

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



**Lauren Andrade Vieira**

**Perfil de extração e digestão biológica *in vitro* de compostos fitoquímicos  
de butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick)**

**Pelotas, 23 de maio de 2022**

**Lauren Andrade Vieira**

**Perfil de extração e digestão biológica *in vitro* de compostos fitoquímicos de butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel como requisito à obtenção do título de doutorado

Orientador: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, 23 de maio de 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

V657p Vieira, Lauren Andrade

Perfil de extração e digestão biológica *in vitro* de compostos fitoquímicos de butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick) / Lauren Andrade Vieira ; Cesar Valmor Rombaldi, orientador. — Pelotas, 2022.

44 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. *Butia odorata*. 2. Digestão biológica *in vitro*. 3. Compostos fenólicos. 4. Extração. 5. Planejamento multivariado. I. Rombaldi, Cesar Valmor, orient. II. Título.

CDD : 634.4

## Agradecimentos

Tenho muito a agradecer por ter chegado até aqui e pela contribuição e ensinamentos que recebi durante a elaboração deste trabalho.

Por vezes foi uma conversa descontraída durante um dia de análises, uma palavra de incentivo, e por outras foi uma ajuda de imenso valor técnico proporcionadas por diferentes pessoas em diferentes fases.

Para dar alguns nomes que ficaram e ficarão comigo durante a vida, gostaria de agradecer imensamente os que seguem.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade do doutorado.

À Capes pela concessão da bolsa.

Ao professor Cesar Valmor Rombaldi, que me acolheu nessa caminhada, teve paciência e compreensão comigo e me ensinou além da sala de aula. Vou levar seu exemplo de humanidade e profissionalismo para a vida.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram a tirar do papel tudo isso que aqui está.

Giovana, que esteve comigo desde a etapa de definição dos parâmetros de extração até a obtenção dos resultados da cromatografia e que muito me ensinou sobre operação do HPLC e como interpretar os resultados obtidos.

Alexandre e Fernanda, que ficaram comigo durante o dia e a noite de extrações e proporcionaram conversas leves e explicações técnicas para quem estava ainda tentando entender esse mundo cromatográfico.

À, agora, professora Jessica Hoffman, que me inspirou na escolha do objeto deste estudo e que me ajudou imensamente com seu conhecimento sobre *Butia odorata*.

À professora Adriana, que me ensinou tanto sobre planejamento multivariado e que auxiliou muito nas etapas iniciais de extração e no entendimento das diversas planilhas do Excel que tivemos que lidar durante o processo de obtenção dos dados.

Aos demais colegas de laboratório que proporcionaram conversas, risos e conhecimento ao longo dessa jornada.

Aos meus pais e irmão pelo apoio sempre incondicional, nunca conseguirei agradecer o bastante nessa vida.

Aos amigos que me incentivaram durante esse período, muito obrigada por tudo.

Não há espaço para agradecer a cada um, mas a todos que de alguma maneira me ajudaram a chegar aqui, meu muito obrigada.

## Resumo

VIEIRA, Lauren Andrade. **Perfil de extração e digestão biológica *in vitro* de compostos fitoquímicos de butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick)** 2022. 44 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

O Brasil é um país que se destaca por possuir biomas contrastantes, todos ricos em diversidade e variabilidade de plantas, animais e micro-organismos. No contexto das espécies vegetais, muitas produzem frutos e frutas com aspectos sensoriais e nutricionais com potencial para domesticação ou exploração como é o caso do butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick). O gênero *Butia*, que compreende 20 espécies, é encontrado na América do Sul, nos países Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. O fruto butiá tem em sua composição minerais, compostos voláteis, compostos fenólicos, carotenoides, ácidos orgânicos, além de fibras, açúcares e lipídeos. De modo geral, vários estudos demonstram o potencial bioativo dos butiás. No entanto, há diferenças marcantes entre os trabalhos, em parte pelas variedades de acessos estudadas, mas também devido aos métodos de extração utilizados para avaliar compostos fitoquímicos. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: conduzir um planejamento experimental multivariado  $2^3$ , que consiste em projetar o experimento de forma que todas as variáveis sejam consideradas em uma faixa ampla para se obterem resultados mais próximos dos reais; identificar os compostos extraídos na melhor das condições de extração; quantificar os compostos extraídos na melhor das condições de extração; caracterizar os compostos extraídos na melhor das condições de extração; realizar um ensaio de digestão *in vitro* para identificar compostos em cada etapa do processo. Com o emprego de planejamento multivariado  $2^3$  foi possível testar 17 condições de extração; foram identificados 15 compostos fitoquímicos após a execução do planejamento multivariado; a partir do item anterior, foi possível prever uma condição ótima de extração para 7 compostos. A condição ótima predita foi: temperatura 55 °C, tempo de 60 minutos e concentração de solução extratora 36% (36:64 etanol:água v/v). Foi realizado um ensaio de simulação de digestão biológica *in vitro* de extrato hidroalcolico de *Butia odorata*, identificando 17 compostos fenólicos na etapa não digerido; 17 compostos fenólicos foram identificados na etapa de digestão oral, 17 identificados na etapa digestão gástrica e 15 na etapa de digestão intestinal. Assim, essa Tese entrega uma condição ótima para a extração dos compostos fitoquímicos dessa fruta e indica que esses compostos são majoritariamente alterados durante a etapa de digestão intestinal. Além disso, mostra que esse perfil se mantém se a polpa for armazenada a -18°C por 24 meses.

## Abstract

VIEIRA, Lauren Andrade. **Extraction profile and biological digestion *in vitro* of phytochemical compounds of *Butia odorata***. 2022. 44 p. Thesis (Doctorate in Science Food and Technology) – Science Food and Technology Post Graduation Program, Eliseu Maciel's Agronomy University, Federal University of Pelotas, 2022.

Brazil is a country that stands out for having different biomes, all rich in diversity and variability of native fruit plants. Among these, many produce fruits and fruits with sensory and nutritional aspects with potential for domestication or exploitation such as butia (*Butia odorata*). The genus *Butia*, which comprises 20 species, is found in South America, Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay. The butia fruit has in its composition minerals, volatile compounds, phenolic compounds, carotenoids, organic acids, besides fibers, sugars and lipids. In general, several studies demonstrate the bioactive potential of butia. However, there are marked differences between the studies, in part due to the varieties of access studied, but also due to the extraction methods used to evaluate phytochemical compounds. Thus, the objectives of this study were to conduct a multivariate experimental planning 23, which consists of designing the experiment in such a way that all variables are considered in a wide range in order to obtain results closer to the real ones; to identify the extracted compounds under the best extraction conditions; to quantify the extracted compounds under the best extraction conditions; to characterize the extracted compounds under the best extraction conditions; to perform an *in vitro* digestion test to identify compounds at each stage of the process. With the use of multivariate planning 23 it was possible to perform 17 different extraction conditions of *B. odorata* hydroalcoholic extract; 15 phytochemical compounds were identified after the execution of multivariate planning; from the previous item, it was possible to predict an optimal extraction condition for 7 compounds. The optimal condition predicted was a temperature of 55 °C, time of 60 minutes and extraction solution concentration 36% (36:64 ethanol:water v/v); an *in vitro* biological digestion simulation test of hydroalcoholic *Butia odorata* extract was performed, identifying 17 phenolic compounds in the non-digested stage; 17 phenolic compounds were identified in the oral digestion stage, 17 identified in the gastric digestion stage and 15 in the intestinal digestion stage. These properties are preserved on the pulp stored under -18°C until 24 months.

## Lista de figuras

Figura 1- Representação das principais classes de compostos fenólicos (adaptado de Ferreira e Abreu, 2007) .....	19
Figura 2- Palmeira de <i>B. odorata</i> com cacho de butiás cultivados no Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas .....	23
Figura 3 - Compostos fenólicos totais em extrato de <i>B. odorata</i> nas etapas de digestão biológica <i>in vitro</i> . .....	41

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Otimização multivariada $2^3$ com pontos centrais e axiais utilizados na otimização da extração de compostos fenólicos de <i>B. odorata</i> .....	24
Tabela 2 - Matriz experimental empregada na otimização do extrato hidroalcoólico de <i>B. odorata</i> .....	24
Tabela 3 - Validação dos modelos matemáticos do planejamento multivariado $2^3$ .....	29
Tabela 4 - Quantificação dos compostos encontrados nos ensaios realizados durante planejamento multivariado $2^3$ .....	30
Tabela 5 - Critérios propostos na predição de condição ótima de extração e respostas observadas .....	32
Tabela 6 - Diferentes condições de extração de compostos de <i>B. odorata</i> .....	34
Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos de <i>B. odorata</i> nas três etapas da digestão biológica in vitro .....	37
Tabela 8 - Quantificação de compostos fenólicos de <i>B. odorata</i> nas três etapas da digestão biológica in vitro, a partir de extratos gerados de polpa congelada e armazenada por 24 meses.....	39

## Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão de literatura .....	16
2.1. <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr. Noblick).....	16
2.2. Compostos fenólicos.....	18
2.3. Digestão biológica <i>in vitro</i> .....	21
3. Material e métodos .....	22
3.1. Material vegetal .....	22
3.2. Otimização multivariada 2 níveis e 3 fatores com postos centrais e axiais	23
3.3. Análise dos compostos fitoquímicos por LC-ESI-QTOF-MS.....	25
3.3.1. Condições instrumentais .....	25
3.4. Análise de simulação de digestão biológica <i>in vitro</i> com extrato obtido na condição ótima de extração.....	26
3.4.1. Preparo da amostra.....	26
3.4.2. Simulação da digestão na boca .....	26
3.4.3. Simulação da digestão no estômago .....	27
3.4.4. Simulação da digestão no intestino .....	27
3.4.5. Compostos fenólicos totais.....	27
3.5. Análise dos dados .....	27
4. Resultados e discussão .....	28
4.1. Definição de temperatura, tempo e solução extratora .....	28
4.2. Digestão biológica <i>in vitro</i> .....	36
5. Considerações finais.....	42
6. Referências.....	44

## 1. Introdução

O Brasil se destaca por possuir macro biomas, com destaque para Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa, todos ricos em diversidade e variabilidade de plantas, com 47 mil espécies já identificadas (REISSIG e ROMBALDI, 2017). Dentre essas, muitas produzem frutos e frutas com potencial para domesticação e/ou exploração devido a seus diferentes aspectos sensoriais e riqueza nutricional, como é o caso do butiá (*Butia* spp.), conhecido e consumido pelo seu agradável sabor e pela sua cor atrativa (BÜTTOW, 2008; BESKOW et al., 2015).

