

**“*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira”**

**FERNANDA FRAGA PESSANHA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
JUNHO – 2010**

**“*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira”**

**FERNANDA FRAGA PESSANHA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
JUNHO – 2010

**“*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira”**

## **FERNANDA FRAGA PESSANHA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira

Aprovada em 07 de junho de 2010

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Michelle Frazão Muzitano (DSc, Química de Produtos Naturais) UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Silvia Menezes de Faria Pereira (DSc, Engenharia e Ciência dos Materiais) UENF

---

Prof. Eder Dutra Resende (DSc, Engenharia Química) UNICAMP

---

Prof<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (DSc, Química de Produtos Naturais) UENF

À minha mãe por todo incentivo ao estudo e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a FAPERJ pelo suporte financeiro;

Agradeço a UENF, pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

Agradeço às professoras Michelle Frazão Muzitano, Silvia Menezes de Faria Pereira e Karla Ferreira da Silva por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Agradeço à Professora Daniela Barros de Oliveira, por ter aceitado me orientar, por todo ensinamento e aprendizado;

Agradeço à Professora Michelle Frazão Muzitano, que me auxiliou nos momentos de ausência da minha orientadora;

Agradeço a Deus por me ajudar a completar mais essa etapa da minha vida, que esteve presente do meu lado sempre;

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, torcendo, acreditando, incentivando, essa etapa da minha vida é dedicada a vocês;

Aos meus amigos do laboratório Natalia, Shalline, Clara, Lorena, Larissa e Cristiano, obrigado pela ajuda, sempre disponíveis nas horas em que precisei.

Agradeço aos funcionários do LTA, Silvia e Valdinéia por todo apoio técnico;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xx</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 – Alimentos funcionais.....	4
3.2 - Radicais livres e Substâncias Antioxidantes.....	6
3.2.1 – Métodos de determinação da atividade antioxidante.....	7
3.3 – Compostos fenólicos.....	8
3.3.1– Ácidos fenólicos.....	9
3.3.2– Flavonóides.....	10
3.3.3 – Taninos e Fenóis Totais.....	12
3.4 – Outras substâncias com poder antioxidante.....	13

3.4.1 – Vitamina C.....	13
3.5 – Pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	14
3.5.1 – Constituintes químicos polares isolados a partir de pitangueira	16
3.5.2 – Atividades biológicas descritas.....	18
<b>4 – METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
4.1. – Coleta de material vegetal.....	22
4.2 – Preparo dos extratos.....	22
4.2.1- Frutos de pitangueira.....	22
4.3 – Análises cromatográficas.....	24
4.3.1 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada do extrato, do sobrenadante e das frações.....	24
4.3.2 – Avaliação do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
4.4 – Métodos de determinação de atividade antioxidante.....	26
4.4.1 – Avaliação qualitativa de atividade antioxidante.....	26
4.4.2 – Avaliação espectrofotométrica de atividade antioxidante.....	26
4.4.3 – Análise de atividade antioxidante pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	27
4.4.4 – Análise da atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio (SNP) .....	28
4.5 – Determinação do teor de Vitamina C (Ácido Ascórbico) .....	28
4.5.1 – Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	28
4.5.2 – Método titulométrico .....	29
4.6 – Determinação de Taninos e Fenóis Totais .....	30
4.6.1 – Método para Dosagem de Taninos Hidrolisáveis.....	30
4.6.2 – Método para Dosagem de Taninos Condensados .....	31
4.6.3 – Método de Dosagem de Fenóis Totais .....	32
<b>6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>

6.1 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato, do sobrenadante e das frações.....	34
6.2 – Avaliação do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	37
6.3 – Avaliação qualitativa de atividade antioxidante .....	61
6.4 – Avaliação espectrofotométrica de atividade antioxidante .....	62
6.5 – Análise de atividade antioxidante pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	68
6.6 – Análise da atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio (SNP).....	76
6.7 – Determinação do Teor de Vitamina C (Ácido Ascórbico).....	77
6.7.1 – Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	77
6.8 – Determinação de Taninos e Fenóis Totais.....	80
<b>7 – RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Antioxidantes sintéticos BHA e BHT.....	02
Figura 2 – Exemplos de estruturas de substâncias que conferem benefícios à saúde.....	05
Figura 3 – Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonóide).....	08
Figura 4 – Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos.....	10
Figura 5 – Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.....	10
Figura 6 – Estrutura química base (difetilpropano) dos flavonóides.....	11
Figura 7 – Biossíntese de flavonóides.....	11
Figura 8– Estruturas de Taninos Hidrolisáveis: Galotanino e Elagitanino.....	12
Figura 9– Estrutura de tanino condensado.....	13
Figura 10 - Estrutura da vitamina C.....	14
Figura 11 – Frutos de pitangueira em vários estádios de maturação.....	15
Figura 12 – Estrutura química da miricetina, kaempferol e quercetina.....	16
Figura 13 – Estrutura química da galocatequina.....	16
Figura 14 –. Estrutura química da miricitrina.....	16

Figura 15 – Estrutura química da oenoteína B.....	17
Figura 16 – Estrutura química da eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2.....	17
Figura 17 - Estrutura química de cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo..	17
Figura 18 - Padrões fenólicos de quercetina e rutina.....	34
Figura 19 - Cromatograma dos padrões quercetina e rutina após revelação com sulfato cérico em CCD.....	35
Figura 20 - Cromatograma do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira após revelação com sulfato cérico em CCD.....	36
Figura 21 - Cromatograma do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira coinjetadas com os padrões quercetina e rutina após revelação com sulfato cérico em CCD.....	37
Figura 22 - Cromatograma 1, perfil químico do padrão quercetina avaliado por CLAE.....	38
Figura 23 - Cromatograma 2, perfil químico do padrão rutina avaliado por CLAE...	39
Figura 24 - Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	40
Figura 25 - Espectros de ultravioleta dos padrões quercetina (A) e rutina (B).....	40
Figura 26 - Cromatograma 3, perfil químico do padrão ácido ascórbico avaliado por CLAE.....	41
Figura 27 - Cromatograma 4, perfil químico do padrão ácido benzóico avaliado por CLAE. ....	42
Figura 28 - Cromatograma 5, perfil químico do padrão ácido ftálico avaliado por CLAE.....	42
Figura 29 – Espectro de ultravioleta do padrão ácido ftálico.....	43
Figura 30 - Cromatograma 6, perfil químico do padrão ácido gálico avaliado por CLAE. ....	43
Figura 31 – Espectro de ultravioleta do padrão ácido gálico.....	44
Figura 32 - Cromatograma 7, perfil químico do padrão ácido salicílico avaliado por CLAE.....	44
Figura 33 – Espectro de ultravioleta do padrão ácido salicílico.....	45

Figura 34 - Cromatograma 8, perfil químico do padrão BHT avaliado por CLAE.....	46
Figura 35 - Cromatograma 9, perfil químico do extrato aquoso dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.....	47
Figura 36 - Cromatograma 10, perfil químico da co-cromatografia do extrato aquoso dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.....	48
Figura 37 - Cromatograma 11, perfil químico do sobrenadante dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.....	48
Figura 38 - Cromatograma 12, perfil químico da co-cromatografia do sobrenadante dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.....	49
Figura 39 - Cromatograma 13, perfil químico da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE. ....	50
Figura 40 - Espectro de ultravioleta dos sinais obtidos no cromatograma da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira.....	51
Figura 41 - Cromatograma 14, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e do padrão quercetina avaliado por CLAE.....	51
Figura 42 - Cromatograma 15, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e do padrão rutina avaliado por CLAE.....	52
Figura 43 - Cromatograma 16, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.....	53
Figura 44 - Cromatograma 17, perfil químico da fração butanólica dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE. ....	54
Figura 45 - Espectro dos sinais obtidos no cromatograma da fração butanólica dos frutos de pitangueira.....	55
Figura 46 - Cromatograma 18, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e do padrão quercetina avaliado por	

CLAE.....	56
Figura 47 - Cromatograma 19, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e do padrão rutina avaliado por CLAE.....	57
Figura 48 - Cromatograma 20, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.....	58
Figura 49 - Cromatograma do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões quercetina e rutina após revelação com DPPH em CCD.....	62
Figura 50 - Cromatograma 21 a 515nm do padrão quercetina antes e depois da reação com DPPH.....	68
Figura 51 - Cromatograma 22, a 515nm do padrão rutina antes e depois da reação com DPPH.....	69
Figura 52 - Cromatograma 23, a 515nm do padrão ácido ascórbico antes e depois da reação com DPPH.....	69
Figura 53 - Cromatograma 24, a 515nm do padrão ácido benzóico antes e depois da reação com DPPH.....	70
Figura 54 - Cromatograma 25, a 515nm do padrão ácido ftálico antes e depois da reação com DPPH.....	70
Figura 55 - Cromatograma 26, a 515nm do padrão ácido gálico antes e depois da reação com DPPH.....	71
Figura 56 - Cromatograma 27, a 515nm do padrão ácido salicílico antes e depois da reação com DPPH.....	71
Figura 57 - Cromatograma 28, a 515nm do padrão BHT antes e depois da reação com DPPH.....	72
Figura 58 - Cromatograma 29, a 515 nm do extrato aquoso antes e depois da reação com DPPH.....	73
Figura 59 - Cromatograma 30, a 515 nm do sobrenadante dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.....	74

Figura 60 - Cromatograma 31, a 515 nm da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.....	74
Figura 61 - Cromatograma 32, a 515 nm da fração butanólica dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.....	75
Figura 62 - Cromatograma 33, perfil químico a 254 nm de vitamina C dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.....	78
Figura 63 - Cromatograma 34, perfil químico a 254 nm de vitamina C do sumo dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.....	78

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Substância isolada e respectiva atividade biológica.....	20
Tabela 2: Gradiente de concentração dos solventes (CLAE-UV).....	25
Tabela 3: Dados de tempo de retenção, área e área percentual dos padrões.....	46
Tabela 4: Dados de massa (em µg) injetada de quercetina e as respectivas áreas obtidas .....	59
Tabela 5: Dados de massa (em µg) injetada de rutina e as respectivas áreas obtidas .....	60
Tabela 6: Estruturas dos padrões utilizados para análise.....	63
Tabela 7: Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões em uma concentração maior de DPPH (1,2mM).....	64
Tabela 8: Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões em uma concentração intermediária de DPPH (0,6mM).....	65
Tabela 9: Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões na concentração menor de DPPH (0,1mM).....	66
Tabela 10: Resumo dos valores de atividade antioxidante das frações dos frutos de pitangueira na concentração de 1000 µg/mL em todas as concentrações analisadas de DPPH.....	67

Tabela 11: Atividade antioxidante dos padrões analisados por CLAE.....	73
Tabela 12: Atividade antioxidante do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira analisados por CLAE.....	75
Tabela 13: Dados obtidos nas análises de taninos hidrolisáveis e taninos condensados dos frutos de pitangueira.....	80
Tabela 14: Dados obtidos na análise de fenóis totais dos frutos de pitangueira.....	81

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Substâncias isoladas a partir de pitangueira de acordo com a parte estudada.....	18
Gráfico 2: Atividades biológicas apresentadas na pitangueira.....	20
Gráfico 3: Curva padrão da área do pico x massa (em $\mu\text{g}$ ) injetada de quercetina obtida a partir dos valores apresentados na tabela.....	59
Gráfico 4: Curva padrão da área do pico x massa (em $\mu\text{g}$ ) injetada de rutina obtida a partir dos valores apresentados na tabela.....	60
Gráfico 5: Seqüestro de NO doado por SNP.....	76
Gráfico 6: Resultados obtidos de vitamina C nas amostras estudadas (n =3).....	79

## ABREVIações

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
NO	Óxido Nítrico
SNP	Nitroprussiato de Sódio
<i>i</i> NOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
RL	Radicais Livres
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
AA	Atividade Antioxidante
AT	Análise de Taninos
FT	Fenóis Totais
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
RF	Fatores de Retenção
TR	Tempo de Retenção
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
IC 50	Concentração inibitória 50%
EBV	Epstein-Barr virus

## RESUMO

PESSANHA, F. F. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2010. “*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira”. Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc. Banca Avaliadora: Michelle Frazão Muzitano, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc.; Karla Silva Ferreira, D.Sc.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico dos frutos de pitangueira, *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e avaliar a atividade antioxidante, o teor de vitamina C, de taninos e fenóis totais, o que em tese pode justificar seu uso como alimento funcional. Foi realizada uma extração líquido-líquido a partir do sobrenadante (S), oriundo da precipitação etanólica do extrato aquoso dos frutos de pitangueira com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as seguintes frações: diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e butanol (FB). O conhecimento do perfil químico do extrato, do sobrenadante e

das frações possibilitou a quantificação dos flavonóides quercetina e rutina. O extrato aquoso, o sobrenadante, as frações e os padrões foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante, onde a fração em acetato de etila apresentou um maior potencial antioxidante. Para a análise do teor de vitamina C, a fruta apresentou maior teor de vitamina C em comparação ao sumo da fruta. A partir das análises de taninos e fenóis totais dos frutos, não foram detectados taninos hidrolisáveis, e os teores de taninos condensados e fenóis totais apresentaram baixas concentrações, ou seja, a capacidade antioxidante do extrato aquoso não está relacionada a esse fator somente. Sendo assim, este trabalho permitiu conhecer o perfil químico das substâncias polares dos frutos de pitangueira até então nunca estudadas e avaliar sua atividade antioxidante, contribuindo para a compreensão científica do seu uso popular como alimento funcional.

## ABSTRACT

PESSANHA, F. F. MSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June 2010. "*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): characterization and evaluation of phenolic compounds, vitamin C and antioxidant activity of the fruits of Surinam." Professor Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc. Banker Appraiser: Michelle Frazão Muzitano, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc., Karla Silva Ferreira, D.Sc.

This work was conducted at the Laboratory of Food Technology of the Center for Agricultural Science and Technology, University of Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. The aim of this study was to evaluate the chemical profile of the fruits of Surinam cherry, *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and their antioxidant activity, the level of vitamin C, tannin and total phenols, which in theory can justify their use as functional food. We performed a liquid-liquid extraction from the supernatant (S), derived from the ethanol precipitation of the aqueous extract of the fruits of Surinam cherry with solvents in order of increasing polarity, yielding the following fractions: dichlorometan (FD), ethyl acetate (FA) and butanol (FB). Knowledge of the chemical profile of the extract, the supernatant fractions and

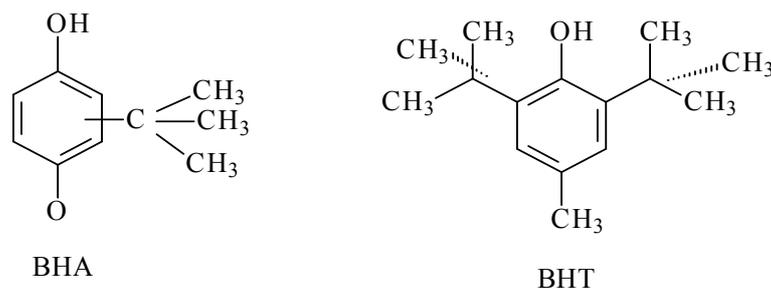
allowed the quantification of the flavonoids quercetin and rutin. The aqueous extract, the supernatant fractions and standards were evaluated for their antioxidant activity, where the fraction in ethyl acetate showed a higher antioxidant potential. For the analysis of vitamin C, fruit showed higher contents of vitamin C compared to fruit juice. From the analysis of tannins and total phenolics of the fruit, not hydrolysable tannins were detected and the levels of condensed tannins and total phenols showed low concentrations, the antioxidant capacity of the aqueous extract is not related to this factor alone. Therefore, this study helped identify the chemical profile of polar substances from the fruits of Surinam cherry never studied and evaluate its antioxidant activity, contributing to the scientific understanding of its popular use as functional food.

## 1. INTRODUÇÃO

O grande interesse no estudo de compostos antioxidantes se deve à capacidade dos mesmos em neutralizar radicais livres, os quais são responsáveis pelo aparecimento de diversas doenças. Estudos epidemiológicos e clínicos têm associado a presença de antioxidantes na alimentação com a menor incidência de alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (Zanfini et al., 2010; Riboli & Norat, 2003).

No século passado, a partir dos anos 80, deu-se o início as pesquisas com antioxidantes naturais que pudessem agir sozinhos ou sinergicamente com outras substâncias, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos (BHT – butil-hidroxi-tolueno e BHA – butil-hidroxi-anisol) (Figura 1) (Broinizi et al., 2007), dos quais muitos pesquisadores relatam efeitos adversos como carcinogenicidade e toxicidade (Mariod et al., 2010).

Além dos possíveis riscos que o uso irregular e/ou indiscriminado dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao homem, soma-se a rejeição generalizada dos aditivos alimentares sintéticos (Broinizi et al., 2007).



**Figura 1:** Antioxidantes sintéticos BHA e BHT (Fonte: Ramalho & Jorge, 2006).

Algumas frutas e vegetais são considerados alimentos funcionais por apresentarem substâncias que trazem benefícios à saúde, como por exemplo, os compostos fenólicos (flavonóides, taninos, dentre outras) e a vitamina C, os quais são considerados compostos antioxidantes (Broinizi et al., 2007, Ajaikumar et al., 2005).

Estas substâncias apresentam-se amplamente distribuídas no reino vegetal; como por exemplo, em pitanga. A pitanga (*Eugenia uniflora* L. – Myrtaceae) é uma espécie vegetal endêmica da região Norte Fluminense (Assumpção & Nascimento, 2000) e apresenta substâncias fenólicas com ação antioxidante, ação hipoglicemiante e antireumáticas, também são utilizadas em distúrbios estomacais e como anti-hipertensiva (Aurichio & Bacchi, 2003).

Desta forma, este trabalho tem como enfoque principal avaliar a composição química no que se refere às substâncias polares e a atividade antioxidante e um possível uso dos frutos desta fonte vegetal como um alimento funcional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Conhecer o perfil químico dos frutos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), com enfoque sob a utilização dos frutos como alimento funcional.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o teor dos flavonóides quercetina e rutina, dos ácidos fenólicos ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico e ácido salicílico e os padrões ácido ascórbico e BHT nos extratos e frações a partir dos frutos de pitangueira através de métodos cromatográficos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos frutos de pitangueira a partir de métodos cromatográficos e espectrofotométricos;
- Determinar o teor de vitamina C nos frutos de pitangueira;
- Determinar o teor de taninos e fenóis totais nos frutos de pitangueira.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Alimentos Funcionais**

Alimento funcional é aquele que permite demonstrar, de forma satisfatória, uma relação entre seu consumo e um efeito benéfico em uma ou mais funções do organismo humano, além dos benefícios nutricionais, melhorando o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzindo o risco de doenças para o consumidor (Lima et al., 2009), além do valor nutritivo inerente à sua composição química (Moraes & Colla, 2006).

Os alimentos funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: 1 - Sistema gastrointestinal; 2 – Sistema cardiovascular; 3 - Metabolismo de substratos; 4 - Crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular; 5 - Comportamentos das funções fisiológicas e 6 - Antioxidantes (Moraes & Colla, 2006).

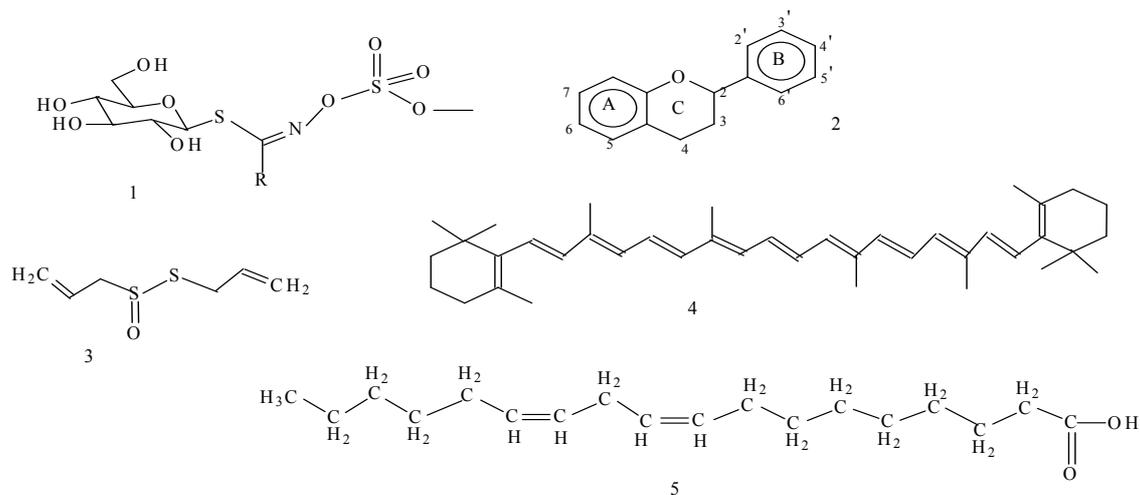
Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características (Moraes & Colla, 2006):

- a) Alimentos consumidos na dieta normal;
- b) Compostos por substâncias naturais, algumas vezes, em elevada ou baixa concentração;
- c) Efeitos positivos como valor básico nutritivo e redução do risco de ocorrência de doenças;
- d) Propriedade funcional com embasamento científico;

- e) Um alimento natural, ou um alimento no qual uma substância tenha sido removida;
- f) Um alimento em que a natureza de uma ou mais substâncias tenham sido modificadas;
- g) Um alimento no qual a bioatividade de uma ou mais substâncias tenham sido modificadas.

Moraes & Colla definem os alimentos funcionais como os alimentos que possuem em sua composição um grupo de substâncias que apresentam benefícios à saúde, tais como as alicinas presentes no alho, os carotenóides e flavonóides encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos encontrados nos vegetais crucíferos, os ácidos graxos poliinsaturados presentes em óleos vegetais e óleo de peixe (Figura 2).

Desta forma, estas substâncias podem ser consumidas juntamente com os alimentos dos quais são provenientes e a grande maioria destas moléculas pode ser antioxidante e estar atuando como seqüestrante de radicais livres.



**Figura 2:** Exemplos de estruturas de substâncias que conferem benefícios à saúde: 1- Glucosinolato; 2- Flavonóide; 3- Alicina; 4- Carotenóide; 5- Ácido Graxo. (Fonte: Simões, 1999).

### 3.2. Radicais Livres e Substâncias antioxidantes

Os radicais livres são substâncias que carregam um elétron desemparelhado, são altamente reativos e são produzidos no curso de muitos processos fisiológicos, especialmente na cadeia respiratória, pela redução parcial do oxigênio e oxidações catalisadas pelas oxigenases. Estas reações são muito comuns, uma vez que, o oxigênio é um ótimo aceptor de elétrons, formando as denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Meotti, 2006).

As EROs incluem radicais livres, como radicais hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ); bem como moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ); ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ânion hidroxila ( $\text{HO}^-$ ), entre outros. Estas moléculas possuem uma grande reatividade e são responsáveis por muitas desordens celulares e pelo desenvolvimento de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, aterosclerose, catarata e inflamação crônica (Ali et al. 2008).

Os antioxidantes são substâncias sintéticas ou naturais adicionadas em produtos para prevenir ou retardar a deterioração dos mesmos pela ação do oxigênio presente no ar e podem ser classificados como endógenos ou exógenos (Gonçalves, 2008; Huang et al., 2005).

Os antioxidantes endógenos são compostos com ação biológica, e podem ser moléculas protéicas com grupos tiólicos como as metalotioneínas, as enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase e catalase, ou ainda, moléculas não-protéicas como a glutathione, enquanto os antioxidantes exógenos são substâncias adquiridas a partir da alimentação como a vitamina C, o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -tocoferol, o licopeno e os flavonóides (Degáspari & Waszczyński, 2004; Evans et al., 1997).

