



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF

JULIANA ANDRES MACHADO PERCIO

**VITAMINA C E COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES  
À BASE DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) POR HPLC-MS/MS**

CASCAVEL - PR

2021

JULIANA ANDRES MACHADO PERCIO

**VITAMINA C E COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES  
À BASE DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) POR HPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa: “Fármacos e Medicamentos”.

Orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josélia Larger Manfio

CASCADEL – PR

2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Andres Machado Percio, Juliana

VITAMINA C E COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES A BASE DE CAMU-CAMU (Myrciaria dubia) POR HPLC-MS/MS / Juliana Andres Machado Percio; orientador Helder Lopes Vasconcelos; coorientadora Joselia Larger Manfio. -- Cascavel, 2021.

86 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmaceuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Camu camu. 2. Espectrometria de massas. 3. Legislação Farmacêutica. 4. Antioxidantes. I. Lopes Vasconcelos, Helder, orient. II. Larger Manfio, Joselia, coorient. III. Título.



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - CCMF

Campus de Cascavel-PR

Rua Universitária, 2069 – CEP 85819110 – 55 45 3220-7290.



PCF-UNIOESTE

Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

## Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA ANDRES MACHADO PERCIO, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Ao(s) 7 dia(s) do mês de dezembro de 2021 às 9h00min, na modalidade remota síncrona, por meio de chamada de videoconferência, realizou-se a sessão pública da Defesa de Dissertação do(a) candidato(a) Juliana Andres Machado Percio, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - nível de Mestrado, na área de concentração em Ciências Farmacêuticas. A comissão examinadora da Defesa Pública foi aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Integraram a referida Comissão os(as) Professores(as) Doutores(as): Ralphe Rinaldo dos Reis, Isabela Angeli de Lima, Helder Lopes Vasconcelos. Os trabalhos foram presididos pelo(a) Helder Lopes Vasconcelos. Tendo satisfeito todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor, o(a) aluno(a) foi admitido(a) à Defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, intitulada: "Vitamina C e compostos fenólicos em suplementos alimentares à base de camu-camu (*Myrciaria dubia*) por HPLC-MS/MS". O(a) Senhor(a) Presidente declarou abertos os trabalhos, e em seguida, convidou o(a) candidato(a) a discorrer, em linhas gerais, sobre o conteúdo da Dissertação. Feita a explanação, o(a) candidato(a) foi arguido(a) sucessivamente, pelos(as) professores(as) doutores(as): Ralphe Rinaldo dos Reis, Isabela Angeli de Lima. Findas as arguições, o(a) Senhor(a) Presidente suspendeu os trabalhos da sessão pública, a fim de que, em sessão secreta, a Comissão expressasse o seu julgamento sobre a Dissertação. Efetuado o julgamento, o(a) candidato(a) foi APROVADA. A seguir, o(a) Senhor(a) Presidente reabriu os trabalhos da sessão pública e deu conhecimento do resultado. E, para constar, o(a) Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE - Campus de Cascavel, lavra a presente ata, e assina juntamente com os membros da Comissão Examinadora e o(a) candidato(a). Em função da Pandemia COVID-19, banca realizada de maneira remota síncrona.

Orientador(a) - Helder Lopes Vasconcelos

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Ralphe Rinaldo dos Reis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - CCMF

Campus de Cascavel-PR

Rua Universitária, 2069 – CEP 85819110 – 55 45 3220-7290.



**PCF-UNIOESTE**

Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

## Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA ANDRES MACHADO PERCIO, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Isabela Angeli de Lima

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Juliana Andres Machado Percio

Aluno(a)

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Prof. Dr. Alexandre Maller**

Coordenador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Portaria 1713/2019 - GRE

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Juliana Andres Machado Percio, natural de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil, nascida em 10 de setembro de 1984, possui graduação em Farmácia pela Universidade Franciscana – UFN, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007. Pós-Graduada em Gerenciamento de Laboratórios pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, 2010; Pós-graduada em Gestão da Tecnologia e Inovação pela Universidade de Campinas – UNICAMP, 2017 e Pós-Graduada em Inovação e Tendências da Educação - Parque Científico e Tecnológico (Biopark), 2021. Atualmente é Farmacêutica Responsável Técnica da Farmácia do Centro de Tratamento e Acolhimento do Ciscopar e mestranda no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *Campus* de Cascavel, Paraná. Desenvolve projeto experimental de dissertação na linha de pesquisa de Fármacos e Medicamentos, orientada pelo Prof. Dr. Helder Vasconcelos.

**“Só existem dois dias do ano em que você não pode fazer nada: um se chama ontem e outro amanhã”**

**(Dalai Lama)**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido e companheiro Maycon pelo incentivo, pela paciência em todos os momentos que abdiquei da família para alcançar o objetivo, além da ajuda técnica e troca de conhecimento e amor compartilhado e dedicado a nossos filhos.

A Deus pela perseverança e força nessa trajetória e aos meus filhos que mesmo sem entender direito porque a mamãe tinha que trabalhar também em casa, foram compreensivos e minha maior inspiração.

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram e incentivaram o estudo, além de proporcionarem que eu tivesse a melhor formação.

Dedico à toda minha família sogro, sogra, cunhados e cunhadas pelo incentivo e palavras de apoio e força.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, pela oportunidade de realizar o mestrado e ampliar os conhecimentos.

Agradeço ao Parque Científico e Tecnológico - Biopark por incentivar, ceder a infraestrutura dos laboratórios e insumos para a realização da pesquisa.

Agradeço, imensamente, ao meu orientador, por ter aceito esse desafio, ter me motivado e orientado, principalmente nos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha co-orientadora, por aceitar o convite com muito carinho, sempre me incentivando e acreditando no meu potencial.

# **AVALIAÇÃO DE VITAMINA C E COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) POR HPLC-MS/MS**

## **RESUMO**

O Camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto originário da Amazônia e é estudado pela presença de inúmeros compostos bioativos identificados em diferentes pesquisas. A elevada quantidade de vitamina C e compostos fenólicos é amplamente relatada, porém, o fruto é azedo, logo, dificulta o consumo *in natura*. Neste contexto, torna-se interessante a utilização do fruto para fabricação de suplementos alimentares. Para a avaliação da qualidade dos suplementos alimentares, faz-se necessária a quantificação dos nutrientes presentes. Inicialmente, foi realizada uma revisão bibliográfica de quais compostos bioativos são encontrados no fruto, além do levantamento de quais são as técnicas mais utilizadas e quais são as mais sensíveis para avaliar compostos fenólicos e vitamina C em matrizes complexas. Verificou-se que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a técnica mais sensível para avaliar diferentes analitos nessas matrizes. Portanto, os objetivos do trabalho foram o desenvolvimento e a validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) e a posterior quantificação de amostras comerciais de suplementos alimentares à base de camu-camu. O método foi otimizado para quantificar a vitamina C, o ácido gálico e a miricetina. Foram avaliadas cinco amostras de suplementos alimentares, preparadas a partir de extrações com metanol acidificado (10% v/v), utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 1% (v/v) em sistema gradiente, coluna cromatográfica C18 (250mm x 4,6mm x 3,5µm) em cromatógrafo com detecção MS/MS (sequencial), através da ionização *eletrospray* (ESI), em modo negativo. Devido à alta sensibilidade observada nos detectores de massas, foi possível quantificar todos os compostos com precisão e exatidão, na faixa linear do método. Os resultados demonstraram que os suplementos alimentares possuem quantidades expressivas de vitamina C, ácido gálico e miricetina. O método desenvolvido foi preciso, exato e linear ( $R > 0,99$ ) para todos os analitos avaliados. Foi possível quantificar os três compostos sem interferência da matriz. Dos cinco produtos analisados, quatro apresentaram resultados expressivos de vitamina C (7,99; 6,15; 2,10 e 11,92 g/100g), assim como dos compostos ácido gálico e miricetina. Portanto, com base nos resultados, conclui-se que a técnica HPLC-MS/MS é capaz de identificar e quantificar compostos em matrizes complexas, por ser um método rápido e muito sensível para avaliação dos compostos bioativos no camu-camu.

**Palavras-chave:** *Myrciaria dubia*; espectrometria de massas, compostos bioativos.

**EVALUATION OF VITAMIN C AND PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD  
SUPPLEMENTS BASED ON CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) BY HPLC-MS/MS**

**ABSTRACT**

The fruit Camu-camu (*Myrciaria dubia*) comes from Amazon and has been studied due to the presence of several bioactive compounds already identified in different studies. Both high amounts of vitamin C and phenolic compounds have been widely described, but the fruit is sour, so, there is some difficulty on its consumption *in natura*. In this context, its manufacture to be applied on dietary supplements becomes worthwhile. It is also necessary to quantify the nutrients present on such fruit to analyze the quality of those dietary supplements. So, firstly, a bibliographic review was carried out to verify which bioactive compounds are present in this fruit, as well as a survey of which techniques are most applied and which ones are the most sensitive to evaluate phenolic compounds and vitamin C in complex matrices. It was observed that liquid chromatography coupled with mass spectrometry is the most sensitive technique to evaluate different analytes in these matrices. Therefore, this research aimed at developing and validating an analytical method by high performance liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry (HPLC-MS/MS) as well as quantifying commercial samples of food supplements based on camu-camu. This method was optimized to quantify vitamin C, gallic acid and myricetin. Five samples of food supplements were evaluated, prepared by extractions with acidified methanol (10% v/v), using as mobile phase a mixture of acetonitrile and 1% formic acid (v/v) in a gradient system, chromatographic column C18 (250mm) x 4.6mm x 3.5 $\mu$ m) in chromatograph with MS/MS detection (sequential), with electrospray ionization (ESI), in negative mode. Due to the high sensitivity observed in the mass detectors, it was possible to quantify all compounds with precision and accuracy, in a linear range of the studied method. The results showed that there are significant amounts of vitamin C, gallic acid and myricetin in those studied food supplements. The method developed was precise, accurate and linear ( $R>0.99$ ) for all analytes evaluated and it was possible to quantify the three compounds without matrix interference. Four of the five analyzed products showed expressive results for vitamin C (7.99; 6.15; 2.10 and 11.92 g/100g), as well as gallic acid and myricetin compounds. Thus, according to the obtained results, it is concluded that HPLC-MS/MS technique can identify and quantify compounds in complex matrices and it is a fast and very sensitive method to evaluate the bioactive compounds in camu-camu.

**Keywords:** *Myrciaria dubia*; mass spectrometry, bioactive compounds.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Camu-camu e os Compostos Bioativos.....	12
3.2 Suplementos alimentares.....	20
4 CAPÍTULO 1: Técnicas analíticas para avaliação de compostos bioativos do camu-camu ( <i>Myrciaria dubia</i> ). Artigo publicado: Revista Thêma et Scientia (Qualis A4).....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
5 CAPÍTULO 2: Avaliação de compostos fenólicos e vitamina C em suplementos alimentares à base de camu-camu por HPLC-MS/MS. Artigo redigido conforme normas da Revista International Journal of Development Issues (Qualis A4). ....	40
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4 CONCLUSÃO.....	56
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO.....	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
8 ANEXOS.....	58
ANEXO 1 – Normas da Revista Científica: Thêma et Scientia – Qualis A4. ....	58
ANEXO 2 – Normas da Revista Científica: International Journal of Development Issues – Qualis A4. ....	64
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 1**

Tabela 1 Classe de compostos fenólicos em plantas _____	30
Tabela 2 Compostos biativos do camu-camu citados em estudos científicos _____	32
Tabela 3 Relação de métodos analíticos utilizados para caracterização de frutos de camu-camu com diferentes características de tratamento, estágios de maturação de acordo com o tipo de composto bioativo avaliado _____	35

**CAPÍTULO 2**

Tabela I Transições preferenciais para quantificação de AA, AG e MI. _____	49
Tabela II Dados de calibração, linearidade e limite de quantificação (LQ) para ácido ascórbico (AA), ácido gálico (AG) e miricetina (MI). _____	51
Tabela III Recuperação (%) e Desvio padrão relativo (%) para Precisão e Exatidão (repetibilidade e precisão intermediária). _____	52
Tabela IV Quantificação de AA, AG e MI em suplementos alimentares de camu-camu. _____	53

## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 Estrutura molecular do ácido ascórbico _____	13
Figura 2 Isômeros do ácido ascórbico (a. Ácido L-ascórbico; b. ácido D-ascórbico; c. ácido L-isoascórbico ou ácido L-eritórbico; d. ácido D-isoascórbico ou ácido D-eritórbico). _____	14
Figura 3 Classificação dos compostos fenólicos. _____	17
Figura 4 Estrutura química base dos flavonoides _____	17
Figura 5 Estrutura molecular da miricetina _____	18
Figura 6 Estrutura molecular do ácido gálico _____	19
Figura 7 Esquema da cromatografia líquida hifenada com espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) _____	23
Figura 8 Esquema do espectrômetro de massas. _____	24
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Figura 9 Fruto do camu-camu _____	28
Figura 10 Relação entre as classes de compostos mais estudados no fruto do camu-camu e frequência dos métodos analíticos utilizados para determinação desses compostos. _____	36
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Figura 11: Cromatogramas da amostra com os compostos AA, AG e MI. _____	48
Figura 12: Cromatograma do diluente no efeito residual. _____	48
Figura 13: Espectro de massas MRM dos íons produtos do AA e estrutura correspondente (175>115). _____	49
Figura 14: Espectro de massas MRM dos íons produtos da MI e estrutura correspondente (317 > 151). _____	50
Figura 15: Espectro de massas MRM dos íons produtos do AG e estrutura correspondente (169 > 125). _____	51

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população faz com que cada vez mais se procure produtos para a alimentação que contenham compostos que sejam saudáveis, que tenham efeitos antioxidantes, vitaminas e minerais. Esses produtos podem ser frutas, verduras e legumes “*in natura*” ou mesmo a utilização de suplementos alimentares.

Um exemplo de fruta com alto potencial de benefícios à saúde é o camu-camu (*Myrciaria dubia*), da família das Myrtaceae. É um fruto nativo da Amazônia com altos índices de compostos fenólicos, vitamina C,  $\beta$ -caroteno e minerais como cálcio, ferro, fósforo, etc. Devido ao seu alto índice de vitamina C, o fruto se torna muito azedo, não sendo um atrativo palatável para seu consumo, porém os seus compostos bioativos fazem com que o interesse pelo consumo e estudo do fruto seja grande; mesmo assim, ainda são poucos os produtos derivados de camu-camu no mercado. Neste contexto, se mostra interessante o estudo de suplementos alimentares derivados do fruto do camu-camu como forma de consumo desses compostos bioativos originários do fruto.

Como tem crescido muito o uso de suplementos alimentares, a Vigilância Sanitária (Anvisa) tem normatizado através de legislações atuais, a fabricação e qualidade dos suplementos alimentares. Para avaliação da qualidade, a Anvisa cita, além da Farmacopeia Brasileira, a USP (Farmacopeia Americana) como compêndio que pode ser seguido, visto que possui capítulos específicos para suplementos alimentares, onde avalia-se além do conteúdo dos marcadores específicos, com propriedades bioativas, também o controle de impurezas como, por exemplo, as impurezas metálicas.

Os compêndios oficiais preconizados pela Anvisa não trazem metodologia analítica para avaliação de suplementos alimentares derivados do camu-camu. Diante disso é importante que se desenvolvam métodos analíticos para avaliação dos marcadores do produto. Sendo assim, justifica-se o desenvolvimento e validação de um método analítico para qualificar e quantificar compostos bioativos como a vitamina C e polifenóis que estão presentes nos produtos derivados do camu-camu, através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sistema em sequencial (HPLC-MS/MS).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar as quantidades de vitamina C e compostos fenólicos em suplementos alimentares à base de camu-camu, através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sistema sequencial (HPLC-MS/MS).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar triagem dos compostos fenólicos no fruto e suplementos alimentares, através da espectrometria de massas para escolha de marcadores;
- Desenvolver método analítico que contemple a avaliação de vitamina C e compostos fenólicos;
- Validação do método para marcadores específicos;
- Avaliar amostras comerciais de suplementos alimentares à base de camu-camu;



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Camu-camu e os Compostos Bioativos

O consumo de frutas vem aumentando devido à alta quantidade de compostos bioativos, sendo esse consumo essencial para a manutenção da saúde. Os compostos bioativos mais comuns são a vitamina C, polifenóis,  $\beta$ -caroteno e licopenos (AGUIAR, G. P. L. et al., 2018). O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é uma fruta tropical rica em vitamina C e compostos fenólicos antioxidantes, que trazem diversos benefícios à saúde (FUJITA et al., 2017; LANGLEY et al., 2015). Típica da Amazônia é considerada uma fruta com alto valor nutricional e seus efeitos benéficos a saúde são associados principalmente com sua ação antioxidante (NERI-NUMA et al., 2018; AZEVÊDO et al., 2015; FRACASSETTI et al., 2013).

Devido a essa excessiva acidez o camu-camu é consumido principalmente em sucos, ou como ingrediente de geleias, sorvetes, licores, vinhos ou outras comidas (FRACASSETTI et al., 2013; CAVALIERI, 1993; FRANCO et al., 2005; VILLACHICA, 1997), ou ainda, pode ser consumido o próprio fruto ou como polpa congelada, sendo que a polpa congelada vem sendo exportada para vários países da Europa e Ásia devido a sua versatilidade na cozinha (FIDELIS et al., 2020). Segundo Fracassetti e colaboradores (2013) o interesse comercial pelo fruto tem aumentado particularmente pelo alto conteúdo de vitamina C. Esse perfil fitoquímico do camu-camu tem despertado o interesse de vários pesquisadores nos últimos anos, pois nele se observa a presença de várias substâncias bioativas.

Sendo um dos frutos com as maiores quantidades de vitamina C já relatadas, alguns autores o chamam de “super fruto” ou mesmo “tesouro amazônico” por ser um cultivo com alto potencial socioeconômico para a região (GRIGIO et al., 2017). Segundo Correa (2011) o conteúdo de ácido ascórbico dos frutos varia de acordo com a região e da época do ano, sendo importante monitorar o conteúdo de vitamina C em cultivos de camu-camu de diferentes lugares e estados de maturação do fruto.

Além da vitamina C são encontrados no camu-camu altos níveis de compostos fenólicos, como os flavonoides que são potentes antioxidantes (GRIGIO et al., 2017). Estudos destacam ainda outros compostos importantes para a saúde humana, como o  $\beta$ -caroteno e a presença de minerais essenciais, como cálcio e potássio (ZANATTA et al., 2007; YUYAMA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2016).

Compostos fenólicos e vitamina C são potentes antioxidantes o que aumenta o interesse comercial pelo fruto, porém o decréscimo na quantidade de vitamina durante o processamento e armazenamento tem estimulado estudo que como preservar a composição nutricional do fruto (FRACASSETTI et al., 2013), sendo que conhecer a quantidade desses compostos é um ponto importante de estudo pela complexidade da matriz.

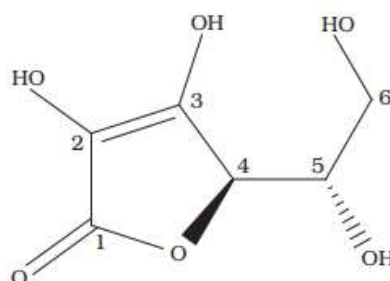
Langley e colaboradores (2015) enfatizam que o fruto é uma opção para o desenvolvimento de produtos, visto que em pesquisas com animais reportaram efeitos anti-inflamatórios do suco de sementes de camu-camu, efeitos antiobesidade em ratos com dieta calórica induzida, além de hepatoproteção. Um estudo em humanos conduzido por Inoue et al. (2008) demonstrou atividade antioxidativa e anti-inflamatória.

Devido à relevante quantidade de compostos e à ausência de método oficial para realizar tais avaliações, a pesquisa e caracterização desses compostos em suplementos alimentares se torna relevante visto que grande parte dos estudos realizados com o camu-camu são na fruta fresca ou em pós da fruta preparados para as pesquisas.

### 3.1.1 Vitamina C

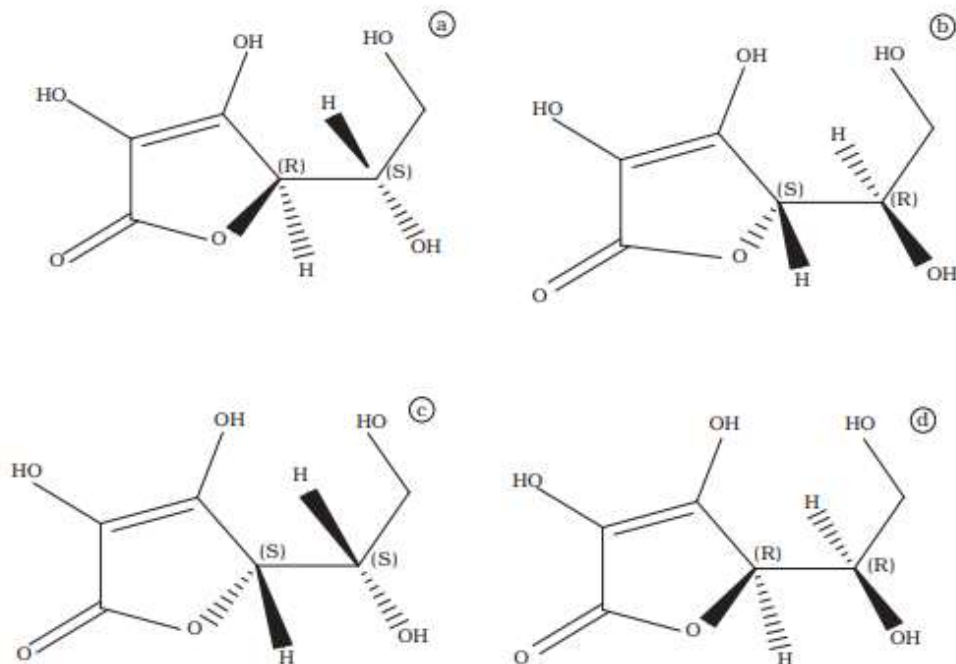
A vitamina C é um nutriente extremamente importante para a fisiologia humana. Conhecida também como ácido ascórbico, é constituída de um anel  $\gamma$ -lactona quase planar com dois centros quirais (Figura 1), determinando dois pares de estereoisômeros, os ácido L e D-ascórbico e ácidos L e D-isoascórbico (Figura 2) (ROSA et al., 2007).

