

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E CONCENTRAÇÃO DE ALCALÓIDES DAS SEMENTES TORRADAS DE CAFERANA (*Bunchosia glandulifera*)

Palavras-Chave: Caferana, Extração, Alcaloides

Autores/as:

Danilo Santos Sigolo, FEA, UNICAMP

Sara Fraga (Doutorado), FEA, UNICAMP

Profa. Dr.^a Klicia Araujo Sampaio (Orientadora), FEA, UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Bunchosia glandulifera*, conhecida popularmente como caferana, cafezinho, ameixa ou ciruela é uma planta nativa da América do Sul, sendo distribuída nas áreas de clima úmido temperado. Seus frutos vermelhos são ricos em licopeno, fenólicos e flavonoides como a rutina. O sabor com residual levemente amargo e picante é devido a presença de alcaloides (Borguini *et al.*, 2022; Peixoto *et al.*, 2017).

Pesquisadores estudaram as folhas da caferana da variedade *Bunchosia armeniaca* e identificaram oitenta e oito compostos bioativos distribuídos entre alcaloides (trigonelina, harmalina e cafeína), ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, polifenóis, aminoácidos, ésteres de ácidos graxos e carboidratos. Os extratos foram testados quanto à atividade anti-inflamatória, antibacteriana e na redução da doença de Alzheimer apresentando resultados promissores (Abbas *et al.*, 2022).

A proporção de sementes presentes nas frutas pode representar entre 40% e 70% da massa total do fruto. A polpa é utilizada pela agroindústria familiar na elaboração de geleias, sucos, sorvetes e molhos agri doces. Porém, as sementes são descartadas ou destinadas ao uso doméstico, para serem torradas e trituradas para consumo humano. Há relatos que o uso constante do pó das sementes promove benefícios à saúde, melhorando o estado físico geral, com otimização das funções cognitivas e da longevidade (Blank *et al.*, 2017; Peixoto *et al.*, 2017).

Pesquisadores têm validado o conhecimento ancestral, revelando que nas sementes da caferana contêm alcaloides como cafeína e δ -lactama que atuam com efeitos benéficos no sistema nervoso central. Além disso, a composição fitoquímica das sementes inclui aminoácidos essenciais, mono e dissacarídeos, polióis, minerais e compostos fenólicos que contribuem para a atividade antioxidantes (Blank *et al.*, 2017; Fraga *et al.*, 2020; 2021; Peixoto *et al.*, 2017).

A tecnologia de extração e fracionamento com fluidos supercríticos – SFE (Supercritical Fluid Extraction), apresenta vantagens em relação à utilização de técnicas convencionais que utilizam solventes orgânicos. Entre estas vantagens estão a aplicação de solventes “verdes” com baixa ou nenhuma toxicidade, custos baixos, seletividade na extração, maior pureza dos extratos e sem necessidade de etapa de purificação (Pereira *et al.*, 2023; Santana *et al.*, 2019).

Este trabalho apresenta como proposta a obtenção de extratos concentrados em alcaloides, a quantificação e identificação de compostos bioativos presentes nas sementes torradas e nos extratos concentrados de caferana.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais e métodos

A matéria-prima foi preparada e torrada em estufa a vácuo (Marconi, MA030/12, Brasil) com temperatura de 170 ± 2 °C sob vácuo de 500 ± 5 mmHg (bomba de vácuo Marconi, MA057/1, Brasil) por 35

min. Após o resfriamento em dessecador, as amostras foram moídas em moinho de facas (Marconi, modelo MA 340, Brasil) e armazenada sob refrigeração (refrigerador modelo BVR28GBANA, Brastemp, Brasil) a temperatura de 8 ± 1 °C até o momento das análises e extrações.

2.2. Análises físico-químicas da matéria-prima

As propriedades físico-químicas da matéria-prima foram caracterizadas quanto à densidade real, densidade aparente e porosidade do leito de partículas (Rahman *et al.*, 1996); diâmetro médio das partículas (Wilcox; Deyoe; Pfost, 1970); teor total de umidade (Ca 23-55 AOCS 1998); teor total de voláteis (Ac 930.04, AOAC 1997); teor de cinzas, fibras e lipídios totais (IAL, 2008); teor de proteínas totais pelo método de combustão Dumas (fator de correção 6,25).