Os antioxidantes protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por radicais oxidativos (Meotti, 2006; Halliwell et al, 1995). Assim, sob condições normais, os sistemas antioxidantes celulares minimizam os danos causados pelas EROs, porém, quando a produção de radicais livres excede a capacidade protetora da célula tem-se o estresse oxidativo que está relacionado com uma série de patologias, como nos processos

neurodegenerativos e em outras desordens como câncer, catarata, isquemia, diabetes mellitus, envelhecimento precoce e cirrose hepática (Havsteen, 2002).

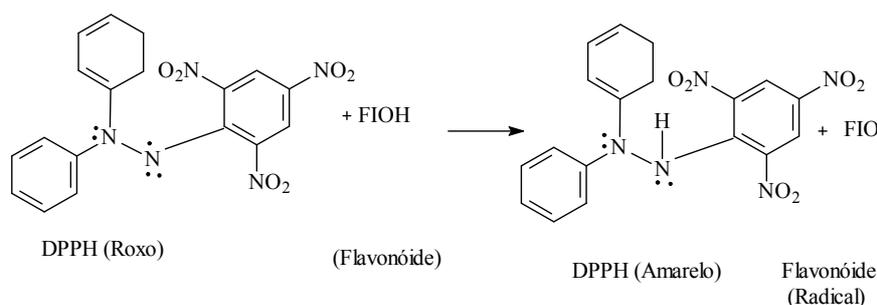
### **3.2.1. Métodos de determinação da atividade antioxidante**

Os efeitos que espécies oxidantes produzem sobre o organismo tornaram-se alvo de interesse e intensa investigação científica. (Magina, 2008; Chisolm e Steinberg, 2000). Todavia, a medida da atividade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em um extrato ou uma amostra biológica, proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados (Gonçalves, 2008; Ghiselli et al., 2000).

Contudo, é necessário enfatizar que os ensaios realizados *in vitro* são limitados e não existe nenhuma similaridade com sistemas biológicos reais (Huang et al., 2005).

As metodologias para a determinação da atividade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, recomenda-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente a atividade antioxidante total de uma amostra (Gonçalves, 2008; Huang et al., 2005; Prior et al., 2005).

Um método simples e rápido para a avaliação da atividade antioxidante é o do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) através de leitura espectrofotométrica. Este método foi proposto por Brand – Williams et al. (1995), que consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre DPPH, de coloração violeta que absorve em 515 nm. Por ação de uma substância antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância, conforme a Figura 3 (Sousa et al., 2007).



**Figura 3:** Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonóide) (*Fonte: Amié et al., 2003*).

Outro método para determinação da atividade antioxidante é o do nitroprussiato de sódio (SNP). Este método avalia a capacidade dos extratos em seqüestrar o NO (óxido nítrico – radical livre) (Slusarczyk et al., 2009).

Este método foi escolhido também para a avaliação das amostras como antioxidantes, devido ao óxido nítrico (NO) exercer importantes funções no sistema imunológico, como no controle de doenças infecciosas, auto-imunes, tumorais e doenças crônicas degenerativas (Bogdan, 2001). No que se refere à inflamação, tanto a inibição da produção de NO, quanto a atividade seqüestradora de radicais livres podem estar associadas a uma melhora no quadro patológico (Huang et al., 2007).

A eficácia da atividade antioxidante depende da concentração destes fitoquímicos presentes nos alimentos, como por exemplo, os carotenóides, os compostos fenólicos e a vitamina C. Todavia, os principais responsáveis por essa ação antioxidante são os compostos fenólicos (Melo et al., 2006).

### 3.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são originários do metabolismo secundário das plantas e se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações ultravioleta, dentre outros (Ângelo & Jorge, 2007; Naczk & Shahidi, 2004).

Essas substâncias encontram-se largamente distribuídas nas fontes vegetais e são um grupo muito diversificado de derivados de fenilalanina e tirosina. Os fenólicos, nas plantas, são essenciais no crescimento e reprodução

dos vegetais, além de atuar como agente antipatogênico e contribuir na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (Ângelo & Jorge, 2007; Naczki et al., 2004).

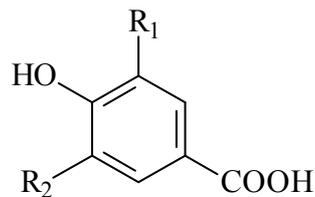
As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas a exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores concentrações na polpa, do que no suco da fruta. Pimenta-verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destas substâncias (Pimentel et al., 2005).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (Lee et al., 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonóides, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis, os quais possuem atividade antioxidante comprovada (Ângelo & Jorge, 2007).

### **3.3.1. Ácidos fenólicos**

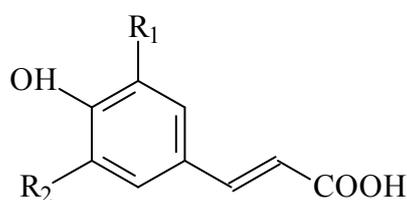
Os ácidos fenólicos constituem um grupo dos compostos fenólicos e caracterizam-se por possuir um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (Soares, 2002; Ferguson & Harris, 1999).

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico (Figura 4) e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 5). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C6–C1; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como por exemplo, os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (Ângelo & Jorge, 2007).



Ácido p-hidroxibenzóico: R1 = R2 = H; Ácido protocatéquico: R1 = OH, R2 = H; Ácido vanílico: R1 = OCH3, R2 = H; Ácido siríngeo: R1 = R2 = OCH3

**Figura 4:** Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (*Fonte: Ângelo & Jorge, 2007*).



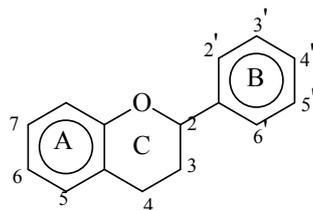
Ácido p-cumárico: R1 = R2 = H; Ácido caféico: R1 = OH, R2 = H; Ácido ferúlico: R1 = OCH3, R2 = H.

**Figura 5:** Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos (*Fonte: Ângelo & Jorge, 2007*).

### 3.3.2. Flavonóides

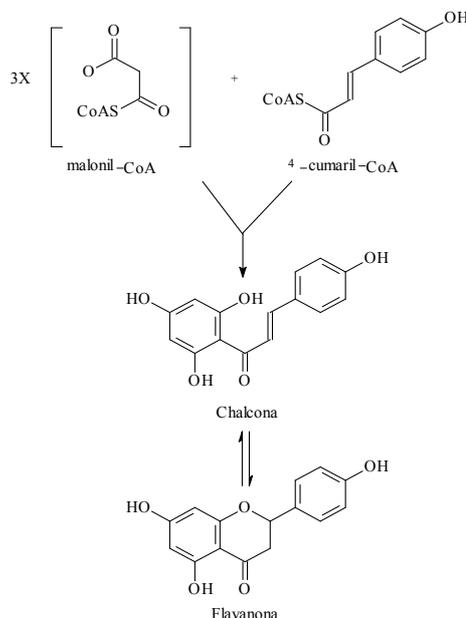
Os flavonóides estão presentes em frutas, vegetais, grãos, sementes, chás e vinhos. Em mamíferos, os flavonóides ocorrem através da dieta, sendo indicada uma média de consumo de 1-2 g de flavonóide por dia (Meotti, 2006; Havsteen, 2002).

Constituem uma família de substâncias com pequenas variações em sua estrutura química. Alguns deles estão ligados a um monossacarídeo (maior parte encontrada na natureza), aumentando sua solubilidade em água e em solventes polares. A porção aglicona (sem o monossacarídeo) constitui-se de difenilpropanos (C6-C3-C6) e está ilustrada na Figura 6 (Meotti, 2006).



**Figura 6:** Estrutura química base (difenilpropano) dos flavonóides (*Fonte: Meotti, 2006*).

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato / malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina conforme a rota biossintética apresentada na Figura 7 (Ângelo & Jorge, 2007).



**Figura 7:** Biossíntese de flavonóides (*Fonte: Hoffman Ribani, 2006*).

As substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides e as variações do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas, antocianidinas, isoflavonol, flavana, isoflavana entre outros (Ângelo & Jorge, 2007; Hollman & Katan, 1999).

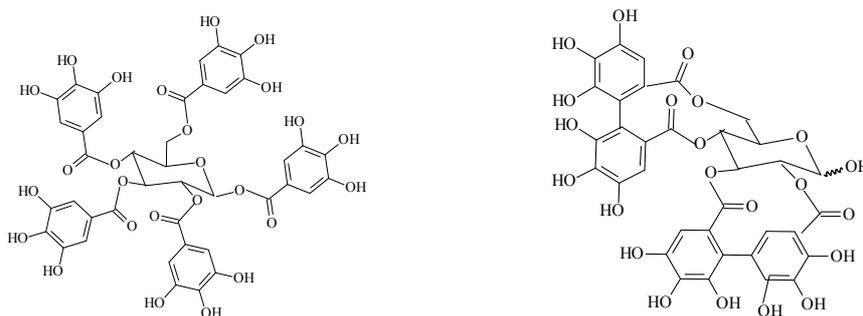
Além de suas propriedades antioxidantes e neutralizadoras de radicais livres, possuem alta capacidade de remover íons de metais pesados, com

potencial de oxirredução, o que também confere proteção à toxicidade das EROs, uma vez que a formação de radicais livres e a oxidação de biomoléculas é catalisada por íons de metais pesados. Interessantemente, esta propriedade quelante de metais torna alguns flavonóides aptos a neutralizarem espécies radicalares usando o próprio metal como agente catalítico (Meotti, 2006).

### 3.3.3. Taninos e Fenóis Totais

Taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton e possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (Monteiro et al., 2005; Mello & Santos, 2001). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (Monteiro et al., 2005; Bruneton, 1991).

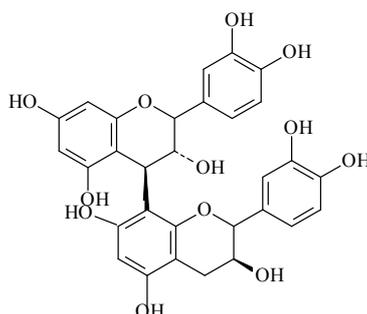
Segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, sendo estes muito mais freqüentes, formados a partir do chiquimato (Monteiro et al., 2005; Heldt, 1997; Bruneton, 1991), onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos de acordo com a Figura 8.



**Figura 8:** Estruturas de Taninos Hidrolisáveis: Galotanino e Elagitanino (*Fonte: Queiroz et al., 2002*).

Largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do

metabolismo do fenilpropanol (Monteiro et al., 2005) de acordo com a Figura 9. As proantocianidinas são assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (Monteiro et al., 2005; Mello & Santos, 2001). Apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos. Os taninos possuem um forte poder antioxidante, podendo atuar no processo de estabilização de radicais livres (Paiva et al., 2002).



**Figura 9:** Estrutura de tanino condensado (*Fonte: Queiroz et al., 2002*).

### 3.4. Outras substâncias com poder antioxidante

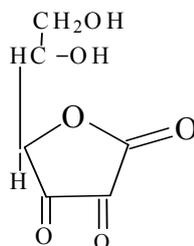
Frutas e vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. Além dos compostos fenólicos, outras substâncias possuem atividade antioxidante comprovada como, por exemplo, as vitaminas C, E e os carotenóides (Broinizi et al., 2007).

#### 3.4.1. Vitamina C

A vitamina C (ácido ascórbico) é, geralmente, consumida em grandes doses pelos seres humanos, sendo adicionada a muitos produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos. Os benefícios obtidos na utilização terapêutica da vitamina C em ensaios biológicos com animais incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos (Moraes & Colla, 2006).

Tem grande importância fisiológica devido à sua participação em diversos eventos no organismo como produção de hormônios e anticorpos, biossíntese de aminoácidos e prevenção de escorbuto. É considerado um antioxidante fisiológico versátil, pois pode exercer ação nos compartimentos intra e extracelulares (Gonçalves, 2008; Bendich & Langseth, 1995).

A vitamina C (Figura 10) funciona como um agente que preserva a integridade do produto, aumentando a sua data de validade podendo contribuir como antioxidante em produtos alimentícios. Sua ação principal está na destruição de radicais livres resultando em produtos metabólicos como o oxigênio. É bastante utilizada na estabilização da cor e do sabor de uma ampla variedade de frutas e vegetais processados na forma de sucos, polpas e outras bebidas (Righetto, 2003).



**Figura 10:** Estrutura da vitamina C. (Fonte: Moraes & Colla, 2006).

### 3.5. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L. - Myrtaceae) é uma planta cultivada na América Central, nas Antilhas, na Flórida, na Califórnia, nas ilhas Havaí, na China Meridional, na Argélia, na Tunísia e até no Sul da França, apresentando boa capacidade de adaptação e de fácil cultivo. No Brasil é o local onde a planta melhor se desenvolve, podendo atingir até oito metros de altura (Oliveira, 2006).

Segundo Oliveira (2006), o gênero *Eugenia* figura entre os mais importantes da família Myrtaceae, com espécies de valor comercial, nutritivo e medicinal.

O fruto (Figura 11) é uma baga globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro, esférico e achatado nas extremidades, forma de gomo, mais ou menos saliente, coroado pelo cálice;

possui aroma característico intenso e sabor doce e ácido. No processo de maturação o epicarpo passa de verde para amarelo alaranjado, vermelho, vermelho-escuro, podendo chegar a até quase negro (Oliveira, 2006; Bezerra et al., 2000).

A pitanga é uma fruta bastante apreciada em decorrência do seu sabor e aroma agradáveis. No Nordeste brasileiro, sua importância econômica vem crescendo em virtude das suas excelentes propriedades sensoriais e altos teores de vitamina A e C em frutos (210mcg / 100g e 14mg / 100g, respectivamente) (Oliveira, 2006).



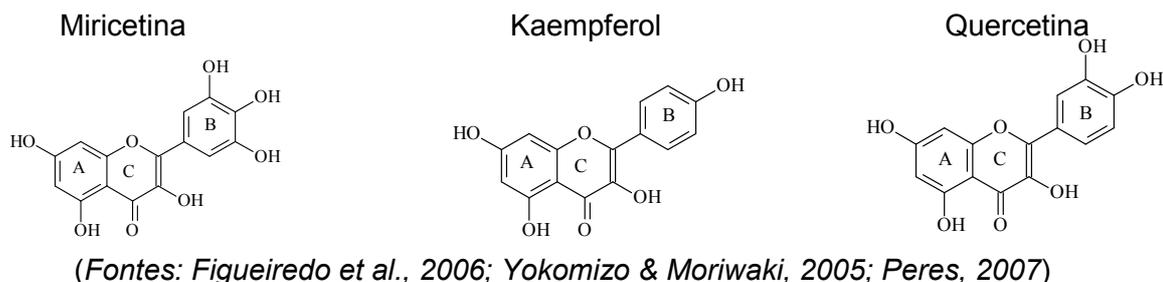
**Figura 11:** Frutos de pitangueira em vários estágios de maturação (Fonte: Lopes, 2005).

Os frutos são consumidos *in natura* ou sob a forma de refrescos e sucos, sorvetes, doces, licores, vinho e geléias (Oliveira, 2006; Lima et al., 2002), aumentando assim o interesse dos produtores e dos consumidores (Kuskoski et al., 2006).

As folhas foram o que primeiro despertou o interesse dos pesquisadores quanto à identificação de substâncias químicas e o estudo da atividade fisiológica, provavelmente, por terem sido utilizadas por muito tempo na medicina popular. No entanto, nos últimos anos, os frutos da pitangueira têm despertado grande interesse dos pesquisadores por apresentar substâncias específicas que podem trazer benefícios à saúde.

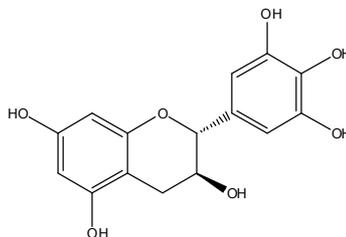
### 3.5.1. Constituintes químicos polares isolados a partir de pitangueira

Hoffman-Ribani e colaboradores (2009) identificaram a presença dos flavonóides miricetina, kaempferol e quercetina em frutos de pitangueira e verificaram que os níveis dos mesmos foram de 2 a 3 vezes menor na polpa congelada comparada com a fruta fresca (Figura 12).

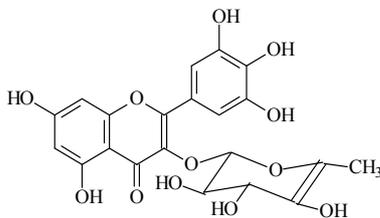


**Figura 12:** Estrutura química da miricetina, kaempferol e quercetina

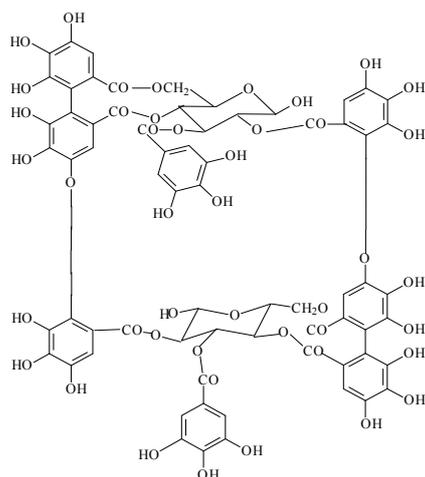
Lee e colaboradores (1997) investigando os constituintes fenólicos de folhas de pitangueira, a partir do extrato metanólico relataram a presença dos flavonóides galocatequina (Figura 13) e miricitrina (Figura 14), dos taninos oenoteína B (Figura 15), eugeniflorina D1 ( $C_{75}H_{52}O_{48}$ ) e eugeniflorina D2 ( $C_{68}H_{48}O_{45}$ ) (Figura 16) (Auricchio et al., 2007).



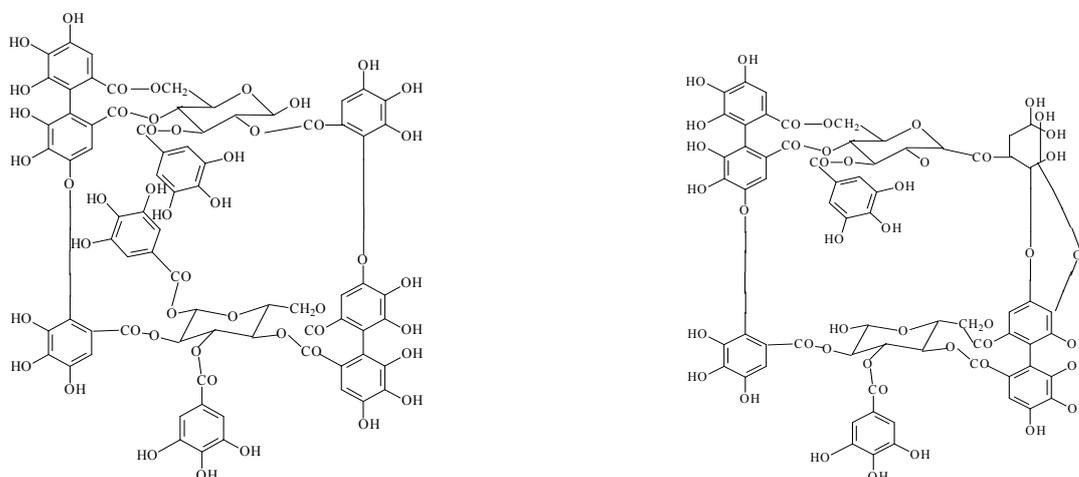
**Figura 13:** Estrutura química da galocatequina (Fonte: Lee et al., 1997).



**Figura 14:** Estrutura química da miricitrina (Fonte: Meotti, 2006)



**Figura 15:** Estrutura química da oenoteína B (Fonte: Lee et al., 1997).



Eugeniflorina D1

Eugeniflorina D2

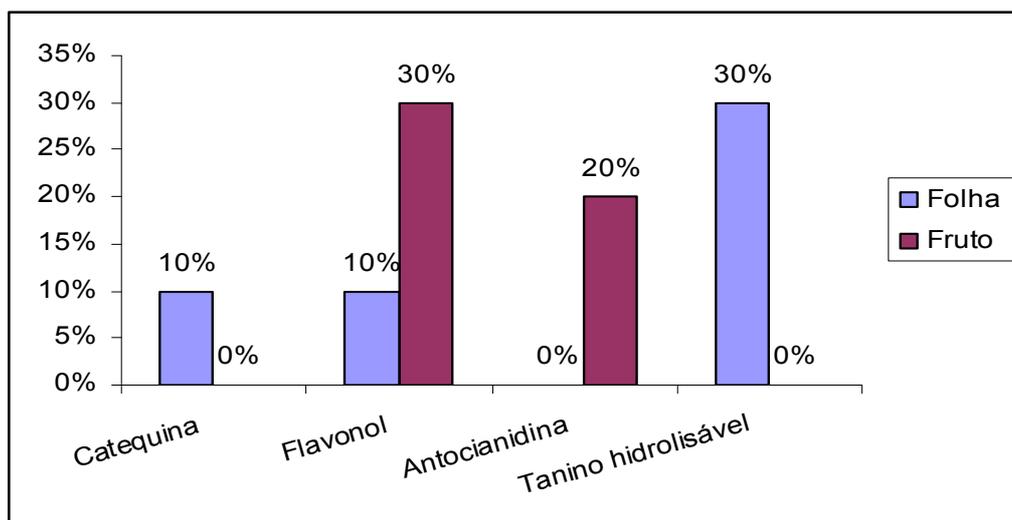
**Figura 16:** Estrutura química de eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2. (Fonte: Lee et al., 2000).

Algumas antocianinas como cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo foram identificadas no extrato aquoso dos frutos desta espécie vegetal respectivamente conforme a Figura 17 (Einbond et al., 2004).



**Figura 17:** Estrutura química de cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo (Fonte: Cabrita et al., 2003).

Logo, das substâncias polares isoladas a partir de pitangueira, 50% foram a partir das folhas e 50% dos frutos. Das substâncias isoladas das folhas foram detectados dois flavonóides (catequina – 10%; flavonol – 10%) e três taninos (tanino hidrolisável – 30%) e dos frutos, cinco flavonóides (flavonol – 30% e antocianidina – 20%) conforme o Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Substâncias isoladas a partir de pitangueira de acordo com a parte estudada.

### 3.5.2 Atividades biológicas descritas

Com relação ao uso medicinal das folhas de pitangueira têm sido referenciadas como eficientes no tratamento de diversas enfermidades como febre, doenças estomacais, hipertensão, obesidade (Weyerstahl et al., 1988; Schmeda-Hirschmann et al., 1987), reumatismo e bronquite, além de sua comprovada atividade calmante e antiinflamatória (Schapoval et al., 1994).

Em vários estudos, ainda com as folhas da pitangueira, observou-se vaso-relaxamento dos anéis da aorta torácica, vasodilatação (IC<sub>50</sub> de 3 mg de folhas secas/kg), atividade diurética (120 mg de folhas secas/kg) (Consolini et al., 1999), atividade cardiovascular, e inibição da DNA polimerase (Lee et al., 2000).

Também foi observada a inibição da digestão de açúcares e gorduras, reduzindo a absorção gastrintestinal destes nutrientes, o que pode ser eficiente

no tratamento de diabetes e obesidade (Arai et al., 1999). Porém, apesar da atividade cardiovascular, estes extratos podem apresentar riscos para pacientes com arritmia cardíaca (Consolini & Sarubbio, 2002).

Com relação à atividade antioxidante dos extratos das folhas inibe a peroxidação lipídica e remove os radicais livres (Auricchio et al., 2007; Vizzoto, 2006; Velázquez et al., 2003).

Os extratos das folhas da pitangueira, assim como os de outras espécies nativas, também apresentam atividade contra *Trypanosoma congolense* (doença do sono) (Adwunmi et al., 2001), e moderada atividade bactericida, sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli* (Holetz et al, 2002).