O gênero *Butia* compreende 20 espécies e é encontrado na América do Sul, na Argentina, no Brasil, no Uruguai e no Paraguai. Dessas, 18 espécies encontram-se em território brasileiro sendo 8 existentes no estado do Rio Grande do Sul (*Butia catarinensis*, *Butia eriospatha*, *Butia exilata*, *Butia lallemantii*, *Butia odorata*, *Butia paraguayensis*, *Butia witeckii* e *Butia yatay*) (SOARES et al., 2014; DEBLE et al., 2017). Dentre essas, a *B. odorata* é de ocorrência exclusiva no Bioma Pampa e seus frutos são utilizados na produção de sucos, néctares, licores, geleias e sorvetes. Ademais, as folhas são utilizadas para confecção de artesanato como tapetes, bandejas, colares, chapéus e bolsas, por exemplo (HOFFMANN et al., 2014; CRUXEN et al., 2017; CRUZ et al., 2017). O fruto, doravante denominado butiá, possui polpa muitas vezes fibrosa, de sabor doce-ácido, com aroma intenso, e tem em sua composição minerais, compostos voláteis, compostos fenólicos, carotenoides, ácidos orgânicos, fibras, açúcares e lipídeos (HOFFMANN et al., 2014; SOARES et al., 2014; CRUXEN et al., 2017).

Embora a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação recomende o desenvolvimento de novos produtos derivados de espécies nativas pouco exploradas, gêneros como o *Butia* ainda têm suas potencialidades pouco elucidadas (FAO, 2008). Com isso, estudos descritivos acerca da composição química que possam contribuir para a valorização dos produtos derivados do butiá e que elucidem suas potencialidades químicas, nutricionais, funcionais e comerciais são relevantes (YAHIA, 2009; HOFFMANN et al., 2017).

Especificamente no caso de butiás, há estudos que fazem esse descritivo parcialmente. É o caso do trabalho de Hoffman et al. (2018), que relata o repertório botânico do gênero *Butia*, bem como das espécies e sua dispersão geográfica. Também há estudos que descrevem a composição físico-química geral (BESKOW et al., 2015; BOEING et al., 2019), possíveis propriedades antimicrobianas (HAUBERT et al., 2019; MAIA et al., 2019) e antiproliferativa (BOEING et al., 2019), bem como seus produtos processados (CRUXEN et al., 2017). Ao se avaliarem esses trabalhos, se observa que, de modo geral, todos demonstram o potencial bioativo dos butiás. No entanto, ao se observar individualmente os compostos identificados e quantificados, há diferenças marcantes entre os resultados apresentados nos trabalhos em relação à composição e à quantidade de compostos presentes no fruto.

Em parte, essas diferenças podem ser decorrentes da variabilidade entre acessos estudados, mas também devido aos métodos de extração utilizados para avaliar compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Além disso, as propriedades que os compostos fenólicos possuem de agir como agentes biológicos têm sido amplamente estudadas em modelos celulares, porém os resultados obtidos não contemplam a complexidade do processo de digestão gastrointestinal. Dessa forma, os efeitos biológicos dos compostos fenólicos podem ser alterados após o processo de digestão biológica *in vitro* (PEÑA-VÁZQUEZ et al., 2022).

É nesse contexto que esse trabalho se insere, ou seja, otimizar as condições de extração de compostos fitoquímicos para, na sequência, realizar a identificação, a quantificação e caracterização dos compostos, bem como avaliar sua disponibilidade após o processo de digestão biológica *in vitro*.

Para isso, foi necessário:

1. conduzir um planejamento experimental multivariado  $2^3$ , que consiste em projetar o experimento de forma que todas as variáveis tempo, temperatura de extração e concentração da solução extratora sejam consideradas em uma faixa ampla;
2. identificar os compostos encontrados nas condições que apresentem maior extratibilidade dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos através de cromatografia líquida de alta eficiência;

3. quantificar os compostos extraídos na melhor das condições de extração; e,
4. realizar um ensaio de simulação de digestão biológica *in vitro* para identificar compostos em cada etapa do processo (a partir de extrato de polpa recém obtida e a partir de extrato produzido com polpa armazenada congelada por 24 meses).

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. *Butia odorata* (Barb. Rodr. Noblick)

O gênero *Butia* (Arecaceae) ocorre na América do Sul e possui 20 espécies distribuídas entre Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. Dessas, 18 são encontradas em território brasileiro, as quais *Butia archeri* (Glassman) Glassman, *B. campicola* (Barb. Rodr.) Noblick, *B. capitata* (Mart.) Becc., *B. catarinensis* Noblick & Lorenzi, *B. eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc., *B. exospadix* Noblick, *B. lallemantii* Deble & Marchiori, *B. leiospatha* (Barb. Rodr.) Becc., *B. lepidotispata* Noblick & Lorenzi, *B. leptospata* (Burret) Noblick, *B. marmorii* Noblick, *B. matogrossensis* Noblick & Lorenzi, *B. microspadix* Burret, *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey, *B. pubispata* Noblick & Lorenzi, *B. purpurascens* Glassman, e *B. yatay* (Mart.) Becc. (LORENZI et al., 2010; NOBLICK, 2011). Dentro dessas 18 espécies, 8 estão localizadas no estado do Rio Grande do Sul (*Butia catarinensis*, *Butia eriospatha*, *Butia exilata*, *Butia lallemantii*, *Butia odorata*, *Butia paraguayensis*, *Butia witeckii* e *Butia yatay*) (SOARES et al., 2014; DEBLE et al., 2017).

Estudos arqueológicos encontraram caroços do fruto junto a restos mortais de indígenas no Rio Grande do Sul que foram sepultados há aproximadamente 2000 anos e há evidências de que as folhas das palmeiras eram utilizadas para obtenção de fibras para produção de colchões em locais onde se encontravam grandes palmares no século XX (FIOR, 2011). Além disso, a planta e seus frutos são amplamente utilizados na produção de sucos, licores,

geleias, doces e sorvetes, além de artesanatos como bandejas, colares, bolsas e acessórios (HOFFMANN et al., 2014; CRUXEN et al., 2017; CRUZ et al., 2017).

Embora haja estudos que confirmem a utilização do butiazeiro há séculos, a exploração da planta, por ser nativa, ocorre somente de modo extrativista e as áreas ocupadas pelos butiazeiros estão sujeitas à proteção pelo Código Florestal Estadual, tendo sua exploração comercial limitada (HOFFMAN, 2014). Além disso, germinação das sementes da palmeira é baixa e não uniforme, o que dificulta a produção de mudas e o cultivo em escala comercial (NEVES et al., 2010).

Os butiazeiros possuem ampla diversidade e variabilidade genética, proporcionando a seus frutos características físico-químicas e sensoriais distintas. De modo geral, os frutos butiá são globosos, levemente adocicados e possuem aroma e sabor intensos. Sua coloração varia de acordo com a espécie e pode ir do amarelo ao avermelhado, variando seu tamanho médio de 1,7 a 4,2 cm. São frutos considerados não-climatéricos e a colheita se dá manualmente. Para aumentar o tempo de pós-colheita, são colhidos em estágio de maturação verde-amarelo e armazenados a 0°C, para manter características sensoriais (HOFFMAN et al., 2014).

Em termos de conteúdo mineral, de forma geral, o gênero *Butia* possui cálcio, potássio, fósforo, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco e é fonte de vitaminas A e C (FARIA et al. 2008; FONSECA, 2012). As características físico-químicas de *B. odorata* variam entre 2,45 a 3,95 de pH, 9,5 a 18,0 graus Brix em teor de sólidos solúveis e 0,69 a 3,90 graus Dornic de acidez titulável (KROLOW et al., 2010; NUNES et al., 2010; SCHWARTZ et al., 2010; BESKOW, 2012; FONSECA, 2012; FERRÃO et al., 2013; HOFFMAN, 2017).

O butiá é considerado um fruto nativo, naturalmente rico em carotenoides, minerais, ácido ascórbico e compostos fenólicos, além de ácidos orgânicos (HOFFMAN et al., 2014). Plantas nativas vêm sendo estudadas pelo seu potencial de ação em diversas doenças crônicas não transmissíveis, como câncer e doenças inflamatórias. Os compostos associados a ação benéfica destes frutos são os denominados metabólitos especializados, que fazem parte do sistema defensivo e adaptativo da planta. Os compostos fenólicos são uma classe de compostos que fazem parte desse metabolismo especializado das

plantas. São considerados promotores de saúde e bem-estar e seu potencial contra doenças já foi reportado por diversos autores (KUMAR e GOEL, 2019). Dessa forma, o estudo de plantas que possuam em sua composição estes compostos e a correta extração para potencializar seus benefícios para a saúde de quem os consome é de elevada importância.

## **2.2. Compostos fenólicos**

Plantas são seres sésseis e por isso precisam de mecanismos que possibilitem sua defesa contra agressões vindas do ambiente onde se encontram. Entre esses mecanismos, está a produção de metabólitos secundários, compostos presentes em todas as plantas, que têm envolvimento direto com seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e maturação. Além disso, possuem importância em processos fundamentais das plantas, como fotossíntese, respiração e plasticidade. Com o passar do tempo, o ser humano aprendeu a utilizar esses compostos para outros fins não relacionados a manutenção e sobrevivência das plantas. Com o conhecimento do seu potencial terapêutico, essas substâncias passaram a ser utilizadas para prevenir ou tratar problemas associados à diversas doenças (REISSING e ROMBALDI, 2021).

Esses compostos são conhecidos como fenólicos, produtos do metabolismo especializado de plantas, sintetizados principalmente pela via do ácido chiquímico e contêm um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente a um anel aromático. Esses metabólitos são originados de metabólitos primários como carboidratos, aminoácidos e lipídios, e são produzidos pelas plantas para proteção contra agentes agressores, conferindo plasticidade às mesmas (KUMAR e GOEL, 2019). São sintetizados através das vias pentose-fosfato, chiquimato e fenilpropanoides. Esses compostos podem ser classificados em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas, cumarinas, curcuminoides e quinonas (BASLI et al., 2017). Os flavonoides são a maior classe de compostos fenólicos contendo dois anéis aromáticos ligados a três átomos de carbono (C6-C3-C6). Os flavonoides incluem principalmente flavonas, isoflavonas, flavonols, flavanas, flavononas, chalconas e antocianinas (BASLI et al., 2017).

Além de agirem como mecanismo de defesa, os benefícios de compostos fenólicos para a saúde humana são variados e incluem proteção contra agentes oxidantes, propriedades anti-inflamatórias, anticâncer, antimicrobianas, antialérgicas, neuroprotetoras, cardioprotetoras entre outras (KUMAR e GOEL, 2019). Na figura 1 encontra-se um esquema com as principais classes de compostos fenólicos e suas estruturas.