2.3. Extração, fracionamento e concentração de compostos bioativos

Para o preparo dos extratos foram utilizados dióxido de carbono (99,5% White Martins Gases Industriais, Brasil) e etanol (99,5% Synth, Brasil) na proporção de 90:10 (m:m). O processo de extração foi realizado em extrator supercrítico de leito fixo com pressão de 300 bar, seguido de fracionamento e concentração de compostos bioativos através de diferentes níveis de pressão, sendo no primeiro vaso coletor 300 bar (fração 1), no segundo vaso 180 bar (fração 2) e no terceiro vaso 80 bar (fração 3). As pressões foram definidas conforme trabalhos realizados por Fraga *et al.* (2020; 2021), bem como a concentração e purificação do alcaloide de interesse. As extrações foram realizadas em triplicatas.

2.4. Cinética de extração e rendimento global dos extratos

Para plotar as curvas da cinética da extração foram aplicados intervalos de tempo de 10 min na primeira hora, 20 min na segunda hora, 30 min na terceira hora e 60 min na quarta hora, completando 13 pontos e 4h de tempo total das extrações. Os extratos foram secos para a retirada total do resíduo de solvente e o rendimento global foi calculado em relação à quantidade de matéria-prima inicial.

2.5. Isolamento, purificação e quantificação do alcaloide presente no extrato concentrado

O extrato concentrado denominado fração 2 foi escolhido para isolamento, purificação e quantificação do alcaloide presente, em função de fornecer visivelmente maiores quantidades de formações de pequenas agulhas com aspecto de cristal. O extrato foi suspenso em hexano aquecido a 40 ± 2 °C e levado a banho de gelo para repouso overnight. Após a formação dos cristais em suspensão, o hexano sobrenadante foi retirado e os cristais precipitados foram novamente lavados com hexano e o processo foi repetido por oito vezes sucessivas, até que o cristal apresentou aspecto branco e brilhante, após ser totalmente seco e o solvente evaporado com auxílio de nitrogênio. A pureza do material isolado foi testada por método termogravimétrico (TGA) em analisador METTLER TOLEDO, Modelo: TGA/DSC1 (Schwerzenbach, Suíça).

2.6. Avaliação da capacidade antioxidante e citotoxicidade dos extratos e do alcaloide purificado

Foram realizadas as análises de fenólicos totais (Singleton *et al.*, 1999); atividade antioxidante com métodos DPPH[•]; FRAP; ABTS (Rasera *et al.*, 2019) e pelo ensaio DCF que baseia-se na capacidade de um reagente, o DCFH-DA, de ser oxidado por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares em células tipo Caco-2 (epitélio intestinal humano), resultando em um produto fluorescente (Foucaud *et al.*, 2007); atividade citotóxica celular (Caco-2) *in vitro* avaliada pelo ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), baseado na redução do sal de tetrazólio a cristais de formazano (Riss *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físico-químicas da matéria-prima

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas da matéria-prima estão disponibilizados na Tabela 1. As análises de densidade real, densidade aparente, porosidade e diâmetro médios das partículas são dados importantes na definição do preenchimento do leito de extração e estão relacionadas com a forma da permeação dos solventes para o interior das partículas, bem como com o tamanho das superfícies que entram diretamente em contato com os solventes. Estes dados interferem diretamente no rendimento da extração e na forma com que o solvente define os caminhos de permeação no leito de partículas, arrastando os compostos com maior eficiência (Fraga *et al.* 2021).

Os resultados encontrados para fibra bruta ($\approx 19\%$) e proteínas totais ($\approx 17\%$)

demonstram que as sementes de caferana são promissoras para aplicação na alimentação humana. A presença de fibras e de proteínas nos alimentos de origem vegetal podem auxiliar na redução da absorção da gordura, do índice glicêmico e na alteração da velocidade de absorção dos carboidratos refinados que, ao serem absorvidos lentamente podem prolongar a saciedade (Sarmiento *et al.*, 2013).

O teor de cinzas totais de 4,76% pode revelar a presença de conteúdo mineral e microelementos como cálcio, fósforo, potássio, ferro e demais minerais nos alimentos. O resultado é compatível com as sementes de caferana pesquisadas por Blank *et al.* (2017) que encontrou potássio (2022.63 mg/100g), fósforo (364.81 mg/100g), cálcio (207.96 mg/100g), enxofre (181.96 mg/100mg), entre outros minerais.

As sementes torradas de caferana apresentaram teores de lipídios maiores do que o encontrado por Blank *et al.* (2017) de 0,30%. No geral, as sementes de frutas apresentam baixos teores de lipídios.