Figura 1 Estrutura molecular do ácido ascórbico



Fonte: ROSA et al., 2007.

Figura 2 Isômeros do ácido ascórbico (a. Ácido L-ascórbico; b. ácido D-ascórbico; c. ácido L-isoascórbico ou ácido L-eritórbrico; d. ácido D-isoascórbico ou ácido D-eritórbrico).



Fonte: Adaptado de ROSA et al., 2007.

A vitamina C encontra-se sob duas formas, reduzida e oxidada (ácido deidroascórbico), sendo que ambas são igualmente ativas, porém a forma oxidada é menos difundida. Essa transformação é reversível funcionando como um sistema oxidorredutor no organismo, participando de processos celulares importantes no organismo (AZULAY et al., 2003). É o mais importante antioxidante solúvel em água presente nos alimentos (CUNHA-SANTOS et al., 2018) sendo vital para o funcionamento das células do corpo humano por exercer função de cofator para duas enzimas essenciais à biossíntese do colágeno. Essa função faz com que a vitamina C previna a oxidação do ferro, portanto, protege as enzimas contra a auto inativação (AZULAY et al., 2003).

Devido à grande atividade antioxidante, a vitamina C é associada a profilaxia de doenças como o câncer, aterosclerose, processos degenerativos e doenças crônicas pois pode retirar diretamente oxigênio singlete, radicais superóxido e hidróxi, além de inibir a oxidação de colesterol LDL (*Low density lipoprotein*) (YARDIM-AKAYDIN et al., 2003; ROSA, 2005). A atividade antioxidante envolve a doação de um elétron e a formação do radical livre ascorbato (ROSA et al., 2007).

A atividade vitamínica do ácido ascórbico é a ação antiescorbútica, sendo o escorbuto uma doença que pode levar à morte, causada pela deficiência nutricional de vitamina C. Mesmo sendo tão importante para o organismo, os seres humanos fazem parte do grupo de seres vivos que não são capazes de sintetizar a vitamina C, devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, que transforma glicose em ácido ascórbico (ROSA et al., 2007).

A quantificação de vitamina C é amplamente relatada, a partir de técnicas mais simples, como no caso da titulação, descrita em compêndios oficiais (Farmacopeia Brasileira e Farmacopeia Americana (USP)), assim como através da espectrofotometria, métodos enzimáticos e fluorimétricos, e mais recentemente a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BAENAS et al., 2019; HERNANDEZ et al., 2006; CUNHA-SANTOS et al., 2018).

Os métodos cromatográficos proporcionam vantagens em relação aos demais métodos devido a disponibilidade de diferentes tipos de detectores, além da identificação e quantificação dos constituintes da amostra com maior exatidão e sensibilidade (CUNHA-SANTOS et al., 2018).

O desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação do ácido ascórbico requer o cuidado em relação a estabilidade da vitamina, a qual pode-se oxidar facilmente, para isso normalmente o preparo de amostras para este composto envolve agitação das amostras em soluções ácidas, visto que este tipo de solvente ajuda a estabilizar a vitamina C, sendo que os comumente utilizados são ácido metafosfórico, ácido oxálico, ácido acético, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e ácido sulfúrico (CUNHA-SANTOS et al., 2018; CAMPOS et al., 2009; ROSA et al., 2007; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003).

Estudos recentes com métodos desenvolvidos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência estão buscando a quantificação não somente do L-ácido ascórbico, mas também do ácido deidroascórbico, visto que ambos são componentes importantes à dieta humana. Cunha-Santos e colaboradores (2018) desenvolveram um método onde compararam os resultados da extração da vitamina C a partir de PLE (*Pressurized liquid extraction*), com extrações ácidas com quantificação por UPLC-DAD, porém para a quantificação do ácido deidroascórbico há necessidade de se realizar uma etapa de redução à ácido ascórbico para avaliação do composto.

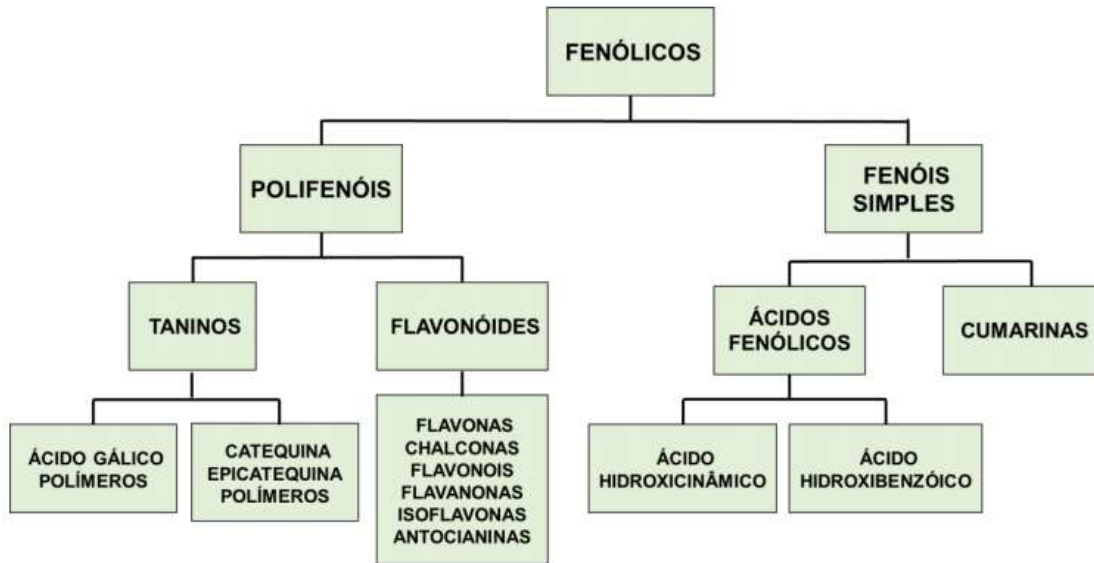
Métodos que envolvem etapas de reação como a derivatização ou redução, por exemplo, demandam de mais tempo e cuidado na execução, devido aos

interferentes durante o processo. Baenas e colaboradores (2019) propuseram um método de quantificação da vitamina C onde ambos os ácidos, L-ascórbico e deidroascórbico foram analisados sem a necessidade da etapa prévia de redução/derivatização do ácido deidroascórbico, assim como, sem a utilização de padrões internos. Para isso utilizaram a técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um detector de massas triplo quadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS), sendo um método rápido e de alta sensibilidade para avaliação dos compostos. A fase móvel utilizada pelo autor possui os mesmos componentes da fase móvel utilizada no desenvolvimento do método proposto neste trabalho para compostos fenólicos, o que é indicativo da possibilidade de realizarmos a avaliação de compostos fenólicos e vitamina C na mesma corrida analítica a partir da cromatografia acoplada a espectrometria de massas.

### **3.1.2 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou em polímeros, que conferem a eles ação antioxidante (ANGELO & JORGE, 2007). Representam a principal classe dos metabólitos secundários nas plantas (GONÇALVES, 2008). Esses metabólitos são produzidos durante a fotossíntese e mesmo não participando de forma direta nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução, são essenciais a sobrevivência da planta, pois atuam como mecanismo de defesa contra herbívoros, microrganismos e plantas competidoras, assim como na defesa contra radiações ultravioleta. Dentre as classes de compostos fenólicos, os que mais se destacam como fontes naturais de antioxidantes são os flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas (Figura 3) (MARTINS et al., 2016; SILVA et al., 2010; WINK, 2016; SCHAFRANSKI, 2019).

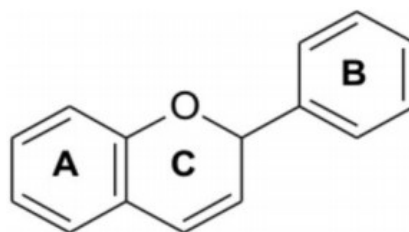
Figura 3 Classificação dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de SCHAFRANSKI (2019)

Os flavonoides são o maior grupo de compostos fenólicos, possuem baixo peso molecular e normalmente estão ligados a moléculas de açúcares. Contém grupos de antocianinas, flavonóis, flavonas e isoflavonas, sendo que normalmente a quercetina é o principal composto fenólico constituinte desses grupos, com correlação direta a capacidades nutritivas de vegetais (KING & YOUNG, 1999). A estrutura desses compostos é constituída por 15 átomos de carbono e apresentam 3 anéis aromáticos (Figura 4), sendo um anel pirano que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático. Essas estruturas podem ocorrer na forma livre (não conjugada com heterosídeos ou agliconas, por exemplo, a quercetina) ou na forma conjugada à uma unidade glicosídica (DAMETTO, 2014; ZUANASSI, 2002; PEREIRA, 2019).

Figura 4 Estrutura química base dos flavonoides



Fonte: Adaptado de ANGELO & JORGE (2007)

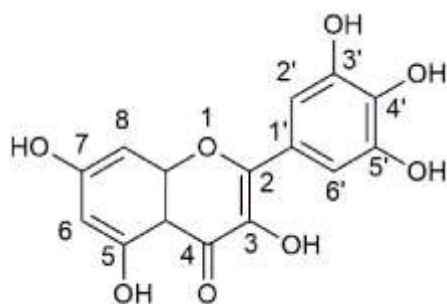
As variações de substituição no anel C resultam em variações na classe dos flavonoides. Esta estrutura contempla compostos como as antocianinas, flavonóis e

seus derivados, ácidos fenólicos, benzoico, cinâmico e derivados (ANGELO & JORGE, 2007).

A miricetina é da classe dos flavonoides sendo um flavonol natural que possui grupos hidroxilas nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. É comumente ingerido na dieta através das frutas, vegetais, chás, frutas vermelhas e vinho tinto (LI, Y. & DING, Y. 2012; HARNLY, et al. 2006) e já é aprovada como suplemento alimentar em alguns países (LIU et al., 2020).

A estrutura química da miricetina é única na qual a combinação de grupos hidroxilas nas posições 3, 5 e três grupos hidroxilas em sequência nas posições 3', 4' e 5' podem aumentar o efeito antioxidante (Figura 5) (LI, Y & DING, Y. 2012).

Figura 5 Estrutura molecular da miricetina

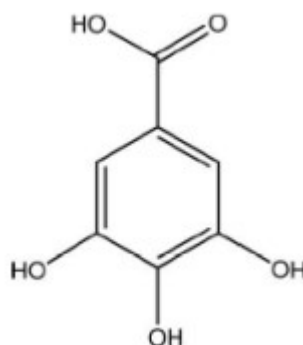


Fonte: LIU et al., 2020

Estudos relatam benefícios a saúde a partir do consumo de miricetina em doenças como diabetes mellitus e Alzheimer (LIU, et al., 2020; LI, Y & DING, Y. 2012).

Os ácidos fenólicos são compostos pelos ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, os quais tem sua ação antioxidante dependente da posição e do número de grupos hidroxilas em relação a posição do grupo funcional carboxílico. Seus principais representantes são os ácidos elágico e gálico, usualmente ocorrendo na forma de taninos hidrolisáveis em frutas e nozes. O ácido gálico possui em sua estrutura um anel benzênico substituído por três hidroxilas e um grupamento carboxila (Figura 6) (MARTINS, 2017).

Figura 6 Estrutura molecular do ácido gálico



Fonte: MARTINS, 2017.

Os taninos possuem peso molecular relativamente alto e em função da estrutura química podem ser hidrolisáveis ou condensados, sendo responsáveis pelo sabor adstringente em frutas e legumes. Os principais grupos dos taninos condensados são as catequinas. Já dos taninos hidrolisáveis, os principais grupos são polímeros de ácidos elágico e gálico. (ANGELO & JORGE, 2007; KING & YOUNG, 1999).

Os elagitaninos são polifenóis formados por polímeros de ácido elágico, segundo Ângelo e colaboradores (2007), os taninos hidrolisáveis ou não condensados são ésteres do ácido gálico e elágicos glicosilados, onde os grupos hidroxilas são esterificados com os ácidos fenólicos.

As proantocianidinas ou taninos condensados são oligômeros ou polímeros de flavan-3-óis e contém exclusivamente unidades de (epi) catequina (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ et al., 2013; MOJZER et al., 2016). No estudo Fracassetti et al. (2013) reportou resultados similares de proantocianidinas à composição do perfil fenólico do chá verde, sendo que recentemente a catequina-galato tem sido descrita como um potente inibidor da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidade com implicações na prevenção da obesidade dentro outros efeitos benéficos a saúde (YILMAZER-MUSA et al., 2012).

As frutas coloridas são potencialmente fontes ricas em compostos antioxidantes. As antocianinas são pigmentos que são responsáveis pelo brilho e cores das frutas e flores, responsável pela coloração vermelha a roxa, sendo encontradas em maiores quantidades durante o processo de amadurecimento dos frutos. Possuem potente ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo compostos também relatados em maior quantidade em frutos maduros do camu-camu (REYNERTSON et al., 2008; NEVES et al., 2015; ZANATTA et al., 2005). Fazem parte



dessa classe os compostos *cyanidin-3-glucoside* e *delphinidin-3-glucoside*, sendo largamente encontrados nas cascas de frutas de coloração vermelho a roxo escuro (ANGELO & JORGE, 2007).

As plantas da família da Myrtaceae do gênero *Myrciaria* demonstraram em vários estudos propriedades biológicas. Segundo Borges e colaboradores (2014), já foram relatadas atividade anti-inflamatória, atividades hipoglicêmica e hipolipêmica, antifúngica e antiproliferativa, antibacteriana, anticolinesterase, anti-plasmódica, atividade gastroprotetora, além do efeito antioxidante e de não apresentar toxicidade.

Chirinos e colaboradores (2010) concluíram que independente do estágio de amadurecimento do camu-camu, a classe de compostos fenólicos mais importantes é a flavan-3-ol, seguida pelo grupo dos ácidos elágico e gálico. Já Myoda e colaboradores (2010), compararam os extratos da casca e da semente, nos quais o teor de compostos fenólicos no extrato da semente foi maior que no extrato da casca, o que torna interessante a caracterização de constituintes fenólicos nesta matriz. Foram detectados também: catequina, campeferol, quercetina, rutina, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e ácido elágico (AKTER et al., 2011; FRACASSETTI et al., 2013). Bataglioni et al. (2015) detectaram miricetina, quercetina, luteolina, ácido p-coumárico e ácido gálico.

### **3.2 Suplementos alimentares**

Os suplementos alimentares não são medicamentos e por isso não servem para tratar, prevenir ou curar doenças, sendo destinados a pessoas saudáveis; pessoas com algum problema de saúde devem consumir os suplementos com orientação de um profissional da saúde habilitado (ANVISA, 2019).

Suplemento alimentar é um produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados (BRASIL, 2018, p. 2).

No Brasil entre os anos de 2010 e 2016 houve um aumento no consumo de suplementos alimentares de 233%, apresentando um faturamento de 1,49 bilhão de reais (DAL MOLIN et al, 2019). Atualmente, o mercado de suplementos vitamínicos é estimado em 3,5 bilhões de reais onde a procura por esses produtos sempre foi muito

forte no país, mas se intensificou no último ano devido à pandemia do novo coronavírus (DIÁRIO DO COMÉRCIO, 2021).

O mercado de suplementos alimentares é cada vez mais internacional, tornando a colaboração entre os órgãos reguladores essencial, visto que decisões nacionais tem implicações internacionais, porém não há um consenso global em como categorizar esses produtos ocorrendo variações nas denominações, como suplementos dietéticos, produtos naturais para a saúde, medicamento complementar ou suplementos alimentares. Como os produtos são consumidos em todo o mundo, padrões de qualidade global deveriam ser adotados (DWYER et al., 2018).

A categoria de suplementos alimentares foi criada pela Anvisa em 2018 para garantir a população produtos seguros e de qualidade, incluiu produtos que estavam em outras classes alimentares e definiu regras mais adequadas incluindo limites mínimos e máximos e alegações com comprovação científica (ANVISA, 2019).

A partir do marco regulatório foi lançada a RDC 243/2018 que define os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Segundo as novas diretrizes legais estão contempladas mudanças em informações contidas nos rótulos até alterações na composição dos suplementos alimentares (DAL MOLIN et al., 2019).

As normas que regulamentam os suplementos alimentares conforme a Anvisa são: RDC 243/2018: criou a categoria de suplementos alimentares e dispôs sobre os requisitos sanitários. RDC 242/2018: alterou a legislação de medicamentos específicos para torná-la coerente com o novo marco regulatório de suplementos alimentares. RDC 241/2018: estabeleceu os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. RDC 240/2018: alterou a RDC 27/2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. RDC 239/2018: estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. Instrução Normativa 28/2018: estabelece as listas de constituintes, limites de uso, alegações e rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

Segundo a RDC 243/2018 (BRASIL, 2018), os ingredientes são fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas e devem atender integralmente às especificações de identidade, pureza e composição estabelecidas em pelo menos uma referência citada pela legislação como: Farmacopeia Brasileira e Compêndio de Suplementos Alimentares da USP (*USP Dietary Supplement Compendium – DSC*).

Como a regulação de suplementação alimentar é um assunto relativamente novo, não se dispõe de muitos métodos analíticos publicados nas farmacopeias, incluindo produtos derivados do Camu-camu, A para a avaliação da qualidade dos produtos comerciais.

### **3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sistema sequencial (HPLC-MS/MS)**

A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases, a fase estacionária e a fase móvel, ou fluído que percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é um importante membro de toda a família de técnicas de separação, visto que consegue separar misturas que possuem um grande número de compostos similares (JARDIM et al., 2006).

A técnica HPLC é um tipo de cromatografia líquida que utiliza colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, conseguindo realizar separações de inúmeros compostos presentes em diferentes tipos de amostras com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM et al., 2006). Essa separação de compostos se dá devido as interações que ocorrem entre os compostos e a fase móvel e, fase estacionária, definindo assim a velocidade de eluição de cada composto pela coluna cromatográfica, de forma que havendo a separação observa-se os compostos em um cromatograma com diferentes tempos de retenção.

Nas últimas décadas, ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos ultravioleta-visível com arranjo e diódos (UV-Vis / DAD), além do aumento do uso de detectores como fluorescência, índice de refração (RI), eletroquímicos, bem como o acoplamento com o espectrômetro de massas (MS) (JARDIM et al., 2006).

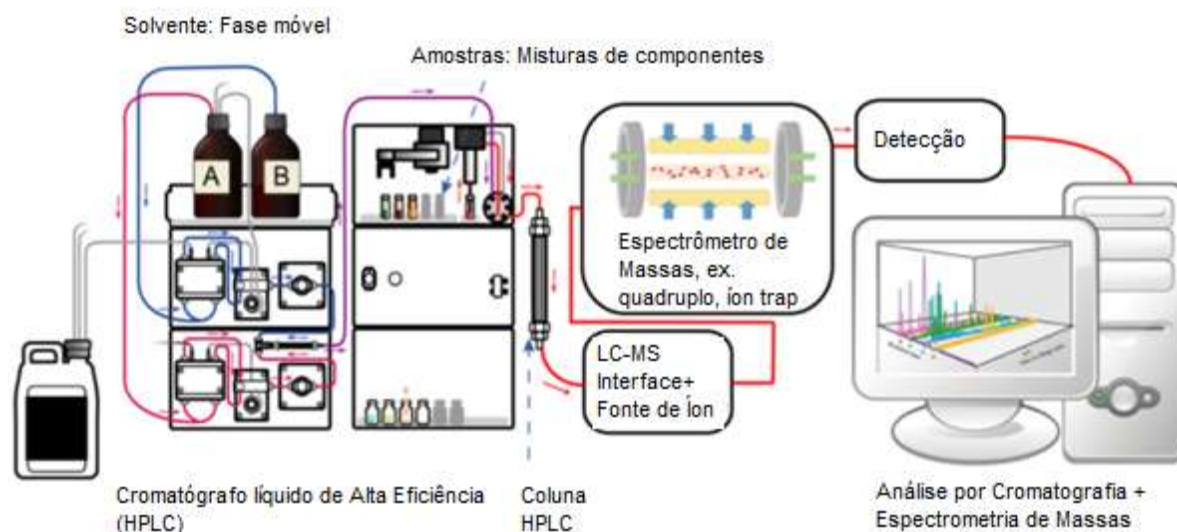
A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é, atualmente, a técnica que possibilita a análise de diversas substâncias com ampla caracterização de polaridade e massa molecular, sendo que esse acoplamento é muito complexo, visto que a cromatografia é utilizada para compostos não voláteis, enquanto no analisador de massas funciona à base de íons na forma gasosa. Muitas adaptações

tiveram que serem realizadas a fim de eliminar o solvente líquido da eluição da coluna, além da cromatografia funcionar em pressão positiva e o MS em um sistema de vácuo (BUSTILLOS, 2020).

A Figura 7 demonstra um esquema do acoplamento do HPLC ao MS. O HPLC é composto por um reservatório do solvente de eluição (fase móvel), bomba que pressuriza o eluente, a coluna cromatográfica, que é considerada o coração do sistema cromatográfico, uma vez que é nela que ocorrerá a separação e o detector que neste caso é o espectrômetro de massas (LANÇAS, 2009).

O mais importante e versátil detector para a análise de traços, especialmente de compostos orgânicos, em misturas complexas no momento, é o espectrômetro de massas (MS), devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como sobre a estrutura do analito. É um instrumento sofisticado constituído em três partes: fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados (LANÇAS, 2009; JARDIM et al., 2006).