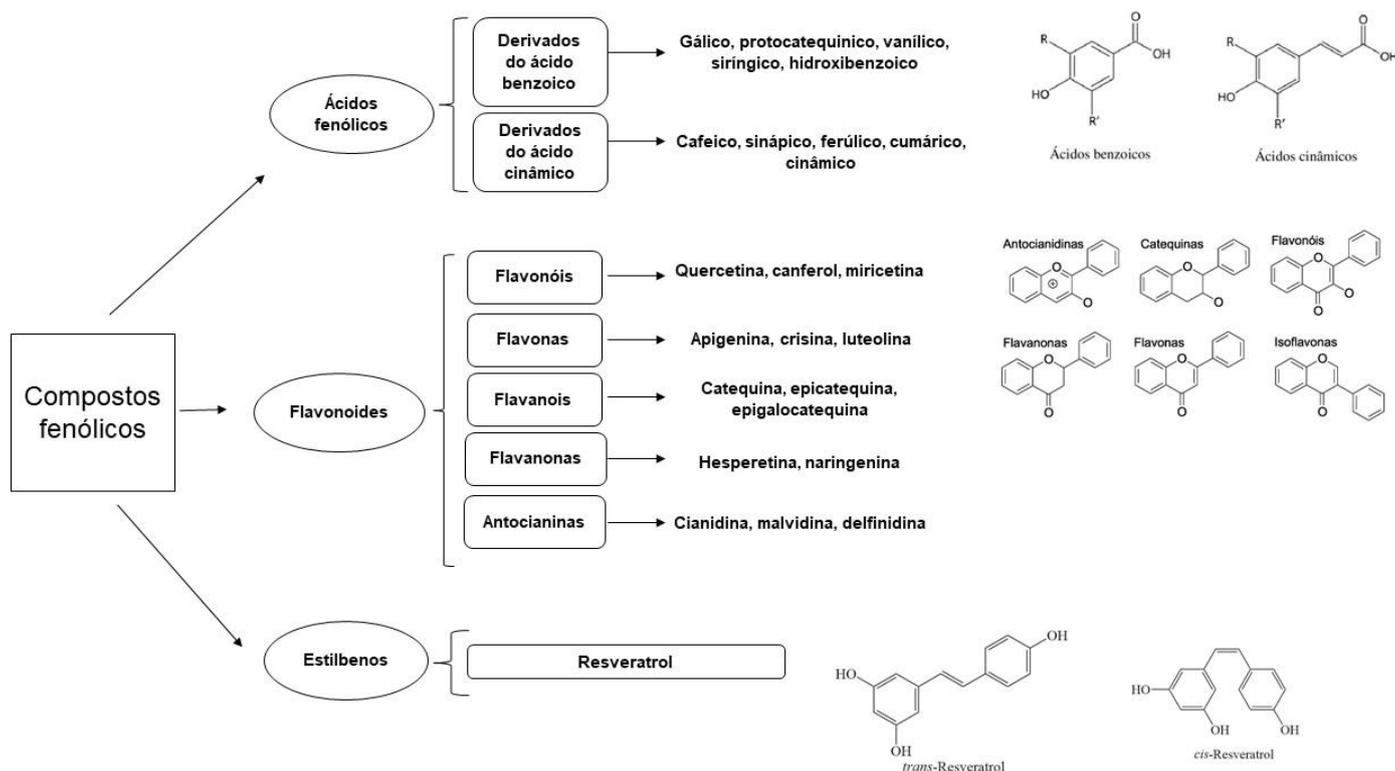


Figura 1- Representação das principais classes de compostos fenólicos (adaptado de Ferreira e Abreu, 2007)

Quanto a sua capacidade antioxidante, os compostos fenólicos agem especialmente auxiliando células a combater o estresse oxidativo causado principalmente por espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs são produtos secundários produzidos por algumas vias metabólicas ou por outros sistemas de controle celular (PLUSKOTA-KARWATKA, 2008). O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, levando a maior produção de oxidantes que não conseguem ser neutralizados por defesas

celulares e acabam por causar danos ao organismo, não somente a nível molecular, com a alteração de funções de sinalização, como também a processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, entre outras (FURUKAWA et al., 2004; SIES, 2015).

Agentes antioxidantes têm um papel fundamental para diminuir a atividade excessiva de radicais livres no organismo e o consumo de alimentos que possuam esses compostos se torna um mecanismo de auxílio para nosso organismo. Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir enzimas produtoras de EROs, evitando a propagação em cadeia de reações de oxidação. A atividade de compostos fenólicos se dá, majoritariamente, a sua capacidade de oxirredução, absorvendo e neutralizando radicais livres, agindo diretamente tanto na etapa inicial como na propagação de EROs e podem agir como antioxidantes indiretos, promovendo o aumento de enzimas protetivas endógenas e tendo um efeito positivo na regulação de eventos de sinalização celular (FURUKAWA et al., 2004)

Os mecanismos moduladores que levam os compostos fenólicos a ter potencial anticancerígeno são multifacetados e incluem ações como regulação das interações de receptores celulares e de cascatas de sinalização celular que determinam a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, na sobrevivência e apoptose da célula, além de efeitos inibitórios no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos que são necessários para o crescimento do tumor e atenuar a adesividade e a invasividade das células cancerígenas, reduzindo seu potencial de metástase (formação de novas células cancerígenas que se espalham pelo corpo) (WAHLE et al., 2010)

Alguns trabalhos realizaram a identificação de compostos fenólicos em *B. odorata*. Beskow et al. (2015) encontraram os ácidos gálico, cafeico, hidroxibenzoico, p-cumárico e ferúlico além dos flavonoides catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol como os principais. Hoffman et al. (2018) identificaram ácido clorogênico, catequina, ácido hidroxibenzoico, ácido siríngico, epicatequina, ácido cafeico, vanílico, quercetina, kaempferol, ácido ferúlico e pinocembrina, também em *B. odorata*. Boeing et al. (2019), também fizeram caracterização fenólica de *B. odorata* e identificaram ácido gálico, catequina, ácido hidroxibenzoico, epicatequina, ácido vanílico, rutina, ácido

siríngico e ácido vanílico como os principais. A partir desses estudos, algumas propriedades dos extratos de butiá foram descritas. Boeing et al. (2019) verificaram que os extratos etanólicos possuíam atividade antiproliferativa em células de câncer cervical linhagens SiHa e C33a. Maia et al. (2019), verificaram que o extrato cetônico de *B. odorata* apresentou atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*.

### **2.3. Digestão biológica *in vitro***

Ensaio de digestão *in vitro* simulam o processo biológico e são utilizados para elucidar o comportamento gastrointestinal de compostos em alimentos ou fármacos. O processo de digestão possui 3 fases, a oral, gástrica e intestinal. Quando o alimento passa por essas fases, sua estrutura é afetada através de reações em sequência que irão definir sua absorção pelo organismo (GIÃO et al., 2012).

A absorção dos compostos bioativos depende da sua bioacessibilidade e biodisponibilidade. Em termos gerais, para que um composto possa ser absorvido de forma satisfatória ele precisa ser bioacessível. A bioacessibilidade é a fração de um composto que é liberada da matriz alimentar durante a digestão e se torna acessível para absorção através da camada epitelial do trato gastrointestinal (DIMA et al., 2020). Já a biodisponibilidade é a soma da bioacessibilidade de um composto com a sua bioatividade, sendo considerada a fração do composto ingerido que está disponível para utilização no organismo em funções fisiológicas normais (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Em alimentos, biodisponibilidade é definida como a quantidade de um composto presente no alimento que é digerida, absorvida e metabolizada e essa quantidade pode ser afetada por diversos fatores como a complexidade da matriz alimentar, a estrutura química do composto e fatores exógenos como a quantidade de outros compostos presentes no alimento, além do tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolização do composto, interações de outros componentes como proteínas, composição da microbiota intestinal e perfil genético de quem consome o alimento (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

O conhecimento sobre as mudanças que ocorrem nos compostos de alimentos durante a digestão pode auxiliar o desenvolvimento de uma alimentação mais saudável que atenda as recomendações de ingestão diária de certos nutrientes, visto que o interesse pelo entendimento da relação entre alimentação e saúde para a prevenção de doenças crônicas vem crescendo dentro da indústria de alimentos (LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018).

Ensaio *in vitro* geralmente apresentam diferenças de resultados quando comparados a ensaios *in vivo*, pois o organismo humano apresenta diversos fatores que contribuem para a absorção de compostos, como microbiota gastrointestinal e características enzimáticas distintas. Porém, ensaios *in vitro* são mais rápidos e mais baratos que estudos *in vivo* e se apresentam como uma boa alternativa a esses, servindo como ferramentas para estudar a digestibilidade de componentes alimentares em um curto período de tempo (LEE et al., 2016).

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Material vegetal**

Os frutos de *B. odorata* foram coletados no município de Capão do Leão/RS (31° 52' 00" S; 52° 21' 24" W) (Figura 2). O registro do acesso está listado no Sisgen A8703BA, em 2016. As amostras foram levadas ao laboratório de processamento de frutas e hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. No laboratório, os frutos foram limpos, descaroçados, congelados em ultrafreezer (-80°C), liofilizados (LIOBRAS K105, São Paulo, Brasil), triturados em moinho de bolas e as amostras foram congeladas novamente em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises.



Figura 2- Palmeira de *B. odorata* com cacho de butiás cultivados no Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas

### **3.2. Otimização multivariada 2 níveis e 3 fatores com postos centrais e axiais**

Para a otimização das variáveis temperatura, tempo e concentração da solução extratora, foi empregado um planejamento multivariado completo de dois níveis e três fatores ( $2^3$ ), com pontos centrais e axiais, realizado de forma aleatória e em duplicata para todos os ensaios (Tabela 1). As variáveis analisadas foram: temperatura (variando entre 30 °C a 95 °C); tempo (variando entre 10 e 60 minutos) e concentração da solução extratora (variando entre 10 e 100% (etanol/água) (Tabela 1).

A matriz com as condições experimentais referente a cada tratamento utilizado na obtenção dos extratos de butiá está apresentada na Tabela 2. Primeiramente, foi pesado 1 g do butiá liofilizado, em seguida transferidos para tubos tipo Falcon de 50 ml; na sequência foi adicionada a solução extratora contendo etanol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e água ultrapurificada (Megapurity®, Jacareí, Brazil). Posteriormente, os tubos foram fechados e incubados em banho-maria com agitação (Velp® Scientifica, Multistirrer, Magnetuc Stirrer). Os extratos obtidos foram filtrados em membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  e conduzidos às análises. Para evitar interferências na avaliação das variáveis, a temperatura dos experimentos foi controlada com variações de  $\pm 1$  °C, a luminosidade foi mantida constante e as extrações foram realizadas em laboratório com temperatura controlada de 25 °C ( $\pm 2$ °C).

