

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET**

KEZIA DE CASTRO FIGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DAS
FOLHAS DE *MYRCIARIA DUBIA*, COLETADA EM ITACOATIARA-AM**

ITACOATIARA – AM

2023

KEZIA DE CASTRO FIGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DAS
FOLHAS DE *MYRCIARIA DUBIA*, COLETADA EM ITACOATIARA-AM**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Amazonas
(UFAM), como requisito para obtenção
do título de Bacharel em farmácia.

Orientador: Dra. Renata Takeara Hattori

ITACOATIARA – AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F475a Figueira, Kezia de Castro
Atividade antioxidante e citotóxica das folhas de myrciaria dubia,
coletada em itacoatiara-am / Kezia de Castro Figueira . 2023
46 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Renata Takeara Hattori
TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Camu-camu. 2. Perfil químico. 3. Antioxidante . 4. Citotóxico. I.
Hattori, Renata Takeara. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

KEZIA DE CASTRO FIGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DAS
FOLHAS DE *MYRCIARIA DUBIA*, COLETADA EM ITACOATIARA-AM**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Amazonas
(UFAM) como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharel em
farmácia.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 07/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Renata Takeara Hattori- UFAM
Orientadora

Prof. Dr.^a Simone Ramos de Castro- IFAM
Avaliador

Prof. Ms. Vanessa Farias dos Santos Ayres - AFYA
Avaliador

AGRADECIMENTOS

É com grande alegria e satisfação que expresso meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de maneira significativa para a conclusão deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Quero expressar minha gratidão à minha orientadora Renata Takeara Hattori por seu apoio, orientação valiosa e confiança ao longo deste processo.

Aos meus Amigos(as) Eliza Oliveira, Anyele Ramos, Juliane Souza, Maylane Gomes, Aquila Neves, Ingrid Haimê, Anderson Esquerdo e Diego Cezar, pela troca de ideias e incentivo mútuo, agradeço pelos bons momentos que passamos juntos, por fazerem parte desta jornada acadêmica, até nos momentos mais difíceis

À minha família e amigos, meu mais profundo agradecimento. O apoio incondicional, compreensão e encorajamento que me proporcionaram foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste projeto acadêmico.

Atenciosamente,

Kezia Castro

RESUMO

A *Myrciaria dubia* também conhecida popularmente como camu-camu”, “caçari”, “araçá d’água” ou “sarão” pertence à família Myrtaceae e pode ser encontrada em igapós, lagos e várzeas no rio Amazonas. Vários estudos com fruto e sementes do camu-camu relatam propriedades citotóxica e antioxidante. No entanto, ainda não há relatos de estudos com o extrato das folhas desta espécie. Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a composição química, atividade antioxidante e citotóxica dos extratos das folhas de *M. dubia*, coletadas em Itacoatiara- Am. Inicialmente, as folhas foram coletadas e secas, em seguida foram trituradas e extraídas com etanol 70%, obtendo-se o extrato hidroalcoólico que foi rotavevaporado para a retirada de todo o etanol para a obtenção do extrato aquoso, uma parte foi posta para secar e a outra parte foi fracionada utilizando solventes em ordem de polaridade crescente. As reações químicas em tubos de ensaio obtiveram os seguintes resultados: O extrato bruto indicou ter a presença de flavanonas, fenóis, chalconas e auronas, enquanto que as frações butanólica, acetato de etila e hidroalcoólica tanino flavabênicos, flavanonas e flavonas. A presença de esteroides livres foi evidenciada no extrato bruto e na fração precipitado, nas frações clorofórmio e hexano triterpenoides pentacíclicos. A fração hidroalcoólica e o extrato bruto apresentaram saponinas triterpênicas e as frações butanólica e acetato de etila saponinas esteroidais. Alcaloides foram evidenciados no extrato bruto e nas frações acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica. A cromatografia em camada delgada indicou a presença de terpenos no extrato bruto e nas frações precipitado, clorofórmica, hexânica, butanólica e hidroalcoólica e a presença de flavonoides no extrato bruto e nas frações precipitado e acetato de etila. A atividade antioxidante revelou que o extrato bruto e as frações acetato de etila e hidroalcoólica indicaram alta atividade antioxidante nas folhas da *M. dubia*. O ensaio citotóxico revelou que a fração clorofórmio e precipitado apresentaram efeito citotóxico em células das linhagens carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60), especialmente a fração precipitado, a fração clorofórmio apresentou uma seletividade para com as células da linhagem carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60).

Palavras-chave: Camu-camu; Perfil-químico; Antioxidante; Citotóxico.

ABSTRACT

Myrciaria dubia is also popularly known as camu-camu”, “çaçari”, “araçá d’água” or “sarão” and belongs to the Myrtaceae family and can be found in igapós, lakes and floodplains on the Amazon River. Several studies with camu-camu fruits and seeds report cytotoxic and antioxidant properties. However, there are still no reports of studies with extracts from the leaves of this species. Therefore, the objective of this work is to evaluate the chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity of extracts from *M. dubia* leaves, collected in Itacoatiara- Am. Initially, the leaves were collected and dried, then they were crushed and extracted with ethanol 70 %, obtaining the hydroalcoholic extract that was rotary evaporated to remove all the ethanol to obtain the aqueous extract, one part was left to dry and the other part was fractionated using solvents in order of increasing polarity. The chemical responses in test tubes obtained the following results: The crude extract indicated the presence of flavanones, phenols, chalcones and aurones, while the butanolic, ethyl acetate and hydroalcoholic tannin flababenic fractions, flavanones and flavones. The presence of free steroids was evident in the crude extract and in the precipitate fraction, in the pentacyclic triterpenoid chloroform and hexane fractions. The hydroalcoholic fraction and the crude extract are composed of triterpene saponins and the butanolic and ethyl acetate fractions are steroidal saponins. Alkaloids were evident in the crude extract and in the ethyl acetate, butanolic and hydroalcoholic fractions. Thin layer chromatography indicated the presence of terpenes in the crude extract and in the precipitated, chloroform, hexane, butanolic and hydroalcoholic fractions and the presence of flavonoids in the crude extract and in the precipitated and ethyl acetate fractions. The antioxidant activity revealed that the crude extract and the ethyl acetate and hydroalcoholic fractions indicated high antioxidant activity in *M. dubia* leaves. The cytotoxic assay revealed that the chloroform and precipitate fraction had a cytotoxic effect on cells of the colorectal carcinoma (HCT116) and promyelocytic leukemia (HL60) lineages, especially the precipitate fraction, the chloroform fraction showed selectivity towards cells of the colorectal carcinoma lineage (HCT116) and promyelocytic leukemia (HL60).

Keywords: Camu-camu; Chemical profile; Antioxidant; cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Extrato bruto.....	28
Figura 2: Fração butanólica.....	28
Figura 3: Fração Acetato de etila	29
Figura 4: Fração Hidroalcoólica.....	29
Figura 5: fração clorofórmio, hidroalcoólica, extrato bruto e precipitado	30
Figura 6: fração butanólica, acetato de etila, hidroalcoólica, extrato bruto.....	31
Figura 7: Fração extrato bruto, hidroalcoólica, acetato de etila e butanoica.	32
Figura 8: Fase estacionária de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador vanilina sulfúrica.....	33
Figura 9: Fase estacionária de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador vanilina sulfúrica.....	33
Figura 10: Fase estacionária de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador NP/Peg.	33
Figura 11: Fase estacionária de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador DPPH	325
Figura 12: Gráficos de inibição em concentração única em três linhagens de células para os extratos do camu-camu.....	31
Figura 13: Gráficos de CI50 em concentração única em cinco linhagens de células nas concentrações máxima e mínima de 250 a 3,90 µg/mL (para os extratos), 100 a 1,56 µg/mL (para as frações).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que caracterizaram os grupos de compostos fenólicos da <i>M. dubia</i>	16
Tabela 2: Teste para fenóis e taninos	21
Tabela3: Teste para antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas e flavanonas.	22
Tabela 4: Rendimentos do extrato bruto e das frações do camu-camu.....	26
Tabela 5: constituintes fenólicos das frações de <i>M. dubia</i>	29
Tabela 6: Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais nas concentrações únicas de 250 µg/mL (para os extratos) e 100 µg/mL (para as frações) de Camu-camu.	37
Tabela 7: CI50 das amostras em linhagens de células após diluição seriada nas concentrações máxima e mínima de 250 a 3,90 µg/mL (para os extratos), 100 a 1,56 µg/mL (para as frações), 10 a 0,15 µg/mL (substâncias puras).....	38
Tabela 8: Índice de seletividade (IS).....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 <i>Myrciaria dubia</i> (camu- camu).....	13
2.2 Composto bioativos presentes na <i>Myrciaria dubia</i>	15
2.3 Atividade antioxidante da <i>M. dubia</i>	17
2.4 Atividade citotóxica da <i>M. dubia</i>	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Coleta do vegetal	20
4.2 Extração e fracionamento.....	20
4.3 Prospecção fitoquímica para caracterização para fenólicos.....	20
4.3.1 Teste para fenois e taninos.....	21
4.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	21
4.3.3 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	21
4.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard).....	22
4.5 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides	22
4.6 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas.....	23
4.7 Teste de confirmação para saponinas	23
4.8 Avaliação em placas cromatográficas	23
4.9 Teste antioxidante.....	23
4.10 Teste citotóxico	24
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26

5.2 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard).....	30
5.3 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas.....	31
5.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides	32
5.5 Avaliação das placas cromatográficas (CCD)	33
5.6 Teste Antioxidante da <i>M.dubia</i>	35
5.7 Teste citotóxico da <i>Myrciaria dubia</i>	36
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade tem ocorrido um aumento do interesse científico nas pesquisas de produtos naturais em relação ao seu potencial de aplicação, composição química e efeitos biológicos que podem ser benéficos a saúde, essa atenção é principalmente devido a presença de compostos antioxidantes como os flavonoides e carotenoides que são descritos como substâncias capazes de proteger contra reações mediadas por radicais livres (Carmo *et al*, 2019; Mendes *et al*, 2020).

O estresse oxidativo é entendido como o acúmulo desbalanceado de radicais livres, que sobrepõem a proteção antioxidante do organismo, causando danos oxidativos às células. Esses danos podem acarretar a formação de compostos mutagênicos e o desencadeamento de processos inflamatórios, dentre outros fatores que estão diretamente ligados ao desenvolvimento de patologias como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Halliwell, 2011; Mendes *et al*, 2020; Santos *et al*, 2022).