Figura 7 Esquema da cromatografia líquida hifenada com espectrometria de massas (HPLC-MS/MS)

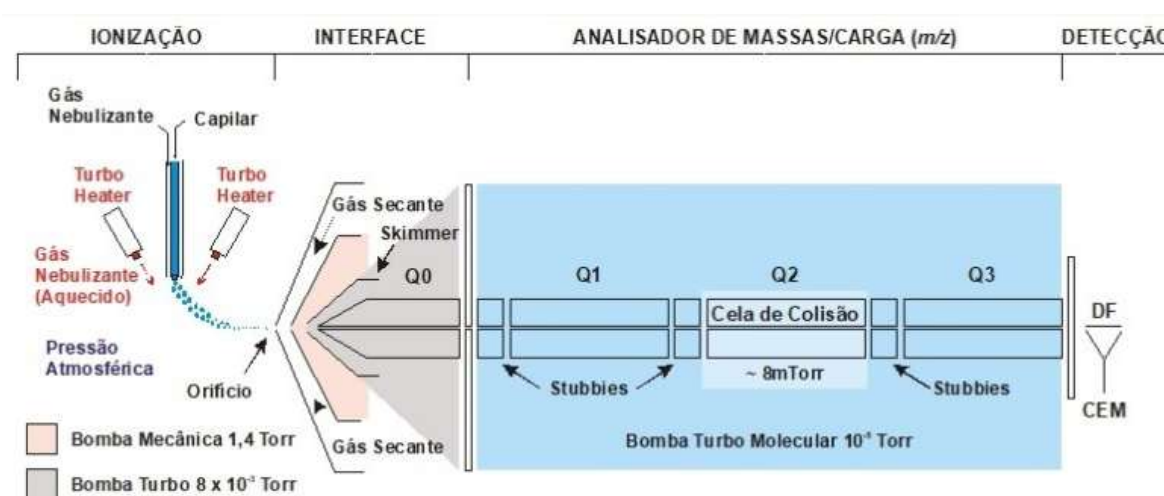


Fonte: Adaptado de BUSTILLOS (2020)

No sistema HPLC-MS/MS (sequencial), a amostra é introduzida pelo injetor passando pelo sistema de separação (coluna), onde são determinados os tempos de retenção (TR) dependendo da interação entre a coluna e a fase móvel. Após esses compostos são introduzidos no MS na fonte de ionização, ocorrendo a ionização e evaporação do solvente. Após a formação dos íons, estes seguem para o primeiro quadrupolo, em que os íons precursores são determinados, segundo a sua razão

massa/carga ( $m/z$ ), na sequência os íons passam pela célula de colisão, segundo quadrupolo, colidindo com o gás e formando fragmentos que são determinados no segundo analisador, terceiro quadrupolo. Este processo é chamado de “*Multiple Reaction Monitoring MRM*”, em português Monitoramento de Reações Múltiplas, sendo o monitoramento de reação selecionada para múltiplos íons produto provenientes de um ou mais íons precursores, aumentando a sensibilidade das análises (BUSTILLOS, 2020; VESSECCHI et al., 2011 (Figura 8).

Figura 8 Esquema do espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado de BUSTILLOS (2020)

Para a detecção por MS os compostos precisam necessariamente serem ionizáveis. Várias interfaces foram desenvolvidas para o acoplamento da cromatografia líquida (LC) com MS de forma que pudesse ser realizada a ionização, porém dois tipos de interface operando à pressão atmosférica destacam-se, desde o início, para o acoplamento LC/MS: *eletrospray* (ESI, *eletrospray interface*), onde o *spray* é produzido com auxílio de uma corrente elétrica, e ionização química (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) na qual produz-se uma espécie química que irá ionizar a substância em análise. Estas fontes de ionização são complementares visto que a ESI é mais empregada para moléculas de maior polaridade e a APCI para moléculas menores e menos polares (LANÇAS, 2009).

Na ionização geralmente é gerado o íon molecular (precursor) que corresponde a molécula original protonada  $[M+H]^+$  ou desprotonada  $[M-H]^-$ , considerando o modelo de ionização *eletrospray* (ESI<sup>+</sup> ou ESI<sup>-</sup>), a qual não é suficiente para a confirmação da identidade do analito, sendo a forma encontrada para se obter mais informações e

confirmação da identidade das substâncias o uso de dois analisadores denominados sistema em Tandem (FAVRETO, 2016).

Em estudos recentes a LC-MS/MS vem sendo utilizada para caracterização de compostos em alimentos, principalmente quando se refere a compostos fenólicos, devido a quantidade de compostos diferentes com estruturas moleculares semelhantes que compõe essa classe de compostos. Fracassetti et al. (2013) em seu estudo sobre a composição do camu-camu identificou compostos das classes: flavonóis, antocianinas, derivados do ácido elágico, elagitaninos, derivados do ácido gálico e proantocianidinas, utilizando o HPLC-DAD-ESI-MS/MS e UPLC-Q-TOF. A análise foi realizada em modo negativo utilizando a fonte eletrospray de ionização, este estudo serviu como base para a avaliação desses compostos nos suplementos alimentares previamente avaliados neste trabalho. A utilização do UPLC-Q-TOF pelo autor possibilitou a caracterização dos compostos devido a maior sensibilidade deste tipo de detector.

Bataglion et al. (2015) pesquisaram compostos fenólicos em frutas tropicais brasileiras, dentre elas o camu-camu, e quantificou 22 compostos fenólicos diferentes através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao MS (UHPLC-MS/MS), utilizando a fonte ESI em modelo negativo. Dentre os compostos avaliados estão o ácido gálico, miricetina e quercetina, também avaliados neste estudo.

Na avaliação dos compostos fenólicos das folhas de amoreira, Schafranski (2019) utilizou LC-ESI-MS/MS para a caracterização dos compostos, através do modo negativo, realizando a extração das amostras com metanol acidificado, onde as leituras foram realizadas utilizando o MRM. Lee et al. (2017) utilizaram entre outras técnicas analíticas o UHPLC-MS/MS para avaliação dos compostos fenólicos e UHPLC-QToF-MS para avaliação de procianidinas, ambos a partir do modo MRM, em modo negativo, na avaliação da soja para a prevenção de aterosclerose.

Grande parte dos estudos recentes em frutas utilizando MS são reportados para a avaliação de compostos fenólicos, porém a avaliação do ácido ascórbico no camu-camu é de extrema relevância. Baenas et al. (2019) avaliaram ácido ascórbico e o deidroascórbico em sucos de laranja e liofilizados do suco de laranja e brócolis e reportaram que esses compostos apresentam  $m/z$  175 e 173, respectivamente, utilizando um método rápido e sem a necessidade de derivatização. Considerando um paralelo com essa pesquisa para um desenvolvimento de método que é possível avaliar compostos fenólicos e vitamina C, observa-se que o ácido gálico é o composto,

dentre os já avaliados, que apresenta  $m/z$  mais próxima com 169 dentre os compostos da classe dos polifenóis avaliados, sendo que a maioria das substâncias da classe dos compostos fenólicos possuem massas mais elevadas.

Dentre as classes de compostos com ação antioxidantes presentes no camu-camu, foram avaliados neste trabalho o ácido gálico e miricetina, pertencentes a classe dos compostos fenólicos, e a vitamina C, compostos relatado em maior quantidade no fruto. As transições do ácido gálico, ácido ascórbico e miricetina são  $m/z$  169, 175 e 317 respectivamente (BAENAS et al., 2019; FACASSETTI et al., 2013).

**4 CAPÍTULO 1: Técnicas analíticas para avaliação de compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia*). Artigo publicado: Revista Thêma et Scientia (Qualis A4)**

**TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DO CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*)**

PERCIO, Juliana Andres Machado.<sup>1</sup>  
VASCONCELOS, Helder Lopes.<sup>2</sup>  
MANFIO, Josélia Larger.<sup>3</sup>

**RESUMO**

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto originário da Amazônia e é pesquisado pela presença de inúmeros compostos bioativos que foram identificados em diferentes estudos. A alta quantidade de compostos fenólicos e vitamina C na fruta é amplamente relatada, e esta apresenta ainda minerais essenciais à saúde humana. Neste contexto torna-se interessante conhecer esses compostos benéficos e quais técnicas analíticas são comumente utilizadas para a identificação e caracterização do fruto. Este estudo tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica de quais são os métodos analíticos mais utilizados para caracterização da fruta do camu-camu, correlacionando os compostos estudados com as técnicas analíticas utilizadas, estágios de amadurecimento do fruto e tratamentos ou subprodutos da fruta. Por meio deste trabalho é possível identificar rapidamente os compostos bioativos mais estudados, as técnicas analíticas aplicáveis às classes de compostos, assim como oportunidades de futuras pesquisas no desenvolvimento analítico para o estudo do camu-camu, principalmente através da espectrometria de massas, devido à confiabilidade das respostas. Assim como a pesquisa de minerais através de técnicas mais sensíveis como o ICP para a caracterização da fruta, produtos e suplementos alimentares derivados do camu-camu.

**PALAVRAS-CHAVE:** Métodos analíticos. Antioxidante. Compostos fenólicos. Minerais. Ácido ascórbico.

**ANALYTICAL TECHNIQUES FOR THE EVALUATION OF CAMU-CAMU BIOACTIVE  
COMPOUNDS (*MYRCIARIA DUBIA*)**

**ABSTRACT**

Camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a fruit originating from the Amazon and is researched for the presence of numerous bioactive compounds that have been identified in different studies. The high amount of phenolic compounds and vitamin C in fruit is widely reported, and it also contains minerals essential to human health. In this context it is interesting to know these beneficial compounds and which analytical techniques are commonly used for fruit identification and characterization. This study aimed to carry out a literature review of which are the most used analytical methods for characterization of camu-camu fruit, correlating the studied compounds with the analytical techniques used, fruit ripening stages and fruit treatments or byproducts. Through this work it is possible to quickly identify the most studied bioactive compounds, the analytical techniques applicable to the classes of compounds, as well as opportunities for future research in the analytical development for the study of camu-camu, mainly through mass spectrometry, due to the reliability their responses, as well as mineral research through more sensitive techniques such as ICP for the characterization of camu-camu fruit, products and dietary supplements.

**KEYWORDS:** Analytical Methods. Antioxidant. Phenolic compounds. Minerals. Ascorbic acid

1. Farmacêutica Mestranda de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE – e-mail: [julianapercio@gmail.com](mailto:julianapercio@gmail.com)
2. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, professor da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE, e-mail: [helder.vasconcelos@unioeste.br](mailto:helder.vasconcelos@unioeste.br)
3. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo, e-mail: [joselia.manfio@biopark.com.br](mailto:joselia.manfio@biopark.com.br)



## 1. INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é uma planta do gênero *Myrciaria* pertencente à família *Myrtaceae* as quais são encontradas em vários biomas brasileiros como a floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa, sendo que este gênero contém aproximadamente 99 espécies conhecidas (Borges *et al*, 2014).

O habitat natural da *Myrciaria dubia* é à beira de rios e igarapés ou regiões permanentemente alagadas, onde parte do caule permanece submersa (RIBEIRO *et al*, 2016). O fruto do camu-camu também é conhecido como caçari ou araçá d'água, sendo uma fruta tipicamente originária da Amazônia. A fruta é redonda com aproximadamente 2,5 cm de diâmetro e o pericarpo é brilhante, variando de vermelho a roxo quando maduro. Já o mesocarpo é ácido e a casca muito azeda, suculento e de cor rosa (NERI-NUMA *et al*, 2018; GRIGIO *et al*, 2017), conforme a Figura 9. A sua elevada acidez devido à quantidade de vitamina C e amargor da casca, devido à presença dos compostos fenólicos dificulta a palatabilidade e consumo da fruta fresca (SALOMÃO-OLIVEIRA *et al*, 2016).

Figura 9 Fruto do camu-camu



Fonte: Arquivo do autor.

O perfil fitoquímico do camu-camu tem despertado o interesse de vários pesquisadores nos últimos anos, pois nele se observa a presença de várias substâncias bioativas. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define substância bioativa como uma substância nutriente ou não nutriente consumida

normalmente como componente de um alimento, que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano (BRASIL, 2018).

Entre as substâncias bioativas do fruto do camu-camu observa-se a presença de vitamina C, estando esta em concentrações até 20 vezes maiores que a acerola e 100 vezes maiores que o limão, com quantidades relevantes de compostos fenólicos, tendo um importante poder antioxidante (CHIRINOS *et al*, 2010; VIDIGAL *et al*, 2011). Estudos destacam ainda outros compostos importantes para a saúde humana, como o  $\beta$ -caroteno e a presença de minerais essenciais, como cálcio e potássio (ZANATTA *et al*, 2007; YUYAMA *et al*, 2003; RIBEIRO *et al*, 2016).

Os diferentes compostos bioativos presentes no fruto do camu-camu podem ser usados para retardar ou prevenir várias doenças crônicas como dislipidemias, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer, devido sua ação antioxidante (AGUIAR *et al*, 2018; ANHÊ *et al*, 2019).

Devido à relevante quantidade de compostos e à ausência de método oficial para realizar tais avaliações, o objetivo deste trabalho foi explorar pesquisas realizadas com o fruto do camu-camu em relação às determinações de compostos bioativos, antioxidantes e minerais, e verificar quais são os métodos analíticos mais utilizados para identificação ou caracterização desses compostos no fruto *innatura* ou após algum processamento.

A metodologia de busca dos artigos foi através dos termos camu-camu, *myrciaria dubia*, compostos fenólicos, compostos bioativos, caracterização, nas plataformas *Pub Med*, *Science Direct* banco de dissertações de Universidades. Os artigos foram selecionados através do título e resumo onde trouxesse informações sobre a etapa analítica de caracterização do fruto.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 COMPOSTOS BIOATIVOS ANTIOXIDANTES E MINERAIS**

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou em polímeros, que conferem a eles ação antioxidante. Podem estar presentes em frutas e vegetais na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas (ANGELO *et al*, 2007). Representam a principal classe dos metabólitos secundários nas plantas e são derivados das vias do ácido

chiquímico e via fenilpropanoídica. Dentre as classes de compostos fenólicos, os que mais se destacam como fontes naturais de antioxidantes são os flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e tocoferóis (GONÇALVES, 2008).

A estrutura dos flavonoides é constituída por 15 átomos de carbono e apresentam 3 anéis aromáticos, sendo um anel pirano que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático. Essas estruturas podem ocorrer na forma livre (não conjugada com heterosídeos ou agliconas, por exemplo, a quercetina) ou na forma conjugada à uma unidade glicosídica (DAMETTO, 2014; ZUANASSI, 2002). Esta estrutura contempla compostos como as antocianinas, flavonóis e derivados, ácidos fenólicos, benzoico, cinâmico e derivados. A Tabela 1 exemplifica a estrutura química dos compostos fenólicos demonstrando a variedade de estruturas que podem ser encontradas nesta classe, desde os mais simples até as moléculas condensadas como os taninos (ANGELO *et al*, 2007).

Tabela 1 - Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6 - C_3$
Naftoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Fonte: Adaptado de ANGELO *et al* (2007).

A vitamina C é um nutriente extremamente importante para a fisiologia humana. Conhecida também como ácido ascórbico, é constituída de um anel  $\gamma$ -lactona quase planar com dois centros quirais, determinando dois pares de isômeros, ácido L e D-ascórbico (ROSA *et al*, 2007). Segundo Correa (2011) o conteúdo de ácido ascórbico dos frutos varia de acordo com a região e da época do ano, sendo importante monitorar o conteúdo de vitamina C em cultivos de camu-camu de diferentes lugares e estados de maturação do fruto.

O stress oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção das espécies reativas (de oxigênio ou nitrogênio) e agentes antioxidantes, sendo estes agentes capazes de inibir, prevenir ou retardar o processo oxidativo, mesmo em

baixas concentrações (DAMETTO,2014).

Os antioxidantes são os responsáveis pelo sequestro de radicais livres, e podem ser classificados em primários, que interrompem a cadeia de reações envolvidas na oxidação, e secundários, que reduzem a taxa de iniciação da oxidação. Alguns antioxidantes são metabólitos secundários das plantas e nelas estão associados ao sistema de defesa desta contra insetos, herbívoros, microrganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores, entre outras (ANGELO *et al*, 2007; GONÇALVES, 2008; GONÇALVES, 2012; CARVALHO *et al*, 2002).

Para exemplificar os compostos estudados no fruto do camu-camu a Tabela 2 traz a relação entre as moléculas já estudadas e suas classes, devido ao fato dos compostos fenólicos, assim como a vitamina C, atuarem como antioxidantes. Os minerais sendo importantes à fisiologia humana, também recebem enfoque neste estudo. Observa-se na tabela que quercetina, ácido gálico, elágico e antocianinas estão presentes em diferentes estudos realizados com camu-camu.

Tabela 2 - Compostos bioativos do camu-camu citados em estudos científicos

Classe ou subclasses	Compostos Bioativos	Autor
Compostos fenólicos	Flavonóides totais; antocianinas totais; compostos fenólicos	Grigio et al. (2017)
Vitamina	Vitamina C	
Sais Minerais	Sais minerais totais	Sousa et al. (2015)
Carotenóides	B-caroteno	Aguiar et al. (2018)
Vitamina	Vitamina C	
Sais Minerais	Ferro; sódio; cálcio	
Compostos fenólicos	Polifenóis totais	
Compostos fenólicos	Ácido gálico p-cumárico Miricetina Quercetina Luteolina	Bataglion et al. (2015)
Flavonóis	Miricetina-3-o-hexosídeo Miricetina -3-o-pentosídeo Quercetina-3-o- hexosídeo Miricetina	Fracassetti et al. (2013)
Antocianinas	Cianidina-3-o-glucosídeo	
Ácido elágico derivado	Ácido valoneico dilactone	
	Ácido elágico hexosídeo	
	Ácido elágico pentosídeo	
	Ácido elágico desoxy hexosídeo	
	Ácido elágico	
Elagitaninos	Ellagic acetyl rhamnoside	
	Ácido elágico derivado	
	Vescalagina; Castalagina	
	HHDP-galoil-glicose	
	Di-HHDP- glicose (pedunculagin)	
Ácido gálico derivado	Di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina/potentialina)	
	Digaloil-HHDP-glicose	
Proantocianidinas	Di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina)	
	Tri-galoil-HHDP-glicose (telimagrandina II)	
	Ácido gálico	
	Ácido gálico derivativo	
Vitamina	Gallocatequina-gallocatequina gallato-gallocatechingallato	
	Gallocatequina-gallato	
Vitamina	Gallocatequina-gallato-dímero	
	Vitamina C	
Sais Minerais	N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn, Fe, Mn, Cu, Na e Se	Gonçalves (2012)
Compostos fenólicos	Ácido elágico livre e total; rutina; antocianinas; proantocianidinas	Chirinos et al. (2010)
Compostos fenólicos	Flavan-3-ol derivado; catequina; delphinidina-3-glucosídeo; cianidina-3-glucosídeo; flavanona; ácido elágico; rutina; ácido elágico derivado	
Vitamina	Vitamina C	
Minerais	Ca, Mg, S, Zn, Fe, Mn, Cu, B, N, P, K.	Ribeiro et al. (2016)
Vitamina	Vitamina C	Filho et al. (2018)
Ácido graxo	Ácido linoleico ômega 3 e 6	
Minerais	K, Na, P, Si, Mg, S, Ti	

FONTE: Elaborado pelos autores

## 2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Nos últimos anos, no Brasil, os compostos bioativos de frutas estão sendo avaliados por diferentes técnicas analíticas, dependendo do composto pesquisado. Diversos autores estão empenhados em identificar e quantificar compostos que possam trazer benefícios à saúde através de alimentos, principalmente compostos fenólicos (SILVA *et al*, 2014).

Esses estudos são baseados em metodologias colorimétricas tradicionais suportadas por medições espectroscópicas. Atualmente inúmeros estudos vêm de encontro ao uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta (UV). Mais recentemente a espectroscopia de massas (MS) tem sido empregada na análise de alimentos para abordagens qualitativas e quantitativas (BIESAGA *et al*, 2009; GRUZ *et al*, 2008; BATAGLION *et al*, 2015; ALOTHMAN *et al*, 2009; LIM *et al*, 2007). O uso da cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectroscopia de massas tem recebido atenção devido à capacidade de caracterizar compostos estruturalmente semelhantes em matrizes complexas (BATAGLION *et al*, 2015; BAZOTI *et al*, 2006; FRANCESCATO *et al*, 2013; GALLART-AYALA *et al*, 2008; NAGY *et al*, 2009). Para uma completa caracterização pode-se utilizar técnicas complementares para a definição da estrutura química dos compostos.

Neri-Numa e colaboradores (2018) no estudo de revisão sobre as frutas brasileiras, enfatizaram a existência de cálcio (Ca), zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e magnésio (Mg) no camu-camu. Neves *et al* (2011) observaram a prevalência dos minerais cálcio (Ca), ferro (Fe) e fósforo (P) que foram determinados por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Ainda neste estudo os autores relataram que os *Blends* (mistura de sucos ou néctares de frutas) elaborados, com o objetivo de melhorar a composição nutricional, não perderam os minerais citados após um período de estabilidade, o que reforça a necessidade de se avaliar esses compostos no fruto ou em produtos derivados do fruto para definição de marcadores bioativos do produto, sabendo-se que os compostos podem se manter estáveis.

Em estudo recente Rodrigues *et al* (2020) desenvolveram uma técnica inovadora de extração dos compostos bioativos do camu-camu através de extração

por ultrassom e osmose reversa e realizaram análises através de técnicas espectrofotométricas para avaliação da atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS), quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, teor de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD/UV-Vis) desenvolvido por Neves *et al* (2015).

Neste estudo Rodrigues *et al* (2020) também realizou a identificação dos compostos bioativos através da cromatograma líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-Q- TOF-MS/ MS) e HPLC-DAD/UV-Vis.

A maioria dos estudos encontrados são de frutas frescas ou processadas a fim de obter pós de partes da fruta ou da fruta inteira. Fidelis *et al* (2020) realizaram um estudo com a incorporação de sementes de camu-camu liofilizadas em iogurte, afim de avaliar o efeito antioxidante e sensorial no iogurte. No estudo os compostos fenólicos quantificados foram vescalagin, castalagin, ácido gálico, procianidina e epicatequinas, através de cromatografia líquida de alta eficiência UV-Vis e fluorescência, sendo que a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH, Folin-Ciocalteu e capacidade redutora de ferro e cobre. Quando adicionadas as sementes de camu-camu liofilizadas ao iogurte este demonstrou aumento da atividade antioxidante e capacidade redutora, além de boa aceitação na análise sensorial.