Entretanto, a partir dos frutos, poucos trabalhos vêm sendo observados, dentre eles podem ser citados a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp.* coagulase (Gonçalves et al., 2005).

Todas as substâncias polares isoladas a partir dos frutos de pitangueira, devido às suas características fenólicas, apresentam atividade antioxidante. Segundo Hoffman-Ribani e colaboradores (2009), os flavonóis (quercetina, miricetina e kaempferol) isolados dos frutos de pitangueira apresentam atividade antitumoral e colaboram na redução do risco de doenças cardiovasculares e de acordo com Meotti (2006), o flavonol miricitrina, apresenta atividade antiinflamatória. As antocianidinas cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo também apresentaram atividade antiinflamatória (Einbond et al., 2004) .

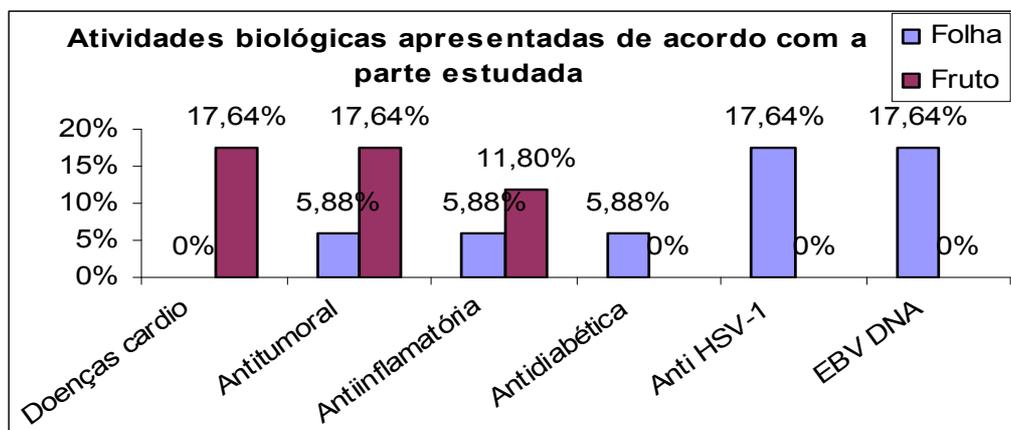
Lee e colaboradores descreveram para eugeniflorina D1, D2 e oenoteína atividade biológica na inibição da atividade EBV DNA polimerase e inibição do crescimento do vírus Herpes simplex tipo 1 e somente para a oenoteína, atividade antitumoral (Lee et al., 2000). De acordo com Negri (2005) o flavonóide galocatequina apresenta atividade antidiabética.

Na Tabela 1 estão descritas todas as substâncias polares isoladas a partir de pitangueira relacionadas com a sua atividade biológica.

**Tabela 1 – Substância isolada e respectiva atividade biológica**

<b>Substância isolada</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Quercetina	Antitumoral e doenças cardiovasculares	Hoffman-Ribani et al., 2009
Miricetina	Antitumoral e doenças cardiovasculares	Hoffman-Ribani et al., 2009
Kaempferol	Antitumoral e doenças cardiovasculares	Hoffman-Ribani et al., 2009
Galocatequina	Atividade antidiabética	Negri, 2005
Miricitrina	Atividade antiinflamatória	Meotti, 2006
Oenoteína B	Inibem a atividade EBV DNA polimerase e inibem o crescimento do vírus Herpes simplex tipo 1 (Anti-HSV-1) e Atividade antitumoral	Lee et al., 2000
Eugeniflorina D1 e D2	Inibem a atividade EBV DNA polimerase e inibem o crescimento do vírus Herpes simplex tipo 1 (Anti-HSV-1)	Lee et al., 2000
Cianidina-3-glicosídeo Delfinidina-3-glicosídeo	Atividade antiinflamatória	Einbond et al., 2004

Das atividades biológicas apresentadas, a principal indicação descrita foi atividade antitumoral, seguido de doenças cardiovasculares, atividade antiinflamatória, inibição da EBV DNA polimerase e Anti HSV-1 e antidiabética, conforme o Gráfico 2.

**Gráfico 2:** Atividades biológicas apresentadas na pitangueira

Desta forma, esta dissertação de mestrado vem a colaborar para o conhecimento químico da espécie vegetal no que se refere às substâncias polares, e mais precisamente quanto aos compostos fenólicos, com enfoque sob a atividade antioxidante.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta do Material Vegetal**

O material vegetal foi coletado em uma lavoura no distrito de Farol de São Tomé, localizada no município de Campos dos Goytacazes - RJ (Latitude = 21° 44' Sul; = 41° 18' Oeste = altitude 12 m do nível do mar) no mês de setembro de 2008 e no mês de outubro de 2009. A exsicata foi depositada no herbário da UENF sob o código H 5084.

### **4.2. Preparo dos Extratos**

#### **4.2.1. Frutos de pitangueira**

Os frutos maduros de pitangueira foram limpos, lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente. A polpa foi separada das sementes e posteriormente a polpa foi triturada em liquidificador comercial com água destilada (1:3) para a obtenção do extrato aquoso. Neste trabalho optou-se por um processo de extração aquosa pela razão da população normalmente consumir os frutos de pitangueira em meio aquoso.

O extrato aquoso (EA) foi submetido ao processo de precipitação etanólica utilizando etanol PA (1:1) com o objetivo de separar as moléculas de maior peso molecular daquelas de menor peso molecular (Schmourlo et al,

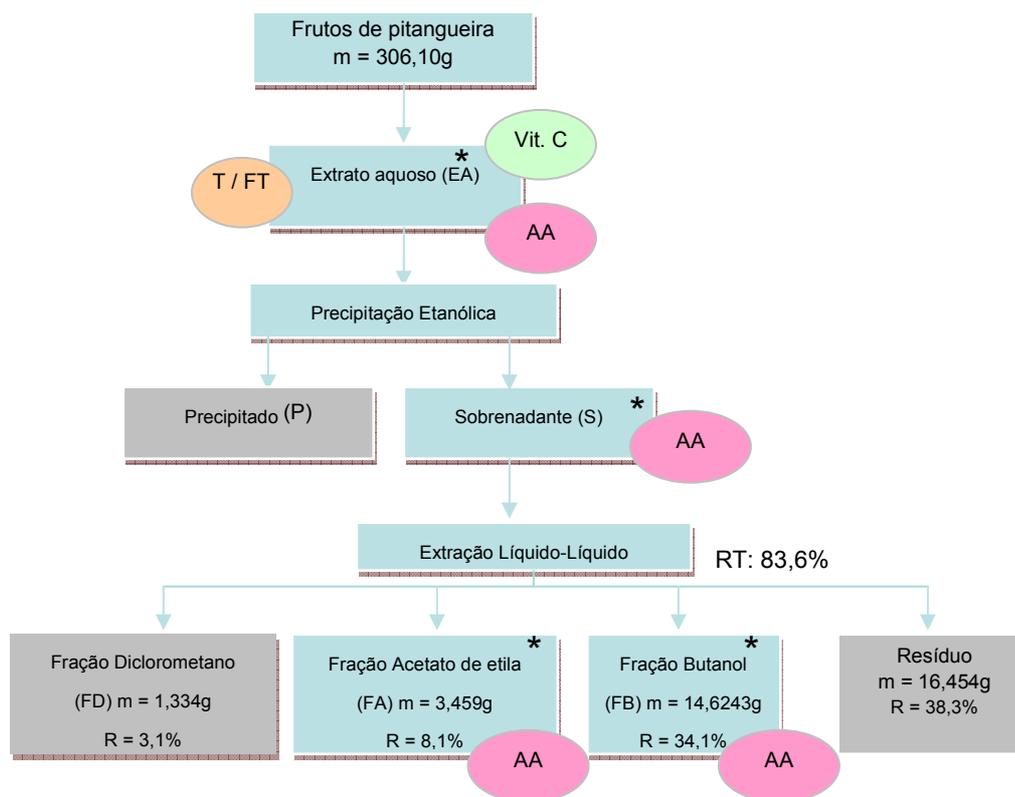
2005) o que originou duas frações, um sobrenadante (S) e um precipitado (P).

O precipitado (P) encerra as macromoléculas, como as proteínas, os taninos e os polissacarídeos. As moléculas de menor peso molecular, tais como os flavonóides e os ácidos fenólicos, permanecem no sobrenadante (S) e são as de interesse neste trabalho.

A partir do sobrenadante (S) foi realizada uma extração líquido-líquido (1:1) com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as seguintes frações: diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e butanol (FB) (Esquema 1).

Para a análise de atividade antioxidante e do perfil cromatográfico foram testados o extrato aquoso, o sobrenadante e as frações em acetato de etila e butanólica, por serem essas frações que apresentam as substâncias polares de interesse neste estudo.

**Esquema 1** – Fluxograma de extração e fracionamento dos frutos de pitangueira



Análises realizadas: T/FT – Taninos e Fenóis Totais; AA – Atividade antioxidante; Vit C – Vitamina C;

\* - Perfil cromatográfico; R – Rendimento; RT - Rendimento total.

O precipitado (P), a fração em diclorometano (FD), e o resíduo (quadro cinza – Esquema 1) não foram utilizados para este trabalho de dissertação de mestrado, por não apresentarem as substâncias de interesse.

### **4.3. Análises cromatográficas:**

A cromatografia é um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura de substâncias, no qual o fluxo do solvente promove a separação dos componentes da mistura em um meio poroso. Esta distribuição se dá entre duas fases que estão em contato íntimo, onde uma delas permanece estacionária e a outra se move através da mesma. Através da relação gerada entre fase estacionária / substância ou mistura de substâncias / fase móvel consegue-se uma separação mais efetiva dos componentes da mistura (Oliveira, 2005).

#### **4.3.1. Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato, do sobrenadante e das frações**

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> em Al, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm) cortadas na medida de 4 cm de comprimento. As amostras analisadas foram diluídas em água e aplicadas a aproximadamente 0,8 cm acima da borda inferior da placa e cerca de 1 cm de distância das bordas laterais.

O sistema de solvente utilizado para eluição cromatográfica por CCD foi o BAW (8 : 1 : 1) (butanol / ácido acético / água destilada), depois da corrida cromatográfica, a placa foi retirada da cuba cromatográfica. As amostras foram reveladas com sulfato cérico (revelador químico - ácido sulfúrico concentrado e água) e observadas sob luz visível e ultravioleta (UV) a 254 nm (curto) e 365 nm (longo) (revelador físico), sendo os locais que apresentam os compostos de interesse demarcados para isolamento de novas substâncias como, por exemplo, manchas amarelas características de flavonóides.

Todas as amostras foram aplicadas (20 µL) na concentração de 6 mg/ml e os padrões de flavonóides e ácidos nas concentrações de 1 mg/ml.

Para todas as placas cromatográficas apresentadas neste trabalho, será incluída uma legenda com as identificações das amostras analisadas.

#### 4.3.2. Avaliação do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conjugada à técnica de detecção por varredura de espectro ao ultravioleta é uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de fontes vegetais, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais (Paiva et al., 2002).

O perfil cromatográfico do extrato aquoso, do sobrenadante e das frações dos frutos de pitangueira foi avaliado por CLAE. Para esta análise foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu Class – LC10, equipado com duas bombas LC10AT, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi a C18 de fase inversa da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm).

A fase móvel foi constituída de água acidificada com ácido fosfórico (pH = 3,5) e acetonitrila, com vazão de 1,0 mL/min. A composição da fase móvel variou em gradiente de concentração em 35 minutos, de acordo com a Tabela 2. A detecção por varredura de espectro foi de 190 a 590 nm com acompanhamento em 2 comprimentos de onda, 254 nm e 350 nm.

**Tabela 2** - Gradiente de concentração dos solventes (CLAE-UV).

Tempo (minutos)	Solvente A (Água acidificada) pH 3,5	Solvente B (Acetonitrila)
0	90	10
5	90	10
13	80	20
25	40	60
30	0	100
35	0	0

Todas as amostras foram injetadas na concentração de 6 mg/ml e os padrões na concentração de 10 µg/ml. Os padrões utilizados para estas análises foram os flavonóides quercetina e rutina, os padrões fenólicos ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico, ácido salicílico e os padrões ácido ascórbico e BHT. Estes padrões foram utilizados para direcionar as análises por CLAE, uma vez que esses representam substâncias comumente presentes em frutas e vegetais (Oliveira, 2005).

#### **4.4. Métodos de determinação de atividade antioxidante**

##### **4.4.1. Avaliação qualitativa de atividade antioxidante**

As amostras foram avaliadas de forma qualitativa quanto ao perfil antioxidante por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Esse processo consiste em borrifar as placas contendo a amostra com a solução de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) 0,1mM em metanol e após 10 minutos de espera, para que a placa seque a temperatura ambiente, observam-se manchas amarelas que correspondem às substâncias capazes de seqüestrar os radicais livres (Cavin et al., 1998). O fundo lilás corresponde à superfície onde o DPPH permaneceu intacto.

##### **4.4.2. Avaliação espectrofotométrica da atividade antioxidante**

O extrato aquoso, o sobrenadante e as frações dos frutos de pitangueira foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante pelo método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) por análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 515 nm (Brand – Williams et al.,1995). O espectrofotômetro utilizado foi o UV-VIS Shimadzu Mini 1240. As amostras foram diluídas e avaliadas em triplicata, com concentrações finais de 1,2, 0,6 e 0,1 mM em metanol. Como branco foi utilizado o metanol, o padrão corresponde a uma solução de DPPH em metanol (1:1) e como controle de referência foram utilizados os padrões de quercetina, rutina, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico, ácido salicílico e BHT na concentração de 1mg/ml.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela equação:

$$\%AA = \{(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) \times 100\} / Abs_{\text{controle}}$$

Onde  $Abs_{\text{controle}}$  é a absorvância do controle DPPH e  $Abs_{\text{amostra}}$  é a absorvância da amostra em solução (Roesler, et al., 2007).

A amostra será considerada antioxidante quando apresentar seqüestro de radicais livres acima de 50%.

#### **4.4.3. Análise de atividade antioxidante pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

A análise da atividade antioxidante por CLAE foi avaliada através da presença de DPPH (após a reação) e da ausência de DPPH (antes da reação) objetivando avaliar a mistura reacional. Para essa análise foi utilizada a fase móvel Metanol / Água ultrapura (80 : 20), com vazão de 1,0 mL / min durante 10 minutos. O pico do DPPH foi monitorado a 515nm (Chandrasekar et al., 2006). Foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu Class – LC10, equipado com duas bombas LC10AT, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi a C18 de fase inversa da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm).

Todas as amostras foram injetadas na concentração de 2mg/mL e os padrões na concentração de 1mg/mL. Como controle positivo foram utilizados os padrões quercetina, rutina, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico, ácido salicílico e BHT. A concentração de DPPH utilizada para esta análise foi de 1,2 mM, por apresentar uma melhor visualização do pico no cromatograma.

A diferença na redução da concentração do pico do DPPH, ou seja, a redução da área do pico do DPPH, entre o padrão (DPPH : Metanol) e a amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de atividade seqüestrante da amostra através da seguinte equação:

$$\% AA_{CLAE} = \{(PA_{\text{padrão}} - PA_{\text{amostra}}) \times 100\} / PA_{\text{padrão}}$$

Onde  $PA_{\text{padrão}}$  é a área obtida pelo padrão DPPH e  $PA_{\text{amostra}}$  é a área obtida pela amostra em solução (Chandrasekar et al., 2006).

#### **4.4.4. Análise da atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio (SNP)**

Foi realizado para este experimento, como doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (SNP).

Preparou-se uma solução estoque a 100 mM de nitroprussiato de sódio (SNP) em PBS (solução salina tamponada de fosfato - pH 7,2). A solução de SNP (5 $\mu$ L) foi adicionada a 95 $\mu$ L de meio de cultura contendo as amostras e quercetina e rutina, como padrões. As soluções foram incubadas a 25°C por 2,5 h e foram analisadas em três diferentes concentrações 500, 100 e 20  $\mu$ g/mL. Após este período, foi realizado o teste colorimétrico de Griess (Wadsworth & Koop, 2001).

Os resultados são expressos em concentração de nitrito no meio, ou seja, se há pouco nitrito no meio, é porque houve seqüestro deste radical pelos extratos.

#### **4.5. Determinação do Teor de Vitamina C (Ácido Ascórbico)**

Para determinação de vitamina C foram utilizadas duas técnicas para fins comparativos.

##### **4.5.1. Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A determinação do teor de vitamina C foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos eppendorff na quantidade exata (1g) para a realização da análise onde a amostra foi estabilizada com ácido oxálico (100 $\mu$ g/mL) na hora da análise.

Para esta análise foi utilizada 1g de amostra, a qual foi homogeneizada em solução de ácido oxálico 0,5% e centrifugada a 5000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi levado ao ultra-som por 10 minutos. A amostra foi filtrada com auxílio de um filtro minisart 0,45µm e posteriormente injetada no cromatógrafo.

Para esta análise foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu Class – LC10, equipado com duas bombas LC10AT, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL. O comprimento de onda foi de 254 nm utilizando uma coluna C-18 de fase inversa da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). A fase móvel utilizada foi o Fosfato Monobásico de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e Brometo de Cetil Trimetil Amônio (BCTMA) 0,05 M (pH 4.0) com vazão de 1,0 mL/min (Benlloch et al; 1993). Foi preparada uma curva padrão a partir de diluições com o padrão ácido ascórbico nas concentrações de 0,001 a 10mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico / 100g de amostra, em base úmida.

#### **4.5.2. Método titulométrico**

Outra metodologia utilizada para fins comparativos foi o método titulométrico do 2,6-dicloroindofenol (2,6D) (Método oficial da AOAC) (Cunniff, 1998). Este método se baseia na redução do 2,6D, de cor roxa, pelo ácido ascórbico em meio ácido, tornando-se incolor. O ponto final de titulação é verificado quando todo ácido ascórbico do meio for oxidado, e a solução 2,6D, não reduzida conferir cor rosa à solução. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos eppendorff na quantidade exata (1g) para a realização da análise. As extrações foram realizadas individualmente e imediatamente antes das titulações, de modo a minimizar a exposição a agentes degradantes.

Para esta análise foi utilizada 1g de amostra, a qual foi homogeneizada em solução ácida (ácido oxálico). Em seguida, foi titulada com a solução de 2,6-dicloroindofenol.

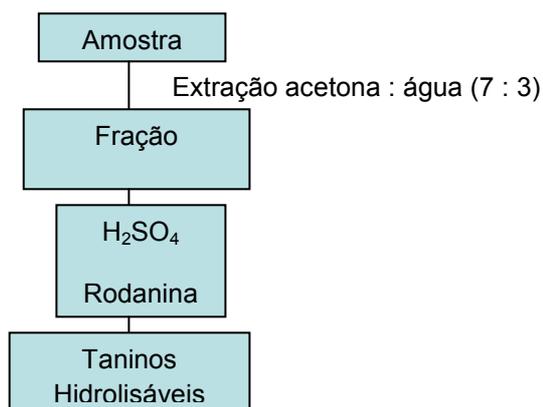
Neste método de determinação é aconselhável que a titulação seja feita de forma rápida, porque o ácido ascórbico reage rapidamente com o 2,6 D, diminuindo assim o efeito da interferência dos açúcares redutores ou de outras substâncias que apresentam esta característica que podem estar presentes nas amostras, as quais não reagem tão rapidamente com o 2,6 D (Zamudio, 2007).

#### **4.6. Determinação de Taninos e Fenóis Totais:**

##### **4.6.1. Método para Dosagem de Taninos Hidrolisáveis:**

A amostra liofilizada (500 mg) foi macerada por 4 vezes com 5 mL de solução de acetona / água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 mL. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi hidrolisada com 5 mL de ácido sulfúrico 1M em banho-maria a 95°C por 24 horas, após o resfriamento, a solução foi avolumada para 10 mL. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão de 10 mL. Após a adição de 1,5 mL de solução de rodanina 0,667% em metanol, aguardou-se por um período de 5 minutos antes da adição de 3 mL de hidróxido de potássio 0,5 M, o volume foi completado com água (Esquema 3).

As amostras foram avaliadas em triplicata, e as amostras positivas desenvolveram coloração vermelha - rósea. As absorbâncias das amostras foram lidas a 520 nm após resfriamento das amostras. O espectrofotômetro utilizado foi o UV - VIS Shimadzu Mini 1240. O branco foi preparado adicionando-se 1 mL do hidrolisado a 3 mL de hidróxido de potássio 0,5 M. A cubeta de referência continha apenas água. O ácido gálico foi utilizado como padrão. Dessa forma as soluções foram preparadas em metanol PA, nas seguintes concentrações finais: 200, 100, 40, 20 e 2 µg/mL (Moreira, 2000). A partir dos resultados obtidos foi construída uma curva padrão, utilizada posteriormente para o cálculo dos teores de taninos hidrolisáveis.

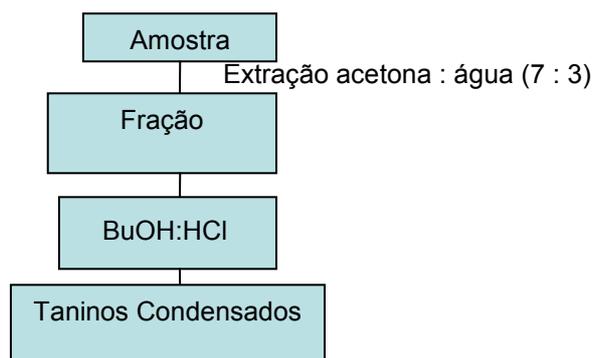
**Esquema 3:** Fluxograma do processo de extração de taninos hidrolisáveis

#### 4.6.2. Método para Dosagem de Taninos Condensados:

A amostra liofilizada (500 mg) foi macerada por 4 vezes com 5 mL de solução de acetona / água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 mL. Em seguida, para 1 mL do extrato foram adicionados 4 mL de solução de butanol em ácido clorídrico 5% (solução ácida). O conjunto foi aquecido em banho-maria a 95°C por 2 horas (Moreira, 2000) (Esquema 4).

As amostras foram avaliadas em triplicata, e as amostras positivas desenvolveram coloração vermelha ou violácea e as absorbâncias das amostras foram lidas a 540 nm após resfriamento das amostras. O espectrofotômetro utilizado foi o UV - VIS Shimadzu Mini 1240. O branco foi preparado adicionando-se 4 mL de solução de ácido clorídrico em butanol a 1 mL da amostra. A cubeta de referência continha solução ácida de butanol (Moreira, 2000).

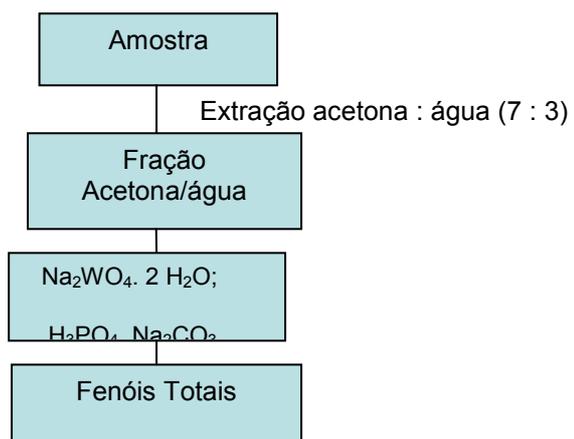
Para esta análise foi utilizada a curva padrão de Moreira (Moreira, 2000).

