de reação específicos (MA *et al.*, 2011; KAMILOGLU *et al.*, 2015).

O método DPPH é aplicado para determinar a capacidade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em sequestrar o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o qual é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta (SHAHIDI; ZHONG, 2015). O ensaio é baseado na doação de elétron de antioxidantes para neutralizar o radical DPPH e a capacidade antioxidante é avaliada pelo monitoramento do decaimento da absorbância (SAEED; KHAN; SHABBIR, 2012).

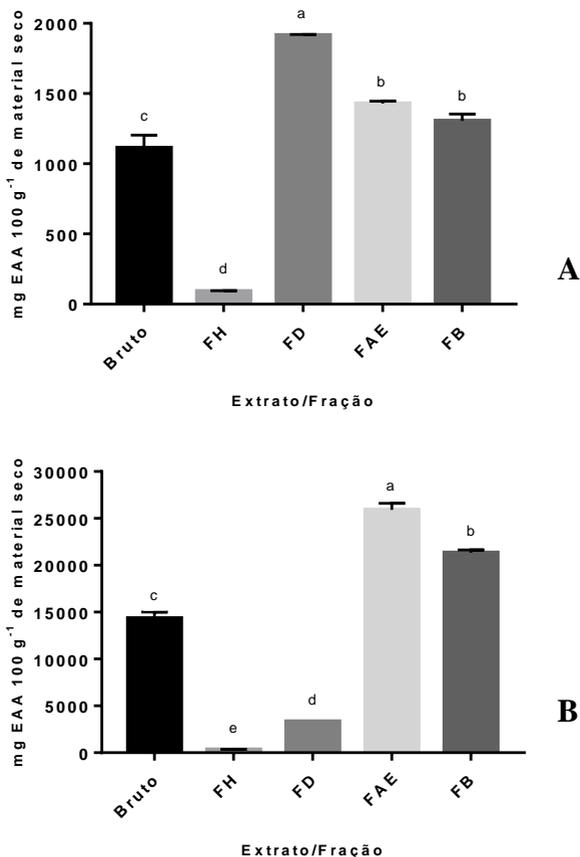
A capacidade antioxidante pode ser determinada também a partir do poder redutor dos compostos. Nesse contexto, no método FRAP o complexo férrico-tripiridiltriiazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPTZ), na presença de compostos antioxidantes e em condições ácidas. O complexo formado por essa reação possui uma coloração azul intensa, a qual é quantificada espectrofotometricamente e indica o poder redutor do composto ou extrato testado (MAGALHÃES *et al.*, 2008; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

No ensaio DPPH os valores variaram de 32,58 a 7325,26 mg equivalentes a ácido ascórbico (EAA) 100 g^{-1} (em matéria seca). A amostra de Pomerode apresentou valores superiores àqueles obtidos para a amostra de Florianópolis. No entanto, em ambas as amostras a fração diclorometânica e a fração hexânica apresentaram, respectivamente, a maior e a menor capacidade de sequestro do radical DPPH (Figuras 6a e 7a).

No ensaio FRAP os valores foram de 86,58 a 42676,00 mg EAA 100 g^{-1} (em matéria seca). Assim como ocorreu para o ensaio DPPH, a amostra de Pomerode apresentou maiores valores quando comparada à amostra de Florianópolis. Neste ensaio a fração hexânica também apresentou a menor capacidade antioxidante, no entanto, foi seguida pela

fração diclorometânica. Foram as frações butanólica e acetato de etila que apresentaram maior poder redutor de ferro (Figuras 6b e 7b).

Figura 6. Capacidade antioxidante (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} em matéria seca) determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP do extrato bruto e frações obtidos de frutos de juçara de Florianópolis, SC.



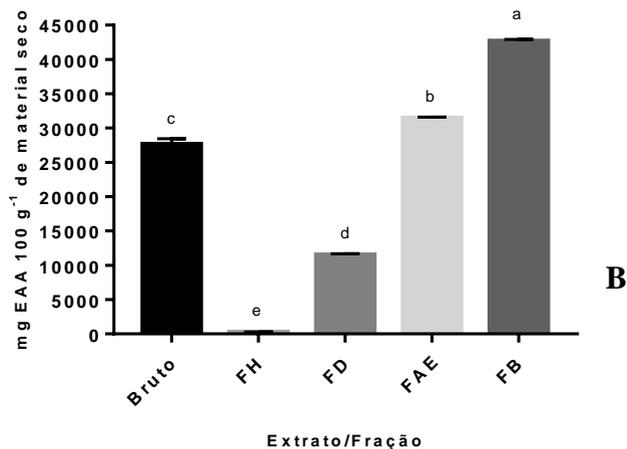
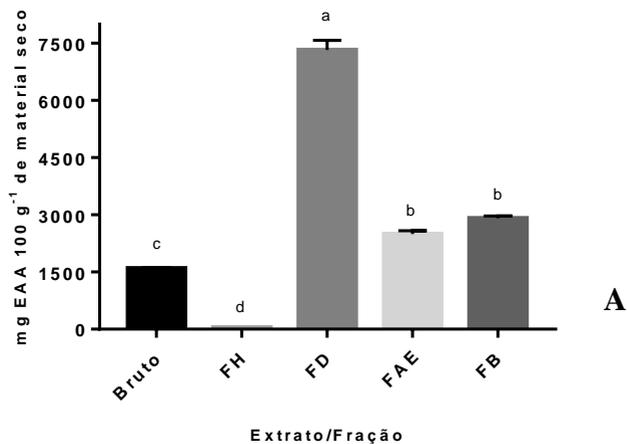
FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica; FAE: fração acetato de etila; FB: Fração butanólica.

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$).

^{a-e} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 7. Capacidade antioxidante (mg equivalentes a ácido ascórbico 100 g^{-1} em matéria seca) determinada pelos ensaios (A) DPPH e (B) FRAP do extrato bruto e frações obtidos de frutos de juçara de Pomerode, SC.



FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica; FAE: fração acetato de etila; FB: Fração butanólica.

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$).

^{a-e} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

Fonte: Schulz *et al.* (2019).

A estrutura dos compostos fenólicos é fator determinante da sua capacidade antioxidante. Por exemplo, para os ácidos fenólicos a atividade antioxidante depende do número e posições dos grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. A atividade antioxidante desses compostos aumenta quanto maior o grau de hidroxilação (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010) e quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4 (SOARES, 2002). Além disso, a dupla ligação presente nos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico contribui com uma maior capacidade antioxidante, pois participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). No caso dos flavonoides, as características estruturais que definem o potencial antioxidante são um anel B dihidroxilado, a presença de instauração no anel em C e a presença de uma função 4-oxo no anel C (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Considerando as características estruturais, sugere-se que a maior capacidade antioxidante observada na amostra de Pomerode pode estar relacionada aos maiores teores, na maioria dos extratos, dos ácidos fenólicos gálico e protocatecuico, os quais apresentam maior número de hidroxilas entre os ácidos fenólicos quantificados e hidroxilas nas posições 3 e 4 (Apêndice B). Maiores concentrações dos flavonoides isoquercitrina, rutina e quercetina, os quais são os únicos entre os compostos quantificados que apresentam as três características estruturais descritas anteriormente (Apêndice B), também pode ter influenciado no maior potencial antioxidante da amostra de Pomerode quando comparada à amostra de Florianópolis. Adicionalmente, compostos como resveratrol, apigenina, galangina, eriodictiol, aromadendrina, naringenina, ácido cinâmico e siringaldeído apresentaram maiores concentrações na maioria dos extratos da amostra de Pomerode (Tabelas 1 e 2).

A maior capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP observada nas frações acetato de etila e butanólica (Figuras 6b e 7b) pode estar associada às maiores concentrações de antocianinas nesses extratos, especialmente na fração butanólica, visto que esta apresentou a menor soma dos fenólicos individuais em relação às outras frações nas quais também foram quantificadas antocianinas (Tabelas 1 e 2). Em contrapartida, a maior capacidade de sequestro do radical DPPH observada para a fração diclorometânica (Figuras 6a e 7a) pode ser resultante do maior número de compostos fenólicos não-antociânicos encontrados nessa fração (Tabelas 1 e 2) e de interações sinérgicas entre esses polifenóis, bem como com outros não avaliados e também com

outros compostos antioxidantes, potencializando capacidade de sequestro do radical DPPH dessa fração (COKLAR; AKBULUT, 2017).

Em concordância com o presente trabalho, as frações butanólica e acetato de etila obtidas a partir do extrato bruto do fruto araticum (*Annona crassiflora*) (JUSTINO *et al.*, 2016) e de cogumelos *Inonotus sanghuang* (LIU *et al.*, 2017) também apresentaram um maior poder redutor do ferro quando comparada às demais frações. De acordo com os autores, o potencial antioxidante das frações do araticum pode estar associado à presença de ácido clorogênico, rutina, quercitrina, icariside II, quercetina e isorhamnetina, enquanto que para os cogumelos se destacam o ácido clorogênico, rutina, quercetina e quercitrina.

Em contrapartida, Im *et al.* (2016) ao avaliarem a capacidade de sequestro do radical DPPH do extrato bruto de berinjela (*Solanum melongena*) e suas frações obtidas com solventes de polaridade crescente, encontrou maior capacidade antioxidante na fração acetato de etila, seguida da fração butanólica, extrato bruto, frações diclorometânica e hexânica. O mesmo resultado para as frações foi observado por De Campos *et al.* (2008) que avaliaram extratos de bagaço de uva Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). Em ambos os estudos, os autores associaram esses resultados à composição fenólica total, visto que a mesma foi maior nas frações com maior capacidade antioxidante. Em goiaba costarriquenha (*Psidium friedrichsthalianum*), Flores *et al.* (2013) também observaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH nas frações mais polares. Os autores sugerem que o maior potencial antioxidante da fração acetato de etila pode estar relacionada à presença de compostos como ácido elágico, miricetina, quercitrina e quercetina nessa fração.