A Tabela 3 apresenta a relação dos estudos realizados com o fruto do camu-camu onde foram pesquisados compostos bioativos da fruta *in natura* ou após algum processamento, sendo que a maioria das pesquisas trata da fruta em forma de polpa ou após algum processo de secagem como a liofilização.

Tabela 3 - Relação de métodos analíticos utilizados para caracterização de frutos de camu-camu com diferentes características de tratamento, estágios de maturação, de acordo com o tipo de composto bioativo avaliado.

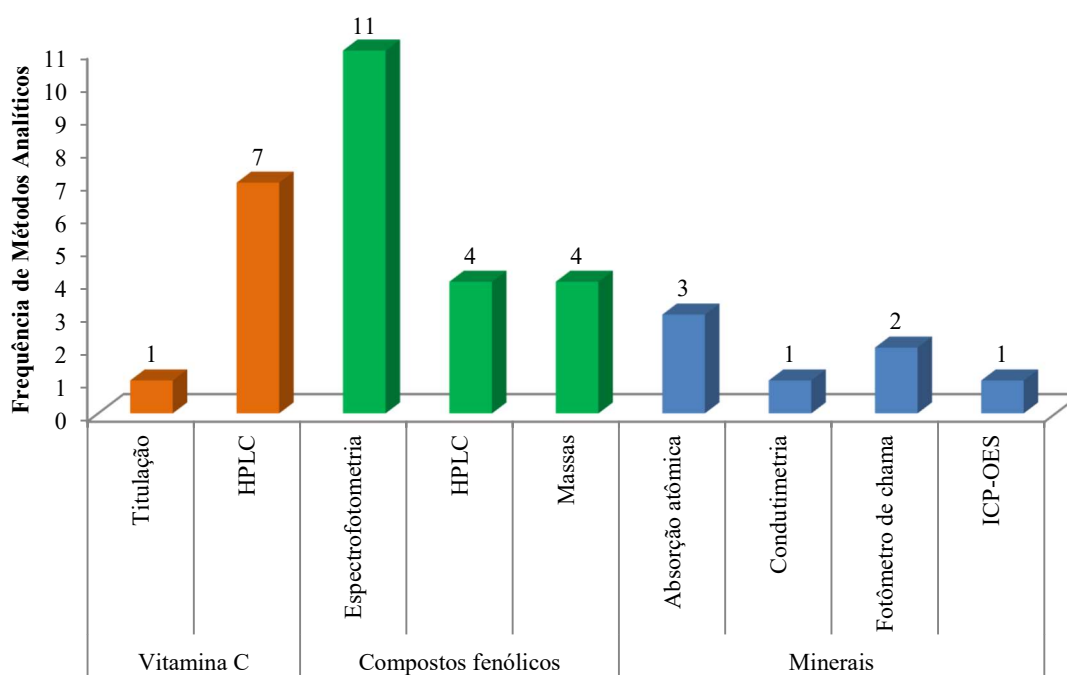
Compostos Bioativos	Técnicas	Tratamento no fruto	Estágio de maturação	Autor
Vitamina C	Titulação	Liofilização	Fruto maduro	Grigio et al. (2017)
		Separação polpa e polpa + casca	Verde Semi-maduro Maduro Sobremaduro	Correa et al. (2011)
	Cromatografia líquida (HPLC)	Fruto fresco	Em maturação	Aguiar et al. (2018)
		Fruta inteira	Verde Semi-maduro Maduro	Chirinos et al. (2010)
		Polpa (pó) Casca + semente (farinha)	Maduro	Fracassetti et al. (2013)
		Polpa (suco concentrado) Polpa + casca (liofilizada)	Não especificado	Gonçalves (2012)
		Polpa e casca	Maduro	Ribeiro et al. (2016)
Compostos fenólicos	Folin-Ciocalteu	Liofilização	Fruto maduro	Grigio et al. (2017)
	UPLC-MS/MS	Polpa	Maduro	Bataglioni et al. (2015)
	DPPH	Fruto fresco	Em maturação	Aguiar et al. (2018)
	Cromatografia líquida (HPLC) DPPH	Fruta inteira	Verde Semi-maduro Maduro	Chirinos et al. (2010)
	HPLC-DAD-MS-MS, DDPH, ABTS, ORAC	Polpa (pó) Casca + semente (farinha)	Maduro	Fracassetti et al. (2013)
	Folin-Ciocalteu DPPH, ORAC, FRAP	Polpa (suco concentrado) Polpa + casca (liofilizada)	Não especificado	Gonçalves (2012)
	DPPH	Óleo extraído da semente	Não especificado	Filho et al. (2018)
Carotenóides	Cromatografia líquida (HPLC)	Fruto fresco	Em maturação	Aguiar et al. (2018)
Proantocianinas	Colorimétrico (DMAC)			
Ácido elágico	Cromatografia líquida (HPLC)	Polpa (suco concentrado) Polpa + casca (liofilizada)	Não especificado	Gonçalves (2012)
Elagitaninos	UPLC-MS			
Proantocianinas	HPLC-Fluorescência			
Minerais	Condutimetria	Co-produtos processados	Não especificado	Sousa et al. (2015)
	Absorção atômica	Fruto fresco	Em maturação	Aguiar et al. (2018)
	Absorção atômica e fotômetro de chama	Polpa (suco concentrado) Polpa + casca (liofilizada)	Não especificado	Gonçalves (2012)
		Polpa e casca	Maduro	Ribeiro et al. (2016)
	ICP-OES	Óleo extraído da semente	Não especificado	Filho et al. (2018)
Ácido graxo	RMN	Óleo extraído da semente	Não especificado	Filho et al. (2018)
$\beta$ - caroteno	Cromatografia líquida (HPLC)	Polpa e casca	Maduro	Ribeiro et al. (2016)

FONTE: Elaborado pelos autores



Tendo em vista que o camu-camu é uma fruta originária da Amazônia, os estudos apresentados foram na grande maioria realizados com frutas adquiridas na região citada, incluindo a região Amazônica Peruana, sendo o estudo realizado por Gonçalves (2012) realizado com frutas adquiridas no estado de São Paulo. O estágio de maturação do fruto também é um dado importante o qual se pode correlacionar resultados dos compostos bioativos, assim validando a melhor época de colheita. As técnicas mais utilizadas para a avaliação de compostos fenólicos estão exemplificadas na figura 10, onde se observa que a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica predominante para a avaliação de vitamina C.

Figura 10 Relação entre as classes de compostos mais estudados no fruto do camu-camu e frequência dos métodos analíticos utilizados para determinação desses compostos.



As técnicas espectrofotométricas são tradicionalmente utilizadas principalmente para a avaliação da capacidade antioxidante onde os métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH, ORAC e FRAC são baseados na capacidade redutora dos reagentes contra os radicais livres. O método de Folin-Ciocalteu é utilizado para avaliação de compostos fenólicos totais através da capacidade redutora do reagente pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve no UV. Porém não é um método específico, pois determina todos os compostos

fenólicos e outras substâncias redutoras, como a vitamina C, podendo interferir nos resultados (ANGELO *et al*, 2007; GONÇALVES, 2012). O método do DPPH baseia-se na determinação da redução do radical estável DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazida) pelos antioxidantes presentes na amostra, enquanto o método de ORAC baseia-se na capacidade de absorção de radicais de oxigênio e o de FRAP pela capacidade antioxidante por redução de ferro (GONÇALVES, 2012).

Por meio de técnicas mais específicas que a espectrofotometria pode-se caracterizar os compostos constituintes do fruto. A espectroscopia de massas e a cromatografia líquida são os métodos mais recentemente utilizados para separação de compostos bioativos em alimentos, e elucidação das suas estruturas usando detectores de UV e espectrometria de massas (ANGELO *et al*, 2007; BATAGLION *et al*, 2015).

Devido à estrutura química dos compostos fenólicos, vários autores utilizam a cromatografia líquida e extração desses compostos em solventes como a água, metanol ou acetonitrila, sendo que, normalmente acidifica-se a fase móvel e o solvente de extração para estabilizar as antocianinas. Esta classe de compostos é facilmente observada no comprimento de onda 520 nm, e geralmente utiliza-se coluna cromatográfica com empacotamento C18 e com 25 cm de comprimento, melhorando a separação cromatográfica. Sendo a cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo as antocianinas mais evidenciadas nos estudos, principalmente nas cascas dos frutos maduros (DAMETTO, 2014; FRACASSETTI *et al*, 2013; BATAGLION *et al*, 2015; GOUVÊA *et al*, 2010).

A espectrometria de massas é responsável por respostas analíticas mais detalhadas das estruturas químicas encontradas no fruto, e o detector analisa traços de compostos orgânicos, em misturas complexas, a qual, acoplada à cromatografia líquida, está consolidada como uma técnica analítica robusta, versátil e com boa sensibilidade (LANÇAS, 2009).

Alguns resultados são interessantes em relação a estudos realizados em diferentes estágios de maturação da fruta, pois por meio de diferentes técnicas analíticas os autores chegaram a conclusões semelhantes sobre os compostos bioativos presentes no camu-camu. Um estudo interessante foi realizado por Fracassetti *et al* (2013) onde foi avaliado dois pós da fruta no estágio maduro, sendo um obtido da polpa e o outro da semente e casca removidos da polpa, com objetivo de caracterizar os compostos fenólicos, quantificar a vitamina C e determinar a

capacidade antioxidante e o potencial nutricional do fruto. As principais classes de compostos encontrados no referido estudo foram flavonoides, ácido elágico, elagitaninos e proantocianidinas, os quais foram facilmente detectados no pó. Tal fato corrobora com Chirinos *et al* (2010) que descreve o ácido elágico e flavan-3-ol como principais compostos fenólicos, e com Borges *et al* (2014) que indicam que a classe de compostos fenólicos mais importante é a flavan-3-ol, seguida pelo grupo dos ácidos elágico e gálico, além de flavonoides, flavanonas, antocianinas, catequinas, e rutina, sendo a cianidina-3-glucosídeo a antocianina encontrada em maior quantidade seguida da delphinidina-3-glucosídeo.

Os compostos também são suscetíveis à degradação pelo aumento da temperatura, conforme observado por Fracassetti *et al* (2013) onde as antocianinas cianidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo não foram observadas após a secagem para a obtenção dos pós.

O processo de amadurecimento é uma variável crítica para as propriedades bioativas, onde o estudo comparativo entre os estágios verde, de semi maturação e maduro demonstraram altos teores de compostos fenólicos no estágio verde e semi maturação e queda no valor no fruto maduro (CHIRINOS *et al*, 2010; AGUIAR *et al*, 2018).

A polpa é a parte da fruta mais considerada nos estudos, onde apresenta a maior concentração de ácidos orgânicos e maiores quantidades de compostos fenólicos. Na casca, quanto mais maduro o fruto maior a incidência de antocianinas visto que conferem o pigmento ao fruto, sendo que as mesmas não foram observadas nas sementes (GRIGIO *et al*, 2017; GONÇALVES, 2012).

Segundo Correa *et al* (2011) as quantidades de vitamina C na casca e polpa são maiores na casca do que as obtidas na polpa em frutos maduros e sobremaduros. Chirinos *et al* (2010) e Langley *et al* (2015) concluíram que o conteúdo de vitamina C diminui com o aumento da maturação, enquanto que flavonoides e capacidade antioxidante aumentam com o amadurecimento. Estas variações podem ser atribuídas à região do cultivo e estágios de maturação, que podem influenciar na composição da fruta do camu-camu (RIBEIRO *et al*, 2016).

Estudos sugerem também que diferentes condições de cultivo modelam os níveis de compostos bioativos, assim como a região também pode influenciar nas propriedades do fruto (AGUIAR *et al*, 2018; RIBEIRO *et al*, 2016). Aguiar *et al* (2018) citam que a quantidade de vitamina C foi mais expressiva em locais secos de cultivo

de camu-camu, assim como as quantidades de potássio, cálcio e enxofre, quando comparados a análise da frutacultivada em ambientes alagados, provavelmente pelo controle do solo.

Em estudos realizados com a semente do camu-camu foi observado tanto a presença de potássio, fósforo, sódio e silício, além de atividade antioxidante (Filho *et al*, 2018) e a ausência de antocianinas (GRIGIO *et al*, 2017).

Frutas e alimentos funcionais com propriedades antioxidantes estão em evidência nos mercados brasileiro e americano, e conhecer o potencial bioativo de frutas brasileiras e seus compostos, como o camu-camu é interessante e pode auxiliar para que estudos mais aprofundados sejam realizados visando o conhecimento e desenvolvimento de produtos derivados do camu-camu, agregando valor aos mesmos (LANGLEY *et al* 2015; FILHO *et al*, 2018).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível verificar quais são as análises mais utilizadas em pesquisas envolvendo cada classe de compostos bioativos do camu-camu. A caracterização completa dos compostos deste fruto pode ser feita por meio do uso da espectrometria de massas, sendo um campo promissor para futuras pesquisas, visto que este método traz respostas analíticas mais confiáveis para a avaliação dos inúmeros compostos existentes no fruto. Observou-se também com este estudo que as pesquisas dos minerais no fruto utilizaram técnicas simples de determinação, porém não foi tomada como foco na maioria dos trabalhos avaliados, uma vez que a maioria citava a existência de diversos minerais no fruto e poucos estudos davam enfoque a esta pesquisa, sendo que a análise por técnicas mais sensíveis como a espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP) foram pouco relatadas. Existem vários estudos relevantes sobre a capacidade bioativa do fruto in natura ematurado, por meio da identificação e caracterização dos compostos pelas técnicas citadas, porém há poucos estudos envolvendo produtos processados ou suplementos alimentares derivados do camu-camu, sendo este desenvolvimento um possível foco para estudos futuros, principalmente devido a marco regulatório para suplementos alimentares

**5 CAPÍTULO 2:** Avaliação de compostos fenólicos e vitamina C em suplementos alimentares à base de camu-camu por HPLC-MS/MS. Artigo redigido conforme normas da Revista International Journal of Development Issues (Qualis A4).

## **AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E VITAMINA C EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE CAMU-CAMU POR HPLC-MS/MS**

PERCIO, Juliana Andres Machado<sup>1</sup>; PERCIO, Maycon Fernando<sup>2</sup>; VASCONCELOS, Helder Lopes<sup>2</sup>; MANFIO, Josélia Larger<sup>3</sup>.

### **RESUMO**

Camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto rico em compostos bioativos originário da Amazônia e pertencente à família das Mytaceas. A alta quantidade de vitamina C e compostos fenólicos é amplamente relatada no fruto, porém ao paladar é considerado azedo, dificultando o seu consumo *in natura*. Neste contexto, torna-se interessante a utilização do fruto para fabricação de suplementos alimentares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de suplementos alimentares à base de camu-camu por meio do desenvolvimento e validação de um método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS). Para tal, vitamina C, ácido gálico e miricetina foram os nutrientes marcadores estudados. O método foi desenvolvido e validado conforme normas regulatórias vigentes. Foram avaliadas 5 amostras, preparadas através de extrações com metanol acidificado (10% v/v), utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 1% (v/v) em sistema gradiente, coluna cromatográfica C18 (250mm x 4,6mm x 3,5µm) em cromatógrafo com detecção MS/MS sequencial, através da ionização *eletrospray* (ESI) em modo negativo, utilizando MRM. O método desenvolvido foi preciso, exato e linear ( $R > 0,99$ ) para todos os analitos avaliados. Foi possível quantificar os três compostos sem interferência da matriz. Dos cinco produtos analisados, quatro apresentaram resultados expressivos de vitamina C (7,99; 6,15; 2,10 e 11,92 g/100g), assim como dos compostos ácido gálico e miricetina. O método desenvolvido, demonstrou ser capaz de identificar e quantificar compostos em matrizes complexas, além de muito sensível para avaliação dos compostos bioativos no camu-camu.

**Palavras-chave:** *Myrciaria dubia*; espectrometria de massas, compostos bioativos.

1. Farmacêutica Mestranda de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE – e-mail: [julianapercio@gmail.com](mailto:julianapercio@gmail.com)
2. Mestre em Engenharia Química pela Universidade do Oeste do Paraná – Unioeste – e-mail: [mpercio@gmail.com](mailto:mpercio@gmail.com)
3. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, professor da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE, e-mail: [helder.vasconcelos@unioeste.br](mailto:helder.vasconcelos@unioeste.br)
4. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo, e-mail: [manfiojoselia@bol.com.br](mailto:manfiojoselia@bol.com.br)

**EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND VITAMIN C IN CAMU-CAMU  
BASED DIETARY SUPPLEMENTS BY HPLC-MS / MS**

**ABSTRACT**

Camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a fruit rich in bioactive compounds originating from the Amazon and belonging to the Mytacea family. The high amount of vitamin C and phenolic compounds is widely reported in the fruit, but on the palate it is considered sour, making it difficult to consume in natura. In this context, it is interesting to use the fruit for the manufacture of dietary supplements. The objective of this work was to evaluate the quality of camu-camu based food supplements through the development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (HPLC-MS/MS). For this purpose, vitamin C, gallic acid and myricetin were the marker nutrients studied. The method was developed and validated according to current regulatory standards. Five samples were evaluated, prepared by extractions with acidified methanol (10% v/v), using as mobile phase a mixture of acetonitrile and 1% formic acid (v/v) in a gradient system, chromatographic column C18 (250mm x 4, 6mm x 3.5 $\mu$ m) in a chromatograph with sequential MS/MS detection, through electrospray ionization (ESI) in negative mode, using MRM. The method developed was precise, accuracy and linear ( $R>0.99$ ) for all analytes evaluated. It was possible to quantify the three compounds without matrix interference. Of the five products analyzed, four showed expressive results for vitamin C (7.99; 6.15; 2.10 and 11.92 g/100g), as well as the compounds gallic acid and myricetin. The developed method proved to be able to identify and quantify compounds in complex matrices, in addition to being very sensitive for the evaluation of bioactive compounds in camu-camu.

**Keywords:** *Myrciaria dubia*; mass spectrometry, bioactive compounds.

## 1 INTRODUÇÃO

Substâncias bioativas que trazem benefícios a saúde estão em ascensão no consumo pela população para melhoria da qualidade de vida. Essas substâncias são nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica no organismo (Percio *et al.*, 2021). Normalmente são encontradas nos alimentos e são compostas por vitaminas ou polifenóis, ou podem ser consumidas em formas farmacêuticas através de suplementos alimentares. A suplementação alimentar é uma forma fácil de administrar os nutrientes desejados na nutrição diária, sendo para reposição de algum composto deficiente ou como suplementação a alimentação.

A regulação da suplementação alimentar é um desafio devido não haver um consenso global de como categorizar esses produtos (Dwyer *et al.*, 2018). No Brasil, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) lançou em 2018 o Marco Regulatório para Suplementos Alimentares para garantir a população produtos seguros e de qualidade, definindo regras mais adequadas, limites mínimos e máximos para substâncias, além de alegações com comprovação científica (Anvisa, 2019). Essa normatização dos suplementos alimentares faz com que sejam necessários mais estudos e desenvolvimento de metodologias para a avaliação dos produtos, o que também é um desafio devido às matrizes complexas em certos tipos de suplementos alimentares.

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um fruto amazônico com grande potencial antioxidante, alta quantidade de vitamina C e compostos fenólicos (Akter *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2010; Fracassetti *et al.*, 2013). É considerado um super fruto devido ao seu perfil fitoquímico único (Bataglion *et al.*, 2015) e vem sendo amplamente estudado para a caracterização desses compostos e avaliação do impacto na administração de seu extrato em doenças associadas a desordens imunometabólicas associadas, como a obesidade (Anhê *et al.*, 2019), o diabetes tipo 2 e hipertensão (Fujita *et al.*, 2017).

Dentre as classes de compostos fenólicos, os que mais se destacam como fontes naturais de antioxidantes são os flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e tocoferóis. Estes são metabólitos secundários essenciais para a sobrevivência da planta, pois atuam em mecanismos de defesa da mesma (Gonçalves, 2008; Martins *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2010; Wink, 2016; Schafranski, 2019).

Diversos estudos realizam a caracterização da fruta contendo diversas classes de compostos fenólicos, sendo identificados normalmente mais de 30 compostos diferentes (Fracassetti *et al.*, 2013; Chirinos *et al.*, 2010), dentre os quais destacamos

como relevante o ácido gálico e a miricetina devido às propriedades antioxidantes e disponibilidade de padrões de alta pureza e a vitamina C, sendo o composto em maior quantidade no camu-camu e utilizado como apelo para a comercialização.

O ácido gálico é um dos principais representantes da classe dos ácidos fenólicos, ocorrendo normalmente na forma de taninos, o qual é responsável pelo sabor adstringente nas frutas (Angelo and Jorge, 2007; King and Young, 1999), tendo sido previamente estudado no camu-camu nas formas de fruta fresca e fruto processado (Chirinos *et al.*, 2010; Fracassetti *et al.*, 2013). Apresenta alta capacidade antioxidante, atividade antitumoral, cardioprotetora, hepatoprotetora e antiofídica (Martins, 2017).

A miricetina é um flavonoide natural que possui múltiplos grupamentos hidroxilas em diferentes posições que confere um forte poder antioxidante e anti-inflamatório. Segundo Li e Ding (2012), a miricetina foi utilizada no tratamento de diabetes melitus em estudos realizados *in vitro*, além de relatos de prevenir a hipertensão.

Em estudo recente, Liu e colaboradores (2020) relacionam o uso de miricetina e dihidromiricetina com a melhora da doença de Alzheimer, devido à inibição da resposta inflamatória no sistema nervoso central, formação de quelatos com íons metálicos e inibição do estresse oxidativo. O estudo ainda propõe que esses compostos poderiam ser utilizados no desenvolvimento de produtos ou alimentos com a capacidade de prevenir e melhorar a doença de Alzheimer.