**Esquema 4:** Fluxograma do processo de extração de taninos condensados

#### 4.6.3. Método de Dosagem de Fenóis Totais:

A amostra liofilizada (500 mg) foi macerada por 4 vezes com 5 mL de solução de acetona / água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 mL. Em seguida, o reagente de Folin-Denis foi adicionado a 0,5 mL dos extratos das amostras e 3 mL de água destilada, e posteriormente avolumado para 10 mL. Em seguida 1 mL da solução de carbonato de cálcio saturada foi adicionado e a solução ficou em repouso por 1 hora. As amostras foram avaliadas em triplicata e as amostras positivas desenvolveram coloração azul intensa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm. O espectrofotômetro utilizado foi o UV - VIS Shimadzu Mini 1240. A água destilada foi utilizada como referência (Moreira, 2000). A curva padrão para esse ensaio foi baseada no preparo das soluções aquosas contendo ácido tânico nas seguintes concentrações finais: 100, 40, 20, 10 e 2 µg/mL (Esquema 5). A partir dos resultados obtidos foi construída uma curva padrão, utilizada posteriormente para o cálculo dos teores de fenóis totais.

O método de Folin-Denis é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais. Este método descrito por Swain e Hillis baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada (Ângelo & Jorge, 2007).

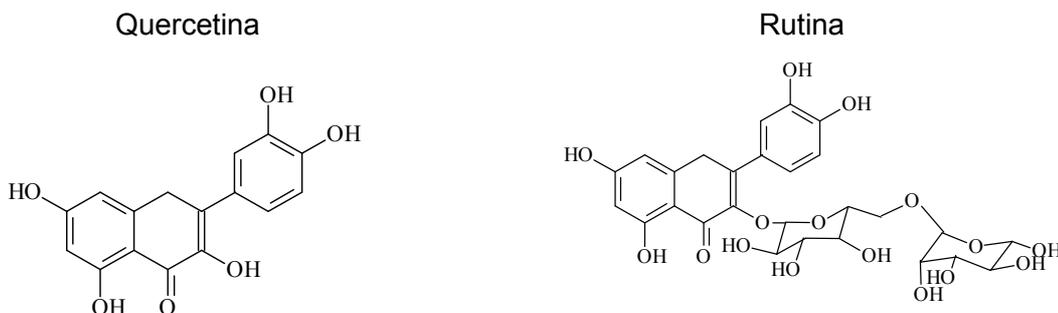
**Esquema 5:** Fluxograma do processo de extração de taninos condensados

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato, do sobrenadante e das frações

O extrato, o sobrenadante e as frações dos frutos de pitangueira foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para se avaliar o perfil cromatográfico (Figura 19), e para tanto foram utilizados dois padrões de flavonóides para direcionar as análises por CCD (Figura 18), uma vez que essas são moléculas presentes em diversas frutas (O'Prey et al., 2003), os quais estão descritos abaixo:

- ✓ Quercetina (flavonol penta-hidroxilado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4');
- ✓ Rutina (flavonol com esqueleto da quercetina acrescido de duas unidades de açúcares ligados na posição 3 do flavonóide).



**Figura 18:** Padrões fenólicos de quercetina e rutina

As condições cromatográficas para a Cromatografia em Camada Delgada estão descritas no capítulo Material e Método (item 4.3.1).

Na Figura 19 se pode verificar o perfil cromatográfico por CCD dos padrões quercetina e rutina, os quais apresentaram como fatores de retenção (Rf) valores de 0,89 e 0,52, respectivamente.



**Figura 19:** Cromatograma dos padrões quercetina (QUE) e rutina (RU) após revelação com sulfato cérico em CCD.

A partir do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) se realizou o perfil cromatográfico das amostras a serem analisadas conforme a Figura 20.

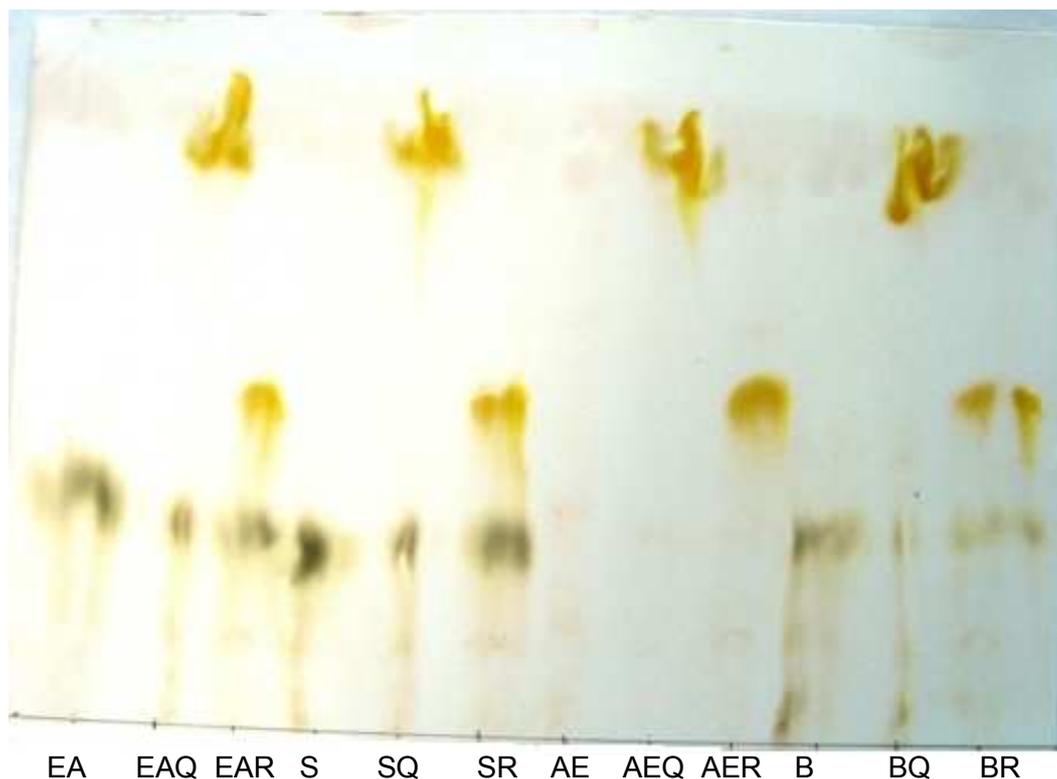


**Figura 20:** Cromatograma do extrato aquoso, do sobrenadante e das frações dos frutos de pitangueira após revelação com sulfato cérico em CCD. EA (extrato aquoso – Rf: 0,32); S (sobrenadante – 0,28); AE (acetato de etila – Rf: 0,27); BU (butanol – Rf: 0,05 e 0,31).

Verifica-se na Figura 20, que o extrato, o sobrenadante e as frações dos frutos de pitangueira possuem substâncias polares, por apresentar grande afinidade com a sílica gel (fase estacionária) nesta fase móvel.

No sistema de solventes utilizado verifica-se que a concentração de substâncias fenólicas é baixa no extrato aquoso (EA) e no sobrenadante (S).

Para verificar a presença de flavonóides nas amostras foi realizada uma co-cromatografia, com os padrões quercetina e rutina, conforme a Figura 21.



**Figura 21:** Cromatograma do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira co-injetados com os padrões quercetina e rutina após revelação com sulfato cérico em CCD. EA (extrato aquoso – Rf: 0,35); EAQ (extrato aquoso com quercetina – Rf: 0,29 e 0,89); EAR (extrato aquoso com rutina – Rf: 0,28 e 0,49); S (sobrenadante – Rf: 0,26); SQ (sobrenadante com quercetina – Rf: 0,29 e 0,90); SR (sobrenadante com rutina – Rf: 0,29 e 0,49); AE (acetato de etila – Rf: 0,33); AEQ (acetato de etila com quercetina – Rf: 0,33 e 0,88); AER (acetato de etila com rutina – Rf: 0,33 e 0,50); B (butanol – Rf:0,32); BQ (butanol com quercetina – Rf: 0,32 e 0,52); BR (butanol com rutina – Rf: 0,32 e 0,90).

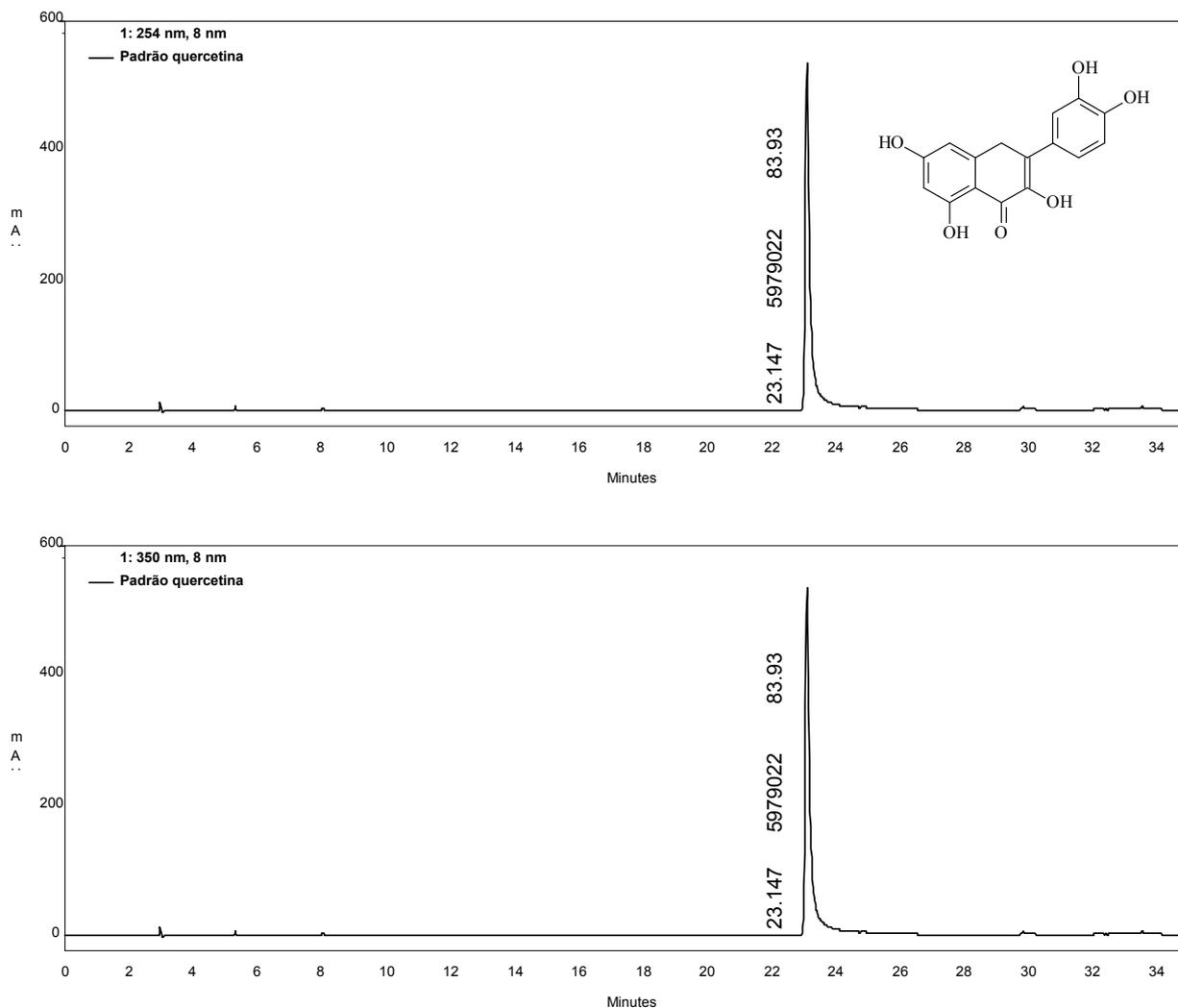
De acordo com as co-cromatografias dos padrões, com o extrato aquoso, o sobrenadante e as frações dos frutos de pitangueira, nenhuma das amostras apresentou Rf próximo dos padrões quercetina e rutina (Figura 21).

## 6.2 - Avaliação do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

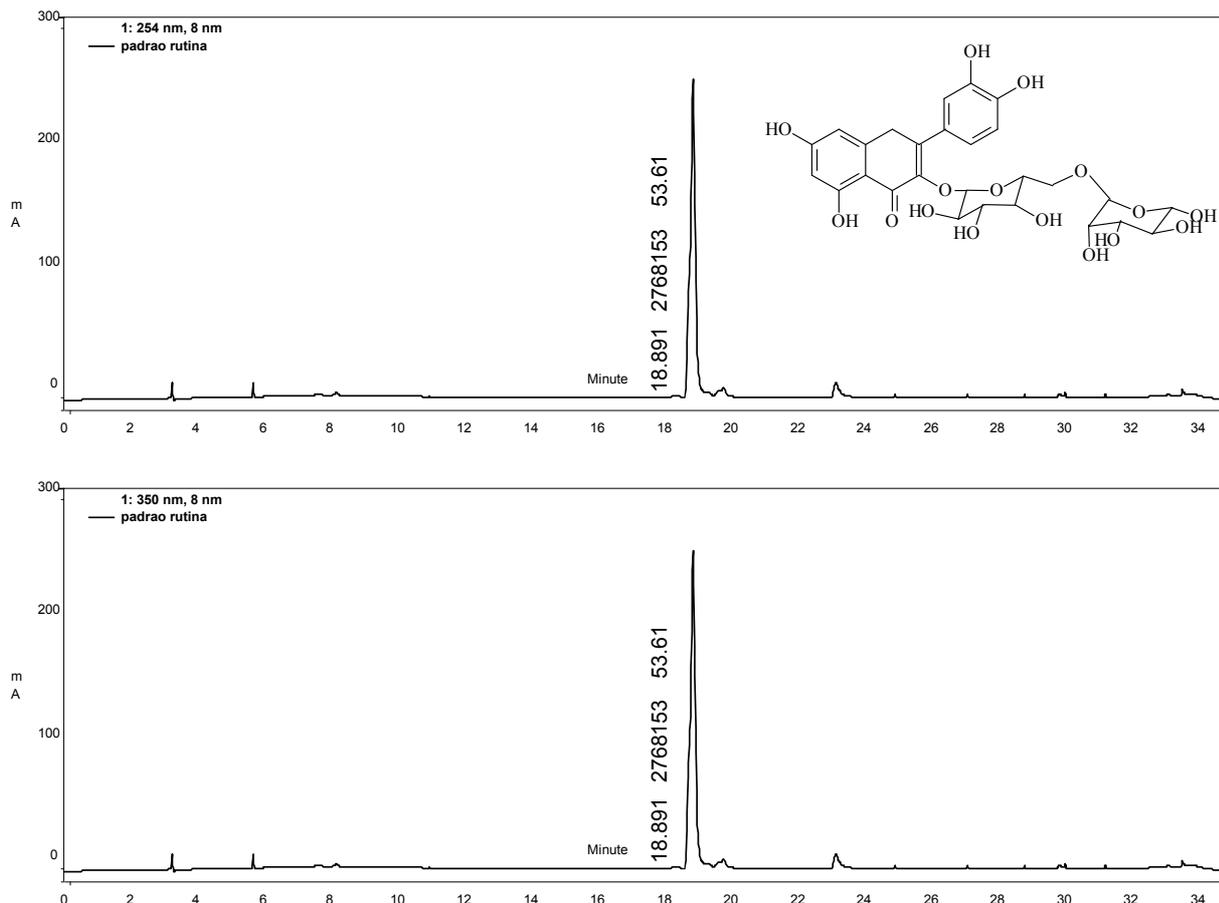
As condições cromatográficas para análises do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) estão descritas no item 4.3.2

(Material e Métodos).

Para essa análise também foram utilizados os mesmos padrões de flavonóides: Quercetina e Rutina, com o objetivo de direcionar as análises por CLAE, abaixo estão apresentados seus respectivos cromatogramas, tempos de retenção, área e área percentual.



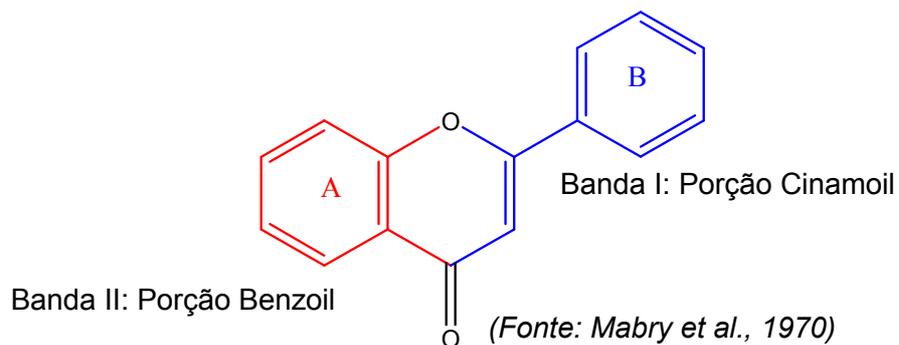
**Figura 22:** Cromatograma 1, perfil químico do padrão quercetina avaliado por CLAE.



**Figura 23:** Cromatograma 2, perfil químico do padrão rutina avaliado por CLAE.

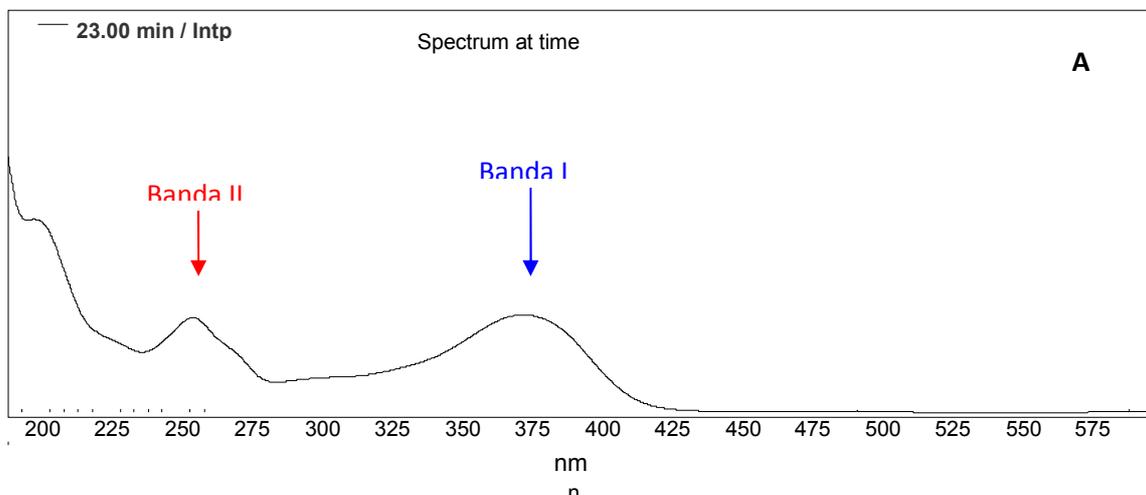
De acordo com as Figuras 22 e 23, pode-se verificar que ambos os padrões absorveram nos dois comprimentos utilizados (254 e 350 nm), para o sistema de solventes utilizado, sendo os picos correspondentes aos tempos de retenção em 23,147 minutos para quercetina e 18,891 minutos para rutina.

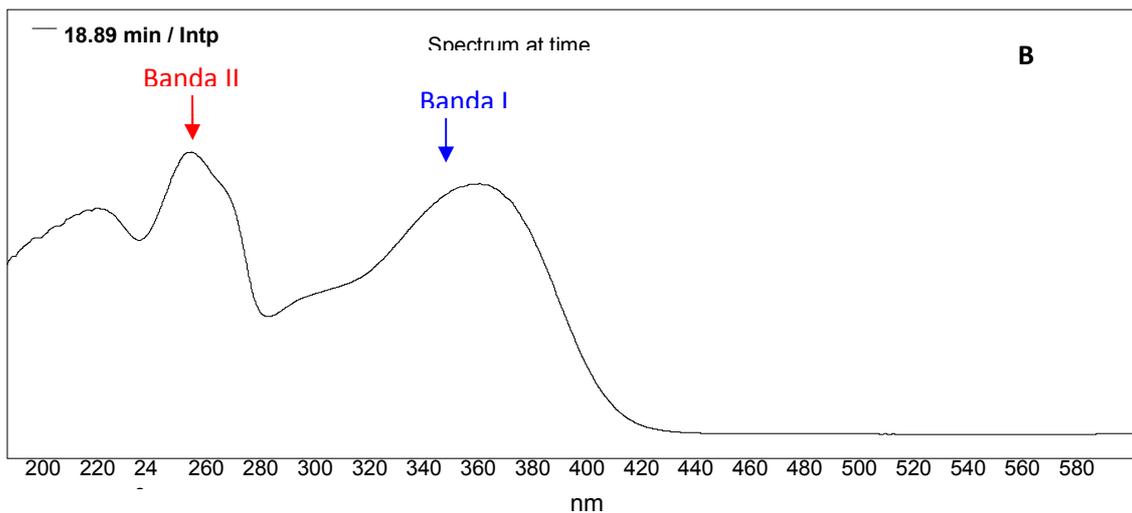
As análises realizadas com os padrões mostraram que ambos produzem duas bandas de absorção características no espectro de ultravioleta na região de 240-400 nm, o que corrobora com as absorções observadas. Essas bandas de absorção são conhecidas como Banda I, que está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B (300-380 nm) e Banda II devido à absorção do sistema benzoil do anel A (240-280 nm) (Alonso-Salces et al., 2004) (Figura 24).



**Figura 24:** Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

De acordo com esta informação, a Figura 25 mostra os espectros de ultravioleta destes padrões quercetina (A) e rutina (B), destacando as bandas características em 350 nm (anel B) e a banda próxima a 240 nm (anel A), o que corrobora com os resultados obtidos dos padrões na análise por CLAE nos comprimentos de onda em 254 e 350 nm (Figura 22 e 23).

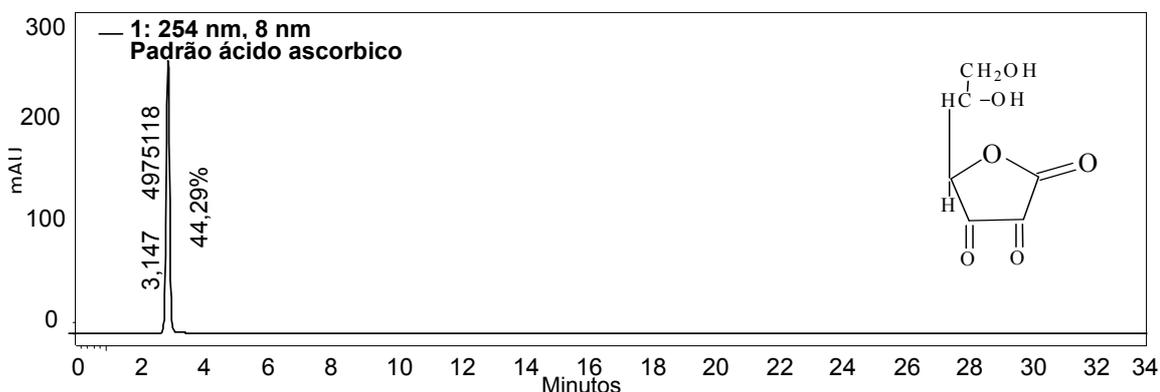




**Figura 25:** Espectros de ultravioleta dos padrões quercetina (A) e rutina (B).

Outros padrões (ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico, ácido salicílico e BHT) também foram selecionados para direcionar as análises por CLAE, a fim de verificar a presença nas amostras de algum destes padrões. Todavia, para essa classe de substâncias ocorre absorção apenas em 254 nm, que corresponde à porção benzoil. Enquanto, em 350 nm para os padrões não se verifica a presença da porção cinamoil (quando comparada aos flavonóides), por essa razão apenas os cromatogramas com comprimento de onda em 254 nm são apresentados.