Tabela 1 - Otimização multivariada 2<sup>3</sup> com pontos centrais e axiais utilizados na otimização da extração de compostos fenólicos de *B. odorata*

Variáveis	Níveis codificados e decodificados				
	-1,68	1,00	0	1,00	1,68
Temperatura (°C)	30	43,15	62,5	81,85	95
Tempo (min)	10	20,12	35	49,88	60
Concentração etanol na solução extratora	10	28,21	55	81,79	100

Tabela 2 - Matriz experimental empregada na otimização do extrato hidroalcoólico de *B. odorata*

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	V1	V2	V3	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Concentração da solução extratora (etanol/água) (%)
1	-1	-1	-1	43,15	20,12	28,21
2	1	-1	-1	81,85	20,12	28,21
3	-1	1	-1	43,15	49,88	28,21
4	1	1	-1	81,85	49,88	28,21
5	-1	-1	1	43,15	20,12	81,79
6	1	-1	1	81,85	20,12	81,79
7	-1	1	1	43,15	49,88	81,79
8	1	1	1	81,85	49,88	81,79
9	0	0	0	62,5	35	55
10	0	0	0	62,5	35	55
11	0	0	0	62,5	35	55
12	1,68	0	0	95	35	55
13	-1,68	0	0	30	35	55
14	0	1,68	0	62,5	60	55
15	0	-1,68	0	62,5	10	55
16	0	0	1,68	62,5	35	100
17	0	0	-1,68	62,5	35	10

\*V1: Temperatura (°C); V2: Tempo (minutos) e V3: concentração da solução extratora (etanol/água) (%).

### 3.3. Análise dos compostos fitoquímicos por LC-ESI-QTOF-MS

#### 3.3.1. Condições instrumentais

Os extratos de butiá foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha).

Foi utilizada coluna de guarda C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Cogent Bidentate C18 – 2,2  $\mu\text{m}$  120 A – 100mm x 2,1mm. As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O gradiente de separação foi iniciado com 10% de A e aumentado linearmente, até atingir 40% de A aos 15 minutos permanecendo até 17 minutos. Entre 17 e 19 minutos o eluente A foi aumentado até 100%, mantendo-se por 1 minuto. Em 20,1 minutos a composição retornou à fase móvel inicial, mantendo-se fixa até 23 minutos para a estabilização das condições para a próxima análise. A vazão da fase móvel foi de 0,2 ml min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e a temperatura do injetor em 25°C. Foram injetados 8  $\mu\text{L}$  do extrato.

A identificação dos compostos foi confirmada por um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo com ionização por eletrospray (ESI-QTOF-MS) modelo Maxis Impact da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha). Os compostos foram identificados combinando-se os valores exatos de  $m/z$  e os padrões de fragmentação do MS com as bases de dados FoodB, Mass Bank, METLIN, HMDB e a literatura da área.

O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200, voltagem do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) de 2 bar, gás de secagem em 8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte de 180°C, energia de colisão de RF de 150 Vpp, transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com solução de formiato de sódio (10 mM), cobrindo toda a faixa de aquisição. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue:  $m/z$  100, 15 eV;  $m/z$  500, 35 eV;  $m/z$  1000, 50 eV, sendo o nitrogênio utilizado como gás de colisão.

Um segundo experimento foi realizado para fragmentação de compostos que não fragmentaram, sendo os valores ajustados de energia de colisão os seguintes: m/z 100, 25 eV; m/z 500, 45 eV; m/z 1000, 100 eV.

Os dados foram processados por meio do *software Data analysis 4.0* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), e com padrões comerciais de compostos fitoquímicos (catequina, rutina, ácido gálico, ácido málico, hesperetina, quercetina, ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico, pinocembrina, ácido sinápico, ácido cinâmico, ácido cafeico, 3,4-ácido dicafeioquínico, 3,5-ácido dicafeioquínico, 4,5-ácido dicafeioquínico, 5-ácido cafeioquínico, proantocianidina B1, proantocianidina B2, teofilina e naringenina) e quantificados em programa QuantAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

### **3.4. Análise de simulação de digestão biológica *in vitro* com extrato obtido na condição ótima de extração**

#### **3.4.1. Preparo da amostra**

Para simulação da digestão, 2 ml de extrato hidroalcoólico de *B. odorata* foram liofilizados por 48 h. Para realização da análise, o extrato seco foi homogeneizado em 2 ml de água destilada. Dessa solução, foi retirada uma alíquota de 600 µl para ser utilizada como controle. Então foram realizadas simulações de digestão na boca, no estômago e no intestino de acordo com o método proposto por Gião et al. (2012), com modificações (RADÜNZ et al, 2021) Esse teste foi realizado em dois momentos: a partir de polpa obtida dos frutos congelados e armazenados congelados (-18°C), e a partir da mesma polpa congelada e armazenada congelada por 24 meses.

#### **3.4.2. Simulação da digestão na boca**

As amostras foram homogeneizadas em 600 µL de solução de α-amilase salivar (100un), pH 7 e agitadas em banho a 37°C por 1 min. Após este processo foram retiradas uma alíquota de 600 µl para a avaliação da digestão na boca. O restante da solução foi utilizado para simulação da digestão no estômago.

### **3.4.3. Simulação da digestão no estômago**

A solução produzida pela simulação da digestão na boca teve seu pH ajustado para 2 com auxílio de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L) e após foram adicionados 750 µL de uma solução de pepsina (25 mg/ml preparada com HCl 0,1 mol/L), em seguida foram agitadas em banho a 37°C por 60 minutos, simulando o tempo de digestão no estômago. Após este processo, foi retirada uma alíquota de 600 µl para a avaliação da digestão no estômago. O restante da solução foi utilizado para a continuação da digestão.

### **3.4.4. Simulação da digestão no intestino**

O pH da solução produzida pela simulação da digestão no estômago foi ajustado para 6 com carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub> 1 Mol/L) e adicionada de 375 µl de solução de pancreatina e sais biliares (2 g/L e 12 g/L respectivamente, dissolvidas em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 Mol/L) e em seguida foram agitadas em banho a 37°C por 60 min. Após este processo foi retirada uma alíquota de 600 µl para a avaliação da digestão no intestino.

### **3.4.5. Compostos fenólicos totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método Folin-Ciocalteu (PEREIRA et al., 2013). A absorbância foi medida a 725 nm e os resultados expressos em mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup>, baseado em curva de calibração.

## **3.5. Análise dos dados**

Os dados referente aos ensaios analíticos da identificação e quantificação dos compostos fitoquímicos foram processados por meio do *software Data analysis* 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), e com padrões comerciais de compostos fitoquímicos (catequina, rutina, ácido gálico, ácido málico, hesperetina, quercetina, ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico, pinocembrina, ácido sinápico, ácido cinâmico, ácido cafeico, 3,4-ácido dicafeioquínico, 3,5-ácido dicafeioquínico, 4,5-ácido dicafeioquínico, 5-ácido cafeioquínico, proantocianidina B1, proantocianidina B2, teofilina e naringenina) e quantificados

em programa QuantAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados referentes aos ensaios de simulação de digestão foram analisados pelo Teste de T através do programa Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK) e Design Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Definição de temperatura, tempo e solução extratora**

Como etapa preliminar à identificação dos compostos fitoquímicos e estudo de suas propriedades, fez-se a otimização das condições de extração, que inclui temperatura (variável A), tempo (variável B) e solução extratora (variável C). Desse trabalho verificou-se que os dados foram adequadamente descritos pelo modelo quadrático, que apresentou leve falta de ajuste ( $F$  calculado 10 vezes maior que o crítico), devido ao baixo erro experimental, distribuição dos resíduos aleatória e regressão significativa (Tabela 3). Apesar da leve falta de ajuste, o modelo foi utilizado para predizer a condição ótima.

Os modelos demonstram as relações entre as condições de experimentação e as respostas observadas através de modelos lineares, quadráticos ou cúbicos e os valores de coeficientes e sinais permitem a interpretação da influência das variáveis na resposta. Os modelos encontrados (tabela 3) demonstram que as variáveis A, B e C têm interação e interferem na predição da melhor condição de extração, com maior relevância para a interação BC (tempo e solução extratora). A partir dos modelos apresentados na tabela 3, fez-se a análise química e os resultados estão apresentados na tabela 4.



Tabela 4 - Quantificação dos compostos encontrados nos ensaios realizados durante planejamento multivariado 2<sup>3</sup>