A vitamina C, composto mais expressivo no camu-camu, não é sintetizada pelo nosso organismo e é envolvida em inúmeras funções bioquímicas, como a neutralização de radicais livres, síntese e proteção de colágeno, absorção de ferro gastrointestinal, entre outros (Baenas *et al.*, 2019; Dasgupta and Klein, 2014). Após o Marco Regulatório de 2018, a Instrução Normativa IN 28/2018 traz as quantidades mínimas e máximas autorizadas para o uso em suplementos alimentares na recomendação diária de consumo por grupo populacional, além de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados (Brasil, 2018). Em contrapartida, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) deixou de ser o fator de diferenciação entre suplementos vitamínicos e/ou minerais e medicamentos específicos (Dal Molin *et al.*, 2019; Brasil, 1998; Brasil, 2016). A instrução normativa IN 28/2018 reporta valores de 13,5 a 1.916,02 mg como quantidades mínima e máxima, respectivamente, permitidas para ácido ascórbico para pessoas maiores de 19 anos (Brasil, 2018).

Considerando a mudança regulatória brasileira, a avaliação da estabilidade e quantidades de nutrientes nos suplementos alimentares é fundamental para a



manutenção da qualidade do produto. A pesquisa de vitamina C é amplamente descrita com técnicas tradicionais (titulação), espectrofotometria e cromatografia líquida. Recentemente o uso da espectrometria de massas tem sido reportado em estudos para a quantificação do ácido ascórbico (AA). O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar uma metodologia para quantificação de compostos fenólicos (miricetina e ácido gálico) e vitamina C no mesmo sistema de detecção, através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (sequencial).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### *Padrões, reagentes e equipamentos:*

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida de sistema ultrapurificador Evoqua (Günzburg, Alemanha). Os equipamentos utilizados foram: centrífuga Eppendorf (Hamburg, Alemanha), agitador de microtubos IKA (Breisgau, Alemanha), ultrassom Quimis (Diadema, Brasil). Ácido ascórbico, myricetin e ácido gálico foram obtidos da Merck Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha), acetonitrila Biograde (Anápolis, Brasil), metanol Supelco (Darmstadt, Alemanha), ácido fórmico Neon (Suzano, Brasil). Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Waters, EUA), espectrômetro de Massas Quattro Micro (MS/MS Waters, EUA).

### *Amostras:*

Para o desenvolvimento e aplicação do método foram adquiridas 5 marcas de amostras comerciais disponíveis em sites na internet de suplementos alimentares, onde os ingredientes descritos eram somente camu-camu em pó.

### *Extração dos compostos ativos:*

A extração dos compostos ativos de interesse das amostras de suplemento de camu-camu foi realizada pesando-se 100 mg de cada amostra, adicionando-se 1,5 ml do solvente de extração (metanol acidificado 10%) e agitando-se por 2 minutos em agitador de microtubos, e por mais 10 minutos em ultrassom. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, diluiu-se 150 µL do sobrenadante em 850 µL de diluente (água: ácido fórmico e metanol, 80:10:10), sendo filtrado em membrana de PVDF 0,45 µm. As amostras foram preparadas protegidas

da luz. A diluição foi definida com base na relação das áreas obtidas com a amostra e a curva de calibração estudada. A proporção do diluente foi testada a fim de obter o melhor perfil cromatográfico para avaliação dos compostos estudados.

#### *Condições CLAE-ESI/MS-MS:*

Ácido ascórbico (AA), Ácido Gálico (AG) e Miricetina (MI) foram quantificados utilizando-se cromatógrafo líquido Alliance Waters acoplado a triplo quádruplo sequencial (Quattro Micro, Waters), operando pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM) e ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo (ES-), coluna Eclipse XDB-C18 Agilent 5  $\mu\text{m}$  x 4.6 x 250 mm (P/N 990967-902) e a fase móvel foi a combinação do sistema binário (solvente A: 1% ácido fórmico e solvente B: 100% acetonitrila) através do gradiente de 35 minutos, começando com 99% A no tempo 0 min, 95% A em 10 min, 80% A em 20 min, 5% A em 24 min, 99% A em 26 min e 99%. O fluxo e volume de injeção foram de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e 5  $\mu\text{L}$ , respectivamente, com temperatura do forno de 40°C. As condições otimizadas para os parâmetros de MS foram: fluxo do gás 650 L/h, nebulizador 4,0 x 10<sup>-3</sup> mbar, voltagem do capilar 4,00 Kv, voltagem do cone 25V, gás de colisão argônio e temperatura de dessolvatação de 400°C.

#### *Parâmetros de verificação do método analítico:*

O método foi avaliado frente a parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e efeito de matriz em concordância com os guias internacionais Harmonised Tripartite Guideline (ICH) e *Guidance for Bioanalytical Method Validation* (FDA) (ICH, 2005; FDA, 2018); a robustez foi realizada previamente à validação do método, na etapa de otimização.

A sensibilidade do método analítico foi definida pela menor concentração mensurada dos analitos, com precisão e exatidão aceitáveis dentro de uma faixa linear aplicável. A avaliação do limite de quantificação (LQ) foi estabelecida através da relação sinal/ruído (S/R) no nível LQ (10/1).

A linearidade é a habilidade de um método analítico provar que a resposta é diretamente proporcional a concentração do analítico (Baenas *et al.*, 2019). O estudo foi realizado em triplicata, em 6 níveis para os três analitos pesquisados, nas faixas de 300 a 1800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para AA, 0,75 a 4,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para AG e 0,30 a 1,80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MI, utilizando-se padrão de alta pureza e qualidade de AA, AG e MI, respectivamente. As soluções estoques foram pesadas separadamente e diluídas em

metanol acidificado. Após, pipetou-se as quantidades necessárias para cada ponto da curva de cada padrão para o mesmo balão e completou-se o volume com diluente (água: ácido fórmico e metanol, 80:10:10). O parâmetro foi avaliado com base na equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, avaliando-se o coeficiente de correlação que deve ser maior ou igual a 0,990. A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação dos padrões AA, AG e MI adicionados na matriz, onde as amostras foram preparadas em triplicata, nas concentrações de 300, 1200 e 1800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para AA; 0,75, 3,00 e 4,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para AG e 0,3, 1,20 e 1,80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MI. Foi calculado o desvio-padrão relativo (DPR) para cada concentração. O percentual de recuperação para o método foi de 90 a 110%. A precisão foi avaliada com base na exatidão para as amostras fortificadas, onde foi calculado o desvio-padrão relativo (DPR), sendo que os valores inferiores a 5% atendem ao critério de repetibilidade.

O efeito de matriz é a influência de outros componentes da amostra na quantificação dos compostos no método analítico (Baenas *et al.*, 2019). Este parâmetro foi determinado adicionando-se na amostra quantidades conhecidas de padrão (concentrações da curva de calibração). O efeito foi avaliado pelo paralelismo (inclinação) das curvas de calibração em solução e matrizada.

Por fim, foram avaliadas no método analítico as amostras comerciais de suplementos alimentares à base de camu-camu em pó.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação do método analítico foi realizada de acordo com os Guias Harmonised Tripartite Guideline (ICH) e *Guidance for Bioanalytical Method Validation* (FDA). Iniciou-se o desenvolvimento analítico com base nos trabalhos de Fracassetti *et al.* (2013), com tempo de corrida de 60 minutos e Gouvêa *et al.* (2012) onde a extração da amostra era realizada utilizando o rotaevaporador.

A primeira etapa realizada foi a otimização do método analítico a fim de obter o melhor sinal analítico para os compostos estudados. Após testes de extração, o preparo da amostra foi adaptado de Brito *et al.* (2007) onde foram extraídas com metanol acidificado 10% (v/v em ácido fórmico) em tubos de 2 mL (ependorf) e protegidas da luz. Foi realizado teste de diluente entre metanol acidificado (10%), EDTA (edetato dissódico 2%) e metanol: ácido fórmico: água (10:10:80). Verificou-se que as amostras analisadas com metanol acidificado e EDTA 2% apresentaram

quebra do pico do ácido ascórbico, sendo necessário alterar a força do diluente, mudando-o para metanol: ácido fórmico: água (10:10:80).

Devido ao efeito matriz observado, foi necessária a diluição das amostras, minimizando-se assim este efeito. A corrida analítica foi otimizada para 35 minutos, de forma que fosse possível a separação entre os compostos e quantificação dos mesmos, sendo que inicialmente a corrida analítica era de 60 minutos.

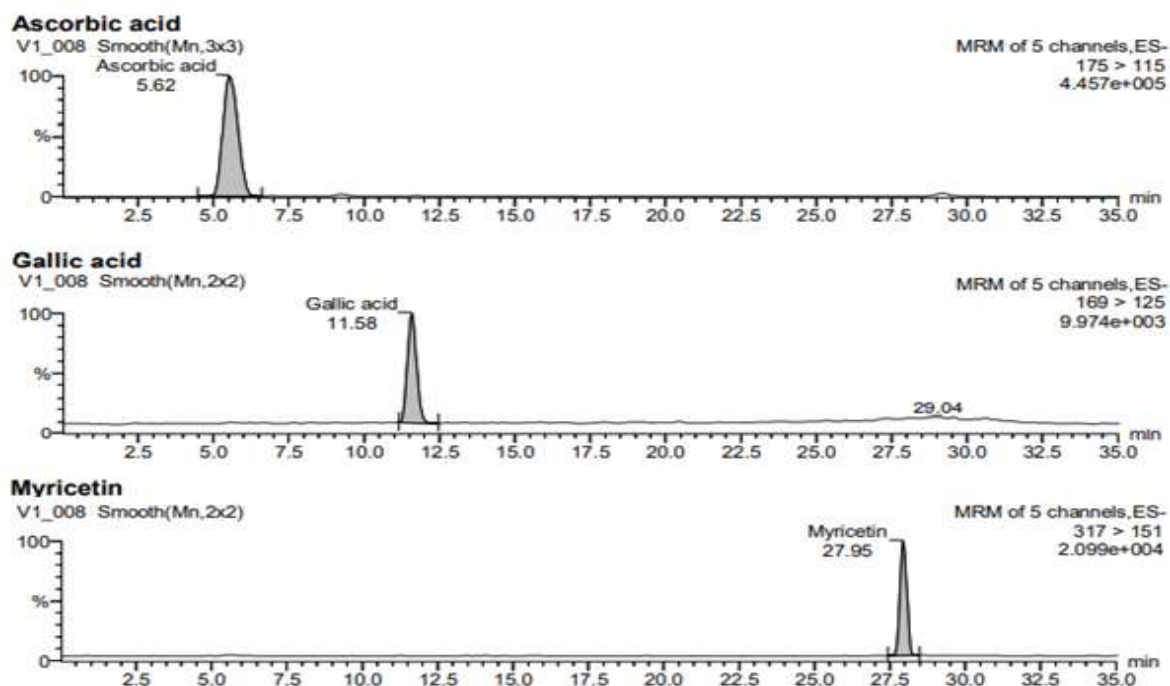
O método desenvolvido foi baseado em estudos realizados para a pesquisa de compostos fenólicos. O desafio era avaliar marcadores importantes do camu-camu em um único método analítico, sendo que os marcadores escolhidos foram o AA, a mais importante vitamina hidrossolúvel para a saúde e encontrada no fruto em quantidades expressivas (Baenas *et al.*, 2019; Fracassetti *et al.*, 2013; Chirinos *et al.*, 2010) e os compostos fenólicos AG e MI, os quais possuem um grande número de hidroxilas que por sua vez podem estar associadas a sua alta atividade antioxidante encontrada (Fracassetti *et al.*, 2013).

#### *Transições MRM:*

Os espectros de massas obtidos após otimização demonstram o íon precursor e o fragmento mais abundante detectados no segundo estágio da espectrometria de massas. O eletrospray foi realizado em modo MRM, no qual o quádruplo 1 foi fixado com os íons precursores; no quádruplo 2 foi utilizada a energia de colisão para induzir a fragmentação e no quádruplo 3 foram selecionados os íons produtos. Ambas as transições (íon precursor e íon produto) foram selecionadas para quantificação de cada composto estudado. Segundo Szultka *et al.* (2013), o modelo MRM é recomendado para a quantificação, uma vez que geralmente atinge a melhor especificidade e S/N para um determinado analito.

Devido à complexidade da amostra, avaliou-se a seletividade do método frente aos possíveis compostos interferentes que poderiam eluir com tempos de retenção próximos ao dos analitos de interesse, como pode ser observado na Figura 11. Não foram verificados interferentes que prejudicassem a quantificação dos compostos. Obteve-se ainda uma boa separação cromatográfica entre os picos observados com tempos de retenção de 5,62 minutos para AA, 11,58 minutos para AG e 27,95 minutos para a MI.

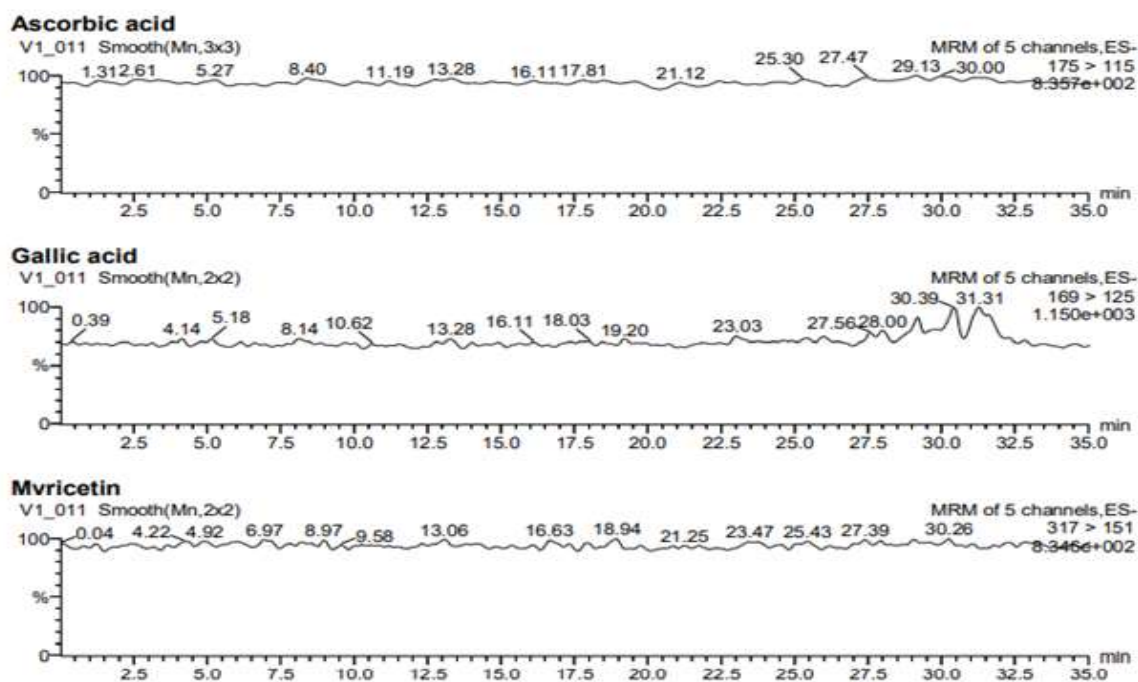
Figura 11: Cromatogramas da amostra com os compostos AA, AG e MI.



Fonte: Autoria Própria.

Testou-se ainda o efeito residual do método injetando-se uma amostra diluente logo após uma amostra de maior concentração, não sendo observado sinal cromatográfico na solução diluente avaliada (Figura 12).

Figura 12: Cromatograma do diluente no efeito residual.



Fonte: Autoria Própria.

As energias de colisão, transições e tempos de retenção para cada composto analisado estão demonstrados na Tabela I, os quais condizem exatamente com os obtidos pelos padrões de altas pureza utilizados, conforme demonstrado no espectro de massas da amostra.

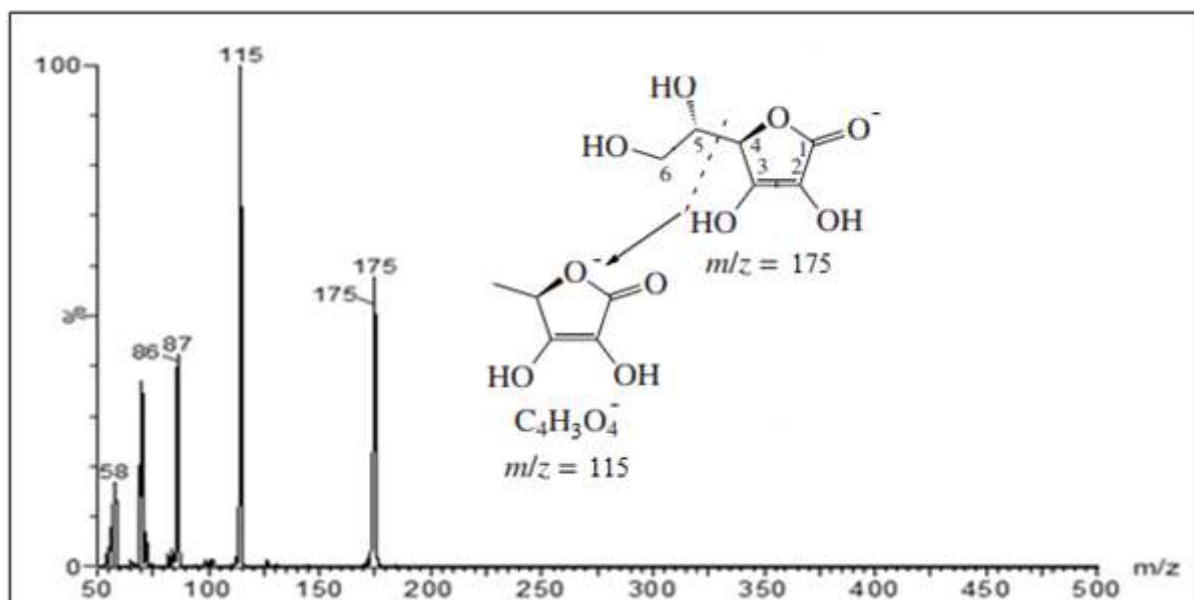
Tabela I: Transições preferenciais para quantificação de AA, AG e MI.

Composto	Tempo de retenção (min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS Fragmentos	Transição de quantificação (m/z)	Energia de colisão
AA	5,62	175	115, 87	175 > 115	12
AG	11,58	169	125	169 > 125	15
MI	27,95	317	271, 179, 151, 137	317 > 151	25

Fonte: Autoria Própria

O íon precursor para a vitamina C é m/z 175, onde o íon molecular não protonado [M-H]<sup>-</sup> foi muito bem monitorado no cromatogramas de MS em ESI modo negativo, o qual apresenta melhor resposta. O íon produto m/z 115 é obtido após a dissociação colisional (Szultka *et al.*, 2013). O fragmento m/z 115 é o que apresenta maior sinal analítico, sendo utilizado para a quantificação do AA (Figura 13).

Figura 13: Espectro de massas MRM dos íons produtos do AA e estrutura correspondente (175>115).

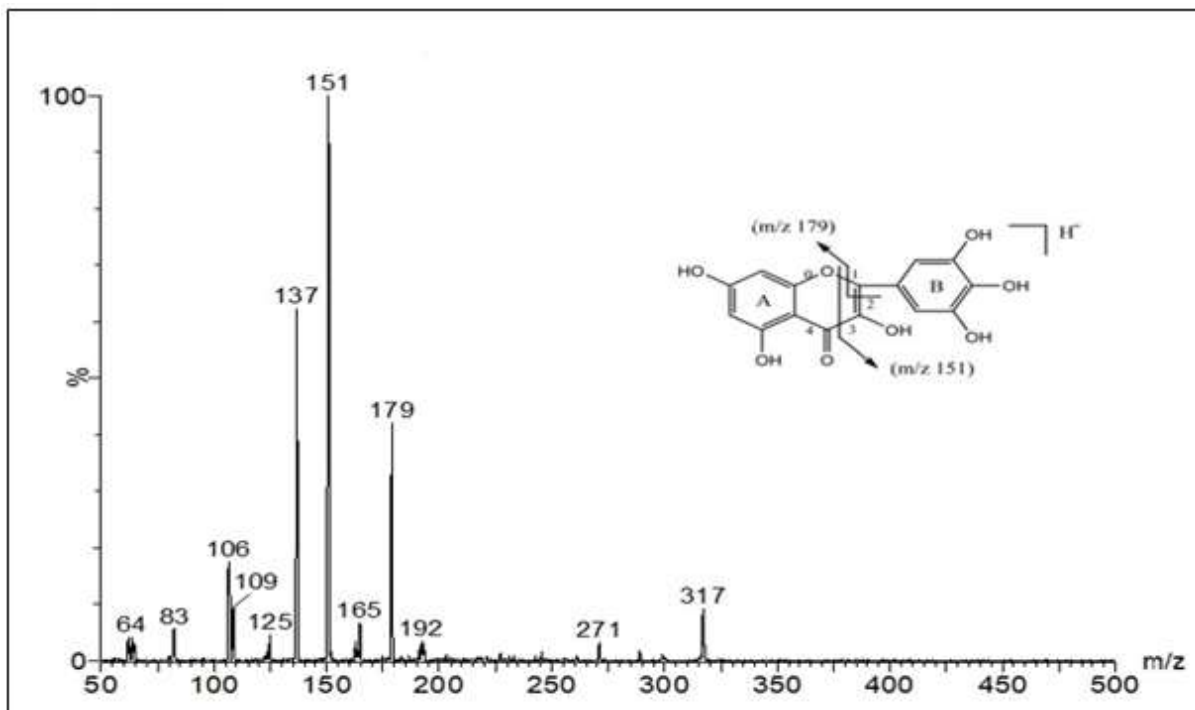


Fonte: Autoria Própria.