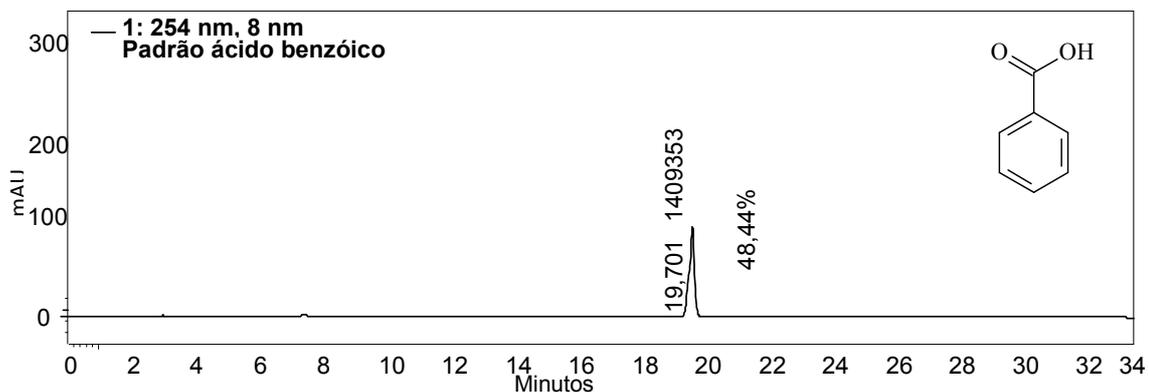
A Figura 26 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão ácido ascórbico.



**Figura 26:** Cromatograma 3, perfil químico do padrão ácido ascórbico avaliado por CLAE.

Depois de realizada a CLAE, se pode observar um pico no tempo de retenção em 3,147 minutos no comprimento de onda de 254nm, com área de 4.975.118 (44,29%).

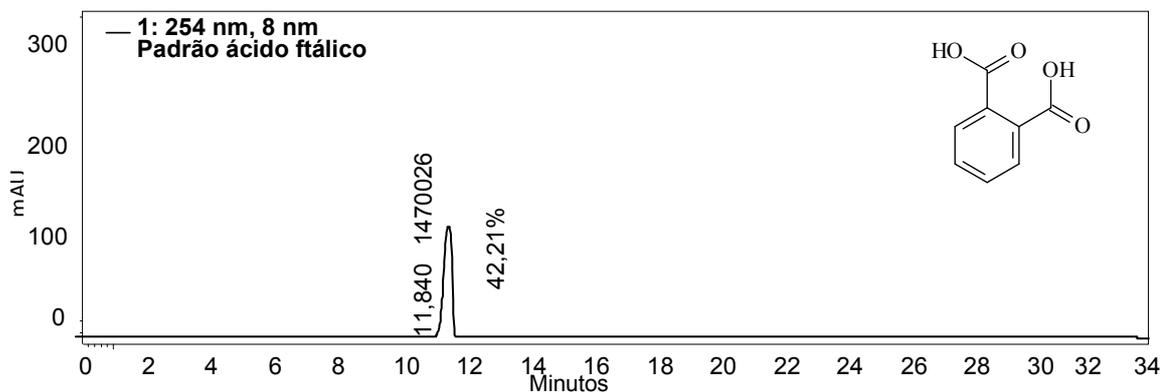
A Figura 27 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão ácido benzóico.



**Figura 27:** Cromatograma 4, perfil químico do padrão ácido benzóico avaliado por CLAE.

Pode-se observar na Figura 27, um pico no tempo de retenção em 19,701 minutos no comprimento de onda de 254nm, com área de 1.409.353 (48,44%).

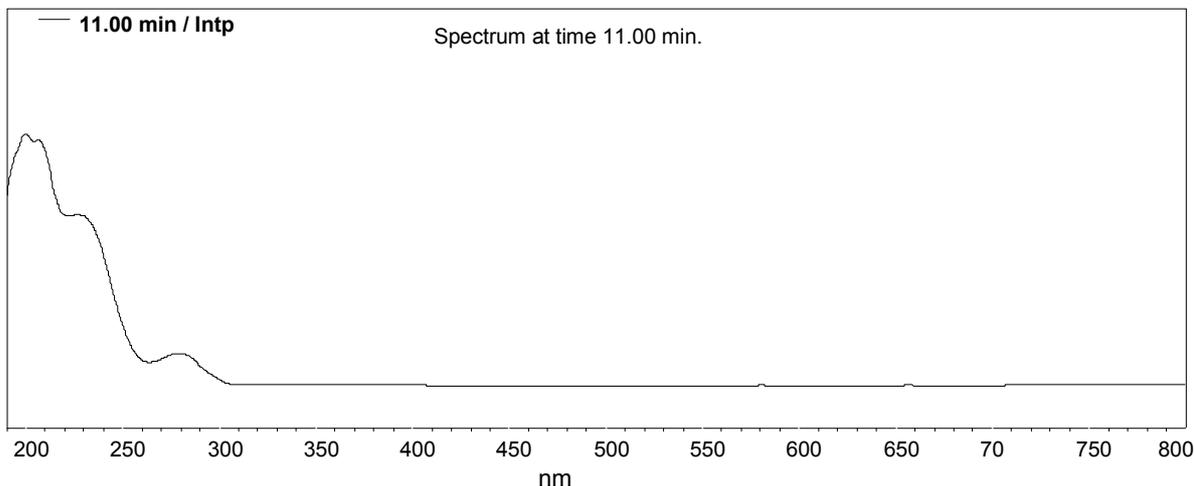
A Figura 28 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão ácido ftálico.



**Figura 28:** Cromatograma 5, perfil químico do padrão ácido ftálico avaliado por CLAE.

Pode-se observar na Figura 28, um pico no tempo de retenção em 11,840 minutos no comprimento de onda de 254nm, com área de 1.470.026 (42,21%).

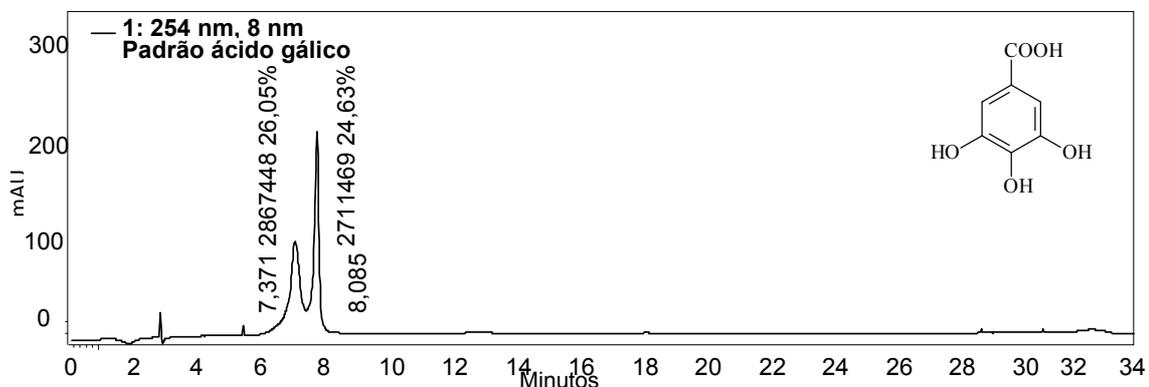
A Figura 29 apresenta o espectro de ultravioleta do padrão ácido ftálico.



**Figura 29:** Espectro de ultravioleta do padrão ácido ftálico.

O padrão ácido ftálico apresentou absorção nos comprimentos de onda de 200, 230 e 280 nm, devido à presença de um anel fenólico e o radical carboxílico.

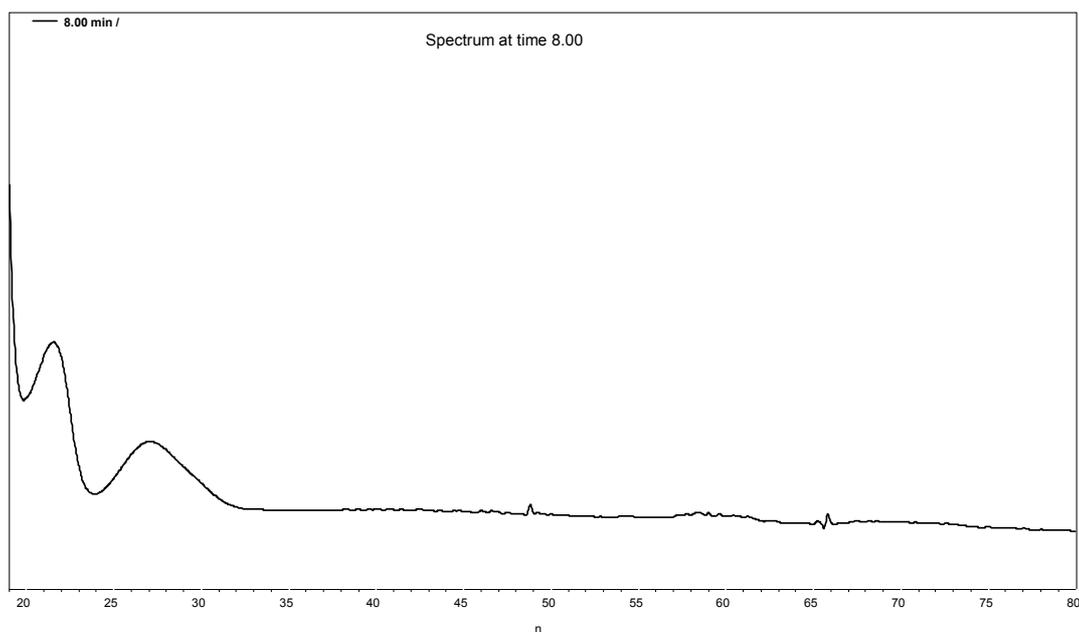
A Figura 30 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão ácido gálico.



**Figura 30:** Cromatograma 6, perfil químico do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.

Pode-se observar na Figura 30, dois picos com tempo de retenção em 7,371 e 8,085 minutos no comprimento de onda de 254nm, com área respectivamente de 2.867.448 e 2.711.469 (26,05 e 24,63%). A presença desses dois picos pode ser devido à contaminação ou à degradação da amostra por má conservação.

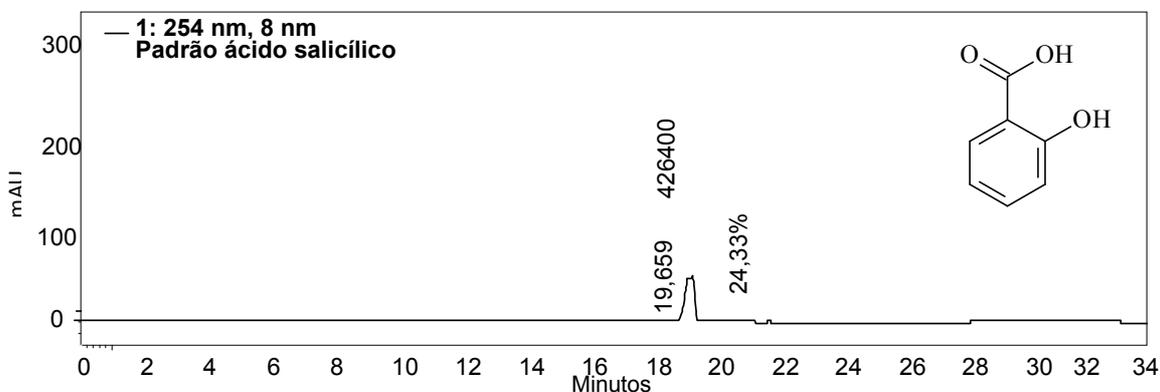
A Figura 31 apresenta o espectro de ultravioleta do padrão ácido gálico.



**Figura 31:** Espectro de ultravioleta do padrão ácido gálico.

O padrão ácido gálico apresentou absorção nos comprimentos de onda de 220 e 270 nm, aproximadamente.

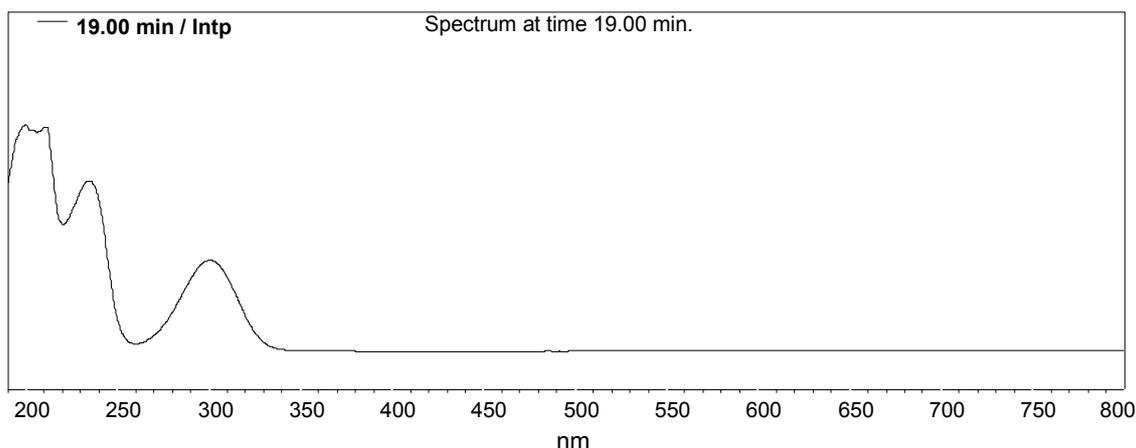
A Figura 32 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão ácido salicílico.



**Figura 32:** Cromatograma 7, perfil químico do padrão ácido salicílico avaliado por CLAE.

Pode-se observar na Figura 32, um pico no tempo de retenção em 19,659 minutos no comprimento de onda de 254nm, com área de 426.400 (24,33%).

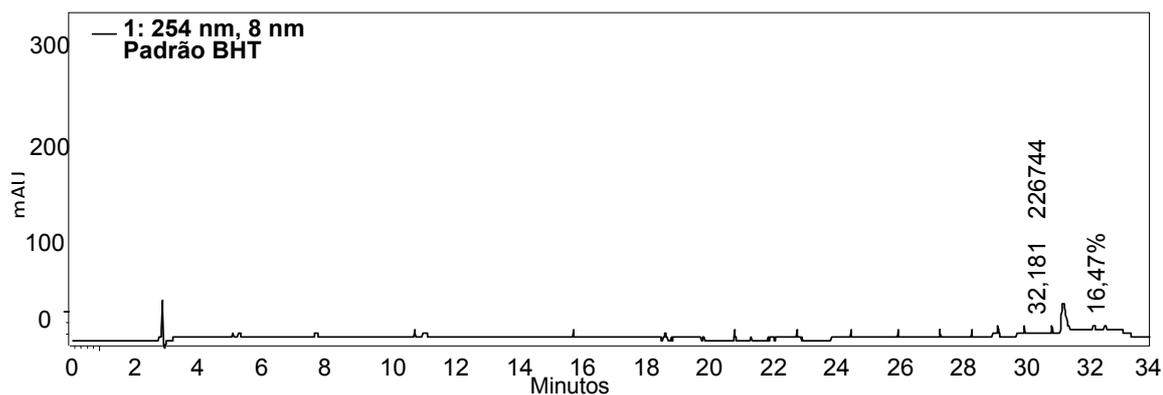
A Figura 33 apresenta o espectro de ultravioleta do padrão ácido salicílico.



**Figura 33:** Espectro de ultravioleta do padrão ácido salicílico.

O padrão ácido salicílico apresentou um espectro de ultravioleta parecido com o padrão ácido ftálico, com alguns valores de absorção próximos (200, 230 e 300 nm). Comparando as 2 estruturas, o que elas têm em comum é o anel fenólico e a parte carboxílica (COOH). Já o padrão ácido gálico apresenta essas mesmas características, mas absorveu somente em 220 e 270 nm.

A Figura 34 mostra o cromatograma do perfil químico do padrão butil-hidroxi-tolueno (BHT).



**Figura 34:** Cromatograma 8, perfil químico do padrão BHT avaliado por CLAE.

Pode-se observar na Figura 34, um pico com tempo de retenção em 32,181 minutos no comprimento de onda de 254 nm, com área de 226.744 (16,47%).

A partir dos cromatogramas apresentados, a Tabela 3 mostra os valores de tempo de retenção, área e área percentual dos padrões, em ordem decrescente de área percentual.

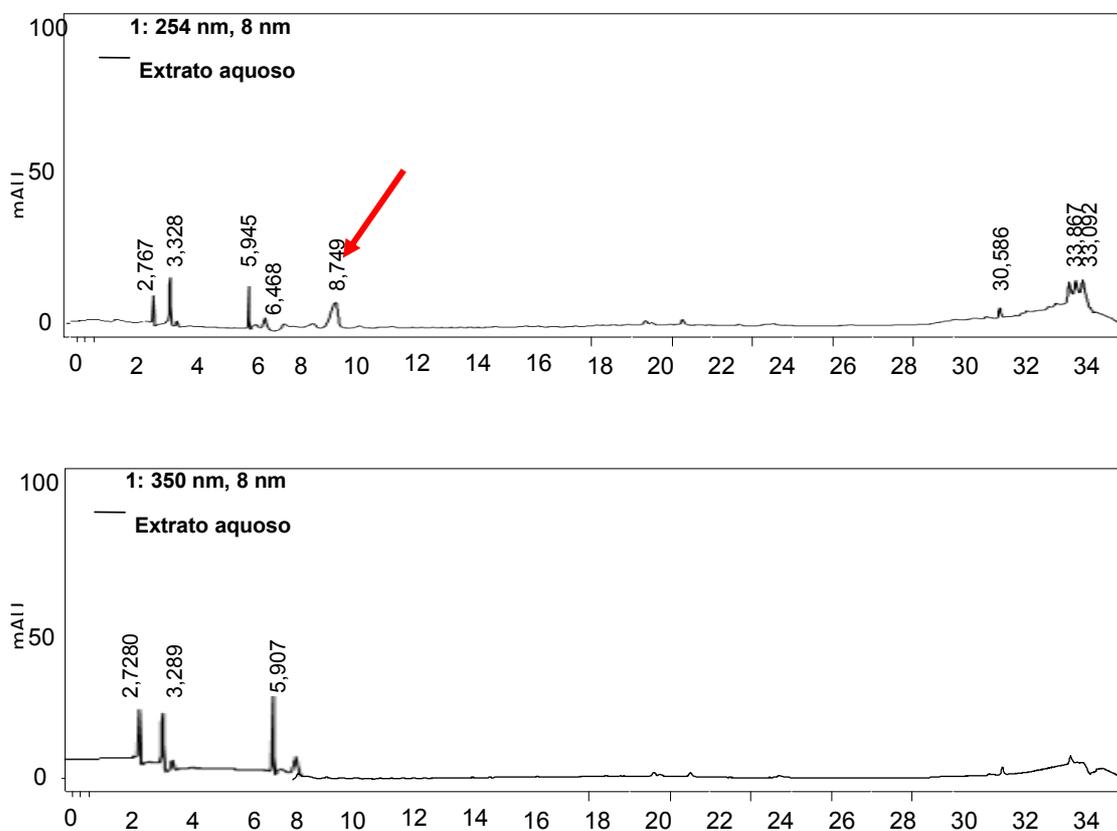
**Tabela 3** – Dados de tempo de retenção, área e área percentual dos padrões.

<b>Padrão</b>	<b>Tempo</b>	<b>Área</b>	<b>% Área</b>
Quercetina	23,147	5979022	83,93
Rutina	18,891	2768153	53,61
Ácido benzóico	19,701	1409353	48,44
Ácido ascórbico	3,147	4975118	44,29
Ácido ftálico	11,840	1470026	42,21
Ácido gálico	7,371	2867448	26,05
Ácido salicílico	19,659	426400	24,33
BHT	32,181	226744	16,47

A área percentual (% área) dos padrões será necessária para obtenção da área percentual dos picos correspondentes a esses padrões nas amostras.

Após verificar os tempos de retenção dos padrões, o extrato aquoso, o sobrenadante e as frações foram submetidos à análise por Cromatografia

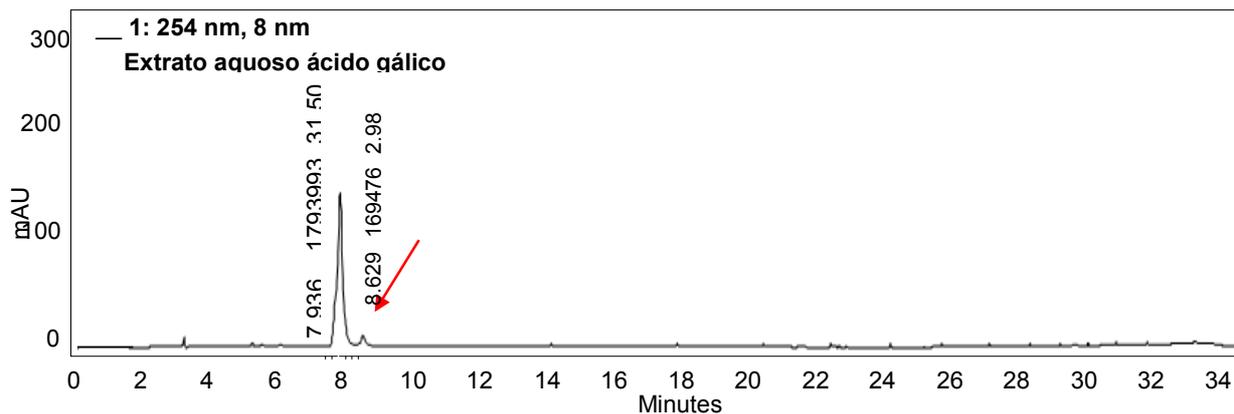
Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para conhecimento do perfil químico. Inicialmente, a Figura 35 mostra o cromatograma do perfil químico do extrato aquoso dos frutos de pitangueira.



**Figura 35:** Cromatograma 9, perfil químico do extrato aquoso dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

De acordo com a Figura 35, o cromatograma do extrato aquoso dos frutos de pitangueira apresentou um pico com tempo de retenção (Tr: 8,749 min) próximo ao observado pelo padrão ácido gálico (Tr: 7,371 min).

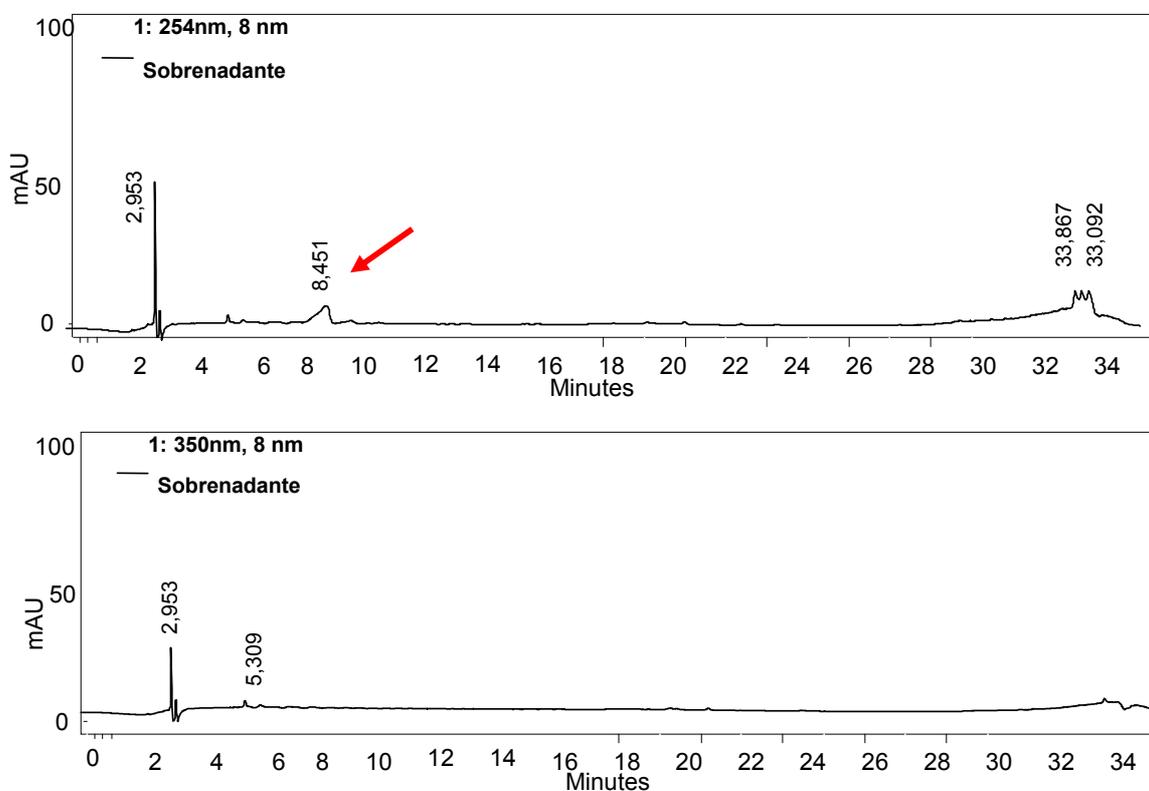
Com o intuito de verificar se há presença de picos compatíveis com os tempos de retenção dos padrões, algumas amostras foram selecionadas para realizar as co-cromatografias, portanto a Figura 36 mostra o cromatograma da co-cromatografia do extrato aquoso com o padrão ácido gálico.