3.2. Cinética de extração e rendimento global dos extratos

Os resultados do rendimento global e do comportamento cinético das extrações, pode ser observado na Figura 1. A extração obteve total médio de $1,36 \pm 0,06$ g, somando $3,76 \pm 0,06\%$ de rendimento global, em relação à matéria-prima ($36,21 \pm 1,11$ g).

Na primeira hora de processo (Figura 1, pontos 0 a 6) o rendimento global foi de 3,34%, correspondendo a cerca 89% do rendimento relativo, demonstrando que esta etapa do processo é governada pelo período de taxa constante de extração (CER) e que o fenômeno de transferência de massa predominante é por convecção (Sovová, 1994).

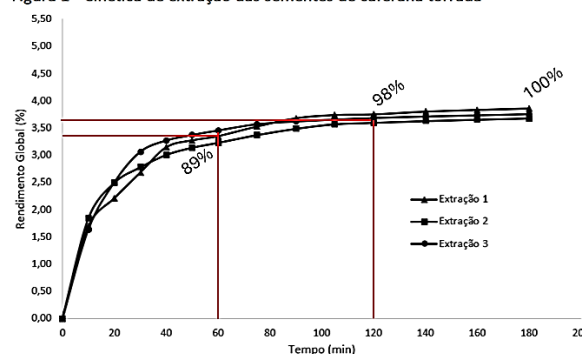
Do ponto 7 até o ponto 10 (2 horas de extração) inicia-se o período de taxa decrescente de extração (FER), onde começam as falhas nas camadas superficiais do soluto e o número de células rompidas já não apresenta uniformidade. Dos pontos 11 até o ponto 13 (3 horas) o período difusional (DC) inicie-se, onde a extração já não apresenta crescimento da taxa de rendimento global e a curva tende a valores praticamente constantes (Sovová, 1994). Considerando a viabilidade econômica como consumo de solvente, energia e trabalho do operador, somada às condições técnicas observadas, o processo de extração deverá ser interrompido em 120 minutos, com rendimento do extrato chegando a 3,68% correspondendo a 98% do total da extração. Para o tempo de 120 minutos o consumo de solvente foi na proporção de 15/1 (g solvente/g de matéria-prima).

Tabela 1 - Resultados físico-químicos das sementes de caferana torradas

Tipo de análise	Resultado
Densidade real das partículas (g/cm^3)	$1,529 \pm 0,001$
Densidade aparente do leito de partículas (g/cm^3)	$0,91 \pm 0,03$
Porosidade (ϵ)	$0,40 \pm 0,02$
Diâmetro médio das partículas (μm)	$324,14 \pm 2,51$
Teor de umidade Karl Fischer (%)	$13,73\% \pm 1,67$
Teor de voláteis totais (%)	$5,86\% \pm 0,27$
Teor de cinzas totais (%)	$4,76\% \pm 0,13$
Teor de fibra alimentar (%)	$19,47\% \pm 0,32$
Teor de lipídios totais (%)	$2,26\% \pm 0,23$
Teor de proteínas totais (%)	$16,70\% \pm 0,06$

Fonte: Autores, 2025.

Figura 1 - Cinética de extração das sementes de caferana torrada

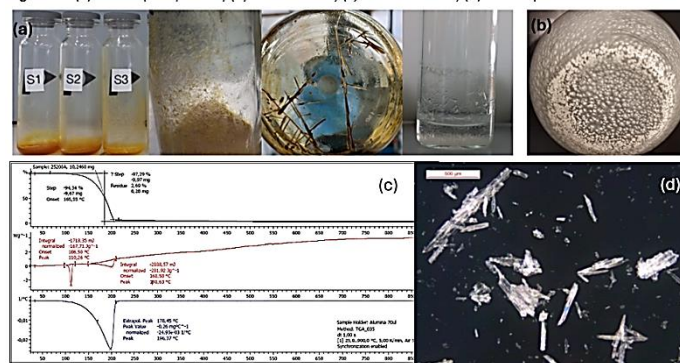


Fonte: Autores, 2025

3.3. Isolamento, purificação e quantificação do alcaloide presente no extrato concentrado

A análise visual da fração 2 pode ser observada na Figura 2a, onde é possível a visualização dos cristais precipitados em formato de agulhas, que ficaram aderidos nas laterais do vidro coletor. Após o isolamento e

Figura 2 – (a) cristais precipitados, (b) cristais secos, (c) análise de TGA, (d) cristais puros da δ -Lactama