A MI apresenta m/z 317 e seu íon produto com maior sinal é m/z 151, seguido de m/z 137, 179 e 271 (Figura 14). Estes valores corroboram os resultados de Latiff *et al.* (2018) que obtiveram os mesmos quatro íons produtos, que se referem a

fragmentação da estrutura da miricetina aglicona, com as seguintes perdas de massas 92 Da, 28 Da ( $2\text{CH}_2$ ) e 14 Da ( $\text{CH}_2$ ), referindo-se à formação dos picos em  $m/z$  179, 151 e 137, respectivamente. A presença de dois picos de  $m/z$  179 e 151 foram atribuídos como íons mais característicos da miricetina (Saldanha *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2012).

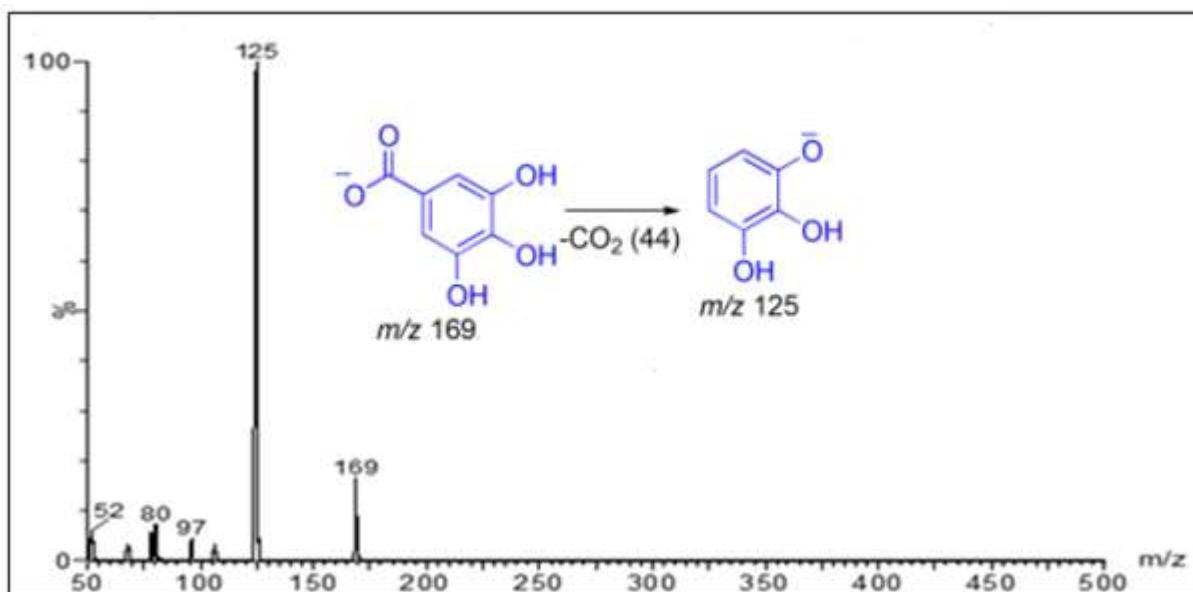
Figura 14: Espectro de massas MRM dos íons produtos da MI e estrutura correspondente ( $317 > 151$ ).



Fonte: Autoria Própria.

O AG apresenta  $m/z$  169 e seu íon produto de maior sinal analítico é  $m/z$  125, utilizado para quantificação do composto nas amostras de suplementos alimentares, os quais corroboram com os valores encontrados no padrão do produto (Figura 15). O fragmento do íon desse composto  $m/z$  125 ocorre através da descarboxilação das porções do ácido gálico (Singh *et al.*, 2015).

Figura 15: Espectro de massas MRM dos íons produtos do AG e estrutura correspondente (169 > 125).



Fonte: Autoria Própria

#### *Linearidade:*

A linearidade foi definida utilizando a resposta do pico cromatográfico do íon e a concentração do íon relevante, no qual as curvas de calibração foram construídas plotando área versus concentração. A curva de padrões foi preparada no intervalo de 300 a 1800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para AA, 0,75 a 4,50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para AG e 0,30 a 1,80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para MI; a equação da regressão linear foi do tipo  $y = ax + b$  e o coeficiente de correlação linear (R) foi maior que 0,99 para todos os compostos avaliados (Tabela II).

Tabela II: Dados de calibração, linearidade e limite de quantificação (LQ) para ácido ascórbico (AA), ácido gálico (AG) e miricetina (MI).

Parâmetros	AA	AG	MI
Intervalo de concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	300 – 1800	0,75 – 4,50	0,30 – 1,80
Curva de calibração	$y=171,51x+17510$	$y=775,37x+223,29$	$y=1708x-46,565$
Coefficiente de correlação linear (R)	0,9996	0,9991	0,9982
LQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	300	0,75	0,30

Fonte: Autoria Própria

Os resultados demonstram que a resposta do método é linear e proporcional a resposta do analito.

#### *Precisão e exatidão:*

A precisão e exatidão do método foram avaliadas através do preparo da amostra conforme método analítico, acrescidas de padrão nas concentrações baixa,



média e alta, conforme curva de calibração. Os resultados foram expressos em relação ao desvio padrão relativo (DPR%) e recuperação (%) frente a amostra controle, ambos calculados através da equação da reta, para todos os compostos estudados, AA, AG e MI (Tabela III).

Tabela III: Recuperação (%) e Desvio padrão relativo (%) para Precisão e Exatidão (repetibilidade e precisão intermediária).

Analito	Conc. $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Repetibilidade (%)		Precisão Intermediária (%)		Rep/Inter
		Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	DPR (%)
Ácido Ascórbico	300	99,7	1,2	100,5	2,1	1,6
	1200	99,7	1,2	100,0	0,8	0,9
	1800	99,0	1,4	100,8	1,0	1,4
Ácido Gálico	0,75	99,6	2,0	100,7	0,7	1,5
	3,00	100,9	1,9	98,8	0,5	1,7
	4,50	100,4	0,9	100,3	1,1	0,9
Miricetina	0,30	100,1	1,5	100,6	0,7	1,1
	1,20	99,8	2,2	101,3	0,9	1,7
	1,80	99,7	0,6	101,2	0,6	1,0

Fonte: Autoria Própria

Os desvios padrões relativos entre a repetibilidade e a precisão intermediária variaram entre 0,9 e 1,6% para AA, 0,9 a 1,7% para AG e 1,0 a 1,7% para MI, demonstrando que o método é preciso e exato (DPR menor que 10,0%); as recuperações obtidas situaram-se entre 98,0 e 102,0%, de acordo com os intervalos aceitáveis pelos guias citados.

#### *Quantificação dos compostos em Suplementos Alimentares:*

Segundo Dal Molin *et al.* (2019), até 2018 no Brasil não havia definição legal para suplementos alimentares, onde a grande parte dos produtos usados como suplementos alimentares era classificada em categorias regulatórias diferentes.

A avaliação de segurança e eficácia desses produtos está sob demanda crescente devido as novas diretrizes regulatórias definidas pela Anvisa, a partir do lançamento do Marcos Regulatórios para Suplementos Alimentares. As novas diretrizes foram publicadas pela Anvisa na RDC nº 243/218, que define os requisitos sanitários dos suplementos alimentares (Brasil, 2018; Dal Molin *et al.*, 2019). O novo marco normativo contempla definições, regras de composição, qualidade, segurança, rotulagem e requisitos para atualização das listas de constituintes, com limites de uso, alegações e rotulagem complementar (Anvisa, 2021).

Não foram relatados estudos prévios para a quantificação de vitamina C ou compostos fenólicos em suplementos alimentares comerciais de camu-camu, o que

demonstra a relevância deste trabalho com o desenvolvimento e validação de metodologia analítica que pode ser aplicada a matrizes complexas para avaliação dos marcadores estudados.

Os resultados da vitamina C e compostos fenólicos caracterizados e quantificados de 5 produtos comerciais de diferentes marcas à base de camu-camu estão demonstrados na Tabela IV. Os pós adquiridos trazem o apelo do fruto ser um potente suplemento de vitamina C, o que se pode observar nos resultados obtidos visto que o composto é o mais abundante nas amostras analisadas, com exceção da amostra 5 que não foi possível detectar vitamina C. Isso demonstra a importância do estudo de estabilidade nos produtos de origem vegetal e sintética utilizados na suplementação, visto que AA é um composto que degrada facilmente em presença de luz e oxigênio.

Tabela IV: Quantificação de AA, AG e MI em suplementos alimentares de camu-camu.

Amostra	Vitamina C (g/100g)	Ácido Gálico (µg/100mg)	Miricetina (µg/100mg)
1	7,99	12,07	1,76
2	6,15	9,39	1,90
3	2,10	14,47	6,76
4	11,92	15,50	9,83
5	nd	1,14	1,40

Fonte: Autoria Própria.

Os resultados obtidos foram comparados com valores anteriormente reportados por diferentes autores em estudos que avaliaram as quantidades desses compostos, no fruto fresco ou processado, mas não em produtos comerciais. Fracassetti *et al.* (2013) analisaram, por cromatografia líquida, o pó da polpa e a farinha da casca e sementes de camu-camu, e obtiveram resultados de 3,51 g/100g e 9,04 g/100g de vitamina C, respectivamente. Estes valores foram inferiores aos obtidos nas amostras comerciais. Na avaliação dos compostos fenólicos por MS/MS para miricetina aglicona, os autores obtiveram o maior valor de 0,98 mg/100g na avaliação do pó da polpa pó e não detectaram quantidades relevantes de ácido gálico na amostra. Os resultados para MI nos suplementos alimentares avaliados demonstraram-se inferiores aos apresentados por Fracassetti *et al.* (2013), e superiores aos resultados obtidos para o AG.

Chirinos *et al.* (2010) avaliaram AA, AG e MI também por cromatografia líquida (UV-DAD) em diferentes estágios de maturação do camu-camu e obtiveram o maior teor de AA no fruto verde (2,28 g/100g). Para MI e AG, o autor não reporta valores, no

entanto comenta que ambos foram detectados, sendo que a MI foi observada somente no fruto maduro.

A variação entre os resultados apresentados para os compostos pode ser devido à diferença no processamento realizado para a fruta, como por exemplo, o tratamento térmico durante a secagem do fruto, reportado em estudos, assim como a secagem a frio indicada em rótulos de algumas das amostras comerciais analisadas. Variações no conteúdo dos compostos também podem ser oriundas de diferentes estágios de maturação da fruta no período da colheita (Fracassetti *et al.*, 2013, Marques *et al.*, 2007; Chirinos *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos do camu-camu foram avaliados na fruta por Bataglione e colaboradores (2015) por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas, onde foram quantificados 7,39 e 100,02 µg/g de AG e MI, respectivamente. O camu-camu se mostra uma importante fonte antioxidante nutricional, contendo vitamina C e compostos fenólicos (Akter *et al.* 2011; Chirinos *et al.* 2010). A ingestão diária de miricetina através dos alimentos é em torno de 0,98 – 1,1 mg, o que é normalmente mais alta que outros flavonóis (Lin *et al.*, 2006; Li and Ding, 2012). Estudos de caracterização dos compostos bioativos do fruto do camu-camu relatam quantidades de miricetina de 74,3 mg/100 g no fruto seco (Anhê *et al.*, 2019).

Avaliando os resultados encontrados neste estudo, pode-se observar que as quantidades de compostos obtidas nas análises de suplementos alimentares são expressivas se comparadas com os valores reportados para a fruta fresca, principalmente para a vitamina C e ácido gálico. Isso provavelmente é devido à qualidade do fruto utilizado na produção dos pós para os produtos acabados, assim como a forma de obtenção do pó, além da armazenagem dos mesmos. A rotulagem das amostras adquiridas na maioria indica que o processamento do pó é realizado a frio, o que se pressupõe que a fruta passa por um processo de liofilização, contribuindo para a manutenção e até mesmo ocorrência da concentração dos compostos após o processamento da fruta, devido à retirada da água.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através das diretrizes regulatórias para suplementos alimentares, define as quantidades mínimas e máximas de nutrientes, assim como aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados e que podem ser utilizadas em suplementos alimentares. No entanto, os valores de ingestão diária recomendada (IDR) para produtos à base de vitaminas, minerais e aminoácidos deixaram de ser o fator de diferenciação entre os suplementos vitamínicos e medicamentos específicos, ou seja, serão considerados medicamentos

específicos somente produtos à base de vitaminas, minerais e aminoácidos isolados ou associados entre si, para uso oral, com indicações e alegações diferentes das utilizadas nos suplementos alimentares (BRASIL, 1998; 2016; 2018).

Os rótulos das amostras analisadas na maioria não traziam informações sobre a quantidade de vitamina C em miligramas (marcador utilizado como apelo para uso), o que impossibilita uma correlação dos resultados obtidos com quantidades declaradas do composto. Observa-se então que com o marco regulatório haverá necessidade de mudanças em rotulagem de produtos e avaliação analítica dos produtos. Essas mudanças necessárias dos produtos nomeados como suplementos alimentares, disponíveis no mercado, tem o prazo de cinco anos para adequações (Dal Molin *et al.*, 2019). Portanto, os produtos analisados não estão condizentes com a rotulagem estabelecida pela Anvisa atualmente, mas quatro das cinco amostras analisadas apresentaram quantidades de AA conforme informado no rótulo, como sendo um produto fonte Vitamina C.

## **4 CONCLUSÃO**

O método analítico desenvolvido mostrou-se linear, preciso e exato para a quantificação de AA, AG e MI em amostras de suplementos alimentares à base de camu-camu, sendo possível a quantificação de diferentes classes de compostos na mesma corrida analítica, além disso pode ser aplicado com sucesso na quantificação dos compostos em amostras comerciais.

Quatro das cinco amostras de suplementos alimentares avaliadas apresentaram quantidades expressivas de ácido ascórbico, corroborando com os estudos já realizados na fruta fresca, assim como quantidades de compostos fenólicos, como os marcadores escolhidos ácido gálico e miricetina.

O camu-camu se mostra uma fonte rica de antioxidantes e possível de ser comercializado na forma de suplementação, de forma a manter compostos bioativos importantes para o organismo humano, assim podendo ser utilizado na prevenção de doenças.

O Marco Regulatório para suplementos alimentares trará a necessidade de adequações de rotulagem nos produtos avaliados, e demais produtos do mercado, assim como garantir a qualidade dos mesmos para a administração na população em geral.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimento a toda a infraestrutura de instrumentação, materiais e insumos cedida pelo Parque Científico e Tecnológico de Biociências (Biopark), Toledo PR.

## **6 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO**

O presente estudo demonstrou a importância do fruto camu-camu para o consumo devido à presença de compostos bioativos que trazem benefícios à saúde humana, mesmo com a dificuldade de palatabilidade.

O artigo de revisão bibliográfica orientou a decisão da utilização da espectrometria de massas como técnica analítica mais sensível para a quantificação de compostos em matrizes complexas.

O método cromatográfico desenvolvido se mostrou preciso, exato e linear para o fim que se destina, sendo possível a quantificação dos compostos ácido ascórbico, ácido gálico e miricetina em suplementos alimentares à base de camu-camu.

O marco regulatório publicado pela Anvisa para a regulamentação dos suplementos alimentares define regras que garantem a qualidade dos produtos comercializados, mas provavelmente haverá necessidade de adequações nos produtos encontrados no mercado Brasileiro.

Os suplementos alimentares analisados apresentaram quantidades relevantes de vitamina C e compostos fenólicos da classe dos flavonoides e ácidos fenólicos, o que demonstra que, dependendo do processo de obtenção do pó de camu-camu, é possível conservar os componentes de forma a trazer benefícios à saúde.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A avaliação de suplementos alimentares é fundamental, garantindo assim a qualidade do produto para o consumidor. Não há estudos prévios sobre a quantificação de compostos bioativos do camu-camu em suplementos alimentares, e os estudos em fruta e subprodutos não comerciais não contemplam a avaliação de vitamina C e compostos fenólicos no mesmo método analítico, o que enfatiza a relevância do trabalho.

O método desenvolvido demonstra-se efetivo na avaliação de matrizes complexas e a utilização do camu-camu como suplementação alimentar, a qual pode ser uma fonte rica de antioxidantes.

## 8 ANEXOS

### ANEXO 1 – Normas da Revista Científica: Thêma et Scientia – Qualis A4.

#### DIRETRIZES PARA AUTORES

Orientações Gerais

O artigo deve ser redigido em português;

Deverá possuir Título, Resumo e Palavras-chave em Português e em Língua Estrangeira;

Com no máximo de cinco autores, já contando o orientador;

#### 1 NORMAS GRÁFICAS PARA ARTIGO

Deve ser escrito no formato Word, digitado em papel A4 (tamanho 21 cm x 29,70 cm), com margem superior de 3 cm, esquerda, direita e inferior de 2 cm, paginados, parágrafo justificado com recuo de 1 cm na primeira linha, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento 1,5 em todo o corpo do artigo (o template já apresenta todas essas configurações);

O resumo, autoria, credenciais dos autores, citações diretas superiores a 3 (três) linhas, ilustrações e tabelas que devem obedecer às normas gráficas para citação da ABNT e serem formatados com espaço entre linhas simples e fonte 10 (o template já apresenta todas essas configurações).

#### 2 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

Título e subtítulo do trabalho: deve constar no topo da página, em letras maiúsculas, centralizado, fonte Times New Roman, tamanho 12 e em negrito. Após o título, deixar uma linha em branco seguido do restante do trabalho;

Nome dos autores: autor principal seguido de co-autores. Autor e co-autores devem obedecer a sequência, Sobrenome (todas maiúsculas) seguido dos pré-nomes (Minúsculo). Exemplo: SILVA, João de Abreu;

Credenciais dos autores: Qualificação do(s) autor(es) e e-mail para contato que deve ser incluído no rodapé da página;

Resumo: deve-se deixar uma linha em branco para iniciar seu conteúdo em único parágrafo. Elemento obrigatório, constituído de uma sequência de frases concisas e

objetivas e não de uma simples enumeração de tópicos, contendo, no mínimo 100 e, no máximo, 250 palavras;

Palavras-chave: Após o resumo, escrever o termo Palavras-chave em fonte 8, Times New Roman. Em seguida listar no mínimo 3 (três) e no máximo 5 (cinco) palavras-chave, separadas por ponto. Essas devem identificar a área do artigo e sintetizar sua temática;

Deve-se pular uma linha e fazer o mesmo para Título, Resumo e Palavras-Chave em Língua Estrangeira, todos com fonte Times New Roman 10.

### 3 TEXTO PRINCIPAL

O trabalho deve conter:

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 2 METODOLOGIA

#### 3 REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA

#### 4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

#### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

#### REFERÊNCIAS

### 4 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DA INTRODUÇÃO

A introdução do artigo deve conter elementos essenciais a uma plena compreensão do texto. Sugere-se que os autores iniciem o texto com uma breve CONTEXTUALIZAÇÃO do assunto e após apresentem o PROBLEMA que será investigado, os OBJETIVOS, bem como, a JUSTIFICATIVA. Ao final da introdução recomenda-se que seja realizada uma apresentação sucinta da estrutura geral do artigo de modo a permitir que o leitor compreenda como o assunto será abordado a partir de então.

Sendo o artigo um ensaio teórico, na introdução o autor deverá informar que se trata de um ensaio teórico/pesquisa bibliográfica.

### 5 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DO REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA

O referencial teórico ou revisão de literatura deveria contemplar: (a) eixos teóricos essenciais para elucidar o problema de pesquisa; (b) base conceitual a compreensão dos processos subjacentes à situação problema; (c) evolução do tema; (d) conceituação; e (e) revisão dos estudos empíricos relacionados ao tema investigado.



## 6 ORIENTAÇÕES SOBRE AS CITAÇÕES (gerais)

Transcrição literal do texto (citações diretas) de outro(s) autor(es) com até TRÊS (3) linhas deverão ser escritas normalmente dentro do texto, entre aspas, e com indicação da fonte em sistema Autor/Data.

Exemplo:

“O New Deal (Novo Ideal[1]) foi um programa econômico adotado por Franklin Delano Roosevelt, então presidente dos Estados Unidos, que visava basicamente combater os efeitos da Grande Depressão.” (MADUREIRA, 2011, p. 75)

Madureira (2011, p. 75) afirma que: “O New Deal (Novo Ideal) foi um programa econômico adotado por Franklin Delano Roosevelt, então presidente dos Estados Unidos, que visava basicamente combater os efeitos da Grande Depressão.”

Citações diretas longas, com mais de Três (3) linhas deverão ser digitadas em Fonte 8, espaçamento simples, sem aspas, separado do texto por um espaço simples e recuo de 4 cm.

Exemplo:

O contexto em que Keynes apresentou sua Teoria Geral é um período marcado pela descrença no Laissez-faire. Período este, logo após a crise de 29, que deixou arrasada a Economia Americana, e arrastou com ela, boa parte das economias de outros países. O modelo Neoclássico, que por muitos anos teve a sua teoria baseada na intervenção mínima do Estado na economia como dominante, entrou em decadência, por não conseguir explicar os novos acontecimentos da economia mundial, com base na lei de Say. (MADUREIRA, 2011, p. 73)

As citações indiretas (parafraseadas) aparecem em forma normal textual e sem aspas. A fonte de onde foi retirada a informação deverá ser indicada sem o número de página.

## 7 ILUSTRAÇÕES

De acordo com a ABNT NBR 14724:2011, qualquer que seja o tipo de ilustração, sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa (desenho, esquema, fluxograma, fotografia, gráfico, mapa, organograma, planta, quadro, retrato, figura, imagem, entre outros), seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos, travessão e do respectivo título. Após a ilustração, na parte inferior, indicar a fonte consultada (elemento obrigatório), mesmo que seja produção do próprio autor, legenda, notas e outras informações necessárias à sua compreensão (se houver). A ilustração deve ser citada no texto e inserida o mais próximo do trecho a que se refere.

## 8 FORMATAÇÃO DE TÍTULOS E SUBTÍTULOS DAS SEÇÕES

Devem ter numeração progressiva, conforme ABNT NBR6024:2012, e alinhamento à margem esquerda, sem utilizar ponto, hífen, travessão ou qualquer outro sinal após o indicativo da seção ou de seu título.