**Figura 36:** Cromatograma 10, perfil químico da co-cromatografia do extrato aquoso dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.

A partir da co-cromatografia do extrato aquoso dos frutos de pitangueira se pode notar que não há pico compatível com o padrão ácido gálico por não apresentar sobreposição dos picos da amostra e do padrão.

Na sequência foi avaliado o perfil cromatográfico do sobrenadante dos frutos de pitangueira, conforme a Figura 37.

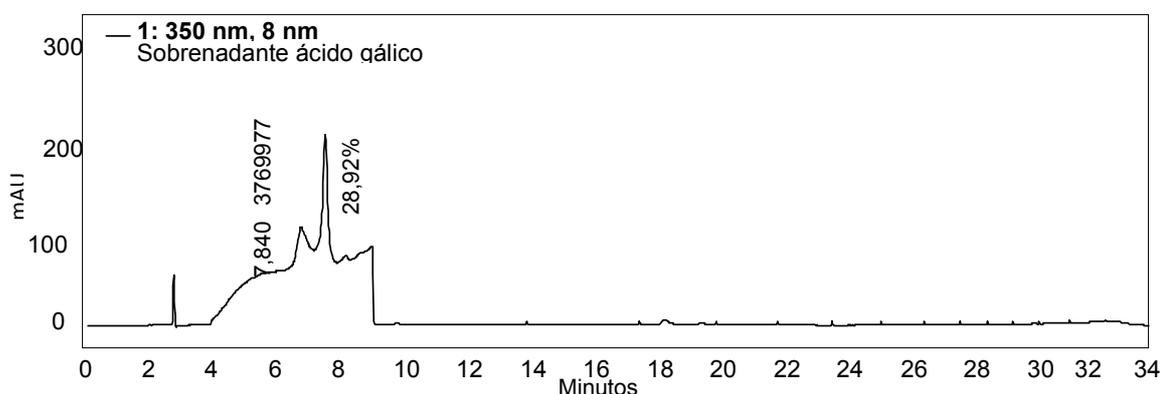


**Figura 37:** Cromatograma 11, perfil químico do sobrenadante dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

O pico com tempo de retenção em 2,953 minutos foi absorvido em ambos os comprimentos de onda, porém nenhum dos padrões analisados apresentou este tempo de retenção (Figura 40).

De acordo com a Figura 37, o cromatograma do sobrenadante dos frutos de pitangueira apresentou um pico com tempo de retenção (Tr: 8,451) próximo ao observado para o padrão de ácido gálico (Tr: 7,371).

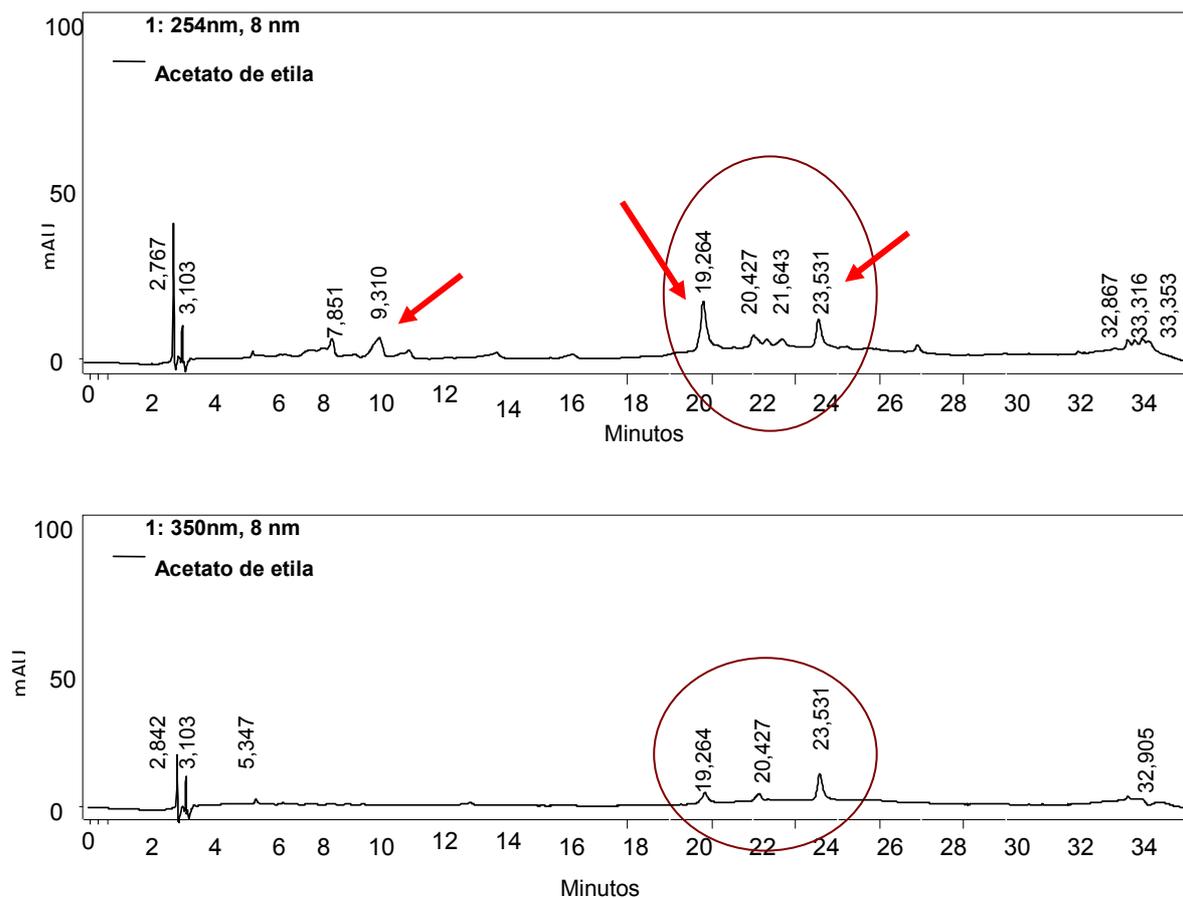
A Figura 38 mostra o cromatograma da co-cromatografia do sobrenadante com o padrão ácido gálico.



**Figura 38:** Cromatograma 12, perfil químico da co-cromatografia do sobrenadante dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.

De acordo com a co-cromatografia do padrão com o sobrenadante, se pode notar que no sobrenadante não há a presença do pico compatível com o tempo de retenção do padrão ácido gálico por não apresentar sobreposição dos picos da amostra e do padrão e para esta análise de co-cromatografia o cromatograma não ficou bem resolvido. Isto pode ser justificado por erro na injeção da amostra ou presença de bolhas no sistema ou ainda por problemas técnicos com o aparelho.

Na seqüência, serão demonstrados os perfis cromatográficos das frações em acetato de etila e butanólica dos frutos de pitangueira. Assim, a Figura 39 mostra o cromatograma da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira.

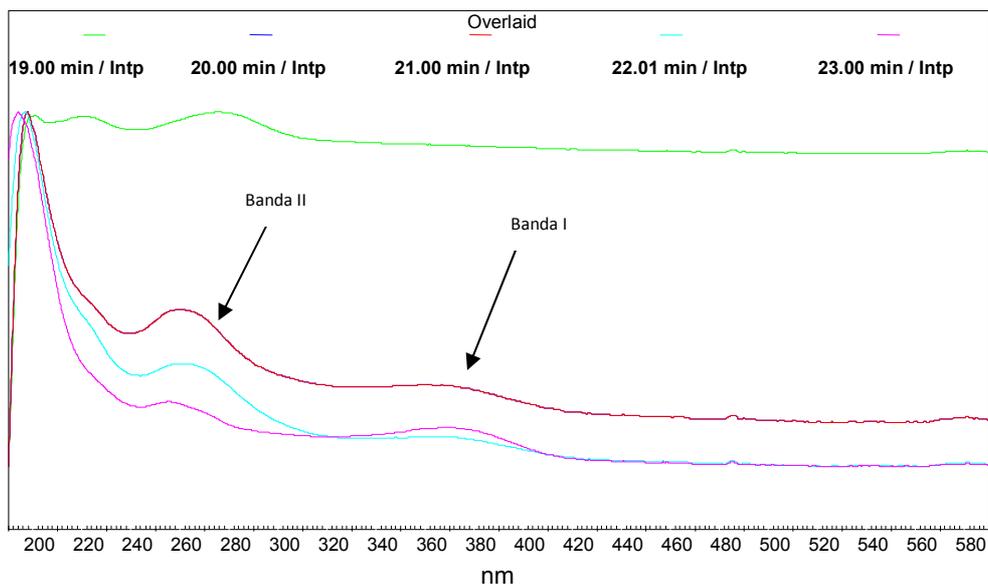


**Figura 39:** Cromatograma 13, perfil químico da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

Os picos com tempo de retenção em 3,103, 19,264, 20,427, 23,531 minutos foram absorvidos em ambos os comprimentos de onda (Figura 39). O cromatograma da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira apresentou um pico com tempo de retenção (Tr: 7,851 min) próximo ao observado pelo padrão ácido gálico (Tr: 7,371 min), um pico com tempo de retenção (Tr: 23,531 min) próximo do padrão quercetina (Tr: 23,147 min) e um pico com tempo de retenção (Tr: 19,264 min) próximo do padrão rutina (Tr: 18,891 min), logo esta fração foi submetida à co-cromatografia com estes padrões.

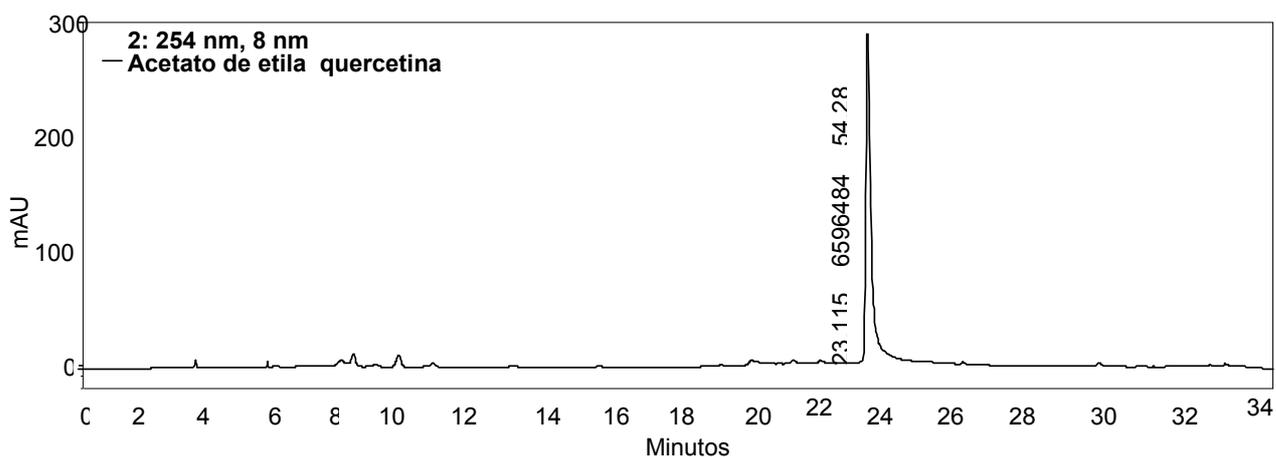
Os espectros de UV confirmam que os picos entre 19 a 23 minutos (circulados em vermelho – Figura 39) correspondem às substâncias fenólicas devido à presença de bandas que foram absorvidas na região de 240 e 350nm, região essa que é característica para flavonóides (Alonso-Salces et al., 2004)

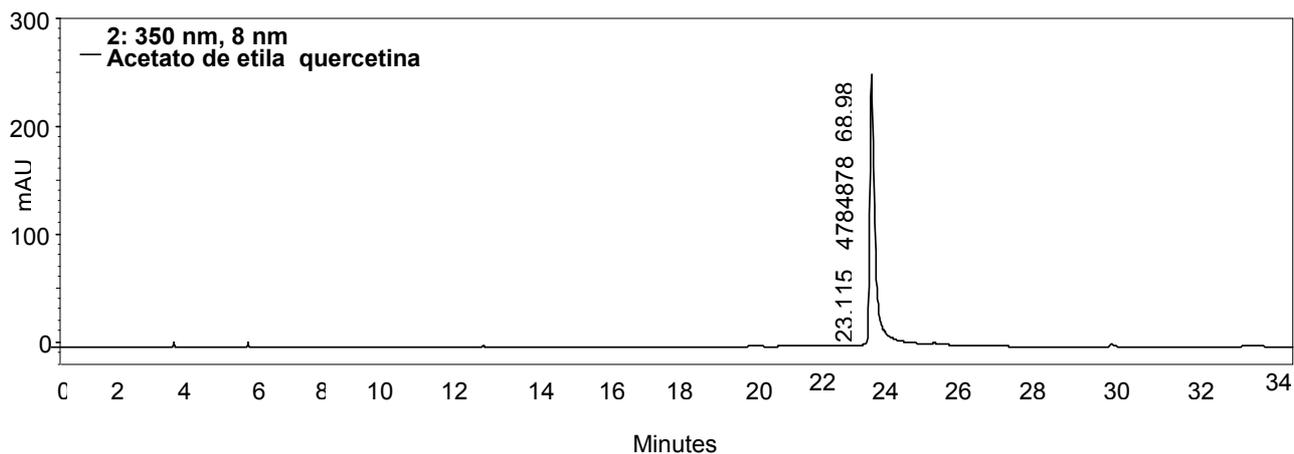
(Figura 40).



**Figura 40:** Espectro de ultravioleta dos sinais obtidos no cromatograma da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira.

A partir disso, a Figura 41 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração em acetato de etila com o padrão quercetina.

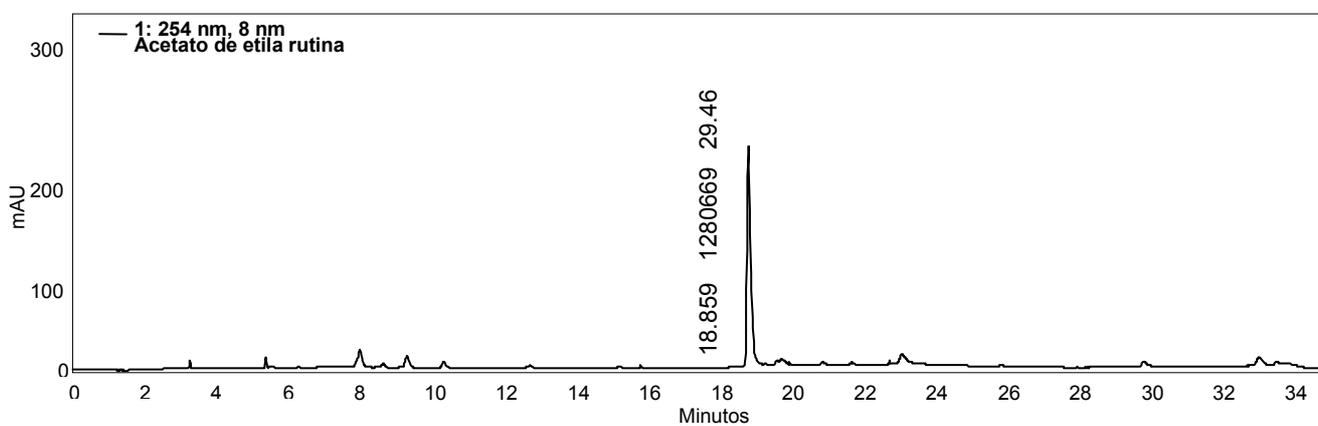


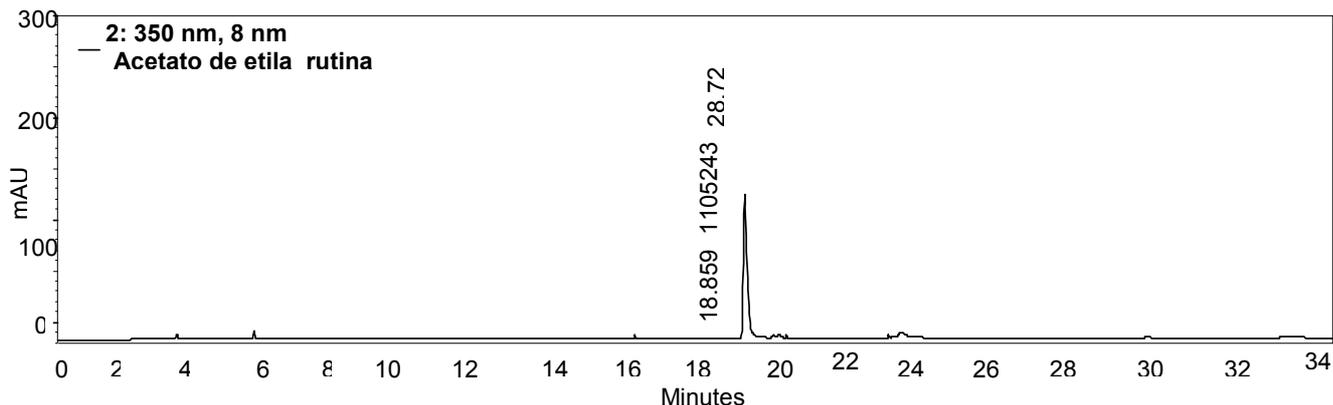


**Figura 41:** Cromatograma 14, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e quercetina avaliado por CLAE.

Conforme a co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira com o padrão quercetina se pode notar que nesta fração há a presença do pico compatível com o tempo de retenção do padrão analisado, com percentual de área de 68,98%.

A Figura 42 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração em acetato de etila com o padrão rutina.

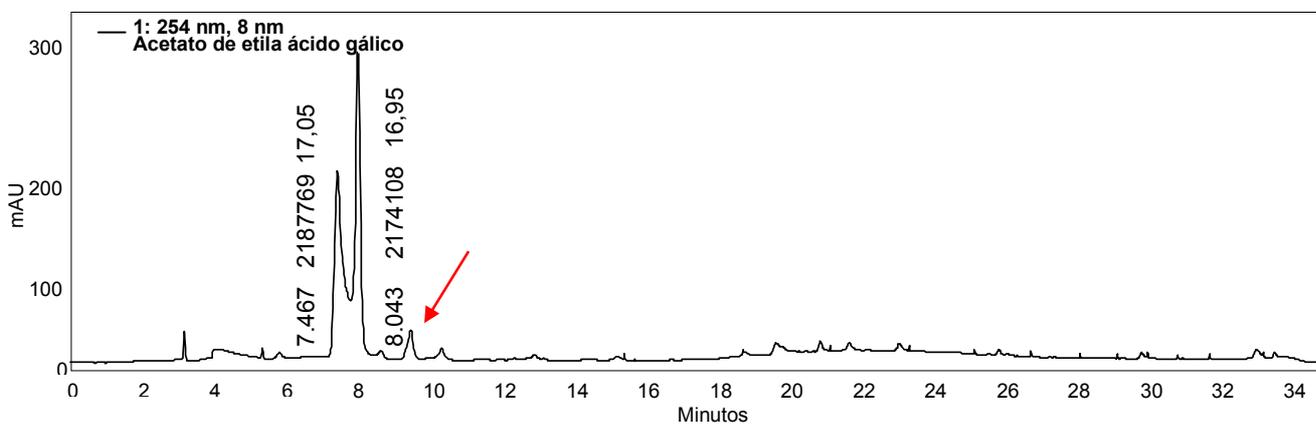




**Figura 42:** Cromatograma 15, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e do padrão rutina avaliado por CLAE.

Conforme a co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira com o padrão rutina se pode notar que nesta fração há a presença do pico compatível com o tempo de retenção do padrão analisado com percentual de área de 29,46%.

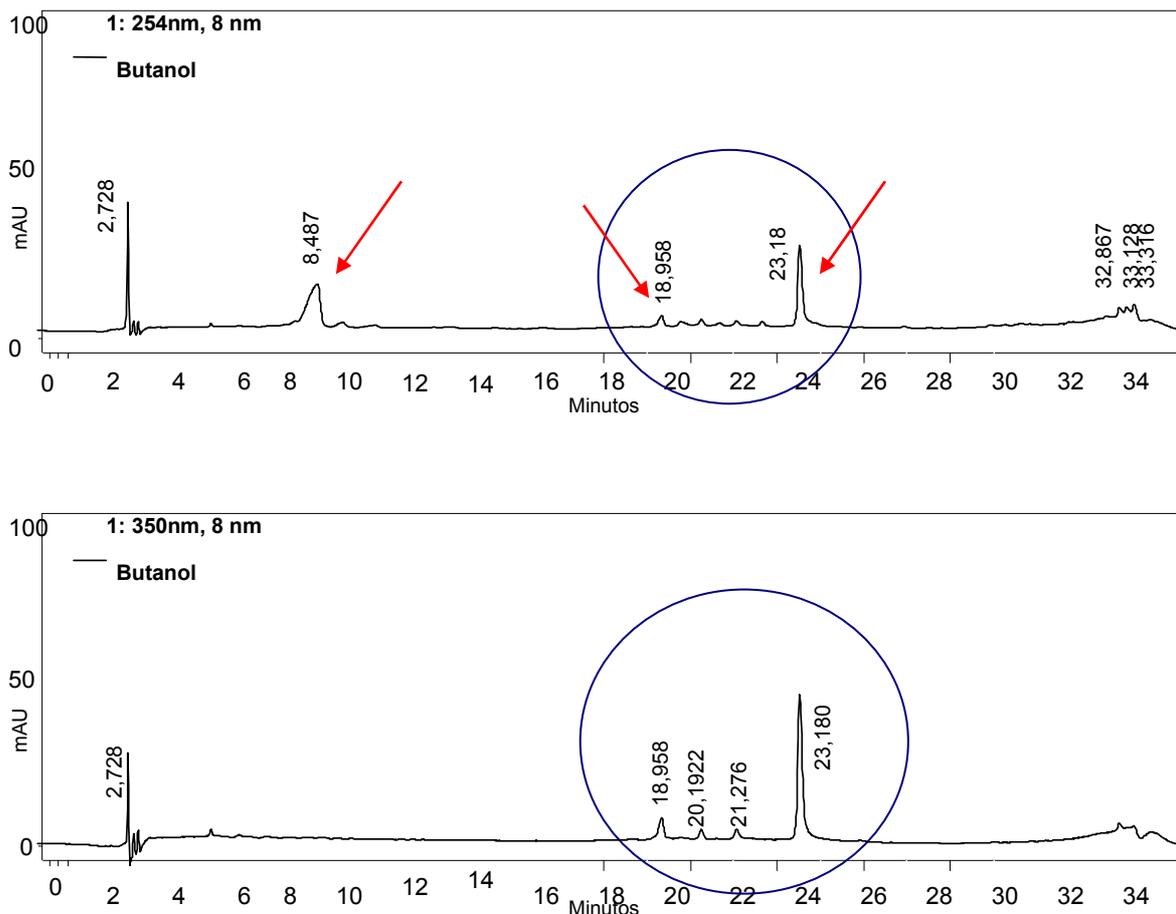
O mesmo procedimento foi realizado com o padrão ácido gálico e esta fração, com isso a Figura 43 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração em acetato de etila com o padrão ácido gálico.