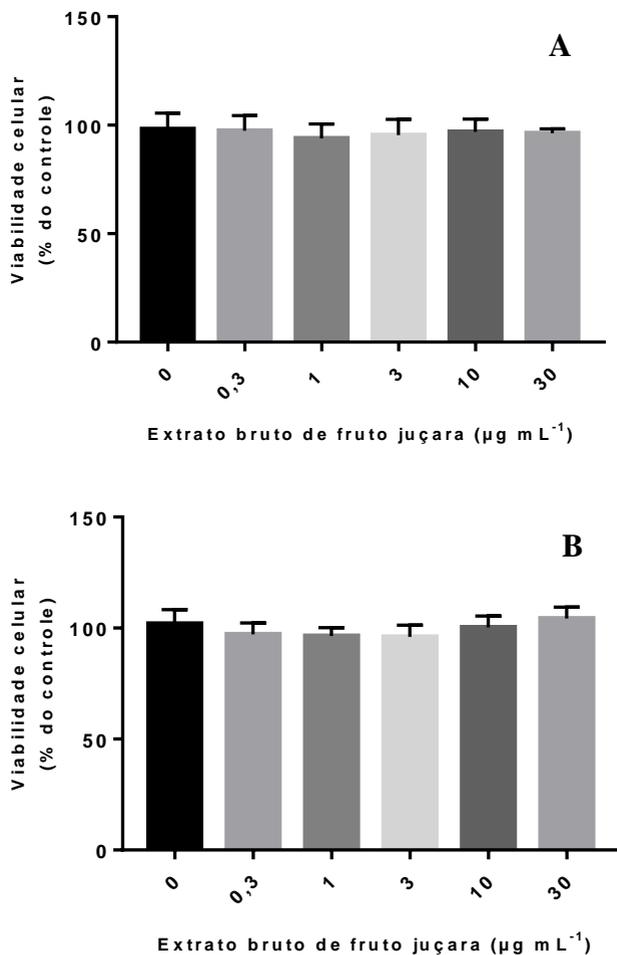
3.3. Toxicidade dos extratos de frutos de juçara em células HT22

Com a finalidade de investigar a possível ocorrência de efeito citotóxico, os extratos brutos e as diferentes frações obtidas das amostras dos frutos de juçara foram testadas sobre as células HT22.

As Figuras 8 a 12 mostram que, as concentrações testadas (0,3, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato bruto e das frações hexânica, de acetato de etila e butanólica de ambas as amostras não diminuíram a viabilidade celular nas células HT22, enquanto que a fração diclorometânica na concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou diferença significativa do

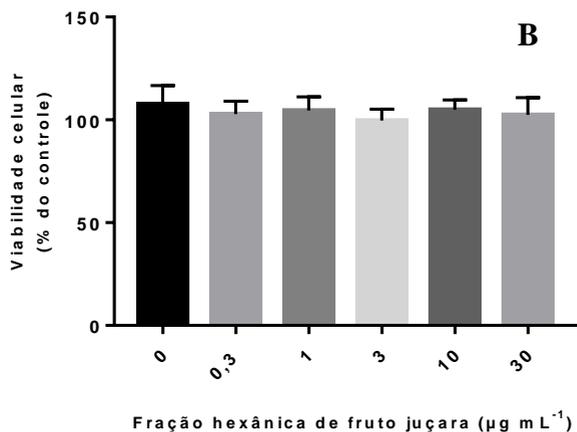
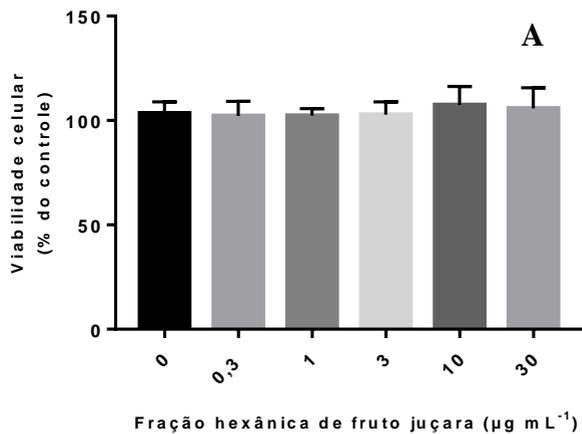
controle ($p = 0,003$ para a amostra de Florianópolis e $p < 0,0001$ para a amostra de Pomerode).

Figura 8. Efeito do extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



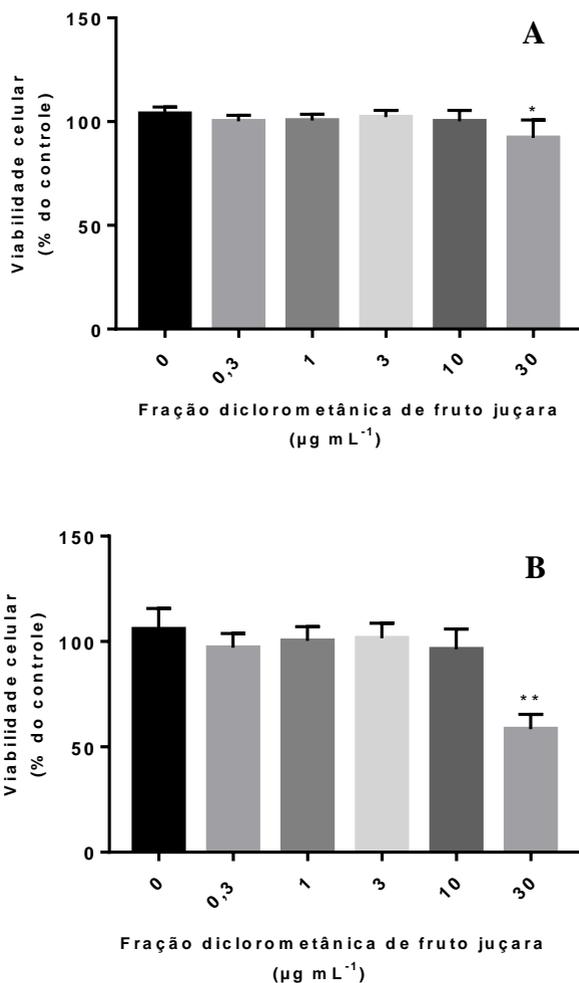
Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). A concentração de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%).
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 9. Efeito da fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



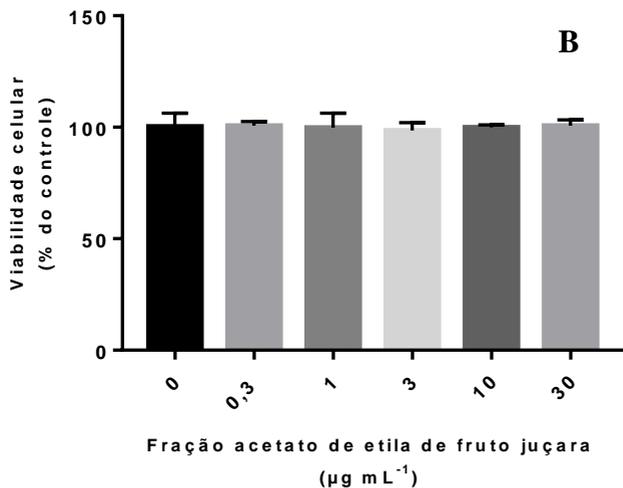
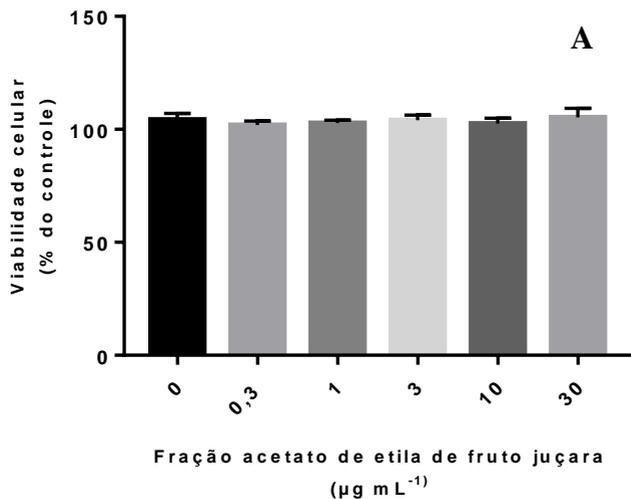
Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). A concentração de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%).
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 10. Efeito da fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



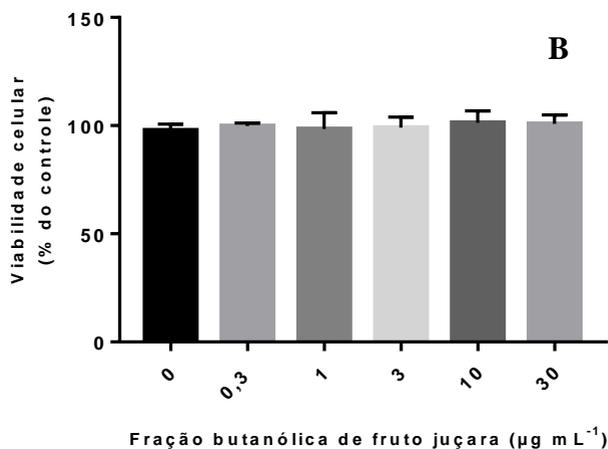
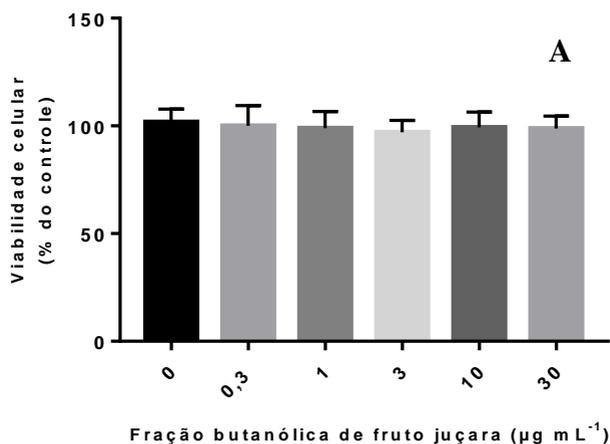
Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). A concentração de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%). * e ** indicam diferença significativa ($p = 0,003$ e $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparado ao grupo tratado somente com DMSO 0,1%.
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 11. Efeito da fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). A concentração de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%).
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 12. Efeito da fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). A concentração de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%).
Fonte: Próprio autor (2018).