Nesse contexto o camu-camu (*Myrciaria dubia*), também conhecido como caçari ou araçá d'água (Fidelis *et al*, 2018), tem ganhado destaque por sua alta capacidade antioxidante, devido ao perfil químico contendo teores significativos de vitamina C e compostos fenólicos como ácido elágico e antocianinas (Azevêdo *et al*, 2019). A pesquisa sobre compostos fenólicos tem sido um foco de interesse na última década devido à sua atividade antioxidante e capacidade de neutralizar radicais livres, em particular, os polifenóis que parecem estar envolvidos em vários efeitos benéficos na saúde (Fracassetti *et al*, 2013).

Os resultados obtidos através de análises químicas e funcionais até o momento, sugerem a aplicação potencial e os efeitos biológicos positivos das bagas do camu-camu indicando propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo*, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos, antiproliferativos, anti-hipertensivos, antimicrobianos e neuroprotetores, assim como exibiu efeitos citotóxicos e atividade antiproliferativa contra células cancerosas (Fracassetti *et al*, 2013; Carmo *et al*, 2019; Fidélis *et al*, 2020; Garcia-Chacon *et al*, 2023).

Apesar do aumento da aplicação do camu-camu proveniente do cultivo comercial como alimento funcional e embora vários estudos tenham se concentrado em investigar as propriedades da polpa do camu-camu, ainda falta conhecimento sobre seus efeitos biológicos, como a capacidade antioxidante e a atividade mutagênica/antimutagênica das folhas da *M. dubia*, quando em comparação com frutos coletados em ambientes naturais alagados na região amazônica, além do mais a literatura que descreve os potenciais benefícios das folhas do camu-camu para a saúde é inexistente (Azevêdo *et al*, 2015; Azevêdo *et al*, 2019).

Considerando o potencial socioeconômico e nutricional do camu-camu, junto com a importância crescentes de novas fontes naturais de compostos bioativos na pesquisa científica. Esse trabalho de conclusão de curso tem como objetivo investigar a composição química, assim como a atividade antioxidante e citotóxica do extrato bruto e das frações das folhas *M. dubia*, além de contribuir para o conhecimento existente e fornecendo novas informações sobre as folhas do camu-camu.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Myrciaria dubia* (camu- camu)

O camu-camu é um arbusto nativo da floresta amazônica pertencente à família Myrtaceae. Essa família é de grande importância botânica e compreende cerca de 142 gêneros e 3.500 a 5.800 espécies distribuídas pelos trópicos e subtropicais. No Brasil, Myrtaceae são representadas por 23 gêneros e cerca de 1.025 espécies, das quais 244 foram registradas no norte do Brasil (Hernández *et al*, 2011; Ribeiro *et al*, 2021). Nesse contexto a *M. dubia* tem se destacado como uma espécie que tem atraído o interesse da indústria alimentícia e das pesquisas científicas que buscam novas fontes de compostos bioativos.

O camu-camu é um arbusto que cresce em áreas densas expostas a inundações substanciais (submersão completa durante quatro a cinco meses) nas margens de rios e riachos, da região amazônica incluindo Peru, Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela (Maeda *et al*, 2006, 2011; Ribeiro *et al*, 2021). Seus frutos são globulares, medem de 1,0 a 3,2 cm de diâmetro, pesam de 2 a 20 g, composto de uma a quatro sementes por fruto, a polpa é branca e a casca fina e brilhante que varia do rosa ao vermelho intenso. (Hernández *et al*, 2011; Castro *et al*, 2018). As sementes têm formato de rim a elipsóide, com tegumentos alongados marrons, finos e cobertos por vilosidades de células espinhosas (Castro *et al*, 2018).

Devido à alta concentração de ácido ascórbico no fruto nos Estados Unidos, Japão e França as indústrias farmacêuticas transformam o camu-camu em tabletes de vitamina C, enquanto que no Brasil é usado no preparo de cosméticos, na Amazônia são utilizados especialmente no preparo de refrescos, sorvetes, geleias, doces e licores (Ledezma, 2020; Maeda *et al*, 2006; Viegas *et al*, 2004).

Um dos fatores que contribuem para a restrição do seu consumo *in natura* é o sabor amargo muito ácido da polpa e o amargor da casca, levando a necessidade de pesquisas para o melhor aproveitamento do fruto. Uma das alternativas para a utilização desde fruto é o uso na forma de néctar, uma bebida natural, nutritiva, pronta para o consumo e de fácil processamento (Maeda *et al*, 2006; Grigio, 2017).

Existem muitas outras alternativas para o uso do camu-camu não só em indústrias alimentares como também farmacêuticas. Vem sendo testadas loção e gel elaborados com extrato estabilizado do fruto do camu-camu, afim de testar sua capacidade antioxidante e fotoprotetora *in vitro*, onde ambas as formulações mostraram atividade antioxidante e fatores de proteção satisfatórios (Camones *et al*, 2014 *apud* Grigio, 2017).

A avaliação dos compostos químicos e das propriedades funcionais das sementes e cascas do camu-camu e suas frações contribui para um melhor aproveitamento e sua valorização econômica, bem como para a redução da pegada de carbono na cadeia de processamento dos frutos (Fidelis *et al*, 2018) pois o entendimento aprofundado dos compostos químicos do fruto pode contribuir para uma gestão mais sustentável da cadeia de suprimentos otimizando os processos logísticos e reduzindo as emissões associadas ao transporte e armazenamento.

O uso industrial de subprodutos do camu-camu (por exemplo, sementes e cascas) reduziria os danos ao meio ambiente causados pelo descarte de resíduos, e a incorporação da casca à polpa pode ser uma alternativa viável para aumentar as concentrações de compostos bioativos nos produtos processados, pois na casca esses compostos estão mais concentrados (Fidelis *et al*, 2020).

2.2 Compostos bioativos presentes na *Myrciaria dubia*

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, amplamente encontrados em frutas, hortaliças e grãos. Esses metabólitos secundários fenólicos têm mostrado funcionalidades bioativas relevantes para a saúde humana (Fujita *et al*, 2015). O camu-camu da região amazônica apresenta altas funcionalidades bioativas, vitamina C e perfis fenólicos ricos, como flavonoides e elagitaninos e também carotenoides (Akter *et al*, 2011; Fujita *et al*, 2015).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que nos últimos anos têm ganhado muita atenção, devido à sua atividade antioxidante e capacidade sequestradora de radicais livres (Fujita *et al*, 2015; Chirinos *et al*, 2010). Além disso alguns desses compostos fenólicos possuem propriedades anti-inflamatórias e apresentam potencial para combater doenças crônicas induzidas pelo estresse oxidativo quando consumidos como parte da dieta (Fujita *et al*, 2015).

Tabela 1: Estudos que caracterizaram os grupos de compostos fenólicos da *M. dubia*.

Grupos fenólicos identificados	Matéria prima	Total de compostos fenólicos identificados	Autor
Ácidos fenólicos, Flavonoides, Estilbenos e Taninos	sementes	16	Fidelis <i>et al</i> (2020)
Flavonoides	casca e semente	11	Chagas <i>et al</i> (2021)
Taninos, Flavonoides e ácidos fenólicos	polpa	Não especificado	Fujita <i>et al</i> (2015)
Flavonoides e taninos	casca, semente e polpa	53	Fracassetti <i>et al</i> (2013)
Flavonoides e ácidos fenólicos	fruto	30	Chirinos <i>et al</i> (2010)

Na tabela 1 é apresentado um ponto de vista geral dos grupos de compostos fenólicos já identificados na *M. dubia* o interesse dos estudos recentes está voltado principalmente as sementes do camu-camu e resíduos (semente, casca e polpa) provenientes do processamento do fruto, devido o teor de compostos fenólicos que conferem as propriedades antioxidante e citotóxica que são alvo de estudos científicos. Além do mais, a extração e análises de compostos bioativos a partir de subprodutos de frutas tem sido cada vez mais estudada a fim de evitar perdas e desperdícios importantes, além de representar potenciais benefícios para aplicações em indústrias farmacêuticas e alimentícias (Fidelis *et al*, 2018; Carmo *et al*, 2019).

Poucos estudos relataram uma composição química completa, particularmente a caracterização de compostos fenólicos do fruto de camu-camu. O teor de fenólicos tem sido frequentemente avaliado como polifenóis totais nos frutos, e os principais componentes previamente identificados foram ácido elágico, quercetina, rutina e ácido gálico (Chirinos *et al*, 2010; Fracassetti *et al*, 2013).

2.3 Atividade antioxidante da *M. dubia*

A propriedade antioxidante dos compostos bioativos encontrados em plantas tem um papel fundamental para a saúde, pois já foi mostrado que podem combater o estresse e suas implicações em várias doenças. O camu-camu é uma planta nativa do Brasil e vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa, pois além da concentração de compostos fenólicos e ácido ascórbico (864 mg/100 g de polpa), já mostrou ter considerável capacidade antioxidante (Carmo *et al*, 2019; Silva *et al*, 2023).

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. Por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (Barreiros *et al*, 2006).

A atividade antioxidante da *M. dubia* é atribuída a alta concentração de compostos fenólicos e vitamina C presente no extrato. A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos (flavonoides) vem da capacidade de eliminar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio e quelantes de metais (Silva *et al*, 2012; Fracassetti *et al*, 2013). Os fenóis são potentes antioxidantes, são compostos que evitam que biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lipídios poliinsaturados e açúcares) sofram danos oxidativos através de reações mediadas por radicais livres (Voulo *et al*, 2019).

Kaneshima, *et al* (2016) identificou que alguns taninos presentes na semente do camu-camu, especialmente a estaquiurina apresentaram atividade antioxidante. Além do mais, compostos fenólicos como elagitaninos, ácido elágico, glicosídeos de quercetina, ácido siríngico e miricetina identificado na polpa do camu-camu também seriam responsáveis pela propriedade antioxidante (Fujita *et al*, 2015).

Os estudos também apontam que a capacidade antioxidante da *M. dubia* é influenciada pela maturação do fruto. Chirinos e colaboradores (2010) verificaram que o ácido ascórbico contribuiu de forma significativa para a capacidade antioxidante global do camu-camu, porém diminuiu durante o amadurecimento, enquanto que os teores de antocianinas, flavonol, flavanol e a capacidade antioxidante aumentaram durante o amadurecimento do fruto.