A	3,4 Ácido Dicafeoi lquinico µg/g	3,5 Ácido Dicafeoil quinico µg/g	4, 5 Ácido Dicafeoil quinico µg/g	5-Ácido Cafeoilq uínico µg/g	Ácido Cafeico µg/g	Catequin a µg/g	Ácido Cinâmíc o µg/g	Ácido GálicoG µg/g	Ácido Málico µg/g	Naringe nina µg/g	Proantoc ianidina B1 µg/g	Proantoc ianidina B2 µg/g	Ácido Sinápic o µg/g	Teofilina µg/g	Rutina µg/g
1	3,97±0,0 1	3,99±0,0 2	3,53±0,0 1	3,42±0,0 8	1,60±0,0 0	18,98±0, 49	2,60±0,0 7	0,74±0,0 0	342,93±6 ,74	0,13±0,0 0	25,30±0, 54	5,81±0,1 1	3,12±0,0 2	0,20±0,0 0	5,77±0,1 6
2	3,98±0,0 0	4,02±0,0 0	3,54±0,0 1	2,96±0,0 2	1,59±0,0 1	10,32±0, 09	2,38±0,1 8	0,74±0,0 0	386, 36±3,34	0,13±0,0 1	18,37±0, 23	4,62±0,0 8	3,12±0,0 0	0,20±0,0 0	5,74±0,2 9
3	3,98±0,0 2	4,00±0,0 0	3,53±0,0 0	3,79±0,0 1	1,60±0,0 0	23,63±1, 16	2,24±0,0 0	0,73±0,0 0	338,45±3 ,69	0,12±0,0 1	71,53±5, 74	12,33±0, 60	3,12±0,0 1	0,20±0,0 0	5,45±0,0 1
4	3,99±0,0 1	4,02±0,0 1	3,55±0,0 0	3,77±0,0 4	1,65±0,0 0	18,58±0, 62	2,50±0,3 0	0,75±0,0 0	291,31±1 ,93	0,12±0,0 0	58,56±2, 38	11,52±0, 35	3,14±0,0 1	0,20±0,0 0	5,48±0,1 3
5	3,98±0,0 0	4,02±0,0 1	3,54±0,0 0	3,88±0,0 0	1,61±0,0 0	19,24±0, 21	2,53±0,3 7	0,74±0,0 0	316,29±1 ,14	0,12±0,0 0	55,55±0, 50	10,02±0, 14	3,14±0,0 0	0,20±0,0 0	5,65±0,0 9
6	3,98±0,0 0	4,03±0,0 1	3,54±0,0 0	3,84±0,0 4	1,60±0,0 1	14,44±0, 72	2,33±0,0 1	0,74±0,0 0	337,60±4 ,27	0,13±0,0 0	19,07±0, 10	4,66±0,0 7	3,13±0,0 0	0,20±0,0 0	5,62±0,2 5
7	3,99±0,0 1	4,02±0,0 0	3,55±0,0 0	2,89±0,0 6	1,56±0,0 0	9,10±0,3 2	2,52±0,3 6	0,74±0,0 0	369,22±0 ,12	0,13±0,0 0	14,72±0, 43	4,26±0,2 0	3,14±0,0 1	0,20±0,0 0	5,75±0,1 1
8	3,98±0,0 1	4,01±0,0 1	3,54±0,0 1	2,97±0,0 2	1,55±0,0 1	8,32±0,2 1	2,31±0,2 1	0,74±0,0 0	370,40±1 ,46	0,13±0,0 0	13,60±0, 36	4,12±0,0 0	3,11±0,0 1	0,21±0,0 0	6,51±0,2 2
9	3,98±0,0 1	4,01±0,0 1	3,54±0,0 2	3,49±0,0 1	1,63±0,0 2	16,92±0, 68	2,64±0,0 3	0,74±0,0 0	312,90±0 ,36	0,13±0,0 0	43,03±1, 39	8,01±0,0 0	3,12±0,0 1	0,20±0,0 0	6,00±0,0 7
10	3,97±0,0 0	3,99±0,0 0	3,52±0,0 0	3,63±0,0 4	1,62±0,0 2	14,71±0, 13	2,43±0,1 6	0,74±0,0 0	330,28±0 ,92	0,13±0,0 0	17,44±0, 78	4,57±0,0 6	3,10±0,0 1	0,20±0,0 0	6,00±0,0 7
11	3,97±0,0 1	4,00±0,0 1	3,53±0,0 1	3,77±0,1 0	1,58±0,0 1	20,31±0, 61	2,27±0,1 7	0,73±0,0 0	329,71±1 2,91	0,13±0,0 0	30,56±0, 96	5,89±0,0 2	3,11±0,0 1	0,20±0,0 0	6,42±0,4 2
12	3,97±0,0 0	4,00±0,0 0	3,53±0,0 1	2,95±0,1 4	1,57±0,0 1	8,10±0,1 1	2,16±0,0 1	0,73±0,0 0	353,53±3 ,63	0,13±0,0 0	14,34±0, 13	4,31±0,0 1	3,11±0,0 1	0,20±0,0 0	7,34±0,4 1
13	3,99±0,0 0	4,03±0,0 1	3,55±0,0 0	3,78±0,3 2	1,60±0,0 5	16,51±2, 93	2,37±0,1 1	0,74±0,0 0	332,46±6 ,19	0,13±0,0 1	21,99±3, 81	5,08±0,6 3	3,11±0,0 0	0,21±0,0 0	6,07±0,2 7
14	3,97±0,0 0	4,01±0,0 1	3,54±0,0 1	3,94±0,0 5	1,62±0,0 2	16,31±1, 41	2,73±0,1 1	0,74±0,0 0	334,27±4 ,80	0,13±0,0 0	24,33±0, 31	5,46±0,0 2	3,10±0,0 0	0,21±0,0 0	7,05±0,1 4
15	3,97±0,0 0	4,00±0,0 1	3,53±0,0 0	3,65±0,0 9	1,62±0,0 2	18,12±0, 14	2,73±0,0 0	0,74±0,0 0	322,89±3 ,73	0,13±0,0 0	45,04±2, 30	8,70±0,2 7	3,10±0,0 0	0,21±0,0 0	6,40±0,1 7
16	3,99±0,0 1	4,01±0,0 1	3,54±0,0 1	3,88±0,0 1	1,63±0,0 0	17,09±0, 25	2,39±0,0 7	0,74±0,0 0	338,75±9 ,24	0,12±0,0 1	22,60±0, 44	5,24±0,0 6	3,12±0,0 1	0,21±0,0 0	6,31±0,2 4
17	3,98±0,0 0	4,02±0,0 1	3,54±0,0 0	2,83±0,0 3	1,59±0,0 1	9,75±0,2 3	2,27±0,0 1	0,74±0,0 0	400,56±5 ,85	0,14±0,0 0	10,47±0, 16	4,03±0,0 7	3,11±0,0 1	0,21±0,0 0	5,19±0,0 9

A tabela 4 mostra os resultados da quantificação dos compostos encontrados nos ensaios. Os compostos encontrados em maior teor foram ácido málico, proantocianidina B1 e catequina, e os em menor teor foram naringenina, teofilina e ácido gálico. O teor de compostos variou entre 3,99 a 3,97 µg/g para 3.4-ácido dicafeioquínico, 3,99 a 4,03 µg/g para 3.5- ácido dicafeioquínico, 3,52 a 3,55 µg/g para 4.5- ácido dicafeioquínico, 2,83 a 3,94 µg/g para 5- ácido cafeioquínico, 1,55 a 1,65 µg/g para ácido cafeico, 2,16 a 2,73 µg/g para ácido cinâmico, 0,73 a 0,74 µg/g para ácido gálico, 291,31 a 400,56 µg/g para ácido málico, 0,12 a 0,14 µg/g para naringenina, 10,47 a 71,53 µg/g para proantocianidina B1, 4,03 a 12,33 µg/g para proantocianidina B2, 3,10 a 3,14 µg/g para ácido sinápico, 0,21 a 0,20 µg/g para teofilina e 5,19 a 7,34 µg/g para Rutina.

Pela análise estatística de Central Composite Design (CCD), comparando os valores encontrados com as 3 variáveis analisadas, pode-se encontrar formas de explicar a variação dos dados e buscar entre eles condições de extração que proporcionem uma quantidade de compostos extraídos maiores do que as previamente testadas nos 17 ensaios do planejamento.

Para o composto catequina, a interação das variáveis tempo e temperatura e temperatura e concentração de solvente foram positivas, enquanto para tempo e concentração de solvente, negativa. Para o ácido málico a interação temperatura e tempo foi negativa e a interação tempo e solvente foi positiva. Para a proantocianidina B1 a única interação significativa foi a de tempo e solvente, negativa.

Quando a interação é positiva, sugere-se que, ao aumentar os valores destas variáveis conjuntamente, elas irão aumentar a extração do composto. Por outro lado, quando ela é negativa, quando aumentar simultaneamente elas irão diminuir ou inalterar a extração desse composto. Quando as variáveis não apresentam diferença estatística em suas interações, elas não alteraram a extratibilidade do composto. Um valor positivo demonstra um efeito ou interação de efeito que favorece a otimização, enquanto um valor negativo indica que há uma contrariedade entre fator e resposta (AHMAD et al., 2020).

O efeito de um fator é definido como a mudança em resposta produzida por uma mudança no nível do fator. Isso é frequentemente chamado de efeito

principal porque se refere a efeitos primários de interesse no experimento. Entrementes, a interação entre os efeitos pode ser usada para modelar o design

experimental que se deseja, ou seja, essas interações podem auxiliar na projeção de um modelo ótimo para extração de cada composto analisado (MACHROUHI et al., 2019).

Uma condição ótima de extração foi determinada através do programa Design Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN). A determinação foi baseada nos modelos matemáticos que se mostraram significativos dentro do programa (tabela 3). Após analisar os dados, o programa determinou que o experimento atinge o ponto ótimo de extração quando a temperatura está em 55 °C, em um tempo de 60 minutos e com concentração de solvente de 36 %. Os compostos que melhor seriam extraídos, de acordo com o programa se encontram na tabela 5. Os compostos foram quantificados e comparados com a predição proposta pelo programa. Esses achados são relatados porque demonstram que para uma ótima extração de compostos fenólicos e ácido málico de butiá, deve-se utilizar 55 °C, por 60 minutos e 36% de solução extratora (36:64 etanol:água v/v).

Tabela 5 - Critérios propostos na predição de condição ótima de extração e respostas observadas

Variável decodificada	Variável resposta	Objetivo	Limite inferior	Limite superior	Importância	Predito	Observado (µg/g)
Temperatura (°C)		na faixa	-1,68	1,68	3	-	-
Tempo (minutos)		na faixa	-1,68	1,68	3	-	-
Solvente (%)		na faixa	-1,68	1,68	3	-	-
	5-Ácido dicafeioquínico	maximizar	2,81	4,01	3	4,07	4,11±0,08
	Catequina	maximizar	8,02	24,45	3	21,76	19,47±1,13
	Ácido málico	maximizar	289,94	404,70	3	319,54	401,78±3,79
	Rutina	maximizar	5,12	7,63	3	5,86	8,88±0,52
	Proantocianidina B1	maximizar	10,36	75,59	3	52,22	17,26±3,05
	Proantocinidina B2	maximizar	3,97	12,75	3	9,74	6,46±0,65
	Ácido cinâmico	maximizar	2,15	2,81	3	2,58	2,22±0,03

Ao se compararem essas condições com as descritas na literatura, verifica-se que as condições são distintas, dependendo da solução extratora e das condições de extração utilizadas. Diferentes métodos podem explicar, pelo menos em parte, a diferença encontrada nos teores de compostos fenólicos em *B. odorata*. Além dos acessos terem relevância na diversidade e na concentração dos compostos, estágio de maturação dos frutos, diferentes solventes, condições de agitação, tempo e temperatura também são importantes para determinação dos compostos.

O preparo da amostra para a extração de compostos depende de vários fatores como a natureza da matriz da amostra e as propriedades químicas dos compostos a serem extraídos. A variação dessas propriedades está relacionada à concentração de polifenóis simples ou complexos e a diferente proporção de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e proantocianidinas, entre outros. Sendo assim, existem diferentes métodos de preparação da amostra para extração de compostos fenólicos, como secagem, liofilização, congelamento, ultracongelamento, moagem, centrifugação, filtração e purificação da amostra antes da análise que podem impactar na extração de compostos fenólicos (KHODDAMI, WILSON e ROBERTS, 2013).