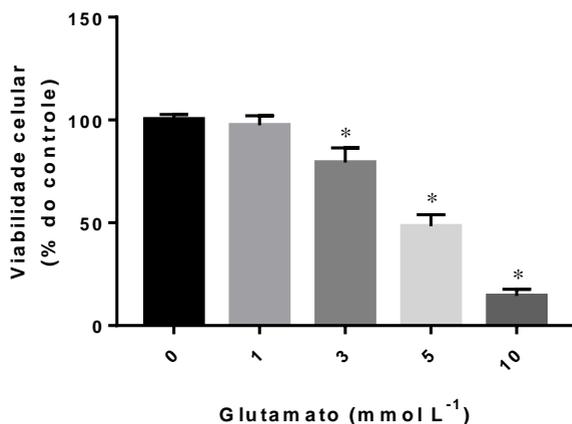
Considerando os resultados obtidos, as concentrações de 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto e das frações foram escolhidas para avaliar o efeito protetor frente à toxicidade glutamatérica.

3.4. Efeito neuroprotetor dos extratos de frutos de juçara em células HT22

A Figura 13 mostra o efeito do glutamato sobre a viabilidade das células HT22. Foram testadas diferentes concentrações de glutamato (1, 3, 5 e 10 mmol L⁻¹) a fim de estabelecer aquela que reduz a viabilidade celular em 50% (IC₅₀). A partir da curva de concentração, o IC₅₀ calculado foi de 4,779 mmol L⁻¹. Portanto, para facilitar a prática experimental, a concentração de 5 mmol L⁻¹ foi escolhida para a realização dos demais experimentos.

Outros estudos que avaliaram efeitos neuroprotetores de extratos vegetais em células HT22 também utilizaram glutamato na concentração de 5 mmol L⁻¹ (KIM *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2014; YANG; SONG, 2014), o que demonstra que este modelo de toxicidade oxidativa possui boa reprodutibilidade.

Figura 13. Efeito de diferentes concentrações de glutamato sobre a viabilidade de células HT22.



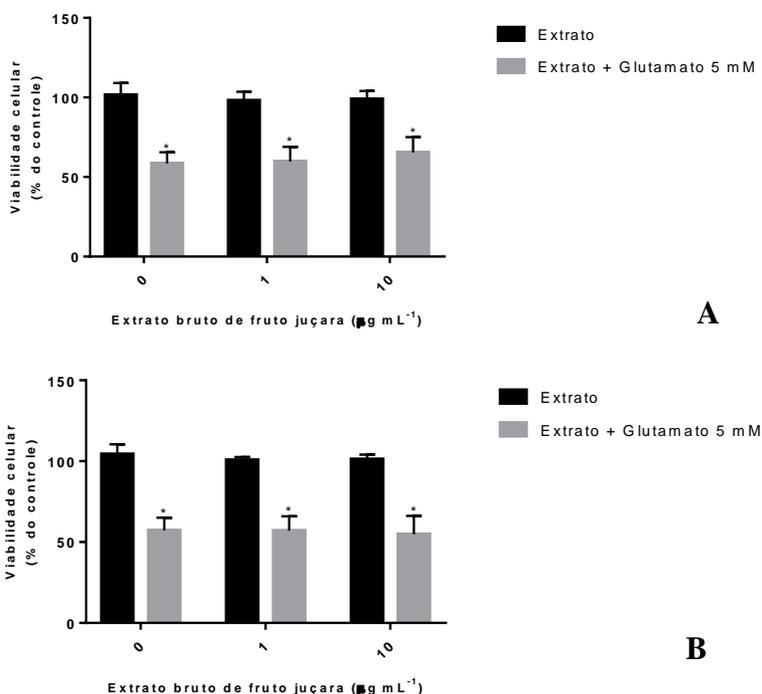
Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n = 5). A concentração de 0 mmol L⁻¹ representa células tratadas com veículo dos compostos (DMSO 0,1%).

* indica diferença significativa quando comparado ao grupo tratado somente com DMSO ($p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

Com o objetivo de investigar a resistência das células HT22 tratadas com o extrato bruto e frações de frutos de juçara e glutamato, foi realizado o pré-tratamento com o extrato bruto e frações 24h antes da exposição ao glutamato. Também foi avaliada a resistência das células co-tratadas com o extrato bruto e frações de juçara e glutamato. Os resultados dos experimentos de pré-tratamento estão apresentados nas Figuras 14 a 18, enquanto que os resultados dos co-tratamentos são mostrados nas Figuras 19 a 23.

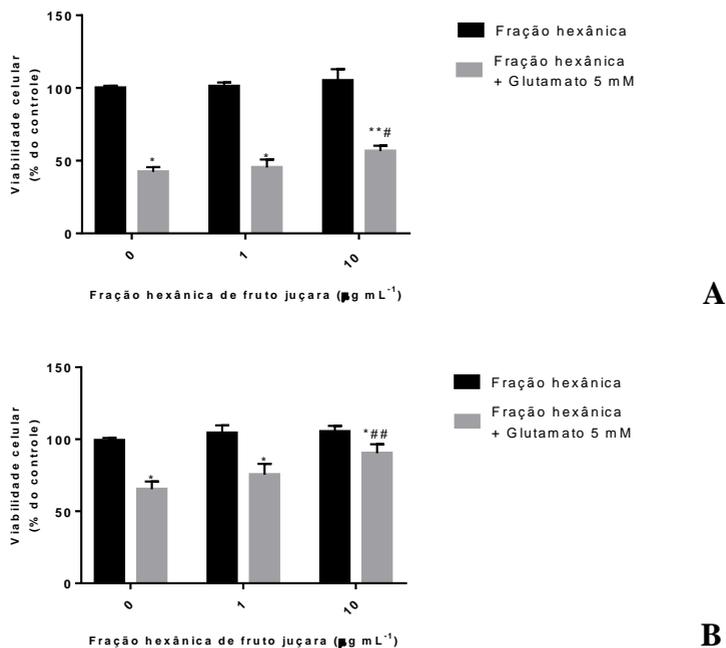
Figura 14. Efeito do pré-tratamento com extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

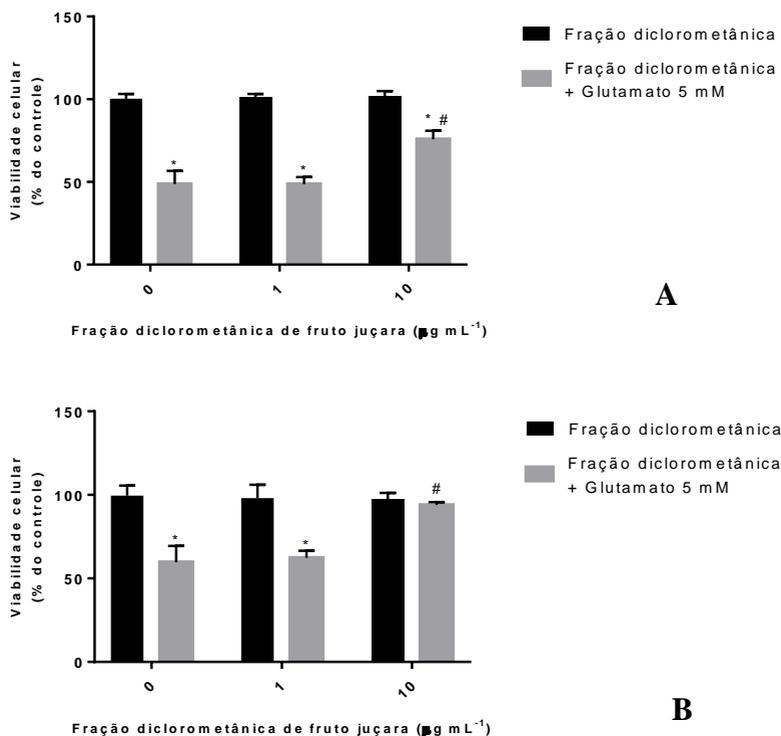
Figura 15. Efeito do pré-tratamento com a fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($*p < 0,004$; $**p = 0,0001$). # indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado somente com o glutamato ($\# p = 0,002$; $## p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

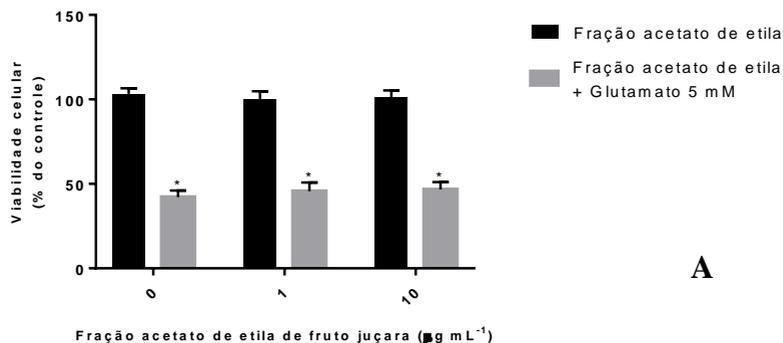
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com a fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



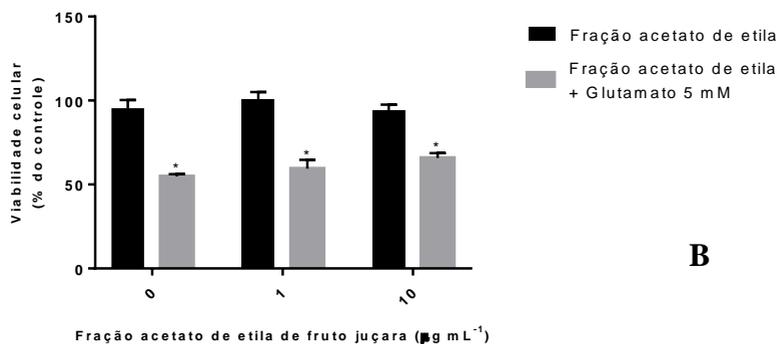
Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,001$). # indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado somente com o glutamato ($p < 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 17. Efeito do pré-tratamento com a fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