Fonte: Autores, 2025

a purificação do alcaloide, o cristal seco (Figura 2b) resultante foi pesado e atingiu 0,49% de rendimento em relação à matéria-prima aplicada na extração supercrítica, conferindo resultado expressivo em termos de composto purificado, que apresentou pureza com cerca de 94 a 98% e ponto de fusão de torno de 106 °C, conforme apresentado na análise de termografia TGA (Figura 2c). O cristal foi analisado por refração de raio X (Figura 2d) para confirmar a pureza, a forma cristalina e a estrutura da δ -Lactama,

conforme isolado pela primeira vez por Fraga *et al.* (2021).

3.4. Avaliação da capacidade antioxidante e citotoxicidade dos extratos e do alcaloide purificado

Os resultados da avaliação do teor de fenólicos totais (TPC) e da capacidade antioxidante dos extratos e do alcaloide podem ser observados na Tabela 2. A fração 2 apresentou o melhor resultado para o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante nos três métodos analisados. Este resultado demonstra a possibilidade de ação sinérgica entre os demais compostos presentes no extrato da fração 2 e a δ -Lactama, pois os resultados de TPC e dos três métodos de análises de antioxidantes da δ -Lactama foram bem mais baixos do que os apresentados na fração 2, bem como na fração 1 e fração 3. Fraga *et al.* (2023) estudou sementes de caferana *in natura* e encontrou valores de 1,59 mg AGE/g, valores menores do que os encontrados nas três frações do extrato analisadas neste trabalho.

Os estudos referentes a atividade antioxidante e citotóxica celular *in vitro* para os extratos das

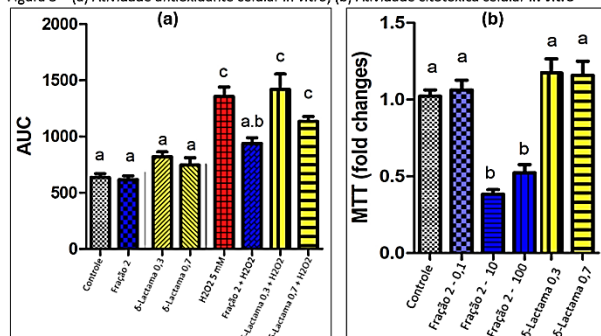
Tabela 2- Resultado das análises dos extratos

Análises	Fração 1	Fração 2	Fração 3	D-Lactama Purificada
Fenólicos totais (mg AGE g ⁻¹)	4,23 ± 0,08	22,38 ± 0,44	2,13 ± 0,08	0,50 ± 0,01
ABTS (μ mol TE g ⁻¹)	28,22 ± 1,44	703,33 ± 6,08	23,99 ± 1,00	14,49 ± 0,10
DPPH (μ mol TE g ⁻¹)	12,49 ± 0,22	129,33 ± 2,15	8,19 ± 0,35	6,42 ± 0,04
FRAP (μ mol TE g ⁻¹)	12,57 ± 0,70	147,57 ± 3,91	11,75 ± 0,56	Não detectada

Fonte: Autores, 2025.

sementes da caferana, bem como para a δ -Lactama purificada são inéditos na literatura. As células Caco-2 foram pré-tratadas com o extrato da fração 2 (0,1 mg/ml), com δ -Lactama (0,3 e 0,7 mg/ml) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 5 mM) durante 1 h. É possível observar na Figura 3a que as células tratadas apenas com os extratos não apresentaram diferença em relação ao controle. As células tratadas com H₂O₂ tiveram um

Figura 3 – (a) Atividade antioxidante celular *in vitro*, (b) Atividade citotóxica celular *in vitro*



Fonte: Autores, 2025

aumento na fluorescência, conforme esperado, indicando aumento na produção de EROs. A pré-exposição com o extrato da fração 2 inibiu a oxidação (diminuiu a fluorescência) voltando a níveis similares ao controle, comprovando a eficiência da fração 2 na proteção celular contra a oxidação. A δ -Lactama não foi capaz de inibir a oxidação em nenhuma das concentrações. A fração 2 em concentração de 0,1 mg/ml foi escolhida para a avaliação da atividade antioxidante por não apresentar toxicidade na análise

MTT, como pode ser observado na Figura 3b, semelhante aos resultados para a δ -Lactama nas duas concentrações testadas. Já, a fração 2 em concentrações de 10 e 100 mg/ml (Figura 3b) reduziu significativamente a viabilidade das células *in vitro*, demonstrando que as duas concentrações provocaram a morte de mais de 50% das células. Este resultado indica possível toxicidade do extrato das sementes de

caferana em altas concentrações, bem como o efeito sinérgico da δ -Lactama com os demais compostos presentes na fração 2 dos extratos.