**Figura 43:** Cromatograma 16, perfil químico da co-cromatografia da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.

De acordo com a co-cromatografia do padrão ácido gálico com a fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira, se pode notar que o pico que foi sugerido compatível com o padrão ácido gálico não apresentou sobreposição, com isso a fração em acetato de etila não possui o ácido fenólico ácido gálico.

A fração butanólica também foi avaliada por CLAE. Assim, a Figura 44 mostra o cromatograma da fração butanólica dos frutos de pitangueira.



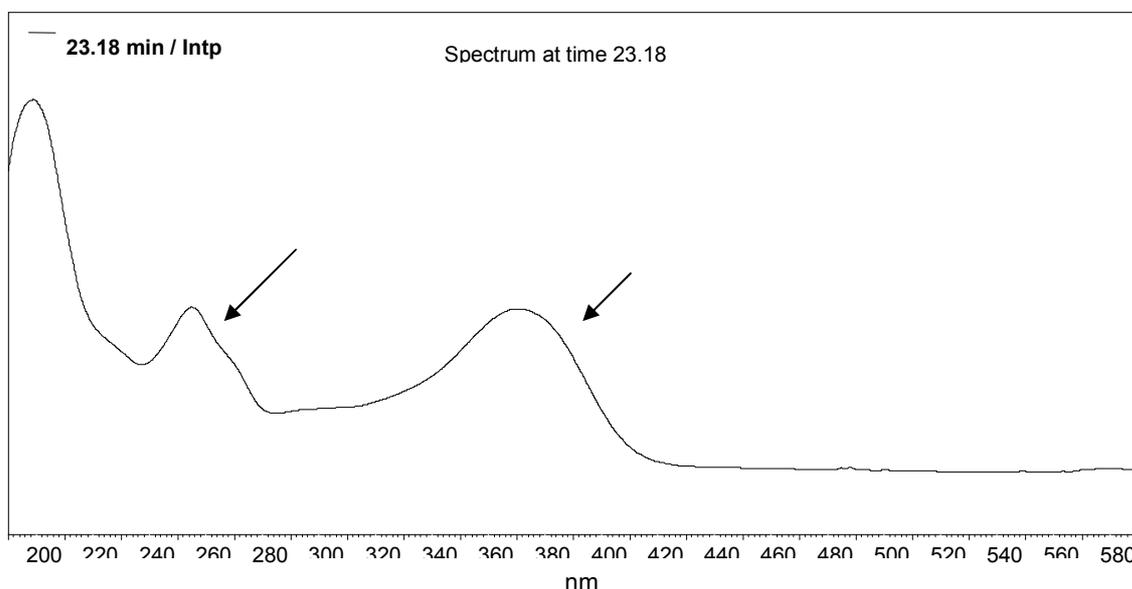
**Figura 44:** Cromatograma 17, perfil químico da fração butanólica dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

De acordo com a Figura 44, o cromatograma da fração butanólica dos frutos de pitangueira apresentou um pico com tempo de retenção ( $Tr$ : 8,487 min) próximo ao observado pelo padrão ácido gálico ( $Tr$ : 7,371 min), um pico com tempo de retenção ( $Tr$ : 18,958 min) próximo do padrão rutina ( $Tr$ : 18,891 min) e um pico com tempo de retenção ( $Tr$ : 23,18 min) próximo do padrão

quercetina (Tr: 23,147 min), pico este majoritário em relação aos demais.

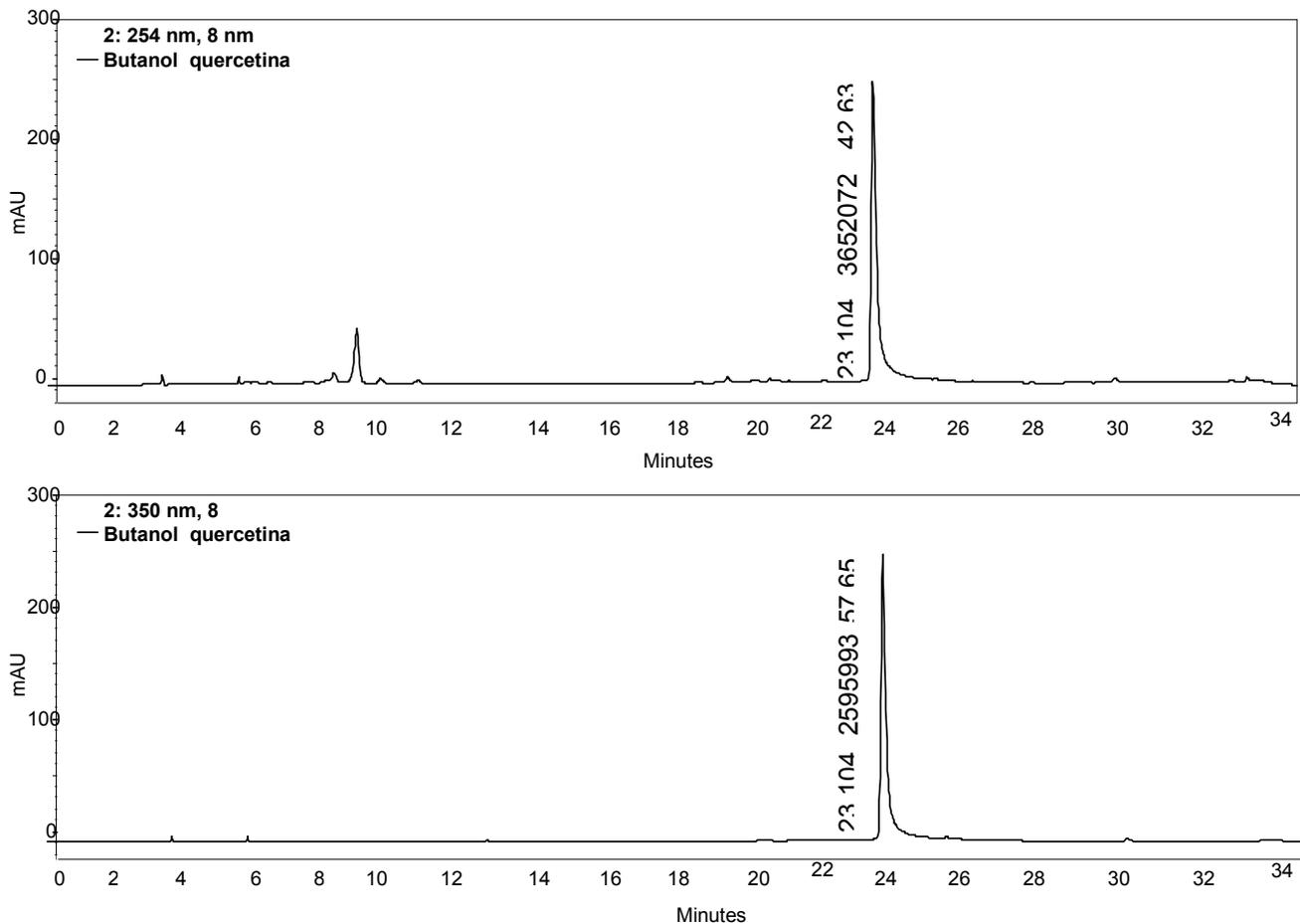
Os picos com tempo de retenção em 2,728, 18,958 e 23,180 minutos foram absorvidos em ambos os comprimentos de onda, porém os picos com tempo de retenção em 20,1992 e 21,276 minutos, embora não tenham sido listados no comprimento de onda em 254 nm, estes podem ser observados também em 350 nm, contudo em baixas concentrações nesta fração.

Também se observa que a fração butanólica dos frutos de pitangueira apresentou dois picos (Tr: 18,958 e 23,18 min) com características para flavonóides (circulado em azul). Essas substâncias foram confirmadas pelos espectros de ultravioleta devido à presença de bandas características para flavonóides (Alonso-Salces et al., 2004) (Figura 45).



**Figura 45:** Espectro dos sinais obtidos no cromatograma da fração butanólica dos frutos de pitangueira.

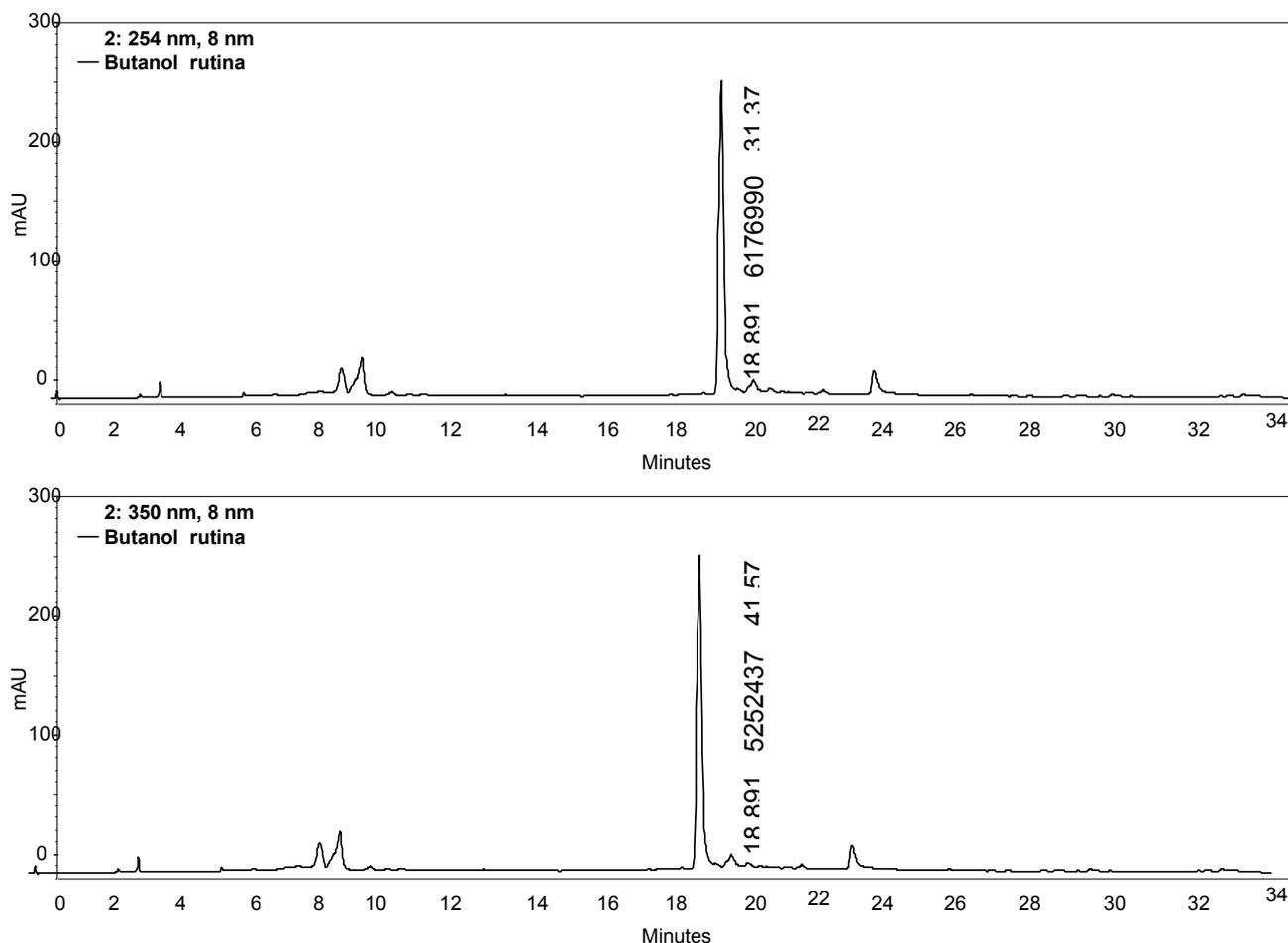
A partir disso, a Figura 46 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração butanólica com o padrão quercetina.



**Figura 46:** Cromatograma 18, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e quercetina avaliado por CLAE.

Conforme a Figura 46, a fração butanólica dos frutos de pitangueira apresentou a presença do pico compatível com o tempo de retenção do padrão quercetina com percentual de área de 57,65%.

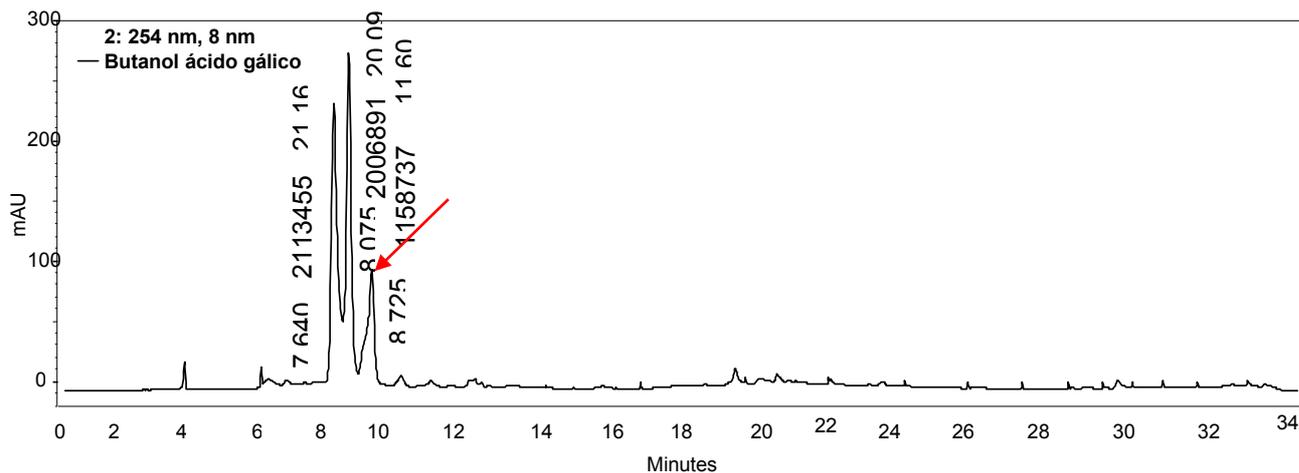
A Figura 47 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração butanólica com o padrão rutina.



**Figura 47:** Cromatograma 19, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e do padrão rutina avaliado por CLAE.

Conforme a co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira com o padrão rutina, se pode notar que nesta fração há a presença de pico compatível com o tempo de retenção do padrão analisado com área percentual de 41,57%.

A Figura 48 mostra o cromatograma da co-cromatografia da fração butanólica com o padrão ácido gálico.



**Figura 48:** Cromatograma 20, perfil químico da co-cromatografia da fração butanólica dos frutos de pitangueira e do padrão ácido gálico avaliado por CLAE.

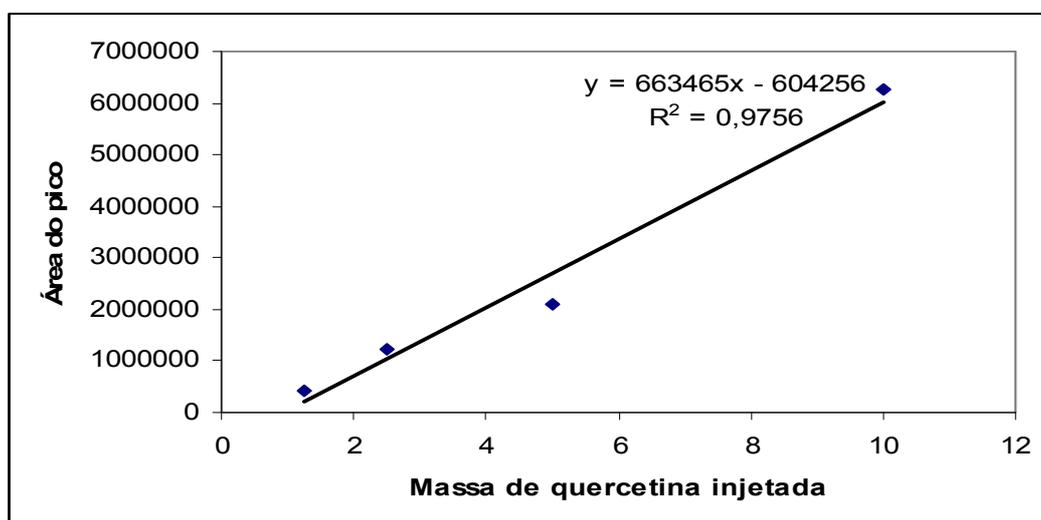
De acordo com a co-cromatografia do padrão ácido gálico com a fração butanólica dos frutos de pitangueira, se pode notar que o pico que sugeria a presença de ácido gálico não foi compatível com o tempo de retenção do padrão e com isso não ocorreu sobreposição dos picos.

A partir dos cromatogramas das frações em acetato de etila e butanólica dos frutos de pitangueira se pode observar que o fracionamento foi eficiente, devido à concentração de substâncias nestas frações, as quais estavam aparentemente ausentes no extrato aquoso e no sobrenadante, devido às baixas concentrações das mesmas.

Devido à presença do padrão quercetina nas amostras foi preparada uma curva padrão (área do pico x massa em  $\mu\text{g}$ ) utilizando-se uma amostra pura de quercetina (Tabela 4; Gráfico 3).

**Tabela 4** - Dados de massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de quercetina e as respectivas áreas obtidas.

Massa de quercetina injetada (em $\mu\text{g}$ )	Área correspondente ao pico
10	6266387
5	2105483
2,5	1225214
1,25	425861



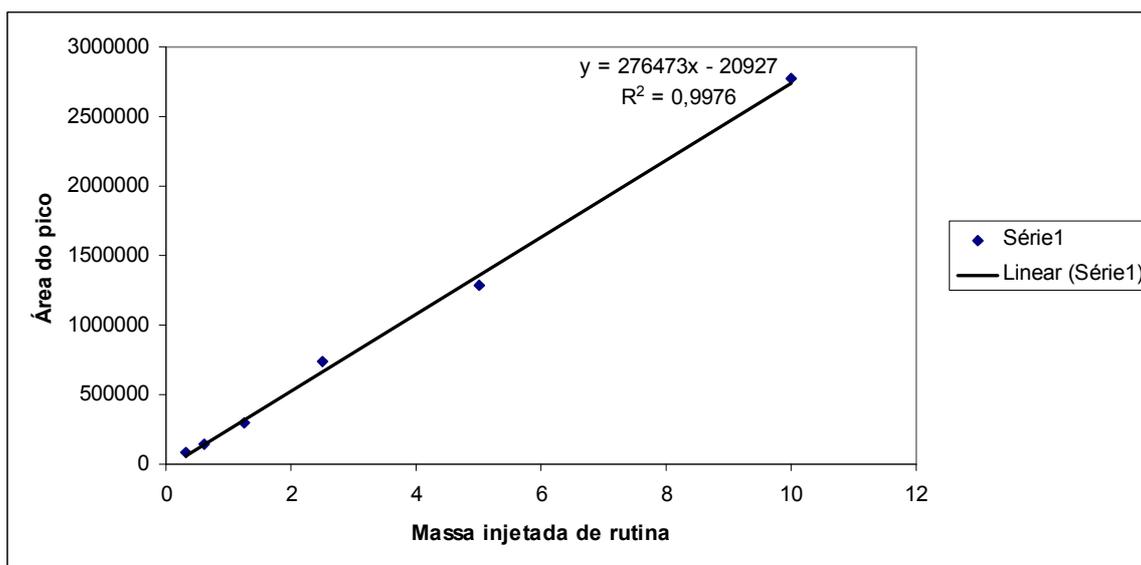
**Gráfico 3:** Curva padrão da área do pico x massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de quercetina obtida a partir dos valores apresentados na tabela.

A partir da curva padrão de quercetina foi possível calcular o percentual (teor) existente nas frações em acetato de etila e butanólica, sendo para a fração em acetato de etila  $1,75 \mu\text{g/mL}$  e para a fração butanólica  $1,79 \mu\text{g/mL}$ .

Devido à presença do padrão rutina nas amostras foi preparada uma curva padrão (área do pico x massa em  $\mu\text{g}$ ) utilizando-se uma amostra pura de rutina (Tabela 5; Gráfico 4).

**Tabela 5** - Dados de massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de rutina e as respectivas áreas obtidas.

Massa de rutina injetada (em $\mu\text{g}$ )	Área correspondente ao pico
10	2768153
5	1285783
2,5	739564
1,25	292702
0,625	142436
0,3125	88856



**Gráfico 4:** Curva padrão da área do pico x massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de rutina obtida a partir dos valores apresentados na tabela.

Devido à concentração de rutina ser pequena na fração butanólica foi necessário preparar mais duas concentrações do padrão para elaboração da curva.

A partir da curva padrão de rutina foi possível calcular o teor existente nas frações em acetato de etila e butanólica, sendo para a fração em acetato de etila 3,18 µg/mL e para a fração butanólica 0,50 µg/mL.

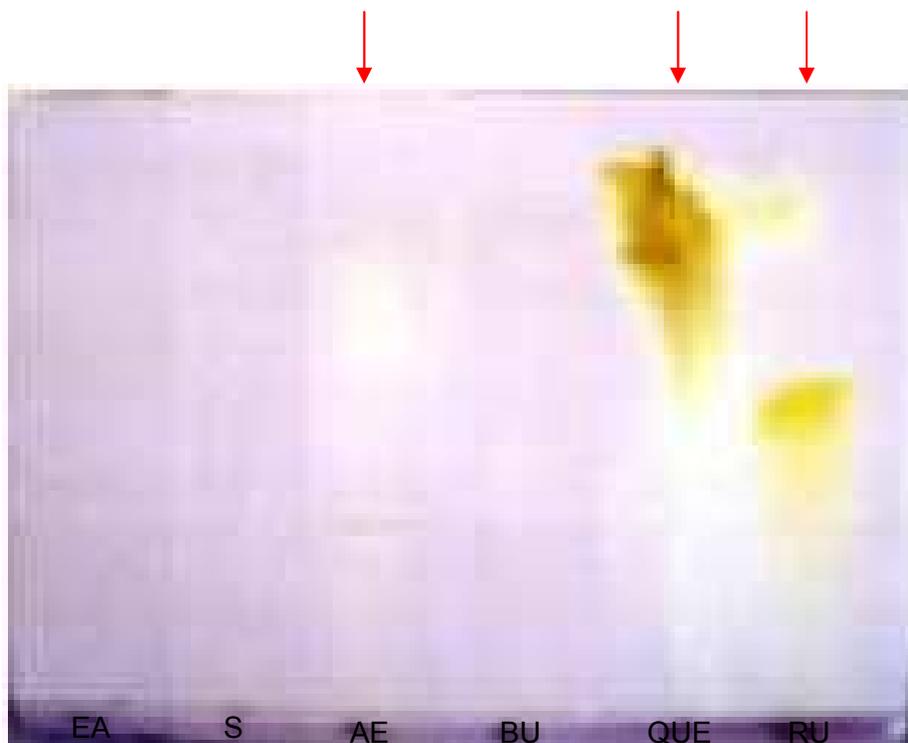
A partir dos resultados apresentados, se pode observar a ausência do padrão ácido gálico nas amostras devido a não sobreposição dos picos da amostra e padrão. Com relação aos flavonóides, a fração butanólica apresentou maior concentração do padrão quercetina e a fração em acetato de etila apresentou maior concentração do padrão rutina.