Apesar das sementes e cascas de camu-camu representarem cerca de 40% do fruto são tratados como subprodutos, geralmente descartados sem tirar proveito de seus constituintes químicos, esses resíduos podem apresentar maior potencial antioxidante quando comparados à polpa, uma vez que a maioria dos compostos bioativos se concentra nas partes dos frutos que são tratados como subprodutos pela indústria alimentícia (Fidelis *et al*, 2018; Azevêdo *et al*, 2014). Além do mais, nota-se que as folhas da *M. dubia* também possuem compostos bioativos importantes, o aproveitamento integral dessas partes da planta apresenta um potencial fonte de recursos valiosos que poderiam contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de produtos com benefícios nutricionais e antioxidantes aprimorados.

O processamento desses subprodutos tem potencial para se tornar um segmento do agronegócio, contribuindo para um melhor aproveitamento, tanto na indústria de alimentos quanto na cosmética, permitindo assim sua valorização econômica (Azevêdo *et al*, 2014; Fidelis *et al*, 2018).

2.4 Atividade citotóxica da *M. dubia*

O câncer tem atraído atenção mundial. Embora terapias tradicionais como cirurgia, quimioterapia e radioterapia tenham alguns efeitos no tratamento do câncer, existem efeitos colaterais significativos, além da resistência e toxicidades das drogas. Assim, a busca por compostos citotóxicos eficientes a partir de recursos naturais é de grande importância, nesse sentido, pesquisas têm mostrado que alguns polifenóis podem atuar como agentes antiproliferativos contra diversos tipos de câncer (Carmo *et al*, 2019).

Estudos tem indicado que alguns polifenóis identificados no camu-camu podem ter ação antiproliferativa. Carmo e colaboradores (2019), descreve que os polifenóis são compostos que mostraram ter capacidade de inibir a

proliferação celular e induzir a apoptose, além de poderem agir nas vias de sinalização celular que participam do crescimento e manutenção das células cancerosas.

Pesquisas já demonstraram a ação do camu-camu na modulação de processos inflamatórios e propriedade antimicrobiana (Fidelis *et al*, 2019). O extrato bruto de camu-camu é uma complexa mistura de polifenóis, que apresentou efeitos sinérgicos *in vivo* na antimutagênese, esse extrato foi capaz de diminuir o estresse oxidativo e proteger contra os efeitos mutagênicos de drogas na medula óssea e micronúcleos intestinais (Azevedo *et al*, 2018; Fidelis *et al*, 2019; Carmo *et al*, 2019). Apesar dos estudos recentes terem mostrado citotoxicidade do extrato do camu-camu contra células cancerosas, ainda existe uma carência em estudos aprofundados sobre as folhas e os mecanismos da atividade citotóxica, pois pouco se conhece a respeito dos compostos específicos responsáveis pelo efeito citotóxico da *M. dubia*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e atividades biológicas do extrato e frações das folhas de *M. dubia*.

3.2 Objetivos específicos

- Obter perfil químico do extrato bruto e frações por meio de reações cromáticas em tubo e cromatografia em camada delgada;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações através da inibição do radical DPPH;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto e frações em diferentes linhagens celulares pelo método MTT;

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta do vegetal

As folhas de *M. dubia* foram coletadas dia 11 de agosto de 2018, no sítio Bom Futuro na estrada do Janamã (Localização geográfica: S 03°06'39,77" W 058°29'41,3") para obtenção do extrato bruto e frações. As folhas foram limpas com pano umedecido em água destilada. Posteriormente, as folhas foram colocadas na estufa (sem circulação forçada) a 50°C para secar por quatro dias. Em seguida trituradas no moinho de martelo e pesadas, obtendo-se 439,96g. Os galhos com folhas e flores foram utilizados para confeccionar exsicata.

4.2 Extração e fracionamento

O material seco e moído foi colocado em um balão de 12L e foi adicionado etanol 70% (EtOH), obtendo-se o extrato hidroalcolico que foi rataevaporado para a retirada total do solvente obtendo assim o extrato aquoso. O extrato aquoso obtido foi fracionado através de partição liquido-liquido usando solventes P.A em ordem crescente de polaridade: Hexano (HX) < Clorofórmio (CHCl₃) < Acetato de etila (AcoEt) < Butanol (ButOH), em seguida as frações foram concentradas em evaporador rotatório e os rendimentos foram calculados.

4.3 Prospecção fitoquímica para caracterização de fenólicos

Neste pesou-se 500 mg do extrato bruto e em seguida foram realizadas três lavagens com 2 mL de clorofórmio cada, obtendo-se o resíduo insolúvel. Filtrou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio foi adicionado 30 mL de metanol 70%, a solução foi solubilizada, filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol 70%. Para as frações: acetato de etila, butánolica e hidroalcoólica, foram pesados 50 mg e em seguida adicionou-se 30 mL de metanol 70%, as soluções foram transferidas para balões 100 mL e os volumes completados com metanol 70%.

Identificou-se tubos ensaio de um a seis e um tubo identificado com "Branco" totalizando sete tubos, cada um em triplicata, exceto o para o branco, isto para cada fração e extrato bruto

4.3.1 Teste para fenóis e taninos

Nos tubos de ensaio identificado com FeCl_3 foi colocado três gotas de cloreto férrico III (FeCl_3), a solução foi agitada e observada a variação da cor ou formação de precipitado na solução. O resultado esperado na solução é mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Teste para fenóis e taninos

Constituintes	Coloração
Fenóis	Azul e vermelho
Taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis)	Precipitado escuro de tonalidade azul
Taninos flobabênicos (tanino condensados ou catéquicos).	Verde

Fonte: Matos (2009)

4.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

O tubo 3 foi acidulado com ácido clorídrico (HCl) até se obter o pH 3, o tubo 4 foi alcalinizado a pH 8,5 com Hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e o tubo 5 a alcalinizado a pH 11 com a mesma solução de NaOH. O resultado esperado nas soluções é mostrado na tabela 3.

4.3.3 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Para esse teste um tubo acidificado a pH 3 com ácido clorídrico (HCl) e outro tubo de ensaio alcalinizado a pH 11 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M no teste para antocianinas foi aquecido no bico de Bunsen por 2 minutos, a alteração da solução esperada encontra-se indicada na tabela 3.

Tabela 3: Teste para antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas e flavanonas.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ^(8,5)	Alcalino ⁽¹¹⁾
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chaconas e auronas	Vermelha	-	Verm. púrpura
Flavonóis e flavononol	-	-	Verm. púrpura
Leucoantocianidinas	Vermelha	-	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-vermelha	-	-
Flavanonas	-	-	Verm. laranja

Fonte: Matos (2009)

4.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard)

Foram pesados 50 mg do extrato bruto e 30 mg das frações HX, PP e CHCl₃. Em seguida, as amostras foram extraídas com 2mL de diclorometano e filtradas para os tubos de ensaio usando um funil coberto por algodão com sulfato de sódio. Em seguida foi adicionado 1mL de anidrido acético aos tubos de ensaio e agitou-se suavemente. Por fim foram adicionadas três gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado seguido de agitação.

Quando a solução apresenta uma coloração Azul evanescente e verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres e a coloração parda vermelha a presença de Triterpenoides pentacíclicos livres (Matos, 2009).

4.5 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides

Para esse ensaio foram pesados 500mg do extrato bruto e 100 mg das frações mais polares (AcOEt, ButOH e HD). O extrato bruto foi lavado três vezes com 2mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e o resíduo insolúvel foi filtrado. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de água acidificada (pH=4) nas frações e no resíduo insolúvel do extrato bruto. Depois foi feita uma filtração e um terço do volume das amostras foi transferido para os tubos de ensaio. Em

seguida, as amostras foram basificadas usando uma solução de Hidróxido de amônio 0,01 N até se obter pH=11. Posteriormente foi feita uma extração com 7 mL de diclorometano, retirou-se a fase orgânica e transferiu-se para outro tubo de ensaio. A observação de formação de precipitado floculoso, é indicativo da presença de alcaloides.

4.6 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas

Para o teste foram pesados 300 mg das frações AcoEt, ButOH, HD e extrato bruto de *M. dubia*. Em seguida, as amostras foram solubilizadas com 10 mL de água destilada, e filtradas para os tubos de ensaio. As soluções foram agitadas por 3 minutos. Matos (2009) diz que a formação de espuma persistente na solução é indicação da presença de saponinas.

4.7 Teste de confirmação para saponinas

Nos tubos de ensaio do teste de caracterização de saponinas foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico concentrado. Os tubos foram imersos em banho-maria por 1h e em seguida foram colocados para esfriar em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado nos tubos de ensaio hidróxido de amônio 0,01 N e as soluções foram agitadas novamente. Para Matos (2009) a não formação de espuma e ausência de precipitado confirma a presença de saponinas nas amostras.

4.8 Avaliação em placas cromatográficas

O perfil químico foi obtido direcionando-se o protocolo para avaliar a presença de terpenos, alcaloides, fenólicos e flavonoides, usando-se para isso reagentes reveladores como: solução de Difetilborato 1% (solução NP), cloreto férrico, vanilina e Dragendorff (GUIMARÃES, 2005).

4.9 Teste antioxidante

A atividade antioxidante foi medida pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). O teste foi feito com o extrato bruto (EB) e as frações butanol (ButOH), acetato de etila (AC) e hidroalcoólica (HD). A placa cromatográfica foi enumerada de 1 a 4, identificada com a sigla do sistema de eluição e do reagente DPPH, foi colocada três vezes em uma cuba de vidro usando como eluente o metanol para eliminar as impurezas, depois foi levada

para a estufa por 30 minutos para ativação, foi posteriormente retirada e colocada para esfriar em temperatura ambiente, 1 mg do extrato bruto e 5 mg das frações butanol, acetato de etila e hidroalcoólica, foram solubilizadas em metanol, e aplicadas na placa cromatográfica com auxílio de capilares.

A placa cromatográfica foi inserida na cuba de vidro para eluição no sistema de eluição BAW (5:1:4) até que a fase móvel cobrisse toda a placa, sendo, posteriormente, retirada. Umedeceu um pedaço de algodão na solução de DPPH e usando o algodão espalhou-se a solução nas áreas onde as amostras foram aplicadas e depois aguardou-se a reação ocorrer.

4.10 Teste citotóxico

Análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al*, 1996).