4. CONCLUSÕES

As sementes da caferana apresentam altos teores de fibras, proteínas e alcaloides, indicando potencial bioativo e benéfico à saúde, como divulgado pelo conhecimento ancestral. A δ -Lactama não apresenta atividade citotóxica nas concentrações testadas (até 0,70 mg/mL) e a fração 2 do extrato das sementes torradas apresentou alta atividade antioxidante, tanto nos testes ABTS, DPPH, FRAP como nas células *in vitro*, revelando potencial ação de outros compostos bioativos presentes, que atuam em sinergia com a δ -Lactama. Estes resultados são indicadores potenciais para a continuidade das pesquisas na busca de elucidação destes outros compostos bioativos. A extração fracionada supercrítica aplicando CO₂ como solvente *verde*, mostrou resultados promissores na obtenção de frações de extratos com diferenciação de constituição bioativa, da ação antioxidante e da ação citotóxica, sendo capaz de produzir extratos de alta pureza, sem resíduos de solventes orgânicos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBAS, H. A. *et al.* Novel Neuroprotective Potential of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC against Lipopolysaccharide Induced Alzheimer's Disease in Mice. *Plants*, v. 11, n. 14, 2022.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 16th. ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1997.
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. In: AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. 6th. ed. Champaign: AOCS Press, 1998. v. Ca-23-55, p. 6–10.
- BLANK, D. E. *et al.* Proximate Composition, Nutrient Mineral and Fatty Acid of the *Bunchosia glandulifera* Fruit. *Journal of Food and Nutrition Research*, United States, v. 5, n. 8, p. 575–578, 2017.
- BORGUINI, R. G. *et al.* Chemical composition of caferana (*Bunchosia armeniaca*) fruit: a rich source of lycopene. *Diversitas Journal*, v. 7, n. 4, p. 2297–2304, 2022.
- Foucaud, L. *et al.* Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicology Letters*, 174(1–3), 1–9. 2007.
- FRAGA, S. *et al.* Caferana seeds (*Bunchosia glandulifera*) as a new source of nutrients: Evaluation of the proximal composition, solvent extraction, bioactive compounds, and δ -lactam isolation. *Food Chemistry: X*, v. 12, 2021.
- Fraga, S. *et al.* Antioxidant activity and technological potential of caferana (*Bunchosia glandulifera*). *Anais Do 15º SLACAN - Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição.*, 406963, 21252–21252.
- IAL, I. A. L. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. In O. Zenebon, N. S. Pascuet, & P. Tiglea (Eds.), Instituto Adolfo Lutz (IV ed. 1a). Instituto Adolfo Lutz. 200
- PEIXOTO, C. R. M. *et al.* Voltametric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Amsterdã, v. 799, n. 2017, p. 519–524, 2017.
- PEREIRA, G. S. L. *et al.* Extraction of bioactive compounds from *Butia capitata* fruits using supercritical carbon dioxide and pressurized fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 199, p. 1–7, 2023.
- RAHMAN, M. S. *et al.* Density, shrinkage and porosity of calamari mantle meat during air drying in a cabinet dryer as a function of water content. *Journal of Food Engineering*, v. 30, n. 1, p. 135–145, 1996.
- Rasera, G. B. *et al.* Biologically active compounds from white and black mustard grains: An optimization study for recovery and identification of phenolic antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 135, 294–300. 2019
- Riss TL. *Et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* [internet]. 2016.
- SANTANA, Á. L. *et al.* Pressurized liquid- and supercritical fluid extraction of crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*): Obtaining of bioactive compounds and mathematical modeling. *Food and Bioproducts Processing*, v. 117, p. 194–202, 2019.
- Sarmiento *et al.* Fibra alimentar-Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo Dietary fiber-Adequate intake and effects on metabolism health. In *Arq Bras Endocrinol Metab*. Vol. 57, n 6, 2013.
- Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ - I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Journal*, 49(3), 409–414. 1994.
- WILCOX, R. A. *et al.* A Method for Determining and Expressing the Size of Feed Particles by Sieving. *Poultry Science*, Amsterdã, v. 49, n. 1, p. 9–13, 1970.