Exemplo de formatação das seções/títulos:

### 2 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1 SUBITEM DO REFERENCIAL TEÓRICO (SE HOUVER)

##### 2.1.1 Tópico do subitem (se houver)

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 SUBITEM DA METODOLOGIA (SE HOUVER)

##### 3.1.1 Tópico do subitem (se houver)

## 9 REFERÊNCIAS

Devem observar as regras da ABNT NBR 6023/2002. São apresentadas em ordem alfabética, espaço entrelinhas simples, alinhamento esquerdo e letra tamanho 10, separadas por uma linha em branco entre cada obra. Atenção: Listar somente as obras efetivamente citadas no artigo.

Regras Gerais: Exemplos

Artigos de Revista:

MADUREIRA, E. M. P. Da Depressão ao Welfare State: mudanças no conceito de desenvolvimento econômico. Revista *Thêma et Scientia*, vol 1, n. 1, p. 72-80. Jan/Jun, 2011.

Obra (livro):

HIRSCHMAN, A. O. *Estratégias do Desenvolvimento Econômico*. Rio de Janeiro: Fundo de Cultura, 1961.

Capítulos de Livros:

NORTH, D. C. Teoria da Localização e Crescimento Econômico. In SCHWARTZMAN, J. *Economia Regional: textos escolhidos*. Belo Horizonte: CEDEPLAR/CETREDE-MINTER, p. 291-313, 1977a. 480 p.

Legislação e Jurisprudência:

BRASIL. Constituição Federal. Brasília: Senado Federal, 1988. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm)>. Acesso em: 9 jun. 2007.

BRASIL. Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. In: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 set. 1981. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L6938.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6938.htm)>. Acesso em: 09 jun. 2007.

Atenção:

Quando a fonte for de internet é preciso indicar o endereço completo e a data de acesso (observar a pontuação correta, destacada no exemplo abaixo:

Disponível em: <<http://www.nomedosite.com.br/completo/23837u803439.htm>>  
Acesso em: 15 set.2010.

O mês é abreviado (somente as 03 primeiras letras)

BRASIL. Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. In: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 set. 1990. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8078.htm)> Acesso em: 9 jun. 2007.

BRASIL. Superior Tribunal de Justiça. Acórdão de decisão que negou provimento ao pedido de dano moral ambiental. Recurso Especial nº 598.281. Ministério Público do Estado de Minas Gerais e Município de Uberlândia. Relator: Ministro Luiz Fux. 02 de maio de 2006. Disponível em: <<http://www.mp.rs.gov.br/areas/ambiente/arquivos/jurcivdmc.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2007.

BRASIL. Superior Tribunal de Justiça. Súmula nº 37. Disponível em: <[http://www.stj.gov.br/SCON/sumulas/toc.jsp?tipo\\_visualizacao=RESUMO&livre=%40docn&&b=SUMU&p=true&t=&l=10&i=310](http://www.stj.gov.br/SCON/sumulas/toc.jsp?tipo_visualizacao=RESUMO&livre=%40docn&&b=SUMU&p=true&t=&l=10&i=310)>. Acesso em: 09 jun. 2007.

BRASIL. Tribunal de Justiça de São Paulo. Acórdão de decisão que negou provimento pedido de indeferir perícia ambiental, em razão de aspectos processuais. Agravo de instrumento nº 409.473-5/8-00. Ministério Público de São Paulo e José Joaquim Trindade. Relator: Desembargador Renato Nalini. 19 de outubro de 2006. Disponível em: [http://juris.tj.sp.gov.br/pg-pesquisa01PRODESP.asp?radio\\_pesquisa=0&num\\_processo=&dig\\_processo=&hie\\_processo=&num\\_registro=01133251&ResultStart=1&ResultCount=10&Processo=4094735800&Query=Processo+%3Cmatches%3E+4094735800&modo=simples&tipos=normal&TipoPesquisa=SQL](http://juris.tj.sp.gov.br/pg-pesquisa01PRODESP.asp?radio_pesquisa=0&num_processo=&dig_processo=&hie_processo=&num_registro=01133251&ResultStart=1&ResultCount=10&Processo=4094735800&Query=Processo+%3Cmatches%3E+4094735800&modo=simples&tipos=normal&TipoPesquisa=SQL)>. Acesso em: 10 mai. 2007.

### **Condições para submissão**

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte Times New Roman 12; as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

## **ANEXO 2 – Normas da Revista Científica: International Journal of Development Issues – Qualis A4.**

### **DIRETRIZES PARA AUTORES**

#### **Formato**

Os arquivos do artigo devem ser fornecidos no formato Microsoft Word.

Comprimento do artigo / contagem de palavras: Os artigos devem ter entre 3.000 e 8.000 palavras. Isso inclui todo o texto, por exemplo, o resumo estruturado, referências, todo o texto em tabelas e figuras e apêndices. É permitido até 280 palavras para cada figura ou tabela.

#### **Título do artigo**

O título deve ser conciso.

**Detalhes do autor:** Os nomes de todos os autores contribuintes devem ser adicionados à submissão do ScholarOne; liste-os na ordem em que deseja que sejam publicados. Cada autor contribuinte precisará de sua própria conta de autor do ScholarOne, da qual extrairemos os seguintes detalhes: Endereço de e-mail do autor (de preferência institucional).

Nome do autor. Iremos reproduzi-lo exatamente, portanto, quaisquer nomes do meio e / ou iniciais que eles queiram apresentar devem ser incluídos.

Afiliação do autor. Este deve ser o local onde os autores estavam quando a pesquisa para o artigo foi conduzida.

Em artigos com vários autores, é importante que TODOS os autores que fizeram uma contribuição significativa para o artigo sejam listados. Aqueles que forneceram apoio, mas não contribuíram com a pesquisa, devem ser apresentados em uma seção de agradecimentos. Você nunca deve incluir pessoas que não contribuíram para o artigo ou que não desejam ser associadas à pesquisa. Leia sobre nossa ética em pesquisa para autoria.

#### **Biografias e agradecimentos**

Se quiser incluir esses itens, salve-os em um documento separado do Microsoft Word e carregue o arquivo com o seu envio. Quando incluídos, uma breve biografia profissional de não mais de 100 palavras deve ser fornecida para cada autor nomeado.

### **Financiamento de pesquisa**

Seu artigo deve fazer referência a todas as fontes de financiamento de pesquisa externa na seção de agradecimentos. Você deve descrever a função do financiador ou patrocinador financeiro em todo o processo de pesquisa, desde a concepção do estudo até a submissão.

### **Resumo estruturado**

Todas as submissões devem incluir um resumo estruturado, seguindo o formato descrito a seguir.

Esses quatro subtítulos e as respectivas explicações devem sempre ser incluídos:

Propósito

Design / metodologia / abordagem

Achados

Originalidade

Os três subtítulos a seguir são opcionais e podem ser incluídos, se aplicável:

Limitações / implicações da pesquisa

Implicações práticas

Implicações sociais

O comprimento máximo de seu resumo deve ser de 250 palavras no total, incluindo palavras-chave e classificação do artigo (veja as seções abaixo).

### **Palavras-chave**

Sua submissão deve incluir até 12 palavras-chave adequadas e curtas que capturem os principais tópicos do artigo.

Observe que, embora sempre tentemos usar as palavras-chave que você sugeriu, a equipe editorial interna pode substituir algumas delas por termos correspondentes para garantir a consistência entre as publicações e melhorar a visibilidade do artigo.

## Classificação do artigo

Durante o processo de submissão, será solicitado a selecionar um tipo para o seu artigo; as opções estão listadas abaixo. Se não encontrar uma correspondência exata, escolha a que melhor se ajusta:

Artigo de Pesquisa

Papel do praticante

Também deverá selecionar uma categoria para o seu artigo. As opções para isso estão listadas abaixo. Se não encontrares uma correspondência exata, escolha a que melhor se ajusta:

Artigo de pesquisa. Relatórios sobre qualquer tipo de pesquisa realizada pelo (s) autor (es), incluindo:

A construção ou teste de um modelo ou estrutura

Pesquisa de ação

Teste de dados, pesquisa de mercado ou pesquisas

Pesquisa empírica, científica ou clínica

Artigos com enfoque prático

Ponto de vista. Abrange qualquer artigo cujo conteúdo dependa da opinião e interpretação do autor. Isso inclui peças jornalísticas e revistas.

Artigo técnico. Descreve e avalia produtos, processos ou serviços técnicos.

Artigo conceitual. Concentra-se no desenvolvimento de hipóteses e geralmente é discursivo. Abrange discussões filosóficas e estudos comparativos do trabalho e pensamento de outros autores.

Estudo de caso. Descreve intervenções ou experiências reais dentro das organizações. Pode ser subjetivo e geralmente não relata pesquisas. Também cobre a descrição de um caso legal ou um estudo de caso hipotético usado como um exercício de ensino.

Revisão da literatura. Essa categoria só deve ser usada se o objetivo principal do artigo for fazer anotações e / ou criticar a literatura de um determinado campo. Pode ser uma bibliografia seletiva que fornece conselhos sobre fontes de informação, ou o artigo pode ter como objetivo cobrir os principais contribuintes para o desenvolvimento de um tópico e explorar os diferentes pontos de vista.

Revisão geral. Fornece uma visão geral ou exame histórico de algum conceito, técnica ou fenômeno. Os artigos são provavelmente mais descritivos ou instrucionais (artigos de "como fazer") do que discursivos.

## **Títulos**

Os títulos devem ser concisos, com uma indicação clara da hierarquia exigida.

O formato preferido é que os títulos de primeiro nível estejam em negrito e os subtítulos subsequentes em itálico médio.

Notas / notas finais

Notas ou notas finais devem ser usadas apenas se absolutamente necessário. Devem ser identificados no texto por números consecutivos entre colchetes. Esses números devem ser listados e explicados no final do artigo.

## **Figuras**

Todas as figuras (gráficos, diagramas, desenhos, páginas da web / capturas de tela e imagens fotográficas) devem ser enviadas eletronicamente. Tanto arquivos em cores quanto em preto e branco são aceitos.

Existem alguns outros pontos importantes a serem observados:

Todas as figuras devem ser fornecidas na mais alta resolução / qualidade possível, com números e texto claramente legíveis.

Os formatos aceitáveis são .ai, .eps, .jpeg, .bmp e .tif.

Figuras eletrônicas criadas em outros aplicativos devem ser fornecidas em seus formatos originais e também devem ser copiadas e coladas em um documento MS Word em branco ou submetidas como um arquivo PDF.

Todas as figuras devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e ter legendas claras.

Todas as fotografias devem ser numeradas como Prancha 1, 2, 3, etc. e ter legendas claras.

## **Tabelas**

As tabelas devem ser digitadas e enviadas em arquivo separado no corpo do artigo.

A posição de cada tabela deve ser claramente rotulada no corpo principal do artigo com os rótulos correspondentes claramente mostrados no arquivo da tabela. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos (por exemplo, I, II, etc.).



Dê a cada tabela um breve título. Certifique-se de que quaisquer sobrescritos ou asteriscos sejam mostrados ao lado dos itens relevantes e que as explicações sejam exibidas como notas de rodapé na tabela, figura ou placa.

## **Referências**

Todas as referências em seu manuscrito devem ser formatadas usando um dos estilos reconhecidos de Harvard.

Estilo de referência de Harvard da Emerald

As referências a outras publicações em seu texto devem ser escritas da seguinte forma:

Autor único: (Adams, 2006)

Dois autores: (Adams e Brown, 2006)

Três ou mais autores: (Adams et al., 2006) Por favor, note que “et al” deve ser sempre escrito em itálico.

Alguns outros pontos de estilo. Isso se aplica ao corpo principal do texto e à lista final de referências.

Ao referir-se às páginas de uma publicação, use ‘p. (Número da página)’ para uma única página ou ‘pp. (Número da página)’ para indicar um intervalo de páginas.

Os números das páginas devem sempre ser escritos por extenso, por exemplo, 175-179, não 175-9.

Quando dois pontos ou travessão aparecem no título de um artigo ou capítulo de livro, a letra que segue esses dois pontos ou travessão deve ser sempre minúscula.

Ao citar um trabalho com vários editores, use a abreviatura ‘Ed.s’.

No final do seu artigo, forneça uma lista de referências em ordem alfabética usando as diretrizes de estilo abaixo. Quando um DOI estiver disponível, ele deve ser incluído no final da referência.

### **Para livros**

Apelido, iniciais (ano), título do livro, editora, local de publicação.

por exemplo. Harrow, R. (2005), No Place to Hide, Simon & Schuster, New York, NY.

Artigo conceitual. Concentra-se no desenvolvimento de hipóteses

Para capítulos de livros

Apelido, iniciais (ano), "título do capítulo", apelido do editor, iniciais (Ed.), Título do livro, editora, local de publicação, números de página.

Por exemplo. Calabrese, F.A. (2005), "Os primeiros caminhos: teoria para a prática - um continuum", Stankosky, M. (Ed.), Criando a Disciplina de Gestão do Conhecimento, Elsevier, New York, NY, pp.15-20.

### **Para revistas**

Sobrenome, iniciais (ano), "título do artigo", nome do periódico, número do volume, números das páginas.

por exemplo. Capizzi, M.T. e Ferguson, R. (2005), "Tendências de lealdade para o século vinte e um", Journal of Consumer Marketing, Vol. 22 No. 2, pp.72-80.

### **Para publicado procedimentos da conferência**

Sobrenome, iniciais (ano de publicação), "título do trabalho", no sobrenome do editor, iniciais (Ed.), Título do processo publicado que pode incluir local e data (s) realizada (s), editora, local de publicação, números de página.

por exemplo. Wilde, S. e Cox, C. (2008), "Principais fatores que contribuem para a competitividade dos destinos turísticos em vários estágios de desenvolvimento", in Richardson, S., Fredline, L., Patiar A., & Ternel, M. (Ed.s), CAUTHE 2008: Onde diabos estamos nós ?, Griffith University, Gold Coast, Qld, pp.115-118.

### **Para não publicado**

#### **Procedimentos da conferência**

Sobrenome, iniciais (ano), "título do trabalho", trabalho apresentado em [nome do congresso], [data do congresso], [local do congresso], disponível em: URL se disponível gratuitamente na internet (data de acesso).

por exemplo. Aumueller, D. (2005), "Semantic authoring and retrieval within a wiki", artigo apresentado na European Semantic Web Conference (ESWC), 29 de maio a 1 de junho, Heraklion, Creta, disponível em: <http://dbs.uni-leipzig.de/file/aumueller05wiksar.pdf> (acessado em 20 de fevereiro de 2007).

### **Para posters de trabalho**

Apelido, iniciais (ano), "título do artigo", papel de trabalho [número se disponível], instituição ou organização, local de organização, data.

por exemplo. Moizer, P. (2003), "Como a pesquisa acadêmica publicada pode informar as decisões políticas: o caso de rotação obrigatória de nomeações de auditoria", documento de trabalho, Leeds University Business School, University of Leeds, Leeds, 28 de março.

Para entradas da enciclopédia

(sem autor ou editor)

Título da enciclopédia (ano), "título de entrada", volume, edição, título da enciclopédia, editora, local de publicação, números de página.

por exemplo. Encyclopaedia Britannica (1926), "Psychology of culture contact", Vol. 1, 13ª ed., Encyclopaedia Britannica, London e New York, NY, pp.765-771.

(para entradas de autoria, consulte as diretrizes dos capítulos do livro acima)

### **Para artigos de jornal (de autoria)**

Sobrenome, iniciais (ano), "título do artigo", jornal, data, números de página.

por exemplo. Smith, A. (2008), "Money for old rope", Daily News, 21 de janeiro, pp.1, 3-4.

### **Para artigos de jornal (sem autoria)**

Jornal (ano), "título do artigo", data, números de página.

por exemplo. Daily News (2008), "Pequenas mudanças", 2 de fevereiro, p.7.

Para arquivo ou outras fontes não publicadas

Sobrenome, iniciais (ano), "título do documento", manuscrito não publicado, nome da coleção, registro do inventário, nome do arquivo, localização do arquivo.

por exemplo. Litman, S. (1902), "Mechanism & Technique of Commerce", manuscrito não publicado, Simon Litman Papers, Record series 9/5/29 Box 3, University of Illinois Archives, Urbana-Champaign, IL.

### **Para fontes eletrônicas**

Se disponível online, a URL completa deve ser fornecida ao final da referência, bem como a data em que o recurso foi acessado.

Sobrenome, iniciais (ano), “título da fonte eletrônica”, disponível em: URL persistente (data mês ano acesso).

por exemplo. Weida, S. e Stolley, K. (2013), “Developing strong thesis afirmações”, disponível em: <https://owl.english.purdue.edu/owl/resource/588/1/> (acessado em 20 de junho de 2018)

URLs autônomos, ou seja, aqueles sem autor ou data, devem ser incluídos entre parênteses no texto principal ou, de preferência, definidos como uma nota (algarismo romano entre colchetes no texto seguido do endereço URL completo no final do artigo).

### **Para dados**

Sobrenome, iniciais (ano), título do conjunto de dados, nome do repositório de dados, disponíveis em: URL persistente, (data mês ano de acesso).

por exemplo. Campbell, A. e Kahn, RL (2015), American National Election Study, 1948, ICPSR07218-v4, Consórcio Interuniversitário para Pesquisa Política e Social (distribuidor), Ann Arbor, MI, disponível em: <https://doi.org/10.3886/ICPSR07218.v4> (acessado em 20 de junho de 2018)

### **Envie seu manuscrito**

Há uma série de etapas importantes que você deve seguir para garantir um envio tranquilo e sem problemas.

### **Verifique novamente o seu manuscrito**

Antes de enviar seu trabalho, é sua responsabilidade verificar se o manuscrito está completo, gramaticalmente correto e sem erros ortográficos ou tipográficos. Alguns outros pontos importantes:

Dê uma leitura final aos objetivos e escopo do periódico. O seu manuscrito é definitivamente um bom ajuste? Se não for, o editor pode recusar sem revisão por pares.

Seu manuscrito está de acordo com nossas diretrizes de ética em pesquisa e publicação?

Você limpou todas as permissões de publicação necessárias?

Você seguiu todos os requisitos de formatação estabelecidos nestas diretrizes do autor?

O manuscrito contém alguma informação que possa ajudar o revisor a identificá-lo? Isso pode comprometer o processo de revisão por pares anônimo. Algumas dicas:

Se você precisar se referir ao seu próprio trabalho, use uma formulação como "a pesquisa anterior demonstrou" e não "a nossa pesquisa anterior demonstrou".

Se você precisar se referir a seu próprio trabalho atualmente inédito, não inclua este trabalho na lista de referência.

Quaisquer agradecimentos ou biografias de autores devem ser enviados como arquivos separados.

Faça uma verificação final para garantir que nenhum nome de autor apareça em nenhum lugar do manuscrito. Isso inclui figuras ou legendas.

Você encontrará uma lista de verificação de envio útil no site Think.Check.Submit.

O processo de submissão

Todos os manuscritos devem ser submetidos por meio de nosso sistema editorial pelo autor para correspondência.

Uma conta de autor separada é necessária para cada periódico ao qual o mestrando se submete. Se esta é a primeira vez que você está enviando para esta revista, escolha a opção "Criar uma conta" ou Cadastre-se agora no sistema editorial. Se você já tem um login Emerald, pode reutilizar o nome de usuário e a senha existentes aqui. Observe que na próxima vez que efetuado o login no sistema, será solicitado o seu nome de usuário. Este será o endereço de e-mail que você inseriu ao configurar sua conta.

Não se esqueça de adicionar seu ID do ORCID durante o processo de envio. Ele será incorporado ao artigo publicado, junto com um link para o registro do ORCID, permitindo que outras pessoas combinem você facilmente com o trabalho.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 9.1 Fundamentação teórica

AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, F. C. A. Antioxidant capacidant and bioactive compounds and health benefits of camu-camu puree (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh). **International Journal of Development Research**, v. 08, n. 06, p. 20472-20475, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/326062156>> Acesso em: 10 jan.2020.

AKTER, M.S.; OH, S.; EUN, J.B.; Ahmed, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**. V. 44, p.1728-1732, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002043>> Acesso em: 21 jun. 2019.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007. Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt)> Acesso em: 20 dez.2019.

ANVISA, 2019. **Suplementos Alimentares**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/suplementos-alimentares>> Acesso em: 29 jun. 2019.

AZEVEDO, J. C., Borges, K. C., GENOVESE, M. I., CORREIA, R. T., & VATTEM, D. A. (2015). Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. **Food Research International**, 73, 135–141.

AZULAY, M. M.; LACERDA, C. A. M.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T. Vitamina C. **An. Bras. Dermatol.** v.78, n.3, p.265-274, 2003.

BAENAS, N.; SALAR, F. J.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GARCÍA-VIGUERA, C. New UHPLC-QqQ-MS/MS Method for the rapid and sensitive analysis of Ascorbic acid and Dehydroascorbic acids in plant foods. **Molecules**. V.24, n.8, 1632. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1632>> Acesso em: 30 nov. 2020.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F.M.; EBERLIN, M.N.; KOOLEN, H.H. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.180, p.280-287, 2015. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615002393>> Acesso em: 21 fev. 2020.

BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria genus*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24491724/>> Acesso em: 02 abr.2020.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC nº 243. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, jul. 2018. Disponível em: <

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)> Acesso em: 29 jun. 2019.

BUSTILLOS, O. V. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS. **Revista Analítica**. v. 106, 2020. Disponível em: <<https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms/>> Acesso em: 15 nov.2020.

CAMPOS, F. M., RIBEIRO, S. M. R., DELLA LUCIA, C. M., SANT'ANA, H. M. P. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Quimica Nova**, v.32, p.87–91. 2009.

CAVALIERI, I. Cor e gosto das fruteiras. **Manchete Rural**, v. 72, p. 28–31. 1993.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCH, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.McVaugh) fruit at different maturity stage. **Food Chemistry**, v.120, p.1019–1024, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460901351X>> Acesso em: 25 jun.2019.

CORREA, S. I., ZAMUDIO, L. B., SOLÍS, V. S., CRUZ, C. O. Contenido de vitamina C em frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H. B. K) Mc Vaugh, em cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma dek INIA Loreto, Perú. **Scientia Agropecuaria**. v. 2, p. 123-130, 2011. Disponível em: <<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/68>> Acesso em: 05 jun. 2019.