As células foram plaqueadas nas concentrações de 7×10^4 céls/mL (HCT-116), 1×10^5 céls/mL (SNB19 e PC3), 3×10^5 céls/mL (HL60), e 5×10^5 céls/mL (HaCat). As amostras foram testadas primeiramente em concentração única nas linhagens Carcinoma de cólon (HCT-116), carcinoma de próstata (PC3) e Astrocitoma (SNB-19). Em seguida, após a seleção das amostras com porcentagem de inibição acima de 60%, foi realizada a diluição seriada nas concentrações máxima e mínima de 250 a 3,90 $\mu\text{g/mL}$ (para os extratos), 100 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ (para as frações), em duplicata em três experimentos diferentes. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C. Ao término deste, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 100 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 μL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

A análise das amostras testadas contra a linhagem não tumoral HaCat teve como objetivo a obtenção de dados para o cálculo do Índice de Seletividade (IS), que indica a seletividade de um determinado composto entre uma linhagem tumoral e uma não tumoral. Esse resultado direciona o potencial da utilização de um composto em estudos futuros na respectiva linhagem tumoral avaliada. O cálculo deste índice corresponde à divisão entre o valor da CI_{50} de cada composto-teste na linhagem de célula não tumoral (HaCat) e o valor da CI_{50} de cada composto na linhagem de células tumorais ($IS = CI_{50} \text{ HaCat} / CI_{50} \text{ células tumorais}$) (Tabela 8). Suffness e Pezzuto (1991) consideraram IS significativo aquele que apresentava um valor maior ou igual a 2,0; ou seja, o composto apresenta atividade duas vezes maior na linhagem de células tumorais do que na linhagem não tumoral.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Para a pesquisa foram obtidos 93,88 g de extrato das folhas da *M.dubia*, o rendimento do extrato bruto e frações: Precipitado, Hidroalcoólica, hexano, acetato de etila e butanol encontra-se na tabela 1 e os cálculos para obter a porcentagem dos rendimentos foram feitos usando a equação 1.

$$(R\%) = \frac{\text{Massa das frações}}{\text{Massa total do extrato}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

Tabela 4: Rendimentos do extrato bruto e das frações do camu-camu

Amostras	Peso	Rendimentos
Extrato Bruto (EB)	39,51g	42,0%
Precipitado (PP)	23,54g	25,0%
Hexano (HX)	0,022g	0,02%
Clorofórmio (CHCl₃)	6,31g	6,72%
Acetato de Etila (AC)	7,96g	8,4%
Butanol (ButOH)	5,58g	5,9%
Hidroalcoólica (HD)	10,96g	11,67%

5.1 Prospecção fitoquímica para caracterização de fenólicos

As plantas são fontes abundantes de compostos fenólicos. A triagem fitoquímica preliminar pode fornecer uma indicação dos constituintes fenólicos. Testes qualitativos simples baseados em observações de cor ou na formação de precipitados com reagentes específicos podem mostrar a presença de certos compostos fenólicos (Kisiriko *et al*, 2021).

Os compostos fenólicos são metabólitos especializados das plantas, com um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila, e podem ser encontrados desde os mais simples, como os ácidos fenólicos, até os mais complexos, como os taninos (Alara *et al*, 2021). A prospecção fitoquímica para fenólicos é uma técnica que tem como objetivo identificar e caracterizar no extrato de plantas compostos fenólicos. Foram avaliados o extrato bruto e frações: acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica.

Na prospecção fitoquímica a caracterização dos compostos fenólicos ocorre por meio de reações químicas que causam mudanças de coloração e até formação de precipitado. Na técnica descrita por Matos (2009) a formação da cor vermelho-azul significa a presença de fenóis e a presença de precipitado escuro de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos). Esse procedimento mostrou fenóis no extrato bruto, enquanto que as frações butanólica, acetato de etila e hidroalcoólica exibiu a presença de taninos flobabênicos como mostra no tubo de ensaio identificado FeCl_3 nas figuras de 1 a 4.

O teste do cloreto férrico utiliza-se de uma reação de complexação entre a hidroxila fenólica e o Fe^+ , os fenóis ao reagirem com cloreto férrico (FeCl_3) formam complexos coloridos, sendo está uma das reações que identificam esses compostos. A coloração do complexo formado varia do azul ao vermelho, dependendo do solvente, essa reação pode ocorrer em água, metanol ou diclorometano (Pazinato *et al*, 2012).

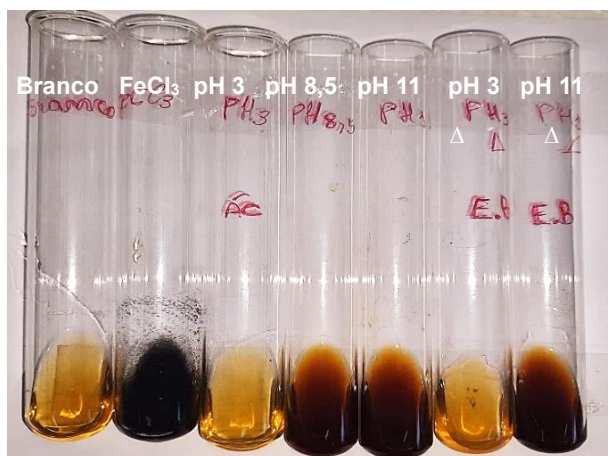
Alguns compostos fenólicos como antocianinas, antocianidinas e flavonoides se comportam de formas distintas conforme a variação de pH, Matos (2009) explica que por isso a caracterização desses compostos é feita em pH 3, pH 8,5 e pH 11. Antocianinas e antocianidinas em pH 3 formam cor vermelha, em pH 8,5 cor lilás e em pH 11 coloração azul-purpura. Por sua vez Flavonas, Flavonóis e Xantonas em pH 11 tem cor amarela. Isso acontece porque os flavonoides sofrem redução pelo hidrogênio liberado na reação do magnésio (Mg) com o ácido clorídrico (HCl), além de facilitar a formação dos complexos coloridos. Chalconas e Auronas em pH 3 apresentam cor vermelha e em pH 11 cor vermelho purpura, enquanto que flavonóis e flavanonol cor vermelho laranja em pH 11. Os resultados do ensaio revelaram a presença de flavanonol e flavanonas nas frações acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica, o extrato bruto evidenciou a presença de flavanonas, chalconas e auronas.

As antocianinas, são amplamente distribuídas nas frutas e nos vegetais são flavonoides estruturalmente relacionados com a flavona. O cloreto de cianidina é um sal vermelho (pH ácido) e sua cor varia conforme o pH da solução. Em solução fracamente básica (pH 8), toma a coloração violeta devido à

formação da anidrobases, de estrutura quinoide. Em repouso, a solução torna-se incolor pela conversão da anidrobases para a pseudobases, onde se perde a estrutura quinoide. Quando esta solução incolor passar para uma alcalinidade maior (pH 12), a cor passa a azul devido à formação do ânion da anidrobases. Se esta solução se torna ácida (pH < 4), a cor passa a vermelho por causa da regeneração do cloreto de cianidina. Por outro lado, em repouso e solução alcalina, todos os compostos são convertidos em chalconas, de cor amarela (Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2017 *apud* Santos, 2018).

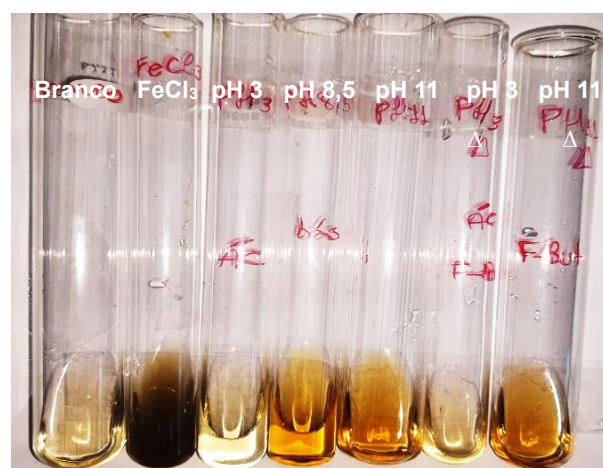
Na caracterização de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas, Matos (2009) recomenda que as soluções contendo as amostras sejam testadas em pH ácido entre 1-3 e pH alcalino de até 11 e aquecidas. Em pH 3 as leucoantocianidinas tem cor vermelha e as catequinas coloração pardo-amarelo e em pH 11 as flavanonas apresentam coloração vermelho laranja como indicado pela tabela 3. O resultado obtido nesse teste revelou a presença de flavanonas no extrato bruto e nas frações butanólica, acetato de etila e hidroalcolólica, como mostra o tubo identificado com pH 11 Δ nas figuras de 1 a 4.

Figura 1: Extrato bruto



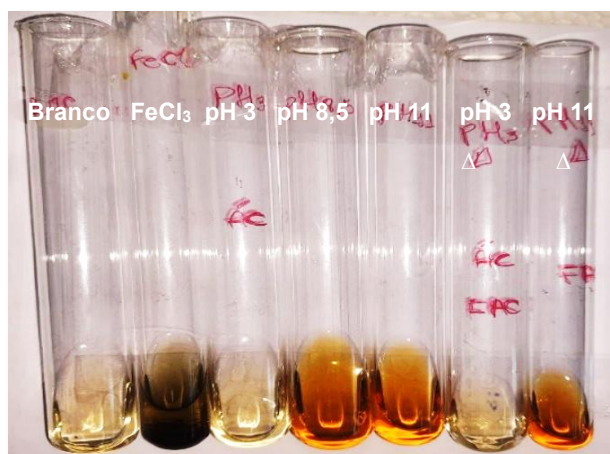
Fonte: AUTOR, 2022

Figura 2: Fração Butanólica



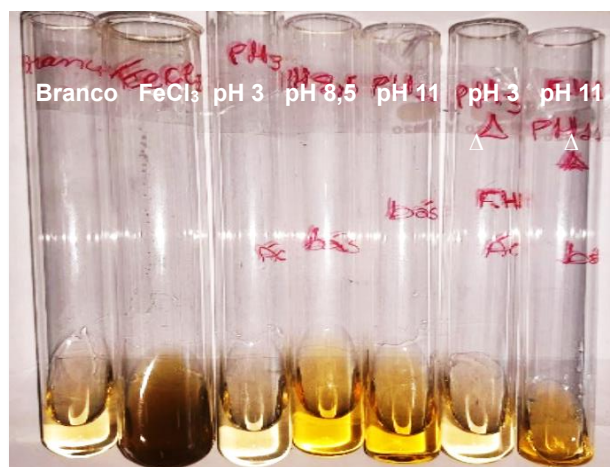
Fonte: AUTOR, 2022

Figura 3: Fração Acetato de etila



Fonte: AUTOR, 2022

Figura 4: Fração Hidroalcolólica



Fonte: AUTOR, 2022

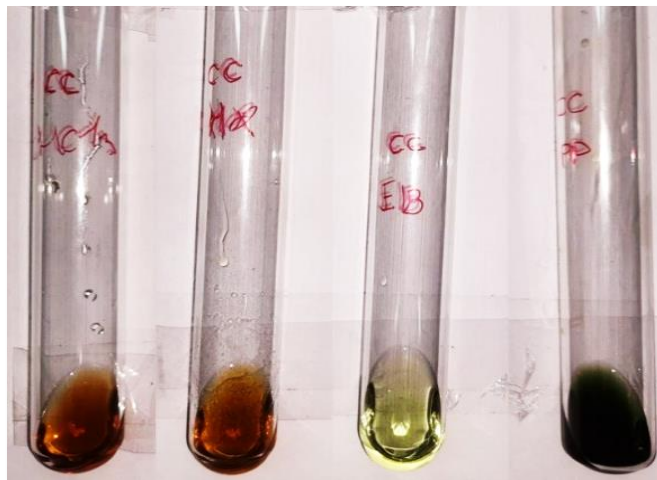
Tabela 5: Constituintes fenólicos das frações de *M. dubia*