A

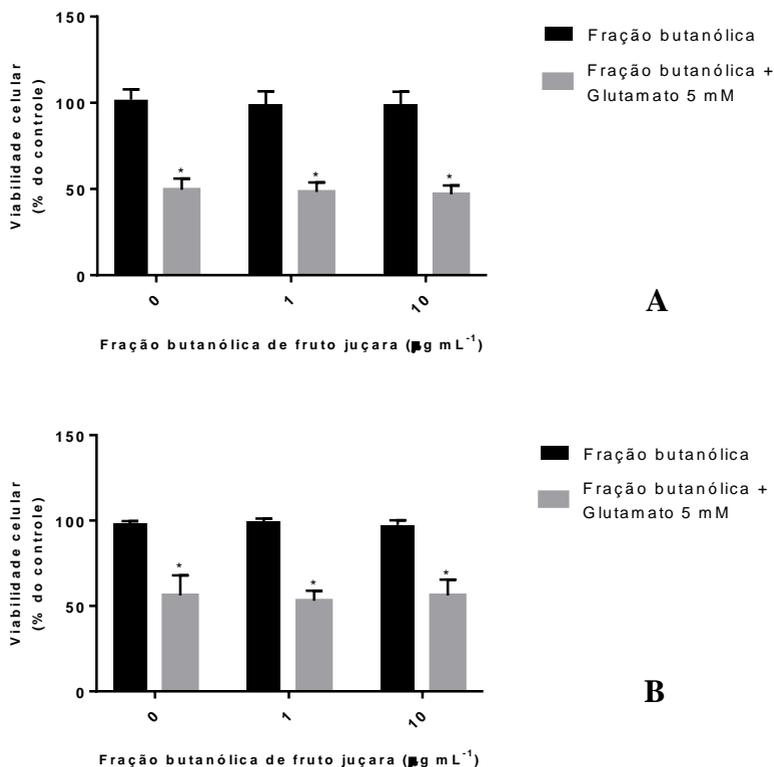


B

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

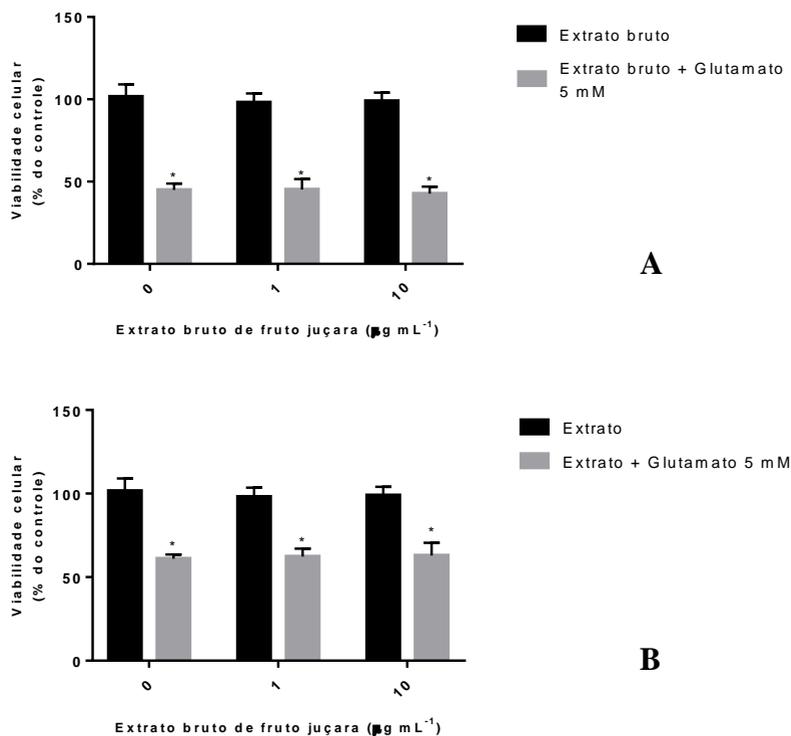
Figura 18. Efeito do pré-tratamento com a fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

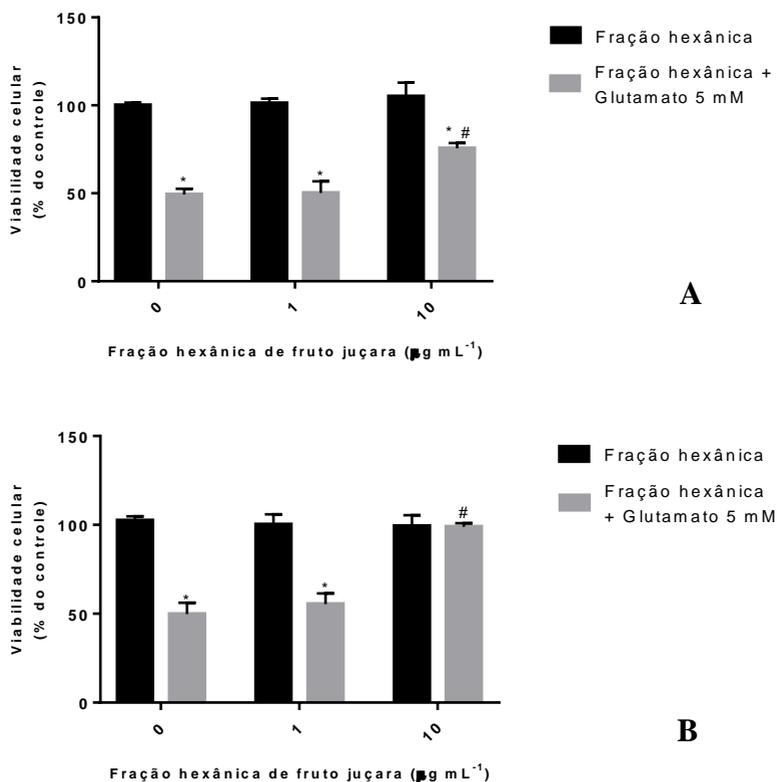
Figura 19. Efeito do co-tratamento com extrato bruto obtido de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

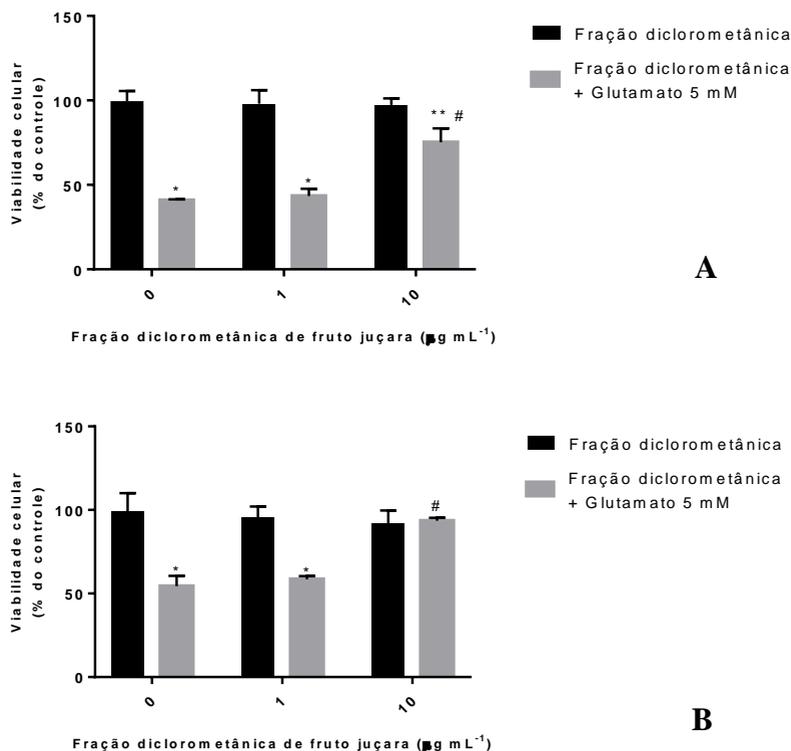
Figura 20. Efeito do co-tratamento com a fração hexânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,0001$). # indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado somente com o glutamato ($p < 0,0001$).

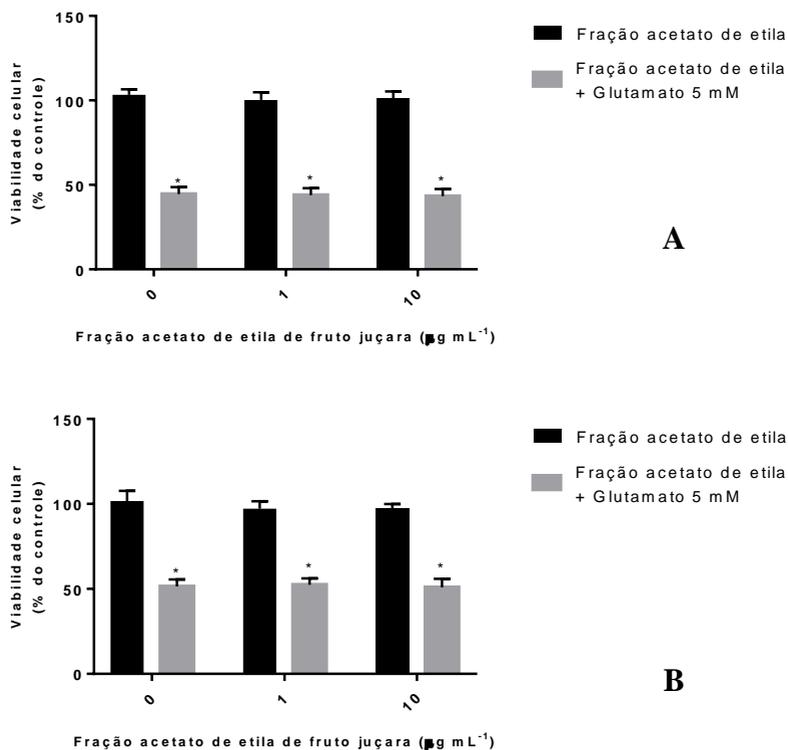
Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 21. Efeito do co-tratamento com a fração diclorometânica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($*p = 0,0001$; $**p = 0,02$). # indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado somente com o glutamato ($p = 0,0002$).
 Fonte: Próprio autor (2018).