CUNHA-SANTOS, E. C. E.; VIGANÓ, J.; NEVES, D. A.; MATÍNEZ, J.; GODOY, H. T. Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. **Food Research International**. v.115, p.160-166, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918306379?via%3Di> hub> Acesso em: 01 dez. 2020.

DAL MOLIN, T. R; LEAL, G. C.; MÜLLER, L. S.; MURATT, D. T.; MARCON, G. Z.; CARVALHO, L. M.; VIANA, C. Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública. **Rev Saúde Pública**, v. 53, n. 90, 2019.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasilienses* e *Eugenia involucata* (Myrtaceae)** 2014. 169 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Paulista, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, 2014. Disponível: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110857>> Acesso em: 30 jul.2019.

Diário do comércio. Venda de suplementos vitamínicos em alta. In: **Brasnutri**. 20 abril 2021. Disponível em: <http://www.brasnutri.org.br/noticias.aspx>. Acesso em: 14 nov. 2021.

DWYER, J. T.; COATES, P. M.; SMITH, M. J. Dietary supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. **Nutrients**. v.10, n.1, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793269/> Acesso em: 01 dez.2020.

FAVRETO, W. A. J. **Desenvolvimento de métodos analíticos indicativo de estabilidade para manidipino e montelucaste por UHPLC-PDA e estudos de caracterização das impurezas e estresse por UHPLC-MS/MS**. 2016. 218 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Maringá, Paraná, 2016.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA. Evolution of colour and phenolic compounds during *Garnacha Tintorera* grape raisining. **Food Chemistry**. v.141, n.3, p.3230-3240, 2013.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v.139, p.578–588, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561148>> Acesso em: 20 jun. 2019.

FRANCO, M. R. B., JANZANTTI, N. S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavor and Fragrance Journal**, v.20, p. 358–371. 2005.

FIDELIS. M.; OLIVEIRA, S. M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; KANESHIMA, T.; OH, W. Y.; SHAHIDI, F.; GRANATO, D. From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in yogurt model. **Journal of Dairy Science**, V. 103, N. 2. 2020.

FUJITA, A.; SARKAR, D.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation. **Process Biochemistry**, V. 59, p.133-140, 2017.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88 f. (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-28012009-161811/pt-br.php>> Acesso em: 15 mar.2020.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C. *et al.* Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 5, p. 124-129, 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/317266588\\_Qualitative\\_evaluation\\_and\\_biocompounds\\_present\\_in\\_different\\_parts\\_of\\_camu-camu\\_Myrciaria\\_dubia\\_fruit](https://www.researchgate.net/publication/317266588_Qualitative_evaluation_and_biocompounds_present_in_different_parts_of_camu-camu_Myrciaria_dubia_fruit)> Acesso em: 10 jun.2020.

HARNLY J. M., DOHERTY R. F., BEECHER G. R., HOLDEN J. M., HAYTOWITZ D. B., BHAGWAT S., GEBHARDT S., Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts, **J. Agric. Food Chem.** v.54, p.9966–9977, 2006.

HERNADEZ, Y., LOBO, M. G., GONZALEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v.96, p.654–664. 2006.



INOUE, T.; KOMODA, H.; UCHIDA, T.; NODE, K. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**. v.52, p.127-132, 2008.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L **Fundamentos de cromatografia**: In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Cromatografia líquida de alta eficiência. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006, Cap. 9, pg 384 – 386.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p.213-218, 1999.

LANÇAS, F. M., **Cromatografia líquida moderna** In: \_\_\_HPLC/CLAE. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009, Cap. 4, pg 121 – 125.

LANGLEY, P. C.; JR PERGOZZI, J. V.; JR TAYLOR, R.; RIDGWAY, C. Antioxidant and associated capacities of Camu camu (*myrciaria dubia*): A systematic review. **The Journal of alternative and complementary medicine**, v.21, n.1, p.8-14, 2015. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25275221/>> Acesso em: 20 abr.2020.

LEE, C. C.; DUDONNÉ, S.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, I.; KIM, J. H.; KIM, J. S.; KIM, J.; PARK, J. H. Y.; LEE, K. W.; LEE, C. Y. Comprehensive phenolic composition analysis and evaluation of Yak-Kong soybean (*Glycine max*) for the prevention of atherosclerosis. **Food Chemistry**. v.234, p.486-493, 2017.

LI, Y. & DING. Y. Minireview: Therapeutic potencial of myricetin in diabetes mellitus. **Food Science and Human Wellness**. v.1, p. 19-25, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2012.08.002>.

LIU, M.; GUO. H.; LI, Z.; ZHANG C.; ZHANG, X.; CUI, Q.; TIAN, J. Molecular level insight into the benefit of myricetin and dihydromyricetin uptake in patients with Alzheimer's diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, V.12, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.601603>.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as effected by pre- and postharvest conditions. A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41-50, 2016.

MARTINS, G. **Desenvolvimento de uma emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> para o carreamento de ácido gálico para fins farmacêuticos e alimentares**. 2017. 88 f. dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, Paraná.

MOJZER, E. B.; HRNCIC, M. K.; SKEGET, M.; KNEZ, Z.; BREN, U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effect. **Molecules**. v.21, n.7, 901, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27409600/> Acesso em: 01 dez.2020.

MYODA, T.; FUJIMURA, S.; PARK, B.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWWA, J.; NISHIZAWA, M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 304-307, 2010. Disponível em: <

[https://www.researchgate.net/publication/267227696\\_Antioxidative\\_and\\_antimicrobial\\_potential\\_of\\_residues\\_of\\_camu-camu\\_juice\\_production](https://www.researchgate.net/publication/267227696_Antioxidative_and_antimicrobial_potential_of_residues_of_camu-camu_juice_production)> Acesso em: 20 jun. 2019

NERI-NUMA, I. A.; SANCHO, R. A. S.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G.M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**. v.103. p.345-360, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917307330>> Acesso em: 10 abr.2020.

NEVES, L. C., SILVA, V. X., PONTIS, J. A., FLACH, A., ROBERTO, S. R. Bioactive compounds and antioxidante activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* H.B.K) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae**. v.186, p. 223-229, 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423815001041>> Acesso em: 01 out.2020.

PEREIRA, E. D. **Composição química e potencial antioxidante do camu-camu (*myrciaria dubia*) e sua influência em composições nutricionais utilizadas na piscicultura**. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná– UTFPR, Programa de pós-graduação em processos químicos e biotecnológicos, Toledo, PR, 2019.

REYNERTSON, K. A., YANG H., JIANG B., BASILE M. J., KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**. v.109, n.4, p.883-890, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814608000836>>

RIBEIRO, P. F. A.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, E. B.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M. P. Teor de vitamina C,  $\beta$ -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 567-572, 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782016000300567](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000300567) Acesso em:10 jun.2020.

ROSA, J. S. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Seropédica, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=24605](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=24605). Acesso em: 20 nov.2020.

ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S. *et al.* Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400025&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400025&script=sci_abstract&tlng=pt).> Acesso em: 10 jun.2020.

SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., ANCOS, B., CANO, M. P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during

refrigerated storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.647-653, 2003.

SCHAFRANSKI, K. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ponta Grossa, Paraná, 2019.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produto vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**. v. 34, n.10, p.1875-1887, 2011.

VILLACHICA, L. H. El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K) McVaugh) en la Amazonia Peruana. In **Tratado de Cooperacion Amazonica**, Lima, Peru. 1997.

WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification. **Academic press: Encyclopedia of Evolutionary Biology**. v. 1, p. 2132, 2016.

YARDIM-AKAYDIN, S.; ÖZKAN, Y.; ÖZKAN, E.; TORUN, M.; SIMSEK, B. The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. **Clinica Chimica**, v. 338, p. 99-105, 2003.

YILMAZER-MUSA, M., GRIFFITH, A. M., SCHNEIDER, E., FREI, B. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.8924–8929. 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22697360/>>.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. L.; YUYAMA, K.; LOPES, T. M.; FÁVARO, D. I. T.; BERGL, P. C. P.; VASCONCELLOS, M. B. A. Teores de elementos minerais em algumas populações de camu-camu. **Acta Amazônica**, v.33, n.4, p.549-554, 2003. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672003000400002&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672003000400002&script=sci_abstract&tlng=pt)> Acesso em: 15 abr.2020.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA HPLC-MS, and NMR. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.9531–9535, 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606003207>> Acesso em: 27 nov. 2019.

ZUANASSI, J. A. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVISCK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, Cap. 23, p. 499-426, 2002.

## 9.2 Referências Capítulo 1

AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, F. C. A. Antioxidant capacity and bioactive compounds and health benefits of camu-camu puree (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh). **International Journal of Development Research**, v. 08, n. 06, p. 20472-20475, 2018. Disponível em: Acesso em: 10 jan.2020.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785– 788, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881460801457X> Acesso em: 15 jan.2020.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007. Disponível em: Acesso em: 20 dez.2019.

ANHÊ, F. F.; NACHBAR, R. T.; VARIN, T. V.; TROTTIER, J. et al Treatment with camu-camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. **Microbiome**, v. 68, p. 453-464, 2019. Disponível em: < <https://gut.bmj.com/content/68/3/453> > Acesso em: 20 jan. 2020.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F.M.; EBERLIN, M.N.; KOOLEN, H.H. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.180, p.280-287, 2015. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615002393> > Acesso em: 21 fev. 2020.

BAZOTI, F.N.; GIKAS, E.; SKALTSOUNIS, A.L.; TSARBOPOULOS, A. Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. **Analytica Chimica Acta**, v.573–574, p.258–266, 2006. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267006006519> > Acesso em: 30 mar.2020.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n. 38, p. 6020–6026, 2009. Disponível em: Acesso em: 20 mar.2020.

BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24491724/> > Acesso em: 02 abr.2020.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 243. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, jul. 2018.

CARVALHO, J. C. T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: \_\_\_\_\_ . SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN,

G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVISCK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, Cap. 23, p. 520-535, 2002.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCH, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.McVaugh) fruit at different maturity stage. **Food Chemistry**, v.120, p.1019–1024, 2010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460901351X>> Acesso em: 25 jun.2020.

CORREA, S. I., ZAMUDIO, L. B., SOLÍS, V. S., CRUZ, C. O. Contenido de vitamina C em frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H. B. K) Mc Vaugh, em cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma dek INIA Loreto, Perú. **Scientia Agropecuaria**. v. 2, p. 123-130, 2011. Disponível em: Acesso em: 05 jun. 2020.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de Eugenia brasilienses e Eugenia involucrata (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Paulista, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, 2014. Disponível: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110857>> Acesso em: 30 jan.2020.

FIDELIS. M.; OLIVEIRA, S. M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; KANESHIMA, T.; OH, W. Y.; SHAHIDI, F.; GRANATO, D. From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in yogurt model. **Journal of Dairy Science**, V. 103, N. 2. 2020.

FILHO, D.; FIHO, A.A. M.; NETO, M.; SANTOS, R.C; CHAGAS, E.A.; CHAGAS, P. C; MONTEIRO, I.F.; SOUZA, R.C.P. Chemical composition, minerals, physicochemical properties and antioxidante activity in Camu camu seed oil. **Chemical Engineering Transactions**. v.64, p.325-330, 2018. Disponível em: Acesso em: 27 jun. 2020.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v.139, p.578– 588, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561148>> Acesso em: 20 jun. 2019.

FRANCESCATO, L. N.; DEBENEDETTI, S. L.; SCHWANZ, T. G.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC– ESIMS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v.105, n. 15, p.192–203, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23598008/>> Acesso em: 20 abr.2020.

GALLART-AYALA, H., MOYANO, E., & GALCERAN, M. T. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the analysis of isopropylthioxanthone in packaged food. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 182– 188, 2008. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18801489/>> Acesso em: 10 jul.2020.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** 2008. 88 f. (Mestre) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-28012009-161811/pt-br.php> > Acesso em: 15 mar.2020.

GONÇALVES, A. L. S. S. **Compostos bioativos do camu-camu (Myrciaria dubia Mc Vaugh): Caracterização e atividade biológica.** 2012. 101 f. (Doutor) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-08032013-165045/pt-br.php> > Acesso em: 15 mar.2020.

GOUVÊA, A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do Açaí por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Seropédica, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/tede/369> Acesso em: 20 abr.2020.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C. et al Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (Myrciaria dubia) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 5, p. 124-129, 2017. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/317266588\\_Qualitative\\_evaluation\\_and\\_biocompounds\\_present\\_in\\_different\\_parts\\_of\\_camu-camu\\_Myrciaria\\_dubia\\_fruit](https://www.researchgate.net/publication/317266588_Qualitative_evaluation_and_biocompounds_present_in_different_parts_of_camu-camu_Myrciaria_dubia_fruit) > Acesso em: 10jun.2020.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC– MS/MS. **Food Chemistry**, v.111, n. 3, p.789–794, 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814608005670> > Acesso em: 20 abr.2020.

LANÇAS, F. M., Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas, SP: **Editora Átomo**, 2009, Cap. 4, pg 121 – 125.

LANGLEY, P. C.; JR PERGOZZI, J. V.; JR TAYLOR, R.; RIDGWAY, C. Antioxidant and associated capacities of Camu camu (myrciaria dubia): A systematic review. *The Journal of alternative and complementary medicine*, v.21, n.1, p.8-14, 2015. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25275221/> > Acesso em: 20 abr.2020.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v.103, n. 3, p.1003–1008, 2007. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606007825> > Acesso em: 20 jul.2020.

NAGY, K. I.; REDEUIL, K.; BERTHOLET, R.; STEILING, H.; KUSSMANN, M. Quantification of anthocyanins and flavonols in milk-based food products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.81, n. 15, p.6347–63, 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20337399/> > Acesso em: 10 ago.2020.

NERI-NUMA, I. A.; SANCHO, R. A. S.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G.M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**. v.103. p.345-360, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917307330>> Acesso em: 10 abr.2020.

NEVES, L. C.; BENEDETTE, R.; TOSIN, J.M.; CHAGAS, E.A.; SILVA, V.X.; PRIL, M. A.S.; ROBERTO, S.R. Produção de Blends a partir de frutos tropicais e nativos da Amazônia. **Rev. Bras. Frutic.** v.33, n.1, p.187-197, 2011. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452011005000023&script=sci\\_abstract&lng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452011005000023&script=sci_abstract&lng=pt)> Acesso em: 30 mar.2020.

NEVES, L. C., SILVA, V. X., PONTIS, J. A., FLACH, A., ROBERTO, S. R. Bioactive compounds and antioxidante activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* H.B.K) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae**. v.186, p. 223-229, 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423815001041>> Acesso em: 01 out.2020.

RIBEIRO, P. F. A.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, E. B.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M. P. Teor de vitamina C,  $\beta$ -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 567-572, 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782016000300567](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000300567) Acesso em:10 jun.2020.

RODRIGUES, L. M., ROMANINI, E. B., SILVA, E., PILAU, E. J., COSTA, S. C., MADRONA, G. S. Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extaction and reverse osmosis). **Journal Pre-proofs**. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32097870/>> Acesso em: 10 set.2020.

ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S. et al Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400025&script=sci\\_abstract&lng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400025&script=sci_abstract&lng=pt)> Acesso em: 10 jun.2020.

SALOMÃO-OLIVEIRA, A.; COSTA, S. S. C.; SANTOS, K. S. C. R.; SOUZA, T. P.; MARINHO, H. A. Ascorbic acid from lyophilized camu-camu fruit: stability and quality control of hard capsules. **Revista de Ciências farmacêuticas Básicas e Aplicada**. v.37, n.1, 2016. Disponível em: < <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/11>> Acesso em:20 fev.2020.

SILVA, L. M.; HILL, L. E.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C. L. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-coglycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 165, n. 15, p. 362–370, 2014. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038688/>> Acesso em: 20 mar.2020.

VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONCALVES, A. C. A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juice: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá

(*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) **Food Research International**, 44, n. 7, p. 1988-1996, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996910004618>> Acesso em: 10 abr.2020.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. L.; YUYAMA, K.; LOPES, T. M.; FÁVARO, D. I. T.; BERGL, P. C. P.; VASCONCELLOS, M. B. A. Teores de elementos minerais em algumas populações de camu-camu. **Acta Amazônica**, v.33, n.4, p.549-554, 2003. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672003000400002&script=sci\\_abstract&lng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672003000400002&script=sci_abstract&lng=pt)> Acesso em: 15 abr.2020.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606003207>> Acesso em: 27 jun. 2020.

ZUANASSI, J. A. S. Flavonoides. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVISCK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 4. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, Cap. 23, p. 499-426, 2002.

### 9.3 Referências Capítulo 2

Akter, M.S. (2011), “Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review”. *Food Research International*, Vol. 44, pp.1728-1732. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002043>>

Angelo, P. M. and Jorge, N. (2007), “Compostos Fenólicos em alimentos - Uma breve revisão”. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, Vol. 66, No. 1, pp. 1-9, Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt)>

Anhê, F. F. *et al.* (2019), “Treatment with camu-camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice”. *Microbiome*, Vol. 68, pp. 453-464. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/68/3/453>>

Anvisa (2021), “Suplementos alimentares: documento informativo atualizado”, Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/suplementos-alimentares-documento-informativo-atualizado>.

Baenas, N. *et al.* (2019), “New UHPLC-QqQ-MS/MS Method for the rapid and sensitive analysis of Ascorbic acid and Dehydroascorbic acids in plant foods”. *Molecules*, Vol. 24, No. 8, p.1632. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1632>>

Bataglion, G.A. *et al.* (2015), “Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS”. *Food Chemistry*, Vol.180, pp.280-287. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615002393>>



Bioanalytical Method Validation (2018), "Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA)", *Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Biopharmaceutics*. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>.

Brasil (1998), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria N° 32, Aprova o regulamento técnico para suplementos vitamínicos e ou de minerais, constante no anexo desta Portaria. Diário Oficial União. 15 jan 1998; Seção1:9.

Brasil (2016), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 97. Altera a Resolução – RDC nº 24, de 14 de junho de 2011. Diário Oficial União. 3 ago 2016; Seção 1:32.

BRASIL (2018), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 243. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, jul. 2018.

Brito, E. S. *et al.* (2007), "Anthocyanins presente in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guariju", *J. Agric. Food Chem.* Vol. 55, pp.9389-9394.

Chirinos, R. *et al.* (2010), "Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.McVaugh) fruit at different maturity stage", *Food Chemistry*, Vol.120, pp.1019–1024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460901351X>>

Dal Molin, T. R, *et al.* (2019), "Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública". *Rev Saude Publica*, Vol 53 No 90.

Dasgupta, A. and Klein, K., (2014) "Antioxidant Vitamins and Minerals, in Antioxidants. In Food, Vitamins and Supplements", *Elsevier*. San Diego, pp. 277–294.

Dwyer, J. T. *et al.* (2018), "Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources". *Nutrients*. Vol.10, No. 41, pp.2-24. Disponível em: <http://doi:10.3390/nu10010041>

Fracassetti, D. *et al.* (2013), "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*, Vol.139, pp.578–588. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561148>>

Fujita *et al.* (2017), "Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation", *Process Biochemisty*, Vol 59, pp.133-140.

Gonçalves, A. E. S. S. (2008), "Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C". 88 f. (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-28012009-161811/pt-br.php>>

Gouvêa, A. C. M. S. *et al.* (2012), “Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol 32 No 1, pp. 43-46.

ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), “Guidelines on Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2 (R1)”. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*. Disponível em: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)

Lin, J. *et al.* (2006), “Flavonoid intake and colorectal cancer risk in men and women”, *Am. J. Epidemiol.* Vol. 164, pp.644–651.

King, A. and Young, G. (1999), “Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals”. *Journal of The American Dietetic Association*, Vol. 99, No. 2, pp.213-218.

Latiff *et al.* (2018), “Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the detection and validation of quercetin-3-O-rutinoside and myricetin from fractionated *Labisia pumila* var. *alata*, *Masaysian Journal of Analytical Sciences*, Vol. 22 No 5, pp.817-827. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2205-09>.

Li, Y. and Ding. Y. (2012), “Minireview: Therapeutic potencial of myricetin in diabetes mellitus”. *Food Science and Human Wellness*. Vol.1, pp. 19-25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2012.08.002>.

Liu, M. *et al.* (2020), “Molecular level insight into the benefit of myricetin and dihydromyricetin uptake in patients with Alzheimer’s diseases, *Frontiers in Aging Neuroscience*, Vol 12, pp. 1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.601603>.

Marques, L. G. *et al.* (2007). Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). *Chemical Engineering and Processing*, Vol. 46, pp.451–457.

Martins, G. (2017), “Desenvolvimento de uma emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> para o carregamento de ácido gálico para fins farmacêuticos e alimentares”, dissertação (mestrado), 88 f – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, Paraná.

Martins, N. *et al.* (2016), “Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as effected by pre- and postharvest conditions. A review”. *Food Chemistry*, Vol. 211, pp. 41-50.

Percio, J. A. M. *et al.* (2021), “Técnicas analíticas para avaliação de compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia*)”. *Revista Thêma et Scietia*. Vol.11, No.1, pp.76-86.

Saldanha, L. L. *et al.* (2013). “Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrciabella cambess* using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR”. *Molecules*, Vol. 18, pp. 8402-8416.

Schafranski, K. (2019), "Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus Nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato". 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ponta Grossa, Paraná.

Silva, M. L. C. *et al.* (2010), "Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produto vegetais". *Semina: Ciências Agrárias*, Vol. 31, No. 3, pp. 669-682.

Singh, A. *et al.* (2016), "Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in different plant parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS", *Natural Product Communications*, Vol.11, No. 2, pp.239-244.

Szultka, M. *et al.* (2013), "Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry", *Electrophoresis*, Vol.35, pp.585-592.

Wink, M. (2016), "Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of". *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Vol. 1, pp. 2132.

Yun, L. *et al.* (2012), "Metabolite identification of myricetin in rats using HPLC coupled with ESI-MS", *Chromatographia*, Vol. 75, No. 11, pp.655-660.