Classes	EB	AC	BUT	HD
Fenóis e taninos	Fenóis	Taninos flababênicos	Taninos flababênicos	Taninos flababênicos
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	Flavonas	Flavonas	Flavonas
Chalconas e auronas	+	-	-	-
Flavanonol	-	+	+	+
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-
Flavanonas	+	+	+	+

A prospecção fitoquímica resultou na identificação de seis grupos de compostos fenólicos (Fenóis, taninos flobabênicos, flavanonas, flavanonol e flavonas) diferentes no extrato bruto e nas frações do extrato das folhas do camu-camu como apresenta a tabela 5. Chagas *et al* (2021) identificaram flavanonas no coproduto (semente, casca e resíduos de polpa) e Chirinos *et al* (2010) no fruto do camu-camu. Taninos condensados foram identificados nas sementes por Fidelis *et al* (2019) e Carmo *et al* (2020), assim como taninos hidrolisáveis no fruto foi caracterizado por Chirinos *et al* (2010). Essas descobertas corroboram com os achados previamente relatados na literatura científica.

5.2 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard)

Figura 5: Fração clorofórmio, hidroalcolólica, extrato bruto e precipitado



Fonte: AUTOR, 2022

O principal teste analítico para detecção de esteroides em plantas é a prova de Liebermann-Burchard, que consiste no tratamento da amostra com anidrido acético em presença de ácido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico ocorrendo a desidratação seguida de oxidação do sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno formando um esteroide aromático que é evidenciada pelo aparecimento de uma coloração azul esverdeada (Burke, 1974; Xiong, 2007 *apud* Gustavo, 2009).

O extrato bruto (EB) e a fração precipitado (PP) demonstraram ter esteroides livres e as frações clorofórmio (CHCl_3) e hexânica (HX) a presença de triterpenoides pentacíclicos. Segundo Matos (2009) a cor vermelha pardo na solução indica triterpenoides pentacíclicos livres enquanto que a formação da cor verde a presença de esteroides livres como mostra a figura 5.

O estudo feito por Ribeiro *et al* (2021) identificou terpenos nas sementes da *M. dubia* e Souza *et al* (2021) constatou a presença de terpenos em todos os estágios de maturação do fruto. Herrera *et al*, (2018) usando o mesmo método de Liebermann-Burchard verificou a presença de terpenos e esteroides no extrato etanólico da *M. dubia*. Essas descobertas estão em concordância com as evidências previamente reportadas na literatura.

5.3 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas

Figura 6: Fração butanólica, acetato de etila, hidroalcoólica.



Fonte: AUTOR, 2022

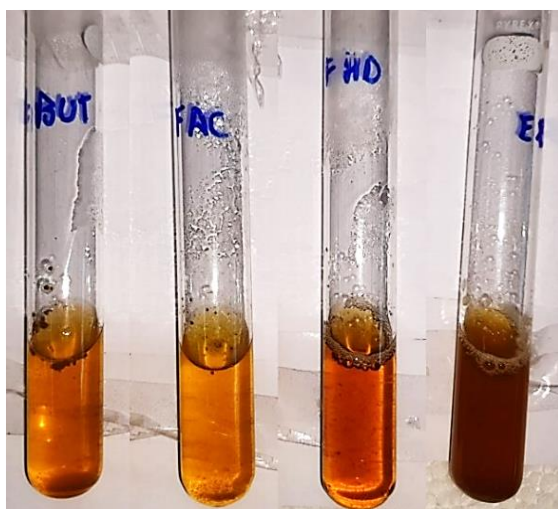
No teste inicial todas as amostras indicaram a presença de saponinas. No teste confirmatório de saponinas o extrato bruto (EB) e a fração hidroalcoólica (HD) apresentaram saponinas triterpênicas e as frações: acetato de etila (AC) e (ButOH) saponinas esteroidais. Na metodologia descrita por Matos (2009), quando tem a formação de espuma na solução é indicativo da presença de saponinas, e a confirmação é a não formação de espuma e presença de precipitado quando o hidróxido de amônio é adicionado à solução.

As saponinas tem glicosídeos que são compostos não nitrogenados que se dissolvem em água originando soluções afrógenas (espumantes), por diminuição da tensão superficial do líquido. Apresentam ainda as propriedades de emulsionar óleos e de produzir hemólise. Esta última deve-se à capacidade do glicosídeo de se combinar com as moléculas de colesterol presentes na membrana dos eritrócitos, perturbando o equilíbrio interno-externo e promovendo a ruptura da célula com consequente liberação da hemoglobina (Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2009)

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al* (2012) que relatou a presença de saponinas no fruto da *M. dubia* e Silva (2018) que demonstrou por análise fitoquímica a presença de saponinas e taninos no suco do camu-camu. Dessa forma os resultados obtidos corroboram com aqueles encontrados na literatura sobre a presença de saponinas no camu-camu.

5.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides

Figura 7: Fração extrato bruto, hidroalcoólica, acetato de etila e butanoica.



Fonte: AUTOR, 2022

Na caracterização para alcaloides o extrato bruto (EB) e as frações: hidroalcoólica (HD), acetato de etila (AC) e butanólica (ButOH) indicaram a presença de alcaloides como mostra a figura 7. Matos (2009) diz que presença de precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos é indicativo da presença de alcaloides na amostra

Os achados estão de acordo com Ribeiro *et al* (2021) que relatou a presença de alcaloides nas sementes do camu-camu, Herrera-Calderón *et al*, (2018) que relatou que em extratos etanólicos do fruto da *M. dubia* contém alcaloides e Silva, *et al* (2022) que identificaram alcaloides na casca do fruto.

5.5 Avaliação das placas cromatográficas (CCD)

Figura 8: Fase estacionaria de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador vanilina sulfúrica.

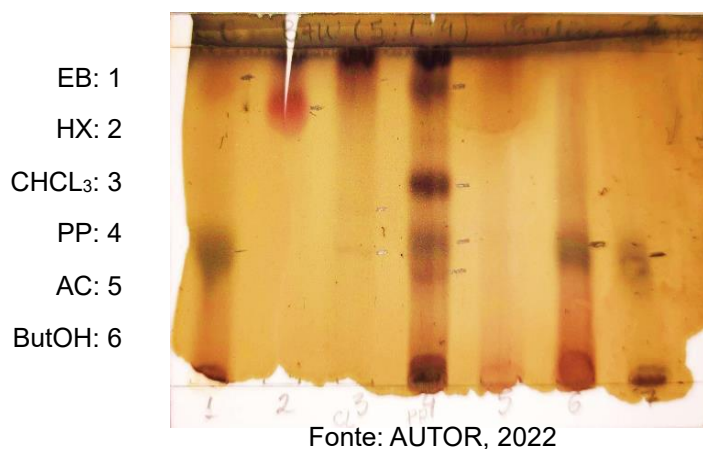
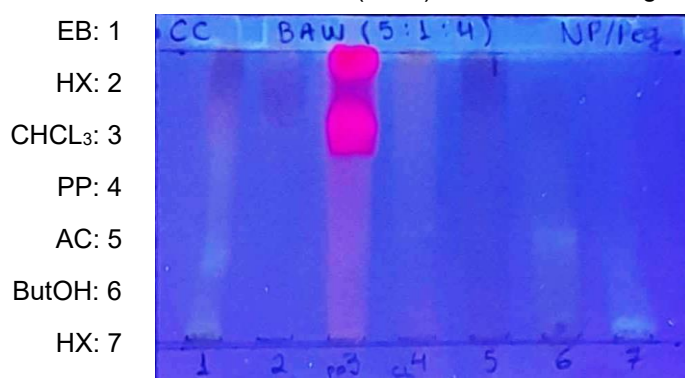


Figura 9: Fase estacionaria de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador vanilina sulfúrica



Figura 10: Fase estacionaria de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador NP/Peg.



A cromatografia em delgada (CCD) indicou a presença de terpenos no extrato bruto (EB) e nas frações: clorofórmica (CHCl₃), hexânica (HX), precipitado (PP), butanólica (ButOH) e hidroalcoólica (HD). A presença de terpenos é indicada pela cor marrom como mostra a figura 8. O extrato bruto (EB) e as frações: precipitado (PP) acetato de etila (AC) mostraram ter flavonoides. A presença desse composto é evidenciada pelo aparecimento da cor amarela na placa cromatográfica mostrada na figura 9 e pela coloração rosa neon na figura 10.

Chagas *et al* (2021) identificaram onze flavonoides nos coprodutos (sementes, cascas e polpa residual) do camu-camu. Da mesma forma Fracassetti *et al* (2013) caracterizaram flavonoides na farinha de resíduos (semente e cascas), assim como terpenos foram identificados nas sementes da *M. dubia* por Ribeiro *et al* (2021). Portanto os resultados obtidos corroboram com aqueles encontrados na literatura.