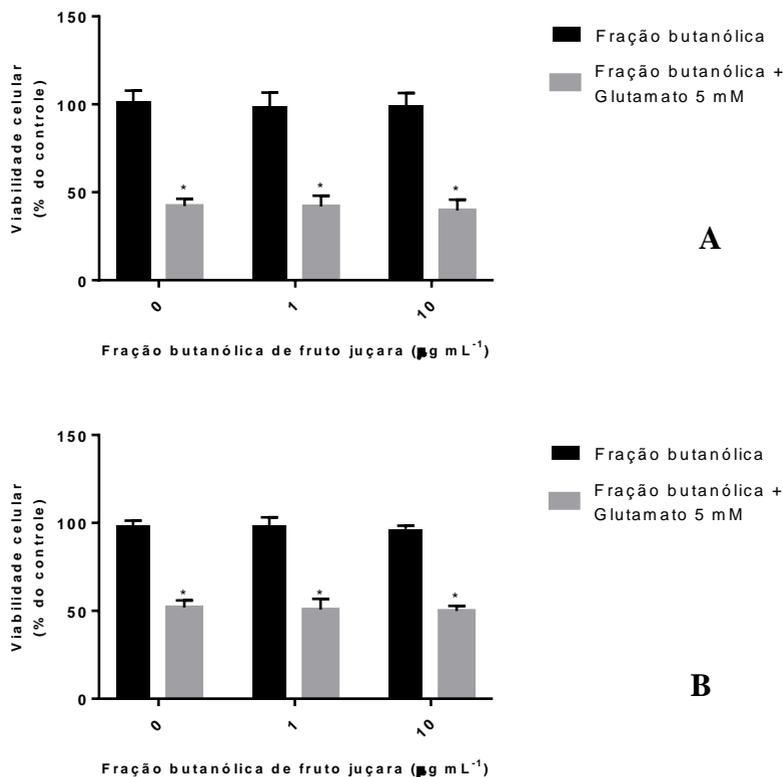
Figura 22. Efeito do co-tratamento com a fração acetato de etila obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 23. Efeito do co-tratamento com a fração butanólica obtida de frutos de juçara de Florianópolis (A) e Pomerode (B) sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5$). * indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com seu respectivo controle ($p < 0,0001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

O tratamento com 5 mmol L^{-1} de glutamato por 24 horas resultou em uma diminuição na viabilidade das células HT22, com valores de 40,88 a 60,26% sobre as células não tratadas (Figuras 14 a 23).

Tanto nos ensaios de pré-tratamento, quanto naqueles de co-tratamento, o teste de post-hoc indicou que na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

¹ o extrato bruto e todas as frações de ambas as amostras falharam em proteger as células da morte induzida pelo glutamato (Figuras 14 a 23). Na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, o extrato bruto e as frações acetato de etila e butanólica também não apresentaram efeitos protetores (Figuras 14 e 19; 17 e 22; 18 e 23, respectivamente).

Em contrapartida, as frações hexânica e diclorometânica de ambas as amostras, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram capazes de proteger as células do dano celular induzido pelo glutamato. A fração diclorometânica da amostra de Pomerode foi capaz de proteger totalmente as células HT22 tanto no pré-tratamento (Figura 16b) quanto no co-tratamento (Figura 21b). O co-tratamento com a fração hexânica da amostra de Pomerode teve o mesmo efeito (Figura 20b), enquanto que o pré-tratamento protegeu parcialmente as células, com viabilidade celular de $90,26 \pm 5,49\%$ (Figura 15b). Para a amostra de Florianópolis, tanto o pré quanto o co-tratamento preveniram parcialmente o dano celular induzido pelo glutamato. A viabilidade celular foi de $93,94 \pm 1,46\%$ e $59,67 \pm 0,43\%$ para o pré-tratamento com as frações diclorometânica (Figura 16a) e hexânica (Figura 15a), respectivamente. No co-tratamento a viabilidade celular foi de $75,18 \pm 7,12\%$ para a fração diclorometânica (Figura 21a) e $75,58 \pm 2,96\%$ para a fração hexânica (Figura 20a).

Esses resultados sugerem que os compostos fenólicos presentes nas frações hexânica e diclorometânica protegem as células HT22 provavelmente, no caso do pré-tratamento, a partir de uma resposta antioxidante intracelular pela indução de fatores de transcrição relacionadas à síntese de enzimas antioxidantes (CHO *et al.*, 2012). Em relação aos resultados de proteção do co-tratamento, podem ter sido resultantes da ação antioxidante direta (ação *scavenger*) (JEONG *et al.*, 2014). No entanto, considerando que um período de 24 horas se passou desde o início do co-tratamento até a realização do teste de viabilidade celular, a indução de fatores de transcrição relacionados à síntese de defesas antioxidantes não pode ser descartada. Estudos adicionais são necessários para elucidar completamente os mecanismos moleculares mediadores da proteção observada.

Esse efeito protetor observado apenas para essas duas frações pode ser associado ao maior número de compostos quantificados e à presença de alguns compostos encontrados apenas nessas frações. Na amostra de Florianópolis, compostos como os ácidos fenólicos 4-aminobenzoico, cinâmico, ferúlico e *p*-cumárico; os flavonoides apigenina, eriodictiol e naringenina; e os aldeídos fenólicos sinapaldeído, siringaldeído e vanilina foram encontrados apenas nas frações hexânica e

diclorometânica (Tabela 1). Na amostra de Pomerode, foram encontrados apenas nessas frações os ácidos fenólicos 4-aminobenzoico, cinâmico, salicílico e siríngico; e os aldeídos fenólicos siringaldeído e vanilina (Tabela 2).

Com exceção do sinpaldeído, efeitos neuroprotetores de forma isolada são relatados na literatura para todos esses compostos encontrados nas frações hexânica e diclorometânica (LOU *et al.*, 2012; BOZKURT *et al.*, 2014; LOU *et al.*, 2014; DHANALAKSHMI *et al.*, 2016; SZWAJGIER; BOROWIEC; PUSTELNIAK, 2017; YUWEI *et al.*, 2017). Além disso, é importante destacar que a neuroproteção de ambas as frações pode também estar relacionada ao efeito da mistura de compostos que conferem um efeito biológico maior, o que é denominado sinergia. Esse efeito sinérgico pode ocorrer a partir de diferentes fenômenos químicos ou bioquímicos, incluindo a degradação de substâncias, associações químicas entre as moléculas, facilitando o transporte pelas células, além de outros fatores ainda obscuros (YUNES; CECHINEL FILHO, 2007; QIN *et al.*, 2018). Por outro lado, dependendo da composição dos extratos e do alvo molecular pode ocorrer o contrário, o efeito biológico pode ser diminuído devido a antagonismos entre os compostos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2007; LUÍS *et al.*, 2018). Sugere-se que esse efeito pode ter ocorrido com o extrato bruto e com as frações acetato de etila e butanólica, visto que a composição dos mesmos incluem fenólicos conhecidos por suas atividades neuroprotetoras, no entanto, falharam na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo glutamato.

Deve-se observar também que a fração hexânica apresentou o menor potencial antioxidante avaliado pelos ensaios DPPH e FRAP. Este fato demonstra que o potencial neuroprotetor dessa fração pode não estar necessariamente relacionado à capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, mas ao bloqueio de uma ou mais etapas envolvidas na oxitose. A oxitose induzida por glutamato envolve a inibição da captação de cistina nas células e, como a cisteína é essencial para a biossíntese da glutatona (GSH), ocorre um declínio nos níveis de GSH intracelular. Assim, há ativação da 12-lipooxigenase (12-LOX), levando ao aumento de ROS, cálcio citosólico na mitocôndria e morte celular. O bloqueio de qualquer um desses passos é suficiente para evitar a morte celular (HIRATA *et al.*, 2018; LEWERENZ *et al.*, 2018).

Além disso, o efeito neuroprotetor da fração hexânica pode estar associado aos ácidos graxos presentes nessa fração como ácido oleico, linoleico e linolênico, os quais são os principais encontrados nos frutos

de juçara (BORGES *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2015). Estudos com modelos celulares e animais têm demonstrado que esses ácidos graxos, em especial o ácido linolênico, podem ter um efeito neuroprotetor a partir da redução do estresse oxidativo de forma indireta, induzindo a ativação da via de sinalização do fator nuclear Nrf2/HO-1 e pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (ALESSANDRINI *et al.*, 2004; AYUSO; GONZALO-GOBERNADO; MONTANER, 2017; KERDILES; LAYÉ; CALON, 2017).

Os resultados obtidos neste estudo destacam a importância de avaliar a possível atividade biológica em todas as frações, visto que nem sempre aquelas que apresentam o maior potencial antioxidante em ensaios *in vitro* são aquelas que apresentarão o possível efeito biológico estudado.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os extratos obtidos a partir dos frutos de juçara apresentam potencial neuroprotetor frente ao dano celular induzido pelo glutamato na linhagem celular HT22. Considerando que o estresse oxidativo induzido pelo glutamato é um importante fator relacionado à morte celular em doenças neurodegenerativas, os resultados deste trabalho sugerem que os compostos presentes nos frutos de juçara são promissores para a redução do risco de tais doenças.

A partir do fracionamento dos compostos utilizando solventes com diferentes polaridades observou-se que as frações menos polares (hexânica e diclorometânica) foram as que apresentaram os melhores resultados. Esse efeito protetor observado pode estar associado aos fenólicos presentes nessas frações, bem como a outros compostos como ácidos graxos. O efeito sinérgico dos compostos na proteção contra os danos oxidativos também deve ser considerado, bem como o bloqueio nas etapas envolvidas no processo de oxidação, especialmente a fração hexânica, que apresentou o menor potencial antioxidante *in vitro*, mas efeitos neuroprotetores.

Este foi o primeiro estudo que avaliou possíveis efeitos neuroprotetores dos frutos de juçara. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para compreender melhor quais são os compostos responsáveis por esta atividade, os mecanismos envolvidos no potencial neuroprotetor, bem como o efeito em outros modelos neuronais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos frutos de juçara ao longo do ciclo de maturação, o que demonstrou que os frutos mais maduros apresentam maiores frações bioacessíveis e maior potencial antioxidante.

Mesmo após as perdas que ocorrem durante o processo de digestão gastrointestinal, os frutos de juçara se destacam por fornecer concentrações relevantes de compostos fenólicos para a absorção do organismo humano, podendo sua ingestão ser recomendada para maximizar a ingestão dietética de antioxidantes.

A realização deste trabalho permitiu demonstrar possíveis efeitos neuroprotetores dos frutos de juçara, apresentar novos compostos fenólicos dessa matriz, bem como apresentar as frações responsáveis por essa possível atividade biológica.

A divulgação dos resultados gerados com este trabalho poderá contribuir com avanços significativos no fornecimento de fundamentação teórica para avanços em pesquisas de influência do consumo dos frutos de juçara sobre a saúde humana.

As informações geradas em relação à composição e possíveis efeitos benéficos poderão contribuir para aumentar o mercado consumidor e expandir a produção dos frutos de juçara, podendo contribuir também com a geração de renda a produtores familiares.

Além disso, o aumento no consumo e na comercialização dos frutos de juçara oferecem benefícios à preservação do bioma Mata Atlântica, considerando que seu cultivo contribui para a restauração ambiental e é uma das estratégias para acelerar a regeneração da espécie *E. edulis*.