Desse modo, se consubstancia a afirmativa feita na introdução dessa Tese, quando se anunciava a dificuldade de comparem-se resultados que utilizaram polpa de butiá como matriz alimentar, já que as condições de avaliação de compostos fitoquímicos diferiam marcadamente e, por conseguinte, as propriedades decorrentes desses extratos também podem ser diversas

Na tabela 6 estão as condições de extração e as concentrações de compostos encontrados por diferentes autores para compostos fenólicos de *Butia*.

Tabela 6 - Diferentes condições de extração de compostos de *B. odorata*

Solução extratora	Condições de extração	Principais compostos encontrados	Autores
Extrato metanólico (75% metanol-0,1% ácido fórmico em água)	Banho ultrassom em temperatura ambiente por 15 minutos	Catequina (332,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Epicatequina (197,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Hesperetina (34,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Ácido clorogênico (21,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Ácido Hidroxibenzoico (17,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Ácido cafeico (5,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Hoffman et al., 2018.
Metanol acidificado (0,01% v/v HCl)	Agitação no escuro a 35°C por 24h	Ácido gálico (234,29 mg 100g <sup>-1</sup> ) Epicatequina (211 mg 100g <sup>-1</sup> ) Ácido hidroxibenzoico (150,14 mg 100g <sup>-1</sup> ) Kaempferol (4,20 mg 100g <sup>-1</sup> ) Ácido ferúlico (4,12 mg 100g <sup>-1</sup> ) Quercetina (4,09 mg 100g <sup>-1</sup> )	Beskow et al., 2015
Extrato etanólico (80:20 v/v etanol:água)	Banho de ultrassom 30°C por 30 minutos	Catequina (259 mg kg <sup>-1</sup> ) Epicatequina (211 mg kg <sup>-1</sup> ) Rutina (161 mg kg <sup>-1</sup> ) Ácido clorogênico (61 mg kg <sup>-1</sup> ) Trans-resveratrol (2,4 mg kg <sup>-1</sup> ) Quercetina (1,08 mg kg <sup>-1</sup> )	Boeing et al., 2019
Metanol	Ultraturrax por 1 minuto Centrifugação 10 minutos a 15°C	Epicatequina (463,0 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ ) Rutina (426,7 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ ) Catequina (189,2 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ ) Hesperetina (188,7 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ ) Ácido clorogênico (115,2 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ ) Ácido hidroxibenzoico (112,5 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ )	Hoffman et al., 2017

No presente trabalho, os frutos foram congelados, liofilizados e moídos antes de se adicionar a solução extratora. No trabalho de Hoffman (2018) e Beskow (2015), o mesmo processo foi feito. Já, no trabalho de Boeing (2019), os frutos foram apenas liofilizados e no trabalho de Hoffman (2017) as polpas do fruto congeladas foram homogeneizadas com o solvente e agitadas no ultraturrax.

As técnicas mais comuns e amplamente utilizadas empregam solventes, orgânicos ou inorgânicos e diversos parâmetros podem influenciar essa etapa da extração, como tempo de extração, temperatura, quantidade e polaridade do solvente utilizado, o número de repetições de extrações, assim como o tipo de solvente empregado. A escolha da solução extratora pode influenciar diretamente no rendimento da extração de compostos fenólicos e os solventes mais utilizados são água, acetona, álcoois como metanol e etanol, bem como suas misturas (GARCIA-SALAS et al., 2010).

Para entender melhor o fator da escolha da solução extratora, há que se levar em consideração que a solubilização de uma substância química é o resultado da interação entre o soluto e o solvente, sendo o soluto o que se almeja solubilizar e o solvente a substância que dissolverá o soluto. Para que se ocorra uma boa solubilização da substância de interesse, é necessário encontrar um equilíbrio entre a quantidade de soluto que irá se dissolver em uma determinada quantidade de solvente (MARTINS, LOPES e ANDRADE, 2013). Esse é outro motivo que nos leva a ter diferentes solventes utilizados para extração de compostos fenólicos. Nos trabalhos de Beskow et al. (2015) e Hoffman et al. (2018), o metanol foi o solvente escolhido. Já no trabalho de Boeing et al. (2019), os autores utilizaram uma mistura de etanol e água e no trabalho de Hoffman et al. (2018) os autores utilizaram uma solução extratora de metanol e água. No presente trabalho, utilizou-se uma solução extratora de etanol e água em diferentes proporções para se tentar chegar a uma proporção ideal de solubilização dos compostos pretendidos, incluindo o argumento de que são solventes compatíveis com futuros usos, seja na indústria de alimentos ou outra.

Ambos os álcoois mencionados são infinitamente solúveis em água, ou seja, totalmente miscíveis. Porém, a solubilidade dos compostos fenólicos não

se dá somente pela polaridade da solução extratora empregada, mas também pelo seu grau de polimerização e formação de complexos insolúveis dentro da célula, trazendo outros fatores que influenciam na extração, como tempo e temperatura de extração (SU et al.,2007). Usualmente, um aumento no tempo e na temperatura aumenta a solubilidade do soluto. Entretanto, compostos fenólicos podem ser degradados ou sofrer reações enzimáticas que diminuem sua extração quando submetidos a um tempo de extração e temperaturas altos (DAVIDOV-PARDO, AROZARENA e MARTIN-ARROYO, 2011; BIESAGA e PYRZYNSKA, 2013).

Nos trabalhos mencionados na tabela 6, a temperatura máxima de extração foi de 35°C acompanhada do maior tempo, que foi de 24 horas (BESKOW et al., 2015). No presente trabalho, a temperatura e o tempo de extração considerados ótimos foram de 55°C por 60 minutos.

Todas essas variáveis devem ser levadas em consideração quando se fala de extração de compostos fenólicos, pois como mencionado acima, há diversos fatores que podem explicar as variações de quantificação dos compostos.

#### **4.2. Digestão biológica *in vitro***

Os compostos fenólicos identificados e quantificados durante o processo de digestão biológica *in vitro* de extrato de *Butia odorata* se encontram na tabela 7. Esses resultados correspondem ao extrato obtido com a condição ótima de extração usando polpa de butiá congelada e armazenada congelada por até 3 meses. Uma segunda avaliação foi feita, nas mesmas condições experimentais, mas com polpa congelada por 24 meses (Tabela 8)

Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos de *B. odorata* nas três etapas da digestão biológica *in vitro*

<b>Compostos</b>	<b>Não digerido (µg/g)</b>	<b>Digestão Oral (µg/g)</b>	<b>Digestão Gástrica (µg/g)</b>	<b>Digestão Intestinal (µg/g)</b>
<b>Ácido cafeico</b>	159,07±0,38a	160,61±1,02a	146,22±1,31b	141,78±4,43b
<b>Ácido elágico</b>	34,00±0,23b	33,02±0,60b	37,42±0,27c	42,48±0,83a
<b>Ácido ferúlico</b>	37,22±0,83b	45,83±1,42a	37,08±0,07b	33,59±0,18c
<b>Ácido gálico</b>	27,18±0,23b	26,64±0,23b	27,77±0,45b	33,48±1,21a
<b>Ácido hidroxibenzoico</b>	46,29±1,25b	31,15±1,37c	70,48±19,83ab	115,05±3,63a
<b>Ácido p-cumárico</b>	6,52±0,39b	3,42±0,45c	4,17±0,00b	3,40±0,47c
<b>Ácido siríngico</b>	39,64±0,22a	39,26±0,16a	38,11±0,98a	38,41±2,12a
<b>Ácido vanílico</b>	463,79±20,92a	382,98±28,00b	396,86±2,00b	322,00±2,00c
<b>Apigenina</b>	119,15±0,75a	118,72±0,77a	119,19±0,90a	-
<b>Catequina</b>	960,96±10,61a	684,83±11,28b	973,78±8,70a	-
<b>Crisina</b>	38,51±0,23a	38,42±0,24a	38,61±0,22a	38,46±0,22a
<b>Epicatequina</b>	1743,65±22,88a	1316,95±12,49b	307,59±1,84c	125,36±1,20d
<b>Hesperetina</b>	33,35±0,02a	31,92±0,30b	31,58±0,27b	30,29±0,07c
<b>Luteolina</b>	41,85±0,17a	36,47±0,36b	37,74±0,72c	40,20±0,34c
<b>Pinocembrina</b>	10,42±0,03a	10,02±0,07b	10,37±0,06a	10,37±0,11a
<b>Quercetina</b>	16,89±0,28a	14,18±0,14b	13,72±0,37b	11,34±0,21c
<b>Rutina</b>	47,61±0,42a	39,58±1,90b	14,95±2,21d	18,50±0,66d

A maioria dos compostos apresentou decréscimo na concentração entre a etapa não digerido e a etapa de digestão intestinal. Observou-se uma redução de 10,86% no ácido cafeico, 9,75% no ácido ferúlico 47,6% no ácido p-cumárico, 30,57% no ácido vanílico, 92,81% na epicatequina, 9,17% na hesperetina, 3,94% em luteolina, 32,85% em quercetina e 61,14% em rutina. Já os ácidos

elágico, gálico e hidroxibenzoico apresentaram aumento da concentração em 24,94%, 23,17% e 148,54%, respectivamente. Esse aumento pode ocorrer devido à ação de enzimas presentes na microbiota intestinal que liberam compostos que tiveram uma liberação ou absorção menor nas outras etapas (QIN et al., 2018) Já a redução da concentração pode ocorrer devido às mudanças de pH ao longo do trato gastrointestinal, pois os compostos fenólicos são instáveis a meios neutros ou alcalinos e podem ter maior afinidade ou resistência a condições estomacais. Outro fator que pode contribuir para esse decréscimo é o efeito das enzimas digestivas, pois essas estimulam a liberação de compostos fenólicos da amostra controle, então a estrutura dos fenólicos pode se tornar instável e, em consequência, submetida à hidrólise (LINGUA, WUNDERLIN e BARONI, 2018).

Os processos iniciais de processamento da amostra são fundamentais para que se consiga uma perda mínima de compostos fenólicos durante o armazenamento. No presente trabalho, os frutos foram liofilizados, macerados e armazenados em ultrafreezer antes da realização da extração. O processo de liofilização é considerado seguro para a manutenção dos compostos bioativos devido as baixas temperaturas empregadas durante o processo (HARGUINDEGUY e FISSORE, 2019).