A presença dos flavonóides (quercetina e rutina) nos frutos de pitangueira reforça a utilização desses alimentos como funcionais, por apresentar atividades biológicas, já descritas na Revisão Bibliográfica (item 3.3.1 e 3.3.2).

### **6.3 – Avaliação qualitativa de atividade antioxidante**

Neste método de determinação de atividade antioxidante, as amostras foram avaliadas apenas de forma qualitativa quanto ao perfil antioxidante por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As condições cromatográficas para esta análise estão descritas no item 4.4.1 (Material e Métodos).

O extrato aquoso, o sobrenadante, as frações e os padrões quercetina e rutina foram submetidos à avaliação qualitativa de atividade antioxidante por CCD, conforme a Figura 49.



**Figura 49:** Cromatograma do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões quercetina e rutina após revelação com DPPH em CCD. EA (extrato aquoso); S (sobrenadante); AE (acetato de etila); BU (butanol); QUE (padrão quercetina) e RU (padrão rutina).

Na Cromatografia de Camada Delgada (CCD) se pode verificar que os compostos presentes nas amostras possuem atividade antioxidante mediante a revelação feita com DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

Os padrões quercetina e rutina apresentaram alta atividade antioxidante, fato este representado pelo arraste amarelo intenso, indicando que existe um conjunto de substâncias que podem estar atuando como redutoras dos radicais livres. Verifica-se que entre as amostras estudadas, a fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira apresentou atividade antioxidante, quando comparado aos padrões.

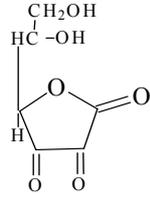
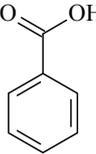
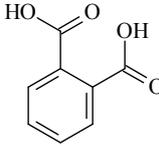
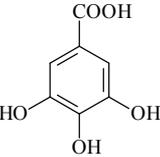
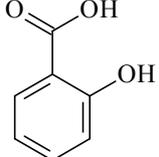
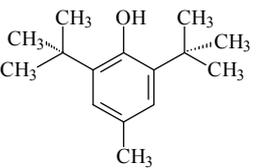
#### **6.4 - Avaliação espectrofotométrica de atividade antioxidante**

As condições cromatográficas para esta análise estão descritas no capítulo Material e Métodos (item 4.4.2).

As Tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira submetidos aos ensaios antioxidantes em três concentrações distintas de DPPH (1,2 mM, 0,6 mM e 0,1 mM).

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados apresentados são as médias aritméticas. Os padrões utilizados para estas análises foram os flavonóides quercetina e rutina, os padrões fenólicos ácido benzóico, ácido ftálico, ácido gálico e ácido salicílico e os padrões ácido ascórbico e BHT (butil hidroxi tolueno). Na Tabela 6, se pode verificar a estrutura dos padrões analisados.

**Tabela 6** – Estruturas dos padrões utilizados para análise.

 <p>Ácido ascórbico</p>	 <p>Ácido benzóico</p>
 <p>Ácido ftálico</p>	 <p>Ácido gálico</p>
 <p>Ácido salicílico</p>	 <p>BHT</p>

Inicialmente serão apresentados os resultados das amostras submetidas ao ensaio antioxidante na concentração de 1,2 mM de DPPH, conforme a Tabela 7.

**Tabela 7** – Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões em uma concentração maior de DPPH (1,2 mM). (Resultados expressos em porcentagem de atividade antioxidante).

Amostras	Concentrações			
	Fruta	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
Extrato aquoso pitanga		1,7 ± 0,1	7,9 ± 0,05	7,9 ± 0,05
Sobrenadante pitanga		3,3 ± 0,2	7,9 ± 0,05	7,9 ± 0,05
Acetato de etila pitanga		15,0 ± 0,3	7,9 ± 0,05	7,9 ± 0,05
Butanol pitanga		4,1 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Padrões	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)	
Quercetina	91,8 ± 0,4	90,1 ± 0,9	6,7 ± 0,6	
Rutina	89,6 ± 0,6	74,8 ± 0,3	5,4 ± 0,5	
Ácido ascórbico	92,4 ± 0,8	92,1 ± 0,4	33,9 ± 0,6	
Ácido benzóico	3,91 ± 0,8	3,31 ± 0,8	3,31 ± 0,1	
Ácido ftálico	7,00 ± 1,0	5,01 ± 0,4	4,98 ± 0,2	
Ácido gálico	93,41 ± 0,2	91,89 ± 0,4	88,79 ± 4,8	
Ácido salicílico	9,54 ± 0,5	9,28 ± 0,3	9,14 ± 0,1	
BHT	90,2 ± 0,2	57,1 ± 0,4	33,9 ± 0,7	

\*Média ± Desvio Padrão (n=3).

De acordo com a Tabela 7, as amostras não apresentaram atividade antioxidante em nenhuma das três concentrações analisadas.

Os padrões quercetina, rutina, BHT e ácido ascórbico apresentaram atividade antioxidante somente nas duas maiores concentrações.

O padrão ácido gálico apresentou valores significativos de atividade antioxidante nas três concentrações. Todos os outros três ácidos não foram capazes de seqüestrar os radicais livres formados, ou seja, atividade antioxidante inferior a 50% nas três concentrações testadas.

A Tabela 8 mostra os resultados das amostras submetidas ao ensaio antioxidante na concentração de 0,6 mM de DPPH.

**Tabela 8** – Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões na concentração intermediária de DPPH (0,6 mM). (Resultados expressos em porcentagem de atividade antioxidante).

Amostras	Concentrações		
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
Fruta			
Extrato aquoso pitanga	7,9 ± 0,7	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2
Sobrenadante pitanga	8,0 ± 0,4	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2
Acetato de etila pitanga	84,1 ± 2,0	7,0 ± 0,3	7,0 ± 0,3
Butanol pitanga	18,5 ± 1,7	14,5 ± 1,3	18,2 ± 1,6
Padrões			
Quercetina	92,7 ± 0,5	93,7 ± 0,6	1,6 ± 0,05
Rutina	91,8 ± 0,4	91,7 ± 0,6	18,2 ± 0,9
Ácido ascórbico	96,1 ± 0,2	95,5 ± 0,5	16,1 ± 0,8
Ácido benzóico	7,13 ± 1,4	6,69 ± 1,2	5,77 ± 0,4
Ácido ftálico	8,05 ± 1,0	7,70 ± 0,9	5,58 ± 2,1
Ácido gálico	95,65 ± 0,2	94,59 ± 0,5	93,60 ± 0,2
Ácido salicílico	4,87 ± 0,4	3,84 ± 0,4	3,14 ± 1,4
BHT	83,4 ± 0,6	82,5 ± 0,4	12,9 ± 0,7

\*Média ± Desvio Padrão (n=3).

Os resultados listados na Tabela 8 mostram que a amostra que apresentou atividade antioxidante foi a fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira na concentração de 1000 µg/ml e apresentou atividade antioxidante ligeiramente maior que o padrão BHT na concentração de 1000 µg/ml.

Os padrões quercetina, rutina, ácido ascórbico e BHT apresentaram atividade antioxidante nas duas maiores concentrações (1000 e 100 µg/mL), enquanto o ácido gálico apresentou atividade antioxidante nas três concentrações analisadas.

Todas as outras amostras e os padrões ácido benzóico, ácido ftálico e ácido salicílico não apresentaram atividade antioxidante nas três concentrações analisadas.

A Tabela 9 mostra os resultados das amostras submetidas ao ensaio antioxidante na concentração de 0,1 mM de DPPH.

**Tabela 9** – Atividade antioxidante do extrato, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira e padrões na concentração menor de DPPH 0,1 mM. (Resultados expressos em porcentagem de atividade antioxidante).

Amostras	Concentrações		
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
<b>Fruta</b>			
Extrato aquoso pitanga	35,6 ± 1,2	0	0
Sobrenadante pitanga	44,7 ± 1,2	0	0
Acetato de etila pitanga	86,1 ± 1,0	44,1 ± 2,0	0
Butanol pitanga	88,7 ± 1,1	0	0
<b>Padrões</b>			
Quercetina	94,9 ± 1,5	93,1 ± 0,3	91,2 ± 0,2
Rutina	88,0 ± 0,9	86,65 ± 1,1	0
Ácido ascórbico	95,6 ± 1,5	94,5 ± 0,5	93,8 ± 2,5
Ácido benzóico	0	0	0
Ácido ftálico	0	0	0
Ácido gálico	94,54 ± 0,7	91,54 ± 0,4	90,54 ± 1,5
Ácido salicílico	0	0	0
BHT	100,0 ± 0,9	52,1 ± 2,2	43,6 ± 1,5

\*Média ± Desvio Padrão (n=3).

Para a Tabela 9 se pode notar que as frações mais ativas foram as frações em acetato de etila e butanólica dos frutos de pitangueira na concentração de 1000 µg/mL.

A fração butanólica dos frutos de pitangueira possui atividade antioxidante ligeiramente maior que do padrão rutina na concentração de 1000 µg/mL.

De acordo com os padrões, o BHT apresentou na maior concentração um seqüestro total de radicais livres. Os padrões quercetina, ácido ascórbico e ácido gálico possuem atividade antioxidante superior a 90% nas três concentrações analisadas, enquanto a rutina apresentou perfil semelhante nas duas concentrações mais altas (1000 e 100 µg/mL).

Todas as outras amostras e os padrões ácido benzóico, ácido ftálico e ácido salicílico não apresentaram atividade antioxidante nas três concentrações analisadas.

A partir da comparação entre as três concentrações de DPPH analisadas (1,2, 0,6 e 0,1 mM), se pode notar que na concentração de 0,1 mM as frações em acetato de etila e butanólica apresentaram um percentual de atividade antioxidante maior que 80% (Tabela 10).

**Tabela 10** – Resumo dos valores de atividade antioxidante das frações dos frutos de pitangueira na concentração de 1000 µg / mL em todas as concentrações analisadas de DPPH.

Frações / [DPPH]	1,2 mM (%)	0,6 mM (%)	0,1 mM (%)
Acetato de etila	15,0	84,1	86,1
Butanol	4,1	18,5	88,7

Na concentração de DPPH de 0,6 mM, somente a fração em acetato de etila apresentou atividade antioxidante. Na maior concentração de DPPH (1,2 mM) nenhuma das frações apresentou atividade antioxidante.

Para os padrões analisados, o ácido gálico foi o que apresentou um melhor seqüestro de atividade antioxidante em todas as concentrações de DPPH, e em todas as diluições analisadas, já na concentração de DPPH a 0,1 mM, os padrões ácido ascórbico e quercetina também apresentaram seqüestro de radicais livres nas três concentrações.

A partir destas três concentrações de DPPH utilizadas (1,2mM, 0,6 mM e 0,1 mM) pode-se observar que a concentração do DPPH que será utilizada para determinar a atividade antioxidante de uma amostra é de extrema importância, pois a concentração do DPPH pode interferir no resultado da análise.

De acordo com os resultados obtidos, se pode observar que à medida que diminui a concentração de DPPH, as amostras e padrões apresentaram maior seqüestro de radicais livres, isto é explicado porque as amostras com um menor número de substâncias capazes de seqüestrar radicais livres, não são capazes de seqüestrar todas as moléculas de DPPH encontradas em uma solução de alta concentração, logo somente as amostras com um elevado número dessas substâncias (alta atividade antioxidante) conseguem reagir com essas moléculas de DPPH, ocorrendo assim a reação (roxo para amarelo) (Figura 3).

É possível afirmar que uma concentração alta de DPPH pode interferir no resultado por este teste ser uma análise colorimétrica. O DPPH em alta concentração apresenta uma cor muito forte, o que pode interferir na hora da

leitura no espectrofotômetro, extrapolando assim os valores de absorvância, sendo necessária a diluição das amostras para a realização da leitura.

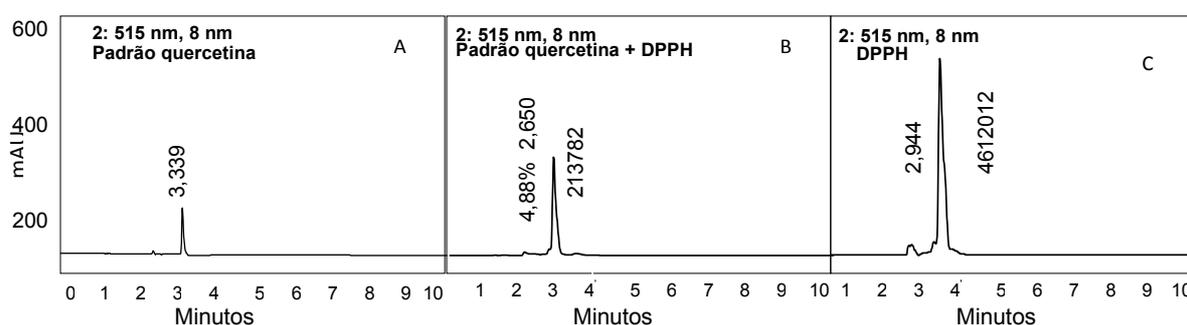
Conclui-se que as frações em acetato de etila e butanólica apresentaram um maior potencial antioxidante devido à concentração das substâncias antioxidantes nestas frações.

### 6.5 - Análise de atividade antioxidante pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As condições cromatográficas para esta análise estão descritas no item 4.4.3 (Material e Métodos).

O radical livre DPPH na ausência de um antioxidante apresentou um pico no tempo de 2,944 minutos com área de 4.612.012. Este resultado da área do DPPH será utilizado para calcular a porcentagem de atividade antioxidante das amostras.

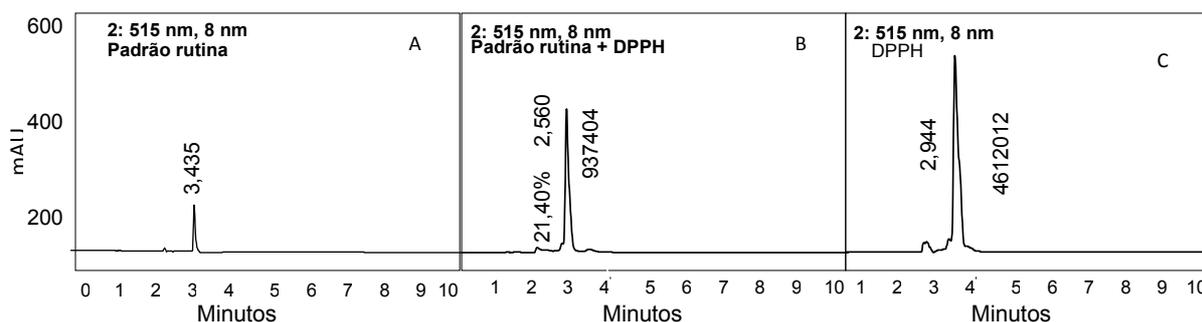
Nas figuras abaixo (Figuras 50 – 57) se observa os cromatogramas dos padrões que mostram o comportamento do radical livre DPPH frente à adição de um antioxidante, em que A significa a amostra a ser analisada, B significa a reação da amostra com o radical livre DPPH e C significa o radical livre DPPH. A partir disso, a Figura 50 mostra o cromatograma do padrão quercetina antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 50:** Cromatograma 21 a 515nm do padrão quercetina antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão quercetina apresentou uma grande redução obtendo uma área de 213.782 no tempo de 2,650 minutos (Figura 50). Isto significa que quase todas as moléculas de DPPH foram seqüestradas pelo padrão quercetina, logo apresenta uma alta atividade antioxidante.

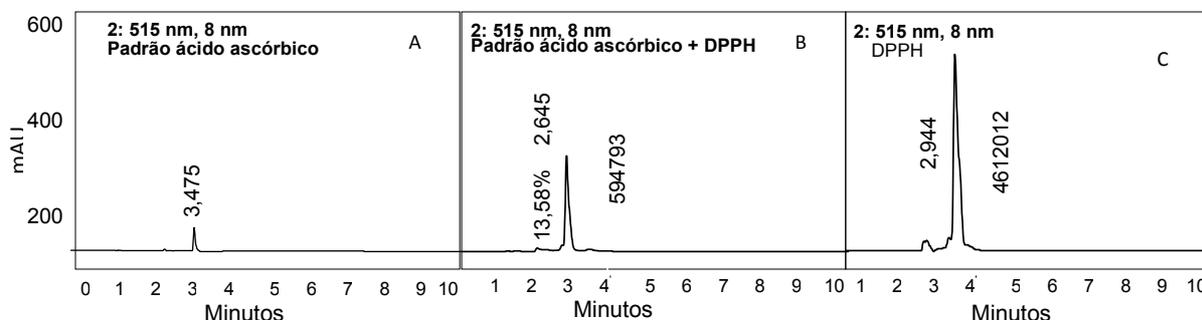
A Figura 51 mostra o cromatograma do padrão rutina antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 51:** Cromatograma 22, a 515nm do padrão rutina antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão rutina apresentou uma grande redução da área de 937.404 no tempo de 2,560 minutos (Figura 51). Isto significa um alto sequestro do radical livre pelo padrão rutina, logo um alto percentual de atividade antioxidante.

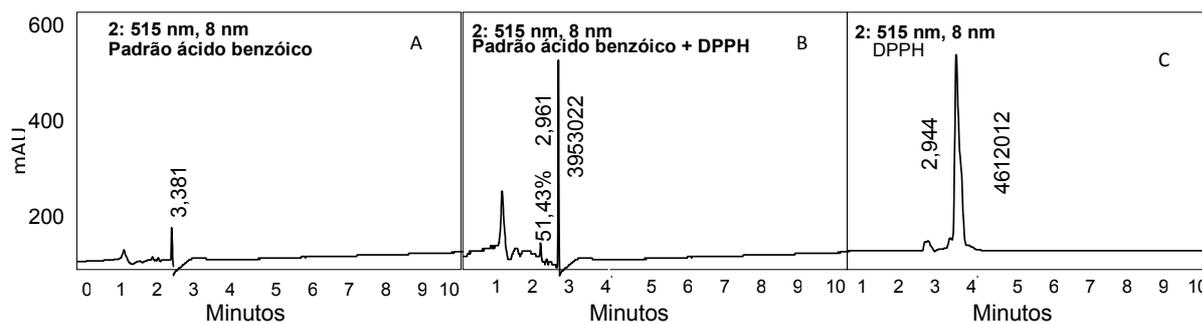
A Figura 52 mostra o cromatograma do padrão ácido ascórbico antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 52:** Cromatograma 23, a 515nm do padrão ácido ascórbico antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão ácido ascórbico apresentou uma grande redução da área de 594.793 no tempo de 2,645 minutos (Figura 52). Isto significa um alto sequestro das moléculas de DPPH pelo padrão ácido ascórbico apresentando uma alta atividade antioxidante.

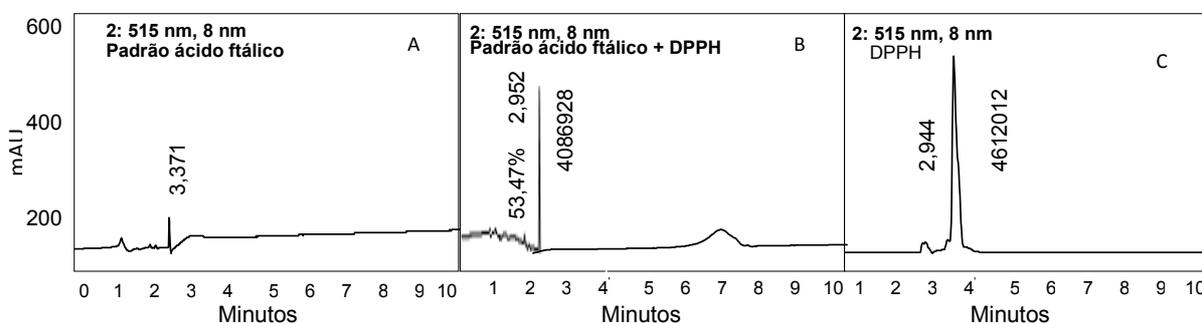
A Figura 53 mostra o cromatograma do padrão ácido benzóico antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 53:** Cromatograma 24, a 515nm do padrão ácido benzóico antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão ácido benzóico apresentou uma pequena redução obtendo uma área de 3.953.022 no tempo de 2,961 minutos (Figura 53). Isto significa que uma pequena quantidade das moléculas de DPPH foram seqüestradas pelo padrão DPPH, logo baixa atividade antioxidante.

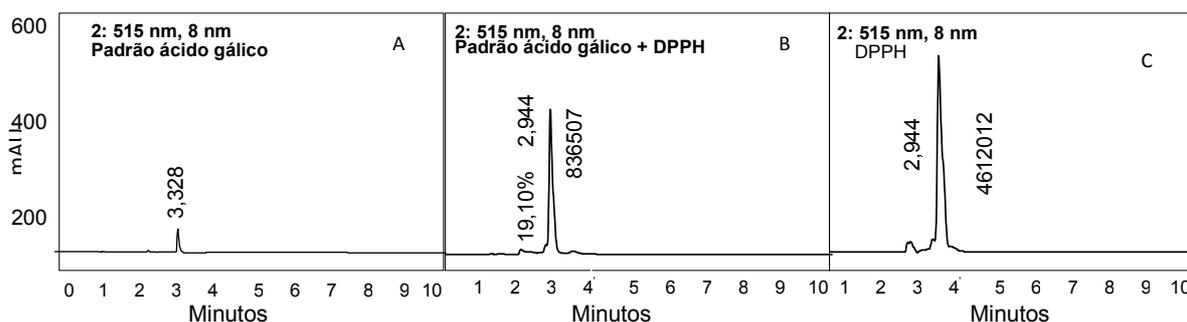
A Figura 54 mostra o cromatograma do padrão ácido ftálico antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 54:** Cromatograma 25, a 515nm do padrão ácido ftálico antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão ácido ftálico apresentou uma pequena redução obtendo uma área de 4.086.928 no tempo de 2,952 minutos (Figura 54). Isto significa que uma pequena quantidade de moléculas de DPPH foram seqüestradas pelo padrão ácido ftálico, possuindo baixa atividade antioxidante.

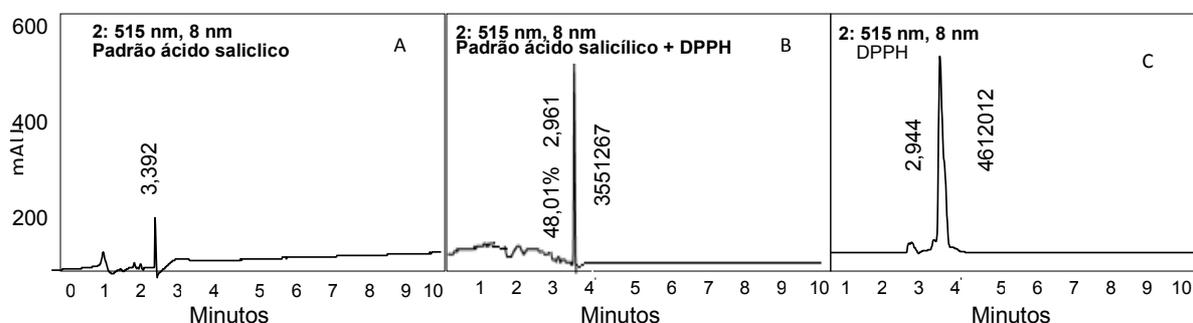
A Figura 55 mostra o cromatograma do padrão ácido gálico antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 55:** Cromatograma 26, a 515nm do padrão ácido gálico antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão ácido gálico apresentou uma grande redução obtendo uma área de 836.507 no tempo de 2,944 minutos (Figura 55). Isto significa um alto seqüestro das moléculas de DPPH pelo padrão ácido gálico, logo apresenta um maior percentual de atividade antioxidante.