Considerando que os estudos com frutos de juçara são escassos, é de grande importância a realização de trabalhos futuros que avaliem a biodisponibilidade dos compostos dessa matriz, seus efeitos biológicos, bem como ensaios clínicos que visem avaliar a influência da ingestão desses frutos na promoção e manutenção da saúde.

REFERÊNCIAS

- AKBAR, M. *et al.* Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. **Brain Research**, v. 1637, p. 34-55, 2016.
- ALESSANDRINI, J. *et al.* Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, p. 509-538, 2004.
- ALMINGER, M. *et al.* *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 413-436, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, p. 325-337, 2003.
- ASSOUS, M. *et al.* Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra. **Neurobiology of Disease**, v. 65, p. 69-81, 2014.
- AYUSO, M. I.; GONZALO-GOBERNADO, R.; MONTANER, J. Neuroprotective diets for stroke. **Neurochemistry International**, v. 107, p. 4-10, 2017.
- BALSLEV, H.; BERNAL, R.; FAY, M. F. Palms – Emblems of tropical forests. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, p. 195-200, 2016.
- 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**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, M. E. S. *et al.* Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius – Juçara palm fruits. **Food Research International**, v. 116, p. 985-993, 2018.

BATAGLION, G. A. *et al.* Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERMÚDEZ-SOTO, M. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.

BERTIN, R. L. *et al.* Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 45-51, 2016.

BICUDO, M. O. P. *et al.* Microencapsulation of juçara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different carriers and drying temperatures. **Drying Technology**, v. 33, p. 153-161, 2015.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 142-147, 2014.

BOBRICH, A. *et al.* Phytochemicals in Japanese plums: impact of maturity and bioaccessibility. **Food Research International**, v. 65, p. 20-26, 2014.

BORGES, G. S. C. *et al.* Chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in Southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

BORGES, G. S. C. *et al.* Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 363-369, 2013.

BOUAYED, J. *et al.* Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1466-1472, 2012.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, 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**, v. 128, n. 1, p. 14-21, 2011.

BOURSCHEID, K. *et al.* *Euterpe edulis* - Palmito juçara. In: **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011, p. 179-183.

BOZKURT, A. A. *et al.* Syringaldehyde exerts neuroprotective effect on cerebral ischemia injury in rats through anti-oxidative and anti-apoptotic properties. **Neural Regeneration Research**, v. 9, p. 1884-1890, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, seção 1, p. 75-83, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 08 de outubro de 2018. **Regulamento**

técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de juçara. Diário Oficial da União. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia Alimentar para a População Brasileira.** 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CARDOSO, A. L. *et al.* Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 152-162, 2015a.

CARDOSO, C. *et al.* Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2014.

CARDOSO, L. M. *et al.* Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 2, p. 702-709, 2015b.

CARVALHO, A. G. S. *et al.* Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract. **Powder Technology**, v. 294, p. 421-428, 2016.

CAXAMBÚ, M. G. *et al.* Palmeiras (Arecaceae) nativas no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 259-270, 2015.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CELEP, E. *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. **Food Research International**, v. 78, p. 209-215, 2015.

CHANG, C. L. *et al.* Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 432-437, 2013.

CHEN, G. L. *et al.* Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 317-331, 2016.

CHEN, G. *et al.* Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 150-157, 2014.

CHO, N. *et al.* Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1940-1945, 2012.

CHOI, D. J. *et al.* Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H₂O₂-induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells. **Nutrition Research**, v. 36, p. 31-43, 2016.

CLEMENT, C. R.; LLERAS PÉREZ, E.; VAN LEEUWEN, J. O. potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v. 9, p. 67-71, 2005.

CLERICI, M.; CARVALHO-SILVA, L. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658-1970, 2011.

COKLAR, H.; AKBULUT, M. Anthocyanins and phenolic compounds of *Mahonia aquifolium* berries and their contributions to antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 166-174, 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal**: juçara (fruto). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3ª ed. Barueri: Manole, 2009. 1172 p.

CUNHA JUNIOR, L. C. *et al.* Classification of intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruits based on dry matter content by means of near infrared spectroscopy. **Food Control**, v. 50, p. 630-636, 2015.

CUNHA JUNIOR, L. C. *et al.* Quality evaluation of intact açai and juçara fruit by means of near infrared spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 64-74, 2016.

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe edulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 134-142, 2014.

DA COSTA, P. A. *et al.* Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603-1606, 2010.

DA SILVA, N. A. *et al.* Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5072-5084, 2014.

DA SILVA, P. P. M. *et al.* Physical, chemical, and lipid composition of juçara (*Euterpe edulis* Mart.) pulp. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, p. 7-13, 2013.

DE CAMPOS, L. M. A. S. *et al.* Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

DE BRITO, E. S. *et al.* Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389-9394, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

DE SOUZA, M. C. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity on fruits from different açai (*Euterpe oleracea* Mart) progenies. **Acta Horticulturae**, v. 841, p. 455-458, 2009.

DE SOUZA, V. R., *et al.* Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362-368, 2014.

DHANALAKSHMI, C. *et al.* Vanillin attenuated behavioural impairments, neurochemical deficits, oxidative stress and apoptosis against rotenone induced rat model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 41, p. 1899-1910, 2016.

DI GIACOMO, C. *et al.* Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 1, p. 145-150, 2009.

DORÉ, S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. **Neurosignals**, v. 14, p. 61-70, 2005.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-22, 2012.

FELZENSZWALB, I. *et al.* Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: a potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 536-544, 2013.

FERNANDES, A. A. **Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e atividade antioxidante em polpa comercial de frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius)**. 2015. 69 f. Trabalho de Conclusão (Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FLORES, G. *et al.* Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-

inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, v. 141, p. 889-895, 2013.

FORTALEZAS, S. *et al.* Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). **Nutrients**, v. 2, p. 214-229, 2010.

FUKUI, M. *et al.* Mechanism of glutamate induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, p. 1-11, 2009.

GARCIA-SALAS, P. *et al.* Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: R. E. WROLSTALD. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: JohnWiley and Sons, p. 1-13, 2001.

GORDON, A., *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p. 256-263, 2012.

GUERGOLETTO, K. B. *et al.* *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251-258, 2016.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2012. 851 p.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023-2044, 2012.

HAYASHI, G.; CORTOPASSI, G. Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, Part A, p. 10-17, 2015.

HIRATA, Y. *et al.* Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells.

Neuropharmacology, v. 135, p. 242-252, 2018.

HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. 1095 p.

HUI, Y. H. **Handbook of fruits and fruit processing**. Ames: Blackwell, 2006. 693 p.

HUR, S. J. *et al.* *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, 2011.

HWANG, S.; SHIH, P.; YEN, G. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 877-885, 2012.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IM, K. *et al.* *In vitro* antioxidative and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of eggplant (*Solanum melongena*) stalks in macrophage RAW 264.7 cells. **Food and Agricultural Immunology**, v. 27, n. 6, p. 758-771, 2016.

INADA, K. O. P. *et al.* 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.

IOM. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements**. Washington: National Academy Press, 2006.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 433-446, 2001.

JACOB, K. *et al.* Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 137-146, 2008.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 666-667, p. 387–392, 2003.

JEONG, E. J. *et al.* Neuroprotective biflavonoids of *Chamaecyparis obtusa* leaves against glutamate-induced oxidative stress in HT22 hippocampal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 397-402, 2014.

JUNG, Y. *et al.* Phenolic compounds from the stems of *Zea mays* and their pharmacological activity. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, p. 379-385, 2014.

JUSTINO, A. B. *et al.* Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KAMILOGLU, S.; CAPANOGLU, E. Investigating the *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 2621-2629, 2013.

KARLSEN, A. *et al.* Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. **European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 2, p. 127-133, 2007.

KERDILES, O.; LAYÉ, S.; CALON, F. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain health: preclinical evidence for the prevention of neurodegenerative diseases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 203-213, 2017.

KIM, H. K. *et al.* Neuropathological relationship between major depression and dementia: a hypothetical model and review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 67, p. 51-57, 2016.

KIM, H. N. *et al.* Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* extract against glutamate-induced oxidative toxicity in HT22 hippocampal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 108-115, 2013.

KIM, Y. C. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1611-1632, 2010.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 844 p.

KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A. *et al.* Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. **Food Chemistry**, v. 170, p. 288-294, 2015.

KUHNEN, S. *et al.* Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1548–1553, 2011.

KULKARNI, S. D. *et al.* Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 681-688, 2007.

LEWERENZ, J. *et al.* Oxytosis/ferroptosis-(Re-) emerging roles for oxidative stress-dependent non-apoptotic cell death in diseases of the central nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1-23, 2018.

LIANG, L. *et al.* *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 76-82, 2012.

LIU, K. *et al.* Polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative, and antimicrobial activities of mushroom *Inonotus sanghuang*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 154-161, 2017.

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, p. 118-126, 2010.

LORENZI, H. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2010. 368 p.

LOU, H. *et al.* Eriodictyol protects against H₂O₂-induced neuron-like PC12 cell death through activation of Nrf2/ARE signaling pathway. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 251-257, 2012.

LOU, H. *et al.* Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 380-388, 2014.

LUÍS, A. *et al.* Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: Effects on antioxidant properties. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 175-185, 2018.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MA, X. *et al.* Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MACHADO, A. K. *et al.* Neuroprotective effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone *in vitro* exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-14.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MARIANI, E. *et al.* Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 5, p. 445-451, 2008.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia**. 4. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013. 527 p.

MARTÍNEZ-TOMÁS, R. *et al.* Daily intake of fruit and vegetable soups processed in different ways increases human serum β -carotene and lycopene concentrations and reduces levels of several oxidative stress markers in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 127-133, 2012.

MARZE, S. Bioaccessibility of lipophilic micro-constituents from a lipid emulsion. **Food & Function**, v. 6, p. 3218-3227, 2015.

MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J.; TÖRRÖNEM, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7193-7199, 2006.

MCCARTHY, A. L.; O'BRIEN, N. M. Bioaccessibility of functional ingredients. **Current Nutrition & Food Science**, v. 9, n. 4, p. 271-282, 2013.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – An international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014.

MIRALLES, V. J. *et al.* Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. **Brain Research**, v. 922, p. 21-29, 2001.

MORAIS, D. R. *et al.* Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392-399, 2015.

MORRIS, G. *et al.* Why should neuroscientists worry about iron? The emerging role of ferroptosis in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. **Behavioural Brain Research**, v. 341, p.154-175, 2018.

MOSELE, J. I. *et al.* Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, v. 201, p. 120-130, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 63, p. 45-55, 1983.