A tabela 8 mostra os compostos fenólicos identificados e quantificados durante o processo de digestão biológica *in vitro* de extrato de *Butia odorata* feito com polpa congelada e armazenada durante 24 meses. A importância de realizar ensaios de digestão biológica *in vitro* após o armazenamento é poder observar e avaliar o quão estáveis ainda estão os compostos primeiramente encontrados. Sendo assim, pode-se observar que a polpa de butiá congelada consegue manter de modo satisfatório os compostos fenólicos presentes no fruto. Embora alguns compostos não tenham aparecido na etapa de digestão intestinal, ainda houve absorção até a etapa gástrica.

Tabela 8 - Quantificação de compostos fenólicos de *B. odorata* nas três etapas da digestão biológica *in vitro*, a partir de extratos gerados de polpa congelada e armazenada por 24 meses

<b>Compostos</b>	<b>Não digerido (µg/g)</b>	<b>Digestão Oral (µg/g)</b>	<b>Digestão Gástrica (µg/g)</b>	<b>Digestão Intestinal (µg/g)</b>
<b>Ácido cafeico</b>	213,45±5,67a	213,45±8,97a	47±5,47b	-
<b>Ácido elágico</b>	45,67±7,68a	43,82±9,61a	23,09±5,67b	-
<b>Ácido ferúlico</b>	33,27±5,45a	35,22±4,53a	32,45±5,66a	33,09±4,88a
<b>Ácido gálico</b>	25,55±3,28a	25,69±3,73a	14,44±2,45b	9,28±1,27c
<b>Ácido hidroxibenzoico</b>	45,67±4,38a	38,87±3,89a	34,23±2,34a	35,75±3,69a
<b>Ácido p- cumárico</b>	3,58±0,59a	3,87±1,45a	3,67±0,98a	3,47±0,78a
<b>Ácido sirínico</b>	49,11±3,21a	49,89±3,87a	47,88±3,79a	-
<b>Ácido vanílico</b>	511,23±12,34a	403,33±13,21b	411,23±21,23b	378,87±12,09c
<b>Apigenina</b>	133,15±11,75a	141,09±10,77a	109,45±9,78a	-
<b>Catequina</b>	1123,45±45,61a	987,76±47,65b	903,32±28,78c	-
<b>Crisina</b>	-	-	-	-
<b>Epicatequina</b>	1987,98±37,67a	1879,76±45,67b	1298,09±33,87c	23,45±12,34d
<b>Hesperetina</b>	55,35±9,02a	41,82±7,65a	41,55±6,27a	29,29±4,09b
<b>Luteolina</b>	44,04±8,17a	46,87±6,36a	47,04±5,89a	44,24±4,45a
<b>Pinocembrina</b>	9,12±1,03a	9,87±2,32a	8,66±01,24a	-
<b>Quercetina</b>	21,66±3,23a	23,18±4,09a	24,56±3,34a	-
<b>Rutina</b>	47,69±4,55a	49,44±8,78a	49,95±2,25a	-

Observou-se uma redução dos compostos ácido gálico em 63,67%, ácido vanílico em 25,89%, epicatequina em 98,82% e hesperetina em 47,08% entre as

etapas não digerido e digestão intestinal. O composto crisina não foi encontrado após os 24 meses de armazenamento, indicando degradação do composto.

Os compostos fenólicos mostraram diferentes estabilidades durante os ensaios desse estudo, assim como outros autores demonstram. Bouayed et al. (2012), em estudo com variedades de maçã em extrato hidrometanólico, encontraram conteúdos de 1,14±0,01 na etapa controle, 0,52±0,01 para etapa de digestão gástrica e 0,78±0,10 mg/100g em etapa de digestão intestinal para ácido p-cumárico. Já para quercetina, 6,63±0,43 no controle, 5,43±0,63 para digestão gástrica e 5,23±0,28 mg/100g para digestão intestinal, rutina 0,46±0,02 para etapa controle 0,33±0,04 e 0,19±0,01 mg/100g. Lingua, Wunderlin e Baroni (2018), em extrato metanoico de uva, encontraram valores de catequina de 25,57±4,76 na etapa controle, 79,87±19,41 na etapa oral, 83,24±3,04 na etapa gástrica e 4,78±0,09 mg/kg de peso fresco de uva na etapa de digestão intestinal. Para quercetina, apenas encontraram 4,38±0,41 na etapa controle, não detectando o composto em outras partes da simulação e digestão. Qin et al. (2018), em trabalho com framboesas, identificou ácido elágico 171,3±1,5, 19,7±2,7, 125,3±3,9 mg/100g para etapas controle, oral e gástrica, não detectando o composto na porção intestinal. Para rutina, os autores encontraram 55,4±3,2, 12,5±1,1, 18,2±1,5 e 23,3±1,7 mg/100g para etapas controle, oral, gástrica e intestino.

A liofilização pode aumentar as reações de escurecimento enzimático, que envolve a oxidação de compostos fenólicos por ações enzimáticas, porém alguns estudos sugerem que uma redução parcial na atividade da enzima polifenol oxidase pode ocorrer devido ao aumento da concentração dos íons H<sup>+</sup> durante o congelamento, o que modifica os valores de pH, fazendo com que a enzima fique estável (SHOFIAN et al., 2011; CARMONA et al., 2017).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar compostos fenólicos é o conteúdo de fenólicos totais. A figura 3 apresenta os valores encontrados para fenólicos totais nas etapas de digestão biológica *in vitro*.

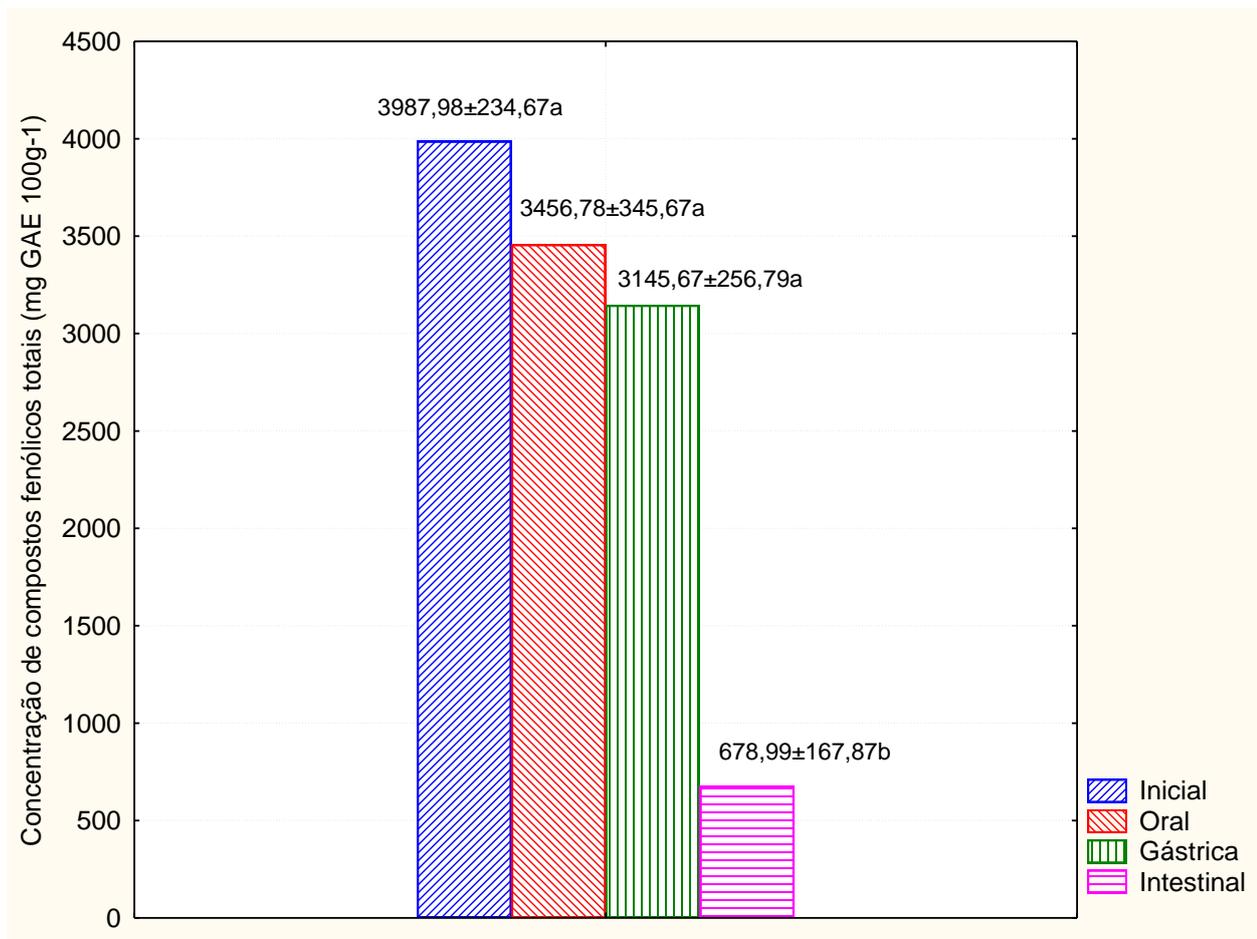


Figura 3 - Compostos fenólicos totais em extrato de *B. odorata* nas etapas de digestão biológica *in vitro*.

Pode-se observar que o conteúdo de compostos fenólicos totais diminuiu majoritariamente entre a etapa não digerido e a etapa intestinal (Figura 3), corroborando com os principais resultados de compostos fenólicos individuais encontrados nas etapas da digestão biológica *in vitro*. Houve uma redução de 82,98% em relação à etapa controle até a etapa de digestão intestinal.

É importante considerar que a interação dos compostos com os demais constituintes da matriz alimentar pode aumentar ou diminuir sua bioacessibilidade (SENGUL et al., 2014), mas que a manutenção dos compostos após 24 meses de armazenamento demonstra que é possível extrair os principais compostos presentes em *Butia odorata* e mantê-los estáveis através de liofilização e armazenamento congelado.