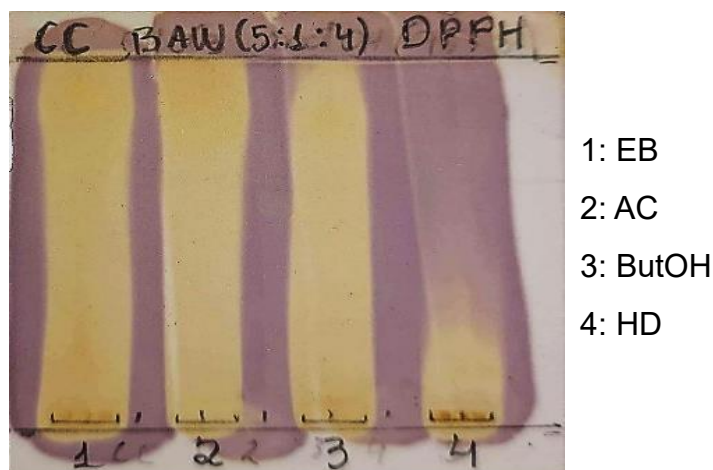
O sistema de eluição BAW (butanol, ácido acético e água) não separou os compostos. A vanilina só revelou terpenos na primeira placa cromatográfica. Na segunda placa cromatográfica como mostra a figura 9, a vanilina sulfúrica revelou terpenos e flavonoides. Uma das explicações para a falha na separação pode ser atribuída a polaridade do sistema de eluição BAW ser semelhante ao das substâncias presentes nas frações.

Fidelis *et al* (2018) em seu trabalho com as sementes do camu-camu relataram que o sistema composto por 40,7% de água, 16% de álcool etílico e 43,3% de propanona foi um sistema de solvente promissor para extrair o maior teor de compostos bioativos em sua pesquisa, os compostos apolares foram extraídos pela propanona. Carmo *et al* (2019) produziram diferentes extratos hidroalcolólicos das sementes do camu-camu e perceberam que havia diferença no conteúdo fenólico entre eles, sugerindo que o sistema de solventes afeta fortemente a extração de compostos fenólicos. O extrato hidroalcolólico composto por 50% H₂O + 50% de EtOH foi o que obteve melhores resultados em sua pesquisa.

O Fator de Retenção (RF) foi calculado usando a placa da figura 8, pois nelas estão todas as frações e o extrato bruto do camu-camu. Os seguintes fatores de retenção foram obtidos: extrato bruto (EB): 0,38 e 0,84, e para a frações: hexânica (HX): 0,74, clorofórmica (CHCl₃): 0,38 e 0,48, precipitado (PP): 0,3/ 0,4/ 0,54 e 0,8, butanólica (BuOH): 0,38 e hidroalcolólica (HD): 0,34. Não foi possível calcular o Rf da fração acetato de etila (AC) porque não houve separação.

5.6 Teste Antioxidante da *M.dubia*

Figura 11: Fase estacionaria de sílica gel, fase móvel BAW (5:1:4), revelador DPPH



Fonte: AUTOR, 2022

O teste de DPPH foi feito com as frações mais polares: ButOH, AC e HD e o EB (Figura 11). O teste mostrou que o extrato bruto (EB) e as frações acetato de etila (AC) e butanol (ButOH) apresentam uma alta atividade antioxidante em comparação com a fração hidroalcoólica (HD) (figura 11).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (Alves *et al*, 2010).

Fidelis *et al* (2020) atribuem a atividade antioxidante da *M. dubia* a alta concentração de compostos fenólicos em sua composição. Os fenóis são potentes antioxidantes, são compostos que evitam que biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lipídios poliinsaturados e açúcares) sofram danos oxidativos através de reações mediadas por radicais livres (Voulo *et al*, 2019). Em sua capacidade antioxidante, os compostos fenólicos são potentes doadores de H⁺ para aceptores de radicais livres devido à deslocalização de elétrons através da molécula, produzindo radicais menos reativos e mais estáveis, prevenindo danos ao DNA, proteínas e lipídios (Carmo *et al*, 2021).

Kaneshima *et al* (2016) ao estudar a propriedade antioxidante das sementes da *M.dubia* identificou 6 taninos (Elagitaninos C-glicosídicos grandinina, vescalagina, castalagin, metilvescalagina, estaquiurina e casuarinina) responsáveis pela atividade antioxidante. A estaquiurina exibiu a atividade antioxidante mais forte entre os taninos identificados no estudo.

Fidelis *et al* (2018) ao estudar o extrato das sementes do camu-camu verificou que quanto menor o teor de compostos fenólicos, menor a capacidade antioxidante, já no estudo de Carmo *et al* (2019) o extrato aquoso das sementes exibiu maior teor de fenólicos totais e atividade antioxidante.

Dessa forma, os taninos flobabênicos e os flavonoides (flavona e flavanonol) presentes no extrato bruto e nas frações butanólica e acetato de etila, de acordo com a prospecção fitoquímica em tubos, podem ser responsáveis pela atividade antioxidantes das folhas da *M. dubia*. Esses resultados reforçam os achados por Kaneshima *et al* (2016) que atribui a atividade antioxidante aos taninos identificados na semente do camu-camu. Os outros estudos citados verificaram que a *M. dubia* tem uma significativa atividade antioxidante pelo método de DPPH, porém não relataram quais seriam os compostos responsáveis pela propriedade antioxidante.

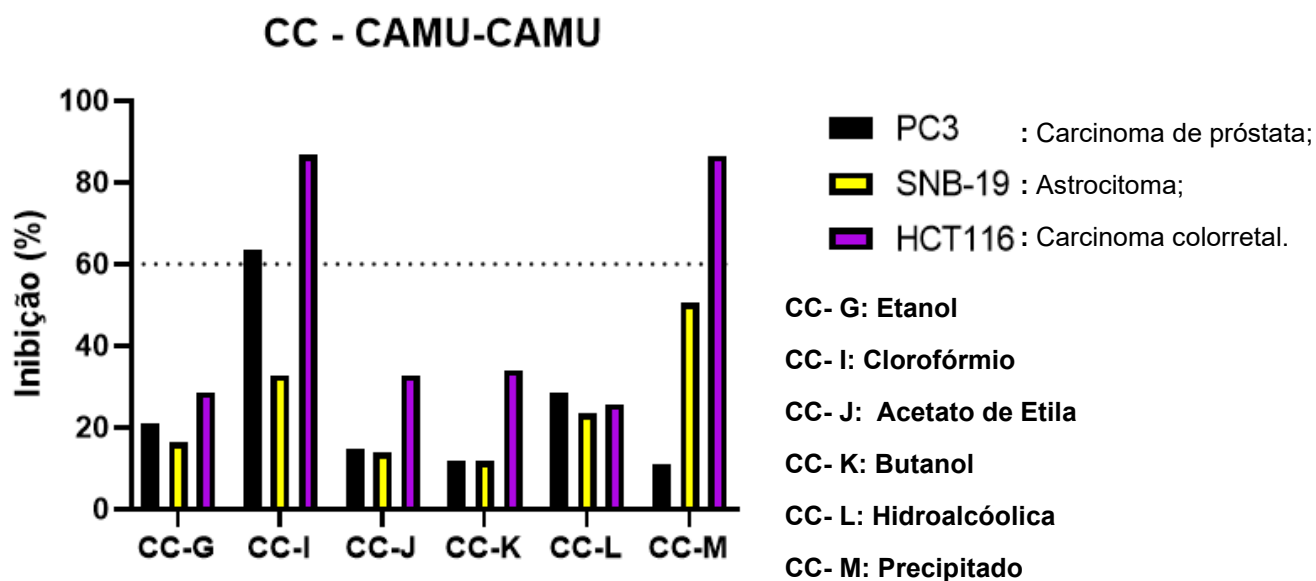
5.7 Teste citotóxico da *Myrciaria dubia*

Das seis amostras enviadas para o teste citotóxico, as frações precipitado e clorofórmio apresentaram potencial inibição de proliferação celular na concentração de 100 µg/mL. A amostra da fração precipitado apresentou 86,58% de inibição para a linhagem de carcinoma colorretal (HCT116) e a fração clorofórmica 63,50% para a linhagem de carcinoma de próstata (PC3) e 86,83% para a linhagem carcinoma colorretal (HCT116) como mostra a Tabela 6 e o gráfico na figura 12.

Tabela 6: Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais nas concentrações únicas de 250 µg/mL (para os extratos) e 100 µg/mL (para as frações) de Camu-camu.

Linhagem celular	PC3		SNB-19		HCT-116	
Amostras	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão
Etanolica	21,11	0,64	16,35	4,54	23,29	9,86
Clorofórmio	63,50	2,61	32,91	3,59	86,83	0,24
Acetato de etila	14,73	2,31	13,97	3,14	32,91	4,26
Butanólica	1,75	1,75	4,97	7,16	27,85	10,78
Hidroalcóolica	28,34	4,58	23,39	1,64	25,79	2,58
Precipitado	10,88	2,10	50,63	2,26	86,58	0,46

Figura 12: Gráfico de inibição em concentração única em três linhagens de células para os extratos do camu-camu



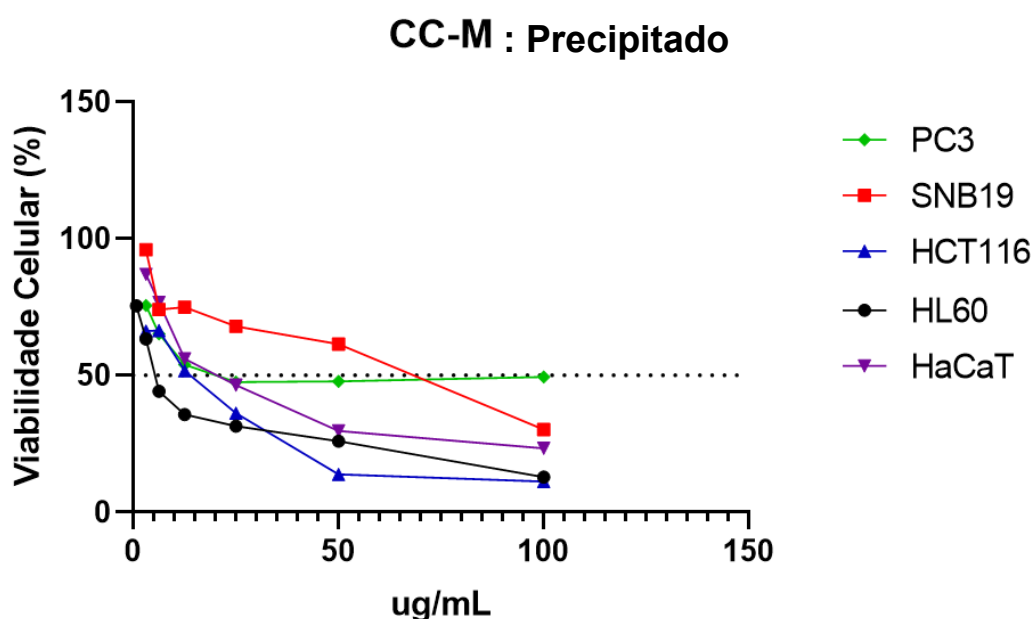
Na determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) a amostra clorofórmica apresentou 41,26 µg/mL para linhagem PC3, acima de 100 µg/mL para linhagem SNB19, 24,70 µg/mL para a linhagem HCT116 24,70 µg/mL e para a linhagem HL60 28,49 µg/mL. Enquanto a fração precipitado apresentou 33,56 µg/mL para linhagem PC3, 55 µg/mL para a linhagem SNB19, para a linhagem HCT116 10,91 µg/mL e para a linhagem HL60 5,80 µg/mL como mostra a tabela 7.

Sendo assim, as frações clorofórmica e precipitado foram mais ativas contra as linhagens de carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL 60), apresentando os menores valores obtidos (Tabela 7 e os gráficos na figura 13), por outro lado a fração precipitado que exibiu uma maior eficácia citotóxica com uma menor concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células cancerosas de carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica em comparação com a fração clorofórmio.

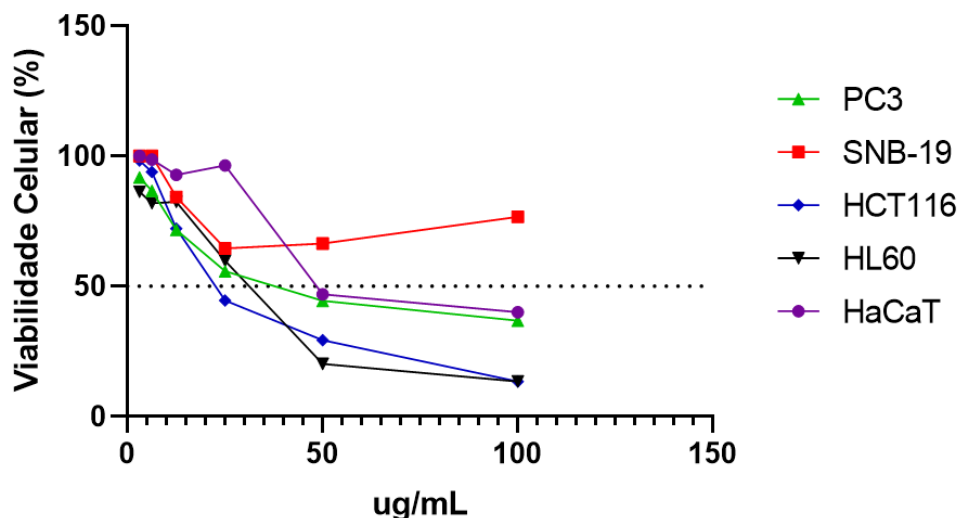
Tabela 7: CI₅₀ das amostras em linhagens de células após diluição seriada nas concentrações máxima e mínima de 250 a 3,90 µg/mL (para os extratos), 100 a 1,56 µg/mL (para as frações), 10 a 0,15 µg/mL (substâncias puras)

Linhagem celular	PC3		SNB-19		HCT-116		HL60		HaCaT		
	Amostra	CI ₅₀	95% IC	CI ₅₀	95% IC	CI ₅₀	95% IC	CI ₅₀	95% IC	CI ₅₀	95% IC
Clorofórmio		41,26	33,62-52,08	>100	-	24,70	23,08-26,44	28,49	25,17-32,17	65,1	52,05-85,90
Precipitado		33,56	22,00-65,90	55,14	42,19-77,82	10,91	8,86-13,25	5,80	4,42-7,39	20,66	18,48-23,14

Figura 13: Gráficos de CI₅₀ em concentração única em cinco linhagens de células nas concentrações máxima e mínima de 250 a 3,90 µg/mL (para os extratos), 100 a 1,56 µg/mL (para as frações).



CC-I : Clorofórmio



Carmo *et al* (2019) demonstrou que o extrato hidroalcolico das sementes da *M. dubia* tem efeito citotóxico contra as linhagens de células cancerígenas de carcinoma hepatocelulas (HepG2), adenocarcinoma de pulmão (A549), carcinoma de colón (Caco-2 e HCT8.) A metilvescalagina e epicatequina foram os principais compostos fenólicos associados a citotoxicidade e nenhum dos extratos testados no estudo apresentou toxicidade em relação as células não cancerígenas de fibroblastos humanos embrionários (IMR90).

Segundo Fidelis *et al* (2020) o extrato otimizado da semente do camu-camu tem efeito citotóxico e atividade antiproliferativa contra as células cancerosa carcinoma de colón (HCT8) e adenocarcinoma de pulmão (A549), além de proteger os eritrócitos contra hemólise. Os resultados obtidos usando os extratos das folhas da *M. dubia* coletadas em Itacoatiara corroboram com os resultados obtidos por Fidelis *et al* (2020) e Carmo *et al* (2019).

Em relação a seletividade, as amostras precipitado e clorofórmio apresentaram valores de Cl_{50} de 65,10 e 20,66 $\mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem não tumoral HaCat, respectivamente esses valores foram usados para calcular o índice de seletividade (IS). A amostra clorofórmica apresentou maior seletividade para as linhagens de carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocitica (HL60) e a amostra precipitado foi mais seletiva apenas para a linhagem leucemia promielocitica (HL60) como mostra a tabela 8. As amostras não apresentaram seletividade para as demais linhagens.

Tabela 8: Índice de seletividade (IS)

AMOSTRA	Índice de Seletividade (IS)			
	PC3	SNB-19	HCT-116	HL60
Clorofórmio	1,58	< 2	2,64	2,29
Precipitado	0,62	0,37	1,89	3,56

Normalmente no teste citotóxico o índice de seletividade superiores a um são ideais porque indica uma maior toxicidade seletiva para células tumorais em relação a células normais. A fração clorofórmio apresentou índices de seletividades superiores a um para as linhagens carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60) indicado uma preferência na toxicidade dessas células cancerosas, enquanto a fração precipitado apresentou um índice de seletividade relativamente alto para a linhagem de leucemia promielocítica (HL60). Dessa maneira, apesar de a seletividade ter uma variação entre as linhagens de células, em especial células cancerígenas da linhagem carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60), os resultados indicam potencial terapêutico seletivo das frações precipitado e clorofórmio da *M. dubia* em relação as células tumorais.

6. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que as frações de *M. dubia* tem compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, esteroides livres, saponinas e flavonoides. O extrato bruto e as frações acetato de etila e butanólica apresentaram uma alta atividade antioxidante, possivelmente em decorrência da alta concentração de compostos fenólicos presentes nas folhas do camu-camu. O teste citotóxico mostrou que a fração clorofórmica e precipitado foram ativas contra células da linhagem carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60). A amostra clorofórmica apresentou maior seletividade para as linhagens carcinoma colorretal (HCT116) e leucemia promielocítica (HL60) e o precipitado foi mais seletivo apenas para a linhagem de leucemia promielocítica (HL60). Os resultados desse estudo evidenciam o potencial da *M.dubia* em termos de atividade antioxidante e citotóxica, possivelmente atribuído à presença de compostos fenólicos.

7. REFERÊNCIAS

- AKTER, S. Mst. *et al.* Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: A review **Food Research International**. v.44, p. 1728-1732, agos. 2011. Disponível em: < [Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu \(myrciaria dubia\) fruit: A review - ScienceDirect](#)> Acesso em 26 de set. 2023.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v.33, p. 2202–2210, out. 2010. Disponível em: < [scielo.br/j/qn/a/XS9CsdV86YbjrxfMjLGmXVL/?format=pdf&lang=pt](#)> Acesso em 28 de out. 2023
- AZEVÊDO, J. C. S. De *et al.* Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**. v. 62, p. 934-940, agos. 2014. Disponível em: < [Dried camu-camu \(Myrciaria dubia H.B.K. McVaugh\) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes - ScienceDirect](#)> Acesso em: 29 de set. 2023.
- AZEVÊDO, J.C.S., *et al.* Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. v. 73, p. 135-141, jul. 2015. Disponível em: < [Efeitos neuroprotetores do resíduo seco de camu-camu \(Myrciaria dubia HBK McVaugh\) em C. elegans - ScienceDirect](#)> Acesso em: 08 de out. 2023.
- AZEVEDO, L. *et al.* Camu-camu (*Myrciaria dubia*) from commercial cultivation has higher levels of bioactive compounds than native cultivation (Amazon Forest) and presents antimutagenic effects in vivo. **Science of food and agriculture**. v. 99, p. 624-631, Jan. 2019. Disponível em: <[Camu-camu \(Myrciaria dubia\) from commercial cultivation has higher levels of bioactive compounds than native cultivation \(Amazon Forest\) and presents antimutagenic effects in vivo - Azevedo - 2019 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library](#)>Acesso em: 25 de set. 2023.
- AZINATO, M. S., *et al.* Uma Abordagem Diferenciada para o Ensino de Funções Orgânicas através da Temática Medicamentos. **Química nova**. v. 34, p. 21-25, fev. 2012. Disponível em: <[05-EA-43-11.pdf \(sbq.org.br\)](#)> Acesso em: 13 de out. 2023.
- BORGES, L. L. *et al.* Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**. v. 153, p.224-233, jun.2014. Disponível em: < [Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus - ScienceDirect](#)> Acesso em 26 de set. 2023.
- CARMO, M. A. V. Do *et al.* Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agentes. **Food Research International**. v. 2019, p. 108551, Nov. 2019. Disponível: < [Hydroalcoholic Myrciaria dubia \(camu-camu\) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents - ScienceDirect](#)> Acesso em: 25 de set. 2023.

CARMO, M. A. V. Do, *et al.* Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view. In: GRANATO, D. **Advances in Food and Nutrition Research**. 2021, cap. 7, p. 253-280. Disponível em: < [Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view - ScienceDirect](#) > Acesso em: 16 de out. 2023.