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

NEVES, L. C. *et al.* Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p. 188-96, 2015.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, v. 30, p. 134-144, 2014.

NOGUEIRA, O. L. Sistema de Produção do Açaí. *In: Sistemas de Produção*, v. 4. Açaí. Embrapa Amazônia Oriental, 2006. ISSN 1809-4325 versão eletrônica. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/intro.htm. Acesso em: 06 de junho de 2016.

NOVELLO, A. A. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, p. 101-112, 2015.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.

OYAMA, L. M. *et al.* Juçara pulp supplementation improves glucose tolerance in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, p. 1-8, 2016.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v. 40, p. 620-628, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4631-4636, 2008.

PEIXOTO, H. *et al.* Anthocyanin-rich extract of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 385-393, 2016.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 11-26, 2015.

PRASAD, A. S. *et al.* Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007.

PUPIN, L. *et al.* Is the bioaccessibility of minerals affected by the processing steps of juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.)? **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 14-25, 2018.

QIN, X. *et al.* Systematic chemical analysis approach reveals superior antioxidant capacity via the synergistic effect of flavonoid compounds in red vegetative tissues. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 1-13, 2018.

RANGEL-HUERTA, O. D. *et al.* Normal or high polyphenol concentration in orange juice affects antioxidant activity, blood pressure, and body weight in obese or overweight adults. **Journal of Nutrition**, v. 15, n. 8, p. 1808-1816, 2015.

RIBEIRO, J. C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, p. 22-28, 2010.

ROBERTS L. J. *et al.* The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1388-1393, 2007.

RODRIGUES, S. S. P. *et al.* A new food guide for the Portuguese population: development and technical considerations. **Journal of Nutrition Education and Behavior**, v. 38, n. 3, p. 189-195, 2006.

ROGEZ, H. **Açai**: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: EDUFPA, 2000.

ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals**: chemistry, nutritional value and stability. Ames: John Wiley & Sons, 2010. 367 p.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Açai (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2100-2106, 2011.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SAEED, N.; KHAN, M. R.; SHABBIR, M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 221, p. 1-12, 2012.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004. 204 p.

SANABRIA, N.; SANGRONIS, E. Caracterización del açai o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): un fruto del Amazonas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, p. 94-98, 2007.

SANGRONIS, E.; SANABRIA, N. Impact of solar dehydration on composition and antioxidant properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 61, n. 1, p. 74-80, 2011.

SANTANA, A. A. *et al.* Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. **Food Chemistry**, v. 212, p. 1-9, 2016.

SANTOS, A. F.; CORREA JUNIOR, C.; NEVES, E. J. M. **Palmeiras para a produção de palmito: juçara, pupunheira e palmeira Real**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SCHAUSS, A. G. Advances in the study of the health benefits and mechanisms of action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart., known as “Açai”. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Fruits, Vegetables, and Herbs**. New York: OxfordAcademic Press, 2016, pp. 177-220.

SCHAUSS, A. G. *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8598-8603, 2006.

SCHIRMANN, G. *et al.* Frutos da palmeira-juçara: alimento de qualidade para os catarinenses. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 26, p. 46-48, 2013.

SCHRECKINGER, M. E. *et al.* Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 233-246, 2010.

SCHULZ, M. *et al.* Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447-454, 2017.

SCHULZ, M. *et al.* Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 2015.

SCHULZ, M. *et al.* Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

SCHULZ, M. *et al.* Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. **Food Research International**, v. 120, p. 114-123, 2019.

SENEN, K.; ESRA, C. Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): effect of sun-drying. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 3, p. 521-535, 2015.

SENGUL, H.; SUREK, E.; NILUFER-ERDIL, D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, v. 62, p. 1069-1079, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 545 p.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 25-34, 2017.

SLAVIN, J.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, p. 506-516, 2012.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 502-517, 2017.

SUBASH, S. *et al.* Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 16, p. 1557-1566, 2014.

SWIECA, M. Potentially bioaccessible phenolics, antioxidant activity and nutritional quality of young buckwheat sprouts affected by elicitation and elicitation supported by phenylpropanoid pathway precursor feeding. **Food Chemistry**, v. 192, p. 625-632, 2016.

SZWAJGIER, D.; BOROWIEC, K.; PUSTELNIAK, K. The Neuroprotective effects of phenolic acids: molecular mechanism of action. **Nutrients**, v. 477, p. 1-21, 2017.

TAN, S.; WOOD, M.; MAHER, P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, p. 95-105, 1998.

TAN, S. *et al.* Oxytosis: a novel form of programmed cell death. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p.497-506, 2001.

TAGLIAZUCCHI, D. *et al.* *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599-606, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TAN, S.; WOOD, M.; MAHER, P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, p. 95-105, 1998.

TAVARES, L. *et al.* Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1443-1452, 2012.

TIBERIO, F. C. S. *et al.* Germination and allometry of the native palm tree *Euterpe edulis* compared to the introduced *E. oleracea* and their hybrids in Atlantic rainforest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 955-962, 2012.

TIWARI, U.; CUMMINS, E. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 497-506, 2013.

TOBABEN, S. *et al.* Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 2, p. 282-292, 2011.

TONON, R. V. *et al.* Steady and dynamic shear rheological properties of açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 425-431, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 3, p. 411-418, 2008.

TORMA, P. D. *et al.* Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Food Chemistry**, v. 222, p. 94-104, 2017.

TREVISAN, A. C. D. *et al.* Market for Amazonian açai (*Euterpe oleraceae*) stimulates pulp production from Atlantic Forest juçara berries (*Euterpe edulis*). **Agroecology and Sustainable Food Systems**, p. 37-41, 2015.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 328-334, 1998.

UMENO, A.; BIJU, V.; YOSHIDA, Y. *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. **Free Radical Research**, v. 51, p. 413-427, 2017.

USA. Department of Agriculture. **Dietary guidelines for Americans**. 7th ed. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, 2010.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VIEIRA, G. S. Chemical and economical evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 196-204, 2013.

VIEIRA, G. S. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2135-2144, 2017.

VYAS, P. *et al.* Chemical analysis and effect of blueberry and lingonberry fruits and leaves against glutamate-mediated excitotoxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7769-7776, 2013.

- WALTON, H. S.; DODD, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 50, p. 1052-1066, 2007.
- WANG, X. *et al.* Profiling and quantification of phenolic compounds in *Camellia* seed oils: natural tea polyphenols in vegetable oil. **Food Research International**, v. 102, p. 184-194, 2017.
- WHO - World Health Organization. (2018). **Promoting fruit and vegetable consumption around the world**. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>. Acesso em: 21 set 2018.
- WIGHTMAN, J. D.; HEUBERGER, R. A. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1584-1597, 2015.
- WILLIAMS, R. J. *et al.* Serial review: Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.
- WONG, D. Y. S. *et al.* Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221-226, 2013.
- XIONG, J. *et al.* Phenolic constituents from the leaves of *Cratogeomys formosum* ssp. *pruniflorum*. **Fitoterapia**, v. 94, p. 114-119, 2014.
- YAMAGUCHI, K. K. D. L. *et al.* Amazon açai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.
- YANG, E.; SONG, K. Andrographolide, a major component of *Andrographis paniculata* leaves, has the neuroprotective effects on glutamate-induced HT22 cell death. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 162-172, 2014.
- YOU, Q. *et al.* Analysis of phenolic composition of noble muscadine (*Vitis rotundifolia*) by HPLC-MS and the relationship to its antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 1115-1123, 2012.

YUNES, R.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. 303p.

YUYAMA, L. K. O. *et al.* Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 545-552, 2011.

YUWEI, H. *et al.* Apigenin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 40, p. 157-162, 2017.

APÊNDICE A – Parâmetros do espectrômetro de massas obtidos para os compostos fenólicos testados em frutos de juçara (*Euterpe edulis Martius*).
(continua)

	DP	EP	CEP	CE	CXP
4-aminobenzóico	-20,00	-9,50	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido salicílico	-25,00	-2,50	-10,00	-24,00	-2,00
Ácido cinâmico	-25,00	-9,00	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido gálico	-25,00	-11,00	-12,00	-20,00	-4,00
Ácido protocatecuico	-26,00	-9,00	-17,32	-17,00	-4,00
Ácido p-cumárico	-21,00	-4,00	-17,69	-13,00	-6,00
Taxifolina	-95,00	-10,50	-16,00	-30,00	-2,00
Rutina	-31,00	-5,00	-34,19	-27,00	-6,00
Quercetina	-80,00	-6,00	-14,00	-32,00	0,00
Resveratrol	-50,00	-8,50	-18,00	-24,00	-4,00
Miricetina	-65,00	-4,50	-18,00	-34,00	-2,00
Aromadendrina	-45,00	-4,00	-16,00	-32,00	-2,00
Hispidulina	-50,00	-7,00	-22,00	-14,00	-4,00
Campferol	-75,00	-4,50	-16,00	-62,00	-2,00
Ácido p-anísico	-25,00	-5,00	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido mandélico	-20,00	-7,50	-10,00	-12,00	-2,00
Vanilina	-25,00	-3,00	-14,00	-14,00	-2,00
Ácido 4 – hidroximetilbenzoico	-30,00	-6,50	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido 3,4 hidroximetilbenzoico	-30,00	-7,00	-10,00	-20,00	-2,00
Umbeliferona	-55,00	-4,50	-10,00	-22,00	-4,00
4-hidroxicinâmico	-25,00	-10,50	-12,00	-20,00	-2,00
Ácido metoxifenilacético	-10,00	-10,00	-10,00	-6,00	-2,00
Ácido vanílico	-30,00	-7,00	-10,00	-18,00	-2,00
4-metilumbeliferona	-45,00	-10,50	-10,00	-28,00	-2,00
Coniferaldeído	-25,00	-10,00	-12,00	-20,00	-2,00
Ácido cafeico	-30,00	-11,00	-10,00	-22,00	-2,00
Siringaldeido	-25,00	-4,50	-10,00	-20,00	-4,00
Escopoletina	-35,00	-4,00	-12,00	-14,00	-2,00
Ácido ferúlico	-40,00	-7,00	-10,00	-24,00	-2,00
Ácido siríngico	-30,00	-10,50	-12,00	-28,00	-2,00
Sinalpadeído	-30,00	-3,00	-12,00	-22,00	-2,00
Ácido sinápico	-30,00	-12,00	-16,00	-22,00	0,00