## 5. Considerações finais

- Com o emprego de planejamento multivariado  $2^3$  foi possível testar 17 condições de extração de extrato hidroalcolico de *B. odorata*;
  - foram identificados 15 compostos fitoquímicos (3.4-ácido dicafeioquínico, 3.5- ácido dicafeioquínico, 4.5- ácido dicafeioquínico, 5- ácido cafeioquínico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido gálico, ácido málico, catequina, naringenina, proantocianidina B1, proantocianidina B2, ácido sinápico, teofilina e rutina) após a execução do planejamento multivariado;
  - foi possível predizer uma condição ótima de extração para 7 compostos (5- ácido cafeioquínico, catequina, ácido málico, rutina, proantocianidina B1, proantocianidina B2 e ácido cinâmico). A condição ótima predita foi de temperatura 55 °C, tempo de 60 minutos e concentração de solução extratora 36% (36:64 etanol:água v/v);
  - com ensaio de simulação de digestão biológica *in vitro* de extrato hidroalcolico de *B. odorata*, identificando 17 compostos fenólicos na etapa não digerido (ácidos cafeico, elágico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, p-cumárico, siríngico e vanílico, apigenina, catequina, crisina, epcicatequina hesperetina, luteolina, pinocembrina, quercetina e rutina); 17 compostos fenólicos foram identificados na etapa de digestão oral e gástrica (ácidos cafeico, elágico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, p-cumárico, siríngico e vanílico, apigenina, catequina, crisina, epcicatequina hesperetina, luteolina, pinocembrina, quercetina e rutina) e 15 na etapa de digestão intestinal (ácidos cafeico, elágico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, p-cumárico, siríngico e vanílico, crisina, epcicatequina hesperetina, luteolina, pinocembrina, quercetina e rutina). Com esse ensaio evidenciou-se que a maior intervenção na composição fitoquímica ocorre no nível intestinal. Esse comportamento também ocorre se a polpa for mantida congelada por 24 meses, indicando que esse método de conservação é adequado para conservar a polpa desse fruto.
- Por fim, essa Tese entrega o conhecimento acerca da condição mais recomendada para a extração de compostos fitoquímicos polares usando

solventes compatíveis com uso alimentar (água e etanol) e mostra que a maioria dos compostos fitoquímicos identificados são estáveis se a polpa for congelada e mantida nessa condição por 24 meses. Esses compostos são majoritariamente metabolizados na fase intestinal, quando se realiza o teste de digestão biológica *in vitro*.

## 6. Referências

AHMAD, A.; AMIR, M.; ALSHADIDI, A. A.; HUSSAIN, M.D.; HAQ, A.; KAZI, M. Validation of HPTLC Method : Relevance in Quantitative Evaluation of Protopine in *Fumaria indica*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20. 2020.

BASLI, A.; BELKACEM, N.; AMRANI, I.; Health benefits of phenolic compounds against cancers. SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS, M.D.R.; **Phenolic compounds – Biological activity**, InTech:Rijeka. 2017.

BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S.; PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 207, p. 115-124. 2016.

BESKOW, G. T.; HOFFMANN, J. F.; TEIXEIRA, A. M.; FACHINELLO, J. C.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food Chemistry**, v. 172, p. 699–704. 2015.

BIESAGA, M. AND PYRZYNSKA, K. Stability of Bioactive Polyphenols from Honey during Different Extraction Methods. **Food Chemistry**, v. 136, p. 46-54. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.095>

BOEING, J. S. et al. Phenolic Compounds from *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick fruit and its Antioxidant and Antitumor Activities. **Food Analytical Methods**, n. 13, p. 61-68. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01515-6>

BOUAYED, J.; DEUßER, H.; HOFFMAN, L.; BOHN, T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in select apple varieties following *in vitro* digestion vs. Their native patterns. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1466-1472. 2012.

BÜTTOW, M. **Etnobotânica e caracterização molecular de *Butia* sp.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS. 2008.

CANDIOTI, L.V.; ZAN, M.M.; CÁMARA, M.S.; GOICOECHEA, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v.124, p. 123-138. 2014.

CARMONA, L. V. et al. Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 41, p. 378-386. 2017.

CRUXEN, C. E. DOS S. et al. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 379–385, 2017.

CRUZ, P. N. et al. Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 229–237, 2017.

DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARTIN-ARROYO, M. R. Kinetics of thermal modifications in grape seed extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7211-7217. 2011.

DEBLE, L.P.; KELLER, H.A.; ALVES, F.D.S. Resurrection and epitypification of *butia poni* (Arecaceae), a neglected palm micro-endemic in the grasslands of misiones, Argentina. **Phytotaxa**, n.316, p. 171–180. 2017. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.316.2.6>

DIMA, C.; ASSADPOUR, E.; DIMA, S.; JAFARI, S. M. B. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 1-22. 2020.

FARIA, J. P. et al. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 827–829. 2008.

FERRÃO, T. S. et al. Evaluation of composition and quality parameters of jelly palm (*Butia odorata*) fruits from different regions of Southern Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 57–62. 2013

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. et al. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v.46, p. 438-450. 2012.

FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde**, v.2, p. 32-39. 2007.

FIOR, C. S. Propagação de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi. (TESE: Doutorado em Fitotecnia Ênfase Horticultura. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 202. 2011.

FONSECA, L.X. Caracterização de Frutos de Butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e Estabilidade de seus Compostos Bioativos na Elaboração e Armazenamento de Geléias. Dissertação (Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 12, p. 1752-1761. 2004.

GADKARI, P.V.; BALARAMAN, M. Catechins: sources, extraction and encapsulation: a review. **Foods and Bioproducts Processing**, v.93, p.122-138. 2015.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 3, n. 15, p. 8813-8826. 2010.

GIÃO, M. S. et al. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 761-767. 2012. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.030>.

HARGUINDEGUY, M.; FISSORE, D. On the effects of freeze-drying processes on the nutritional properties of foodstuff: A review. **Drying Technology**, v. 38, n. 7, p. 846-868. 2019.

HAUBERT, L. et al. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates from food and food environments. **Food Research International**, v. 116, p. 652-659. 2019, DOI: [doi:10.1016/j.foodres.2018.08.092](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.092)

HOFFMAN, J.F.; BARBIERI, R.L.; ROMBALDI, C.V.; CHAVES, F.C. *Butia* spp. (Arecaceae): An overview. **Scientia Horticulturae**, n. 179, p. 122-131. 2014.

HOFFMANN, J. F. et al. *Butia* spp. (Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 523–532, 2017a.

HOFFMANN, J. F. et al. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017b.

HOFFMANN, J. F. et al. Flavan-3-ol, flavanone, flavone, flavonol, phenolic acid, and stilbene contents of four *Butia* species (Arecaceae). **Fruits**, v. 73, n. 2, 2018.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites *versus* parent compounds: a review. **Food Chemistry**, n. 173, p. 501-513. 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375. 2013.

KROLOW, A. C. R. et al. Processing and characterization of *Butia capitata* from Rio Grande do Sul, Brazil. In: **International Conference on Food Innovation**. University of Valencia, Valencia, p. 1–4. 2010.

KUMAR, N., PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v.4, p. 86-93. 2014.

KUMAR N.; GOEL, N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370. 2019.

LEE, S.J.; LEE, S.Y.; CHUNG, M.S.; HUR, S.J. Development of novel *in vitro* human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p.113-121. 2016.

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, p. 76-82. 2012.

LINGUA, M.S.; WUNDERLIN, D.A.; BARONI, M.V. Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. **Journal of Functional Foods**, v.44, p. 86-94. 2018.

LORENZI, H. et al. Flora brasileira: Arecaceae (Palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. 382p. 2010.

LUCAS-GONZÁLEZ, R.; VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J. *In vitro* digestion models suitable for foods: opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v.107, p.423-436. 2018.

MACHROUHI, A.; ALILOU, H.; FARNANE, M.; EL HAMIDI, S.; SADIQ, M.; ABDENNOURI, M.; TOUNSADI, H.; BARKA, N. Statistical optimization of activated carbon from *Thapsia transtagana* stems and dyes removal efficiency using central composite design. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v.4, p. 544-553. 2019.

MAIA, D. S. V. et al. *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. **Journal of Food Science and Technology**, n. 56, p. 1663-1668. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03686-w>

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8. 2013.

NEVES, S.C, et al. In vitro germination of *Butia capitata* (Mart.) Becc.(Arecaceae) embryos obtained from fruits at different stages of maturity. **Revista Biologia Neotropical**, n. 7, p. 47–54. 2010.

NOBLICK, L.R. Validation of the name *Butia odorata*. **Palms**, v. 55, p.48-49. 2011.

NUNES, A. M. et al. Morphological and physico-chemical characteristics of the jelly palm tree (*Butia capitata*) in the Pelotas region, Brazil. **Interciencia**, v. 35, p. 500–505. 2010.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, n. 34, v. 6. 2011.

PEÑA-VÁZQUEZ, G. I. et al. *In vitro* simulated gastrointestinal digestion impacts bioaccessibility and bioactivity of Sweet orange (*Citrus sinensis*) phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 88. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104891>

PEREIRA, M.C. et al. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 19–24. 2013.

PLUSKOTA-KARWATKA, D. Modifications of nucleosides by endogenous mutagens -DNA adducts arising from cellular processes. **Bioorganic Chemistry**, v. 36, p. 198-213. 2008. DOI: 10.1016/j.bioorg.2008.04.002

QIN, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LI, Y.; WU, Z. Release of phenolics compounds from *Rubus idaeus* L. dried fruits and seeds during simulated *in vitro* digestion and their bio-activities. **Journal of Functional Foods**, v.46, p. 57-65. 2018.

RADÜNZ, M. et al. Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. **Food Chemistry**, v. 339. 2021.

REISSIG, G. N.; ROMBALDI, C. V. Brazilian native fruits: from a plurality of examples and bioactive compounds to the most diverse potentialities. In: **Bioactive Compounds: Sources, Properties and Applications**. [s.l.: s.n.].

REISSING, G. N.; Rombaldi, Cesar V. From the Plant to the Body: Phytochemicals and their Bioactivity for Humans. In: Gulcin Yildiz, Gökçen İzli. (Org.). (Org.). **Bioactive compounds and importance**. 1ed. Turquia: Hauppauge: Nova Science Publishers, v. 1, p. 1-18. 2021.

SCHWARTZ, E. et al. Performance of *Butia capitata* population in Santa Vitoria do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 736–745. 2010.

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.

SHOFIAN, N. M. et al. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4678-4692. 2011.

SIES, H. Oxidative stress: impact in redox biology and medicine. **Archives of Medical and Biomedical Research**, v. 2, n. 4. 2015.

SOARES, K. P. et al. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 1, p. 113–139, 2014

SOARES, K.P.; LONGHI, S.J.; NETO, L.W.; ASSIS, L.C. Palmeiras (Arecaceae) No Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia - Instituto Pesquisa Jardim Botânico do Rio Janeiro**, p. 113–139. 2014.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; CASTILHO, P.C. Changes in the phenolic composition of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus*

*lanceolata* after *in vitro* gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. **Food Research International**, v.122, p.283-294. 2019.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599-606. 2010.

WAHLE, K. W. J., BROWN, I., ROTONDO, D., & HEYS, S. D. **Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. Bio-Farms for Nutraceuticals**, p.36–51. 2010.

YAHIA, E.M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. **Fruit and Vegetable Phytochemicals**. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell, p. 3-51. 2009.