CASTRO, J. C. *et al.* Camu-camu—*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. In: RODRIGUES, S. *et al.* **Exotic Fruits**. Editora: Academic Press, 2018. pag. 97-105. Disponível em: < [Camu-camu—Myrciaria dubia \(Kunth\) McVaugh - ScienceDirect](#) > Acesso em: 25 de set. 2023.

CHAGAS, E. G. L. das *et al.* Enrichment of antioxidants compounds in cookies produced with camu-camu (*Myrciaria dubia*) coproducts powders. **LWT**. v. 137, p.110472, fev. 2021. Disponível em: < [Enrichment of antioxidants compounds in cookies produced with camu-camu \(Myrciaria dubia\) coproducts powders - ScienceDirect](#) > Acesso em: 26 de set. 2023.

CHIRINOS, R. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**. v. 120, p. 1019-1024, jun. 2010. Disponível em: < [Compostos antioxidantes e capacidade antioxidante do camu peruano \(Myrciaria dubia \(H.B.K.\) McVaugh\) frutos em diferentes estádios de maturação - ScienceDirect](#) > Acesso em: 24 de set. 2023.

FIDELIS, M. *et al.* Camu-camu seed (*Myrciaria dubia*) - from side stream to an antioxidant, anti-hyperglycemic, antiproliferative, antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient. **Food Chemistry**. v. 310, p. 125909. abr. 2020. Disponível: < [Camu-camu seed \(Myrciaria dubia\) – From side stream to an antioxidant, antihyperglycemic, antiproliferative, antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient - ScienceDirect](#) > Acesso em: 25 de set. 2023.

FIDELIS, M. *et al.* In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**. Brasil, v. 120, p. 479-490, out. 2018. Disponível em: < [In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu \(Myrciaria dubia McVaugh, Myrtaceae\) seed coat: A multivariate structure-activity study - ScienceDirect](#) > Acesso em: 24 de set. 2023.

FRACASSETTI, D. *et al.* Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**. v. 139, p. 578-588, agos. 2013. Disponível em: < [Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit \(Myrciaria dubia\) - ScienceDirect](#) > Acesso em: 29 de set. 2023.

FUJITA, A. *et al.* Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. **Food Research International**. v. 77, p. 194-203, nov. 2015. Disponível em: < [Evaluation of](#)

[phenolic-linked bioactives of camu-camu \(Myrciaria dubia Mc. Vaugh\) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation - ScienceDirect](#)> Acesso em: 30 de set. 2023.

FUJITA, A. *et al.* Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**. v. 54, p. 495-500, nov. 2013. Disponível em: < [Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu \(Myrciaria dubia Mc. Vaugh\) - ScienceDirect](#)> Acesso em 29 de set. 2023.

GARCÍA-CHACÓN, J. M. *et al.* Camu Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh): An Amazonian Fruit with Biofunctional Properties- A Review. **ACS Omega**. Fev. 2023. Disponível em: < [Camu Camu \(Myrciaria dubia \(Kunth\) McVaugh\): An Amazonian Fruit with Biofunctional Properties–A Review - PMC \(nih.gov\)](#)> Acesso em: 24 de set. 2023.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants - quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.32, p.125-130, mar. 2011. Disponível em: < [Free radicals and antioxidants – quo vadis? - ScienceDirect](#)> Acesso em: 07 de out. 2023.

HERNÁNDEZ, M.S. *et al.* 16 - Camu-camu (*Myrciaria dubia* Kunth McVaugh). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. Editor: Elhadi M. Yahia, 2011. Cap. 16, pag. 352-373. Disponível em: < [Camu-camu \(Myrciaria dubia Kunth McVaugh\) - ScienceDirect](#)> Acesso em: 25 de set. 2023.

HERRERA, C. O., *et al.* Phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant, and cytotoxic activity of five peruvian plants on human tumor cell lines. **Pharmacognosy Research**. Vol.10. pag. 161-165. Dez. 2018. Disponível em: < [Phytochemical Screening, Total Phenolic Content, Antioxidant, and Cytotoxic Activity of Five Peruvian Plants on Human Tumor Cell Lines | Pharmacognosy Research \(phcogres.com\)](#) > Acesso em 17 de jan. de 2023.

KANESHIMA, T. *et al.* Antioxidant activity of C-Glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*). **LWT - Food Science and Technology**. v. 69, p. 76-81, Jun. 2016. Disponível em: < [Antioxidant activity of C-Glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu \(Myrciaria dubia\) - ScienceDirect](#)> Acesso em: 29 de set. 2023.

KISIRIKO, M., *et al.* Phenolics from Medicinal and Aromatic Plants: Characterisation and Potential as Biostimulants and Bioprotectants. **Molecules**. 2021. Disponível em: <[Phenolics from Medicinal and Aromatic Plants: Characterisation and Potential as Biostimulants and Bioprotectants - PMC \(nih.gov\)](#)> Acesso em: 16 de out. 2023

LEDEZMA, C. C. Q. ative food crops for present and future generations: Their role in nutrition and health. In: BETORET, N.; BETORET, E. **Sustainability of the Food System Sovereignty, Waste, and Nutrients Bioavailability**. Cap.1, p. 3-23, 2020. Disponível em: < [Native food crops for present and future generations: Their role in nutrition and health - ScienceDirect](#)> Acesso em: 11 de out. 2023.

MAEDA, R.N, *et al.* Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). **Food Science and Technology**. v. 26, p. 70-74, mar. 2006. Disponível em: < [Redalyc.DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO NÉCTAR DE CAMU-CAMU \(Myrciaria dubia McVaugh\)](#)> Acesso em: 10 de out. 2023.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3°. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009, p. 45-62.

MENDES, A. P. A, *et al.* Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos. In. CORDEIRO, C.A.M. **Tecnologia de alimentos: Tópicos físicos, químicos e biológicos**. Editora científica digital, 2020. Cap.20, p. 296-312. Disponível em: <[ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: CONCEITOS FUNDAMENTAIS SOB OS ASPECTOS DA NUTRIÇÃO E DA CIÊNCIA DOS ALIMENTOS - Editora Científica Digital \(editoracientifica.com.br\)](#)> Acesso em: 07 de out. 2023.

NASCIMENTO, W. M. O. Do. *Myrciaria dubia*: Camu-camu. In: EMBRAPA. (org.) **Plantas para o futuro**. Cap.5 alimentícias, p. 368-378. Disponível em: < [Plantas-para-o-Futuro-Norte-369-379.pdf \(embrapa.br\)](#)> Acesso em: 11 de out. 2023.

NEVES, L. C. *et al.* Days after anthesis and postharvest behavior define maturity, harvesting time and nutraceutical content of camu–camu fruit. **Scientia Horticulturae**. v. 224, p. 37-47, out. 2017. Disponível em: < [Days after anthesis and postharvest behavior define maturity, harvesting time and nutraceutical content of camu–camu fruit - ScienceDirect](#)> Acesso em: 29 de set. 2023.

PANTOJA, J. S. *et al.* **Morfometria de fruto em promogênies estabelecidas no bag-camu-camu**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA EMBRAPA. XV., 2011, Belém. Disponível em: <[Frutocamucamu-Juliana-SeminarioPIBIC2011-corrigido-1.pdf \(embrapa.br\)](#)> Acesso em: 09 de out. 2023.

QUEIROZ, G. S. Análise de esteróides em extratos vegetais e estudos fitoquímicos e biológicos preliminar de *Brunfelsia uniflora*. 2009. p.56, **Relatório da disciplina de estágio supervisionado II**. Universidade Federal de Santa Catarina. nov. 2009. Disponível em: < [Gustavo.pdf \(ufsc.br\)](#)> Acesso em: 14 de out. 2023.

RIBEIRO, O. D. *et al.* Seed anatomy and histochemistry of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, an Amazonian Myrtaceae. **Flora**. Belém, v. 280, p. 151847, Jul. 2021. Disponível em:< [Anatomia e histoquímica de sementes de Myrciaria dubia \(Kunth\) McVaugh, uma mirtaceace amazônica - ScienceDirect](#)> Acesso em: 24 de set. 2023.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extraction and reverse osmosis). **Ultrasonics Sonochemistry**. Brasil, v. 64, p. 105017, jun. 2020. Disponível em: < [Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes \(ultrasound assisted extraction and reverse osmosis\) - ScienceDirect](#)> Acesso em: 24 de set. 2023.

SANTOS, D. D. M. **Avaliação do efeito inseticida de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da leishmaniose visceral no Brasil.** 2018. 69 p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal dos vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2018. Disponível em: <[UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES \(ufvjm.edu.br\)](http://UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES (ufvjm.edu.br))> Acesso em 27 de out. 2023.

SANTOS, I. C. *et al.* O papel dos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação- REASE.** São Paulo, v.8, p.906-917, mar. 2022. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/download/4663/1754/6990>> Acesso em: 07 de out.2023.

SILVA, F. C. da *et al.*, Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food and Chemical Toxicology.** Vol.30. pag.2275-2281. Jul.2012. Disponível em: <[Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu \(Myrciaria dubia\) juice on mice blood cells - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278682912000000)> Acesso em: 20 de janeiro de 2023.

SILVA, F. C. Da, *et al.* Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food and Chemical Toxicology.** v. 50, p. 2275-2281, jul. 2012. Disponível em: <[Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu \(Myrciaria dubia\) juice on mice blood cells - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278682912000000)> Acesso em: 29 de set. 2023.

SILVA, J. T. da. **O efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico do fruto da *Myrciaria dúbia* (Kunth/0 Mcvaugh (camu-camu).** 2018. 35 f. dissertação (Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018. Disponível em: <[jefte-teixeira-da-silva.pdf \(ufac.br\)](http://jefte-teixeira-da-silva.pdf (ufac.br))> acesso em 19 de jan. 2023.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Flavonoides e Antocianos.** [s.d]. Disponível em: <sbfognosia.org.br> Acesso em: 13 de out. 2023.

SOUZA, F. C. A., *et al.* Vitamin characterization and volatile composition of camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh, Myrtaceae) at different maturation stages. **Food Science and Technology.** vol. 41. Pag. 961-966, Dez. 2021. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/cta/a/DYkHdKJZFb4dVKc6p4sZ8nC/?lang=en&format=pdf>> Acesso em: 19 de janeiro de 2023.

VOULO, M. M. *et al.* Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: CAMPOS, M. R. S. **Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications.** Editor; Maira Rubi Segura Campos, 2019, cap. 2, p. 33-50. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012814774000>> Acesso em: 16 de out. 2023.