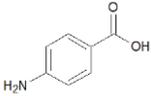
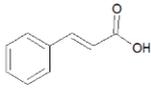
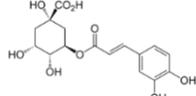
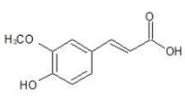
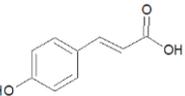
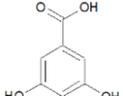
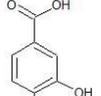
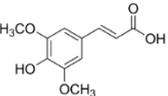
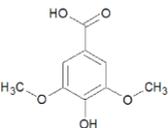
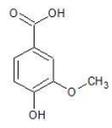
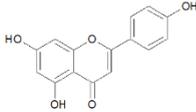
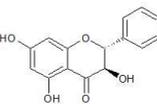
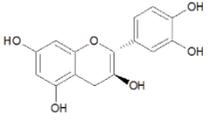
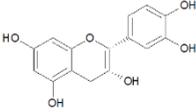
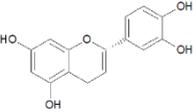
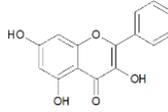
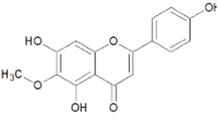
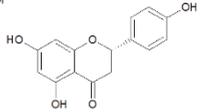
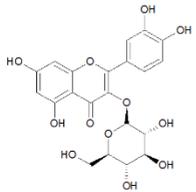
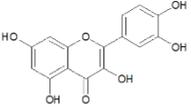
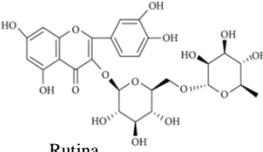
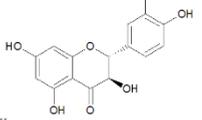
APÊNDICE A – Parâmetros do espectrômetro de massas obtidos para os compostos fenólicos testados em frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius).
(conclusão)

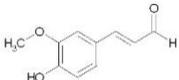
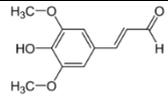
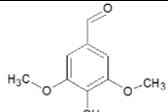
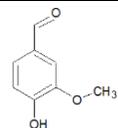
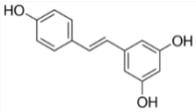
Crisina	-65,00	-10,00	-20,00	-52,00	-2,00
Pinocembrina	-60,00	-12,00	-22,00	-54,00	-2,00
Apigenina	-75,00	-9,00	-14,00	-46,00	-2,00
Galangina	-75,00	-8,50	-16,00	-64,00	-10,00
Naringenina	-60,00	-4,50	-12,00	-28,00	-2,00
Carnosol	-75,00	-5,00	-16,00	-16,00	-4,00
Ácido clorogênico	-25,00	-5,00	-24,00	-28,00	-2,00
Ácido rosmarínico	-50,00	-3,00	-18,00	-28,00	-4,00
Isoquercitrina	-245,00	-3,00	-48,00	-44,00	-2,00
Naringina	-250,00	-4,00	-36,00	-52,00	-2,00
Eriodictiol	-75,00	-9,50	-16,00	-36,00	-4,00
Fustina	-45,00	-4,00	-14,00	-38,00	-2,00
Catequina	-55,00	-4,50	-14,00	-34,00	-4,00
Epicatequina	-290,00	-4,00	-16,00	-40,00	-2,00
Ácido elágico	-50,00	-10,50	-16,00	-58,00	0,00

DP - Potencial de desagregação; EP – Potencial de entrada; CEP – Potencial de entrada da célula de colisão; CE – Energia de colisão; CXP - Potencial de saída da célula de colisão.

Fonte: Schulz *et al.* (2015).

APÊNDICE B - Estrutura dos compostos fenólicos quantificados no extrato bruto e frações de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius).

Ácidos fenólicos			
			
Ácido 4-aminobenzoico	Ácido cinâmico	Ácido clorogênico	Ácido ferúlico
			
Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido gálico	Ácido protocatecuico	Ácido salicílico
			
Ácido sinápico	Ácido siríngico	Ácido vanílico	
Flavonoides			
			
Apigenina	Aromadendrina	Catequina	Epicatequina
			
Eriodictiol	Galangina	Hispidulina	Naringenina
			
Isoquercetrina	Quercetina	Rutina	Taxifolina

Aldeídos fenólicos			
 <p>Coniferaldeído</p>	 <p>Sinapaldeído</p>	 <p>Siringaldeído</p>	 <p>Vanilina</p>
Estilbeno			
 <p>Resveratrol</p>			

Fonte: Schulz *et al.* (2019).

ANEXO A– Publicações geradas a partir desta tese

Food Research International 89 (2016) 14–26



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Review

Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds



Mayara Schulz^{a,*}, Graciele da Silva Campelo Borges^b, Luciano Valdemiro Gonzaga^a, Ana Carolina Oliveira Costa^a, Roseane Fett^{a,*}

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Food Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2016

Received in revised form 28 July 2016

Accepted 31 July 2016

Available online 3 August 2016

Keywords:

Açai

Berry

Antioxidant

Composition

Bioactive compounds

Human health

ABSTRACT

Juçara (*Euterpe edulis* Martius) is a palm tree widely distributed in the Atlantic Forest, which produces round fruits that recently gained worldwide attention, mainly for its resemblance to fruits of *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria* Martius used to produce açaí. Juçara fruits stand out for their high nutritional value, which contain different kinds of nutrients, including fatty acids, protein, fibers, minerals and vitamins, and bioactive compounds such as anthocyanins, non-anthocyanin flavonoids and phenolic acids, which are associated with potent biological activities. The main objective of this work is to present the available compositional data regarding juçara fruits to produce a comprehensive source of recent information on important chemical constituents and the potential health benefits of these fruits in reference to the species *E. oleracea* and *E. precatoria*. In addition, information on botanical aspects, production chain and markets are presented.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Chapter 17

EUTERPE FRUITS: HIGH POTENTIAL FOR FOOD, NUTRITION, AND HEALTH

Mayara Schulz*, Luciano Valdemiro Gonzaga and Roseane Fett†

Department of Food Science and Technology,
Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis, SC, Brazil

ABSTRACT

The Euterpe genus consists of about 28 species and in Brazil the most important are *E. oleracea*, *E. edulis* and *E. precatoria*. *E. oleracea* is found mainly in the Brazilian states of Pará, Maranhão, Tocantins, and Amapá, while *E. precatoria* is native to the state of Amazonas. On the other hand, *E. edulis* is native to the Atlantic Forest. Despite their differences in location and characteristics of palm trees, the fruits produced by the three species are very similar. They are globose berries with a color that evolves from green to black during the ripening process. Euterpe fruits stand out for their high lipid content, with a predominance of oleic acid. Others fatty acids include linoleic, linolenic and palmitic in relevant concentrations. Moreover, fruits of *E. oleracea*, *E. edulis* and *E. precatoria* assume great importance in human nutrition due to their rich content of other essential nutrients which include protein, minerals, vitamins, and dietary fiber. The bioactive compounds such as anthocyanins, other flavonoids, and phenolic acids are widely evaluated which are related to the potent antioxidant capacity of these fruits. Other significant health benefits are ascribed, such as anti-inflammatory, hypolipidemic, neuroprotective, and anticancer properties demonstrated *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Euterpe edulis, Euterpe oleracea, Euterpe precatoria, açaí, juçara



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of *juçara* fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion



Mayara Schulz^{a,*}, Fabiola Carina Biluca^a, Luciano Valdemiro Gonzaga^a,
Graciele da Silva Campelo Borges^b, Luciano Vitali^c, Gustavo Amadeu Micke^c, Jefferson Santos de Gois^{c,d},
Tarcisio Silva de Almeida^c, Daniel Lazaro Gallindo Borges^e, Paul Richard Momsen Miller^e,
Ana Carolina Oliveira Costa^a, Roseane Fett^{a,*}

^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, Brazil

^bDepartment of Food Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

^cDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

^dDepartment of Analytical Chemistry, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 20550-900, Brazil

^eDepartment of Rural Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2016

Received in revised form 6 February 2017

Accepted 8 February 2017

Available online 10 February 2017

Keywords:

Berry

Phenolic

Mineral

Metal

Bioavailability

ABSTRACT

An *in vitro* method involving simulated gastrointestinal digestion was used to assess the bioaccessibility of fifteen minerals, twenty-two phenolic compounds and the antioxidant capacity in *juçara* fruit during seven ripening stages. For minerals and phenolics, respectively, initial contents were up to 1325.9 and 22.9 mg 100 g⁻¹, whereas after *in vitro* digestion, the maximum values were 556.7 and 14.43 mg 100 g⁻¹ (dry matter). Antioxidant capacity, determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP), after *in vitro* digestion decreased 51–78% when compared to the crude extract. Bioaccessible fractions of quercetin, protocatechuic and *p*-coumaric acids presented positive and significant correlation with results of DPPH and FRAP. Furthermore, our study demonstrated that the ripening stages of *juçara* fruit influenced the bioaccessibility of compounds and antioxidant capacity, which presented higher levels in purple fruits collected 42–69 days after the appearance of the red berries on bunches.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Original research article

Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells

Mayara Schulz^{a,*}, Luciano Valdemiro Gonzaga^a, Viviane de Souza^b, Marcelo Farina^b, Luciano Vitali^c, Gustavo Amadeu Micke^c, Ana Carolina Oliveira Costa^a, Roseane Fett^{a,*}^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, Brazil^b Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil^c Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

acid
Antioxidant
Polyphenols
Anthocyanins
LC-ESI-MS/MS

ABSTRACT

This study investigated the neuroprotective effect of juçara fruit extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 cells. Potential relationships between the extracts' polyphenolic composition and their protective/antioxidant capacities were also investigated. Experiments with the addition of either the crude methanolic extract or hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions 24 h before glutamate (pretreatment) and together with glutamate (co-treatment) were performed. At the concentration of 10 µg ml⁻¹, the hexane and dichloromethane fractions were able to protect cells, both in pretreatment and co-treatment. These fractions presented the highest number of quantified polyphenolics (24 and 21, respectively) although the total levels were 63-fold higher in the dichloromethane fraction. Syringaldehyde, vanillin and 4-aminobenzoic, cinnamic, salicylic and syringic acids were found only in these fractions. The dichloromethane fraction presented higher 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging activity, while the butanol and ethyl acetate fractions showed higher ferric reducing antioxidant power. These results suggest juçara fruits extracts as promising for the reduction of the risk of neurodegenerative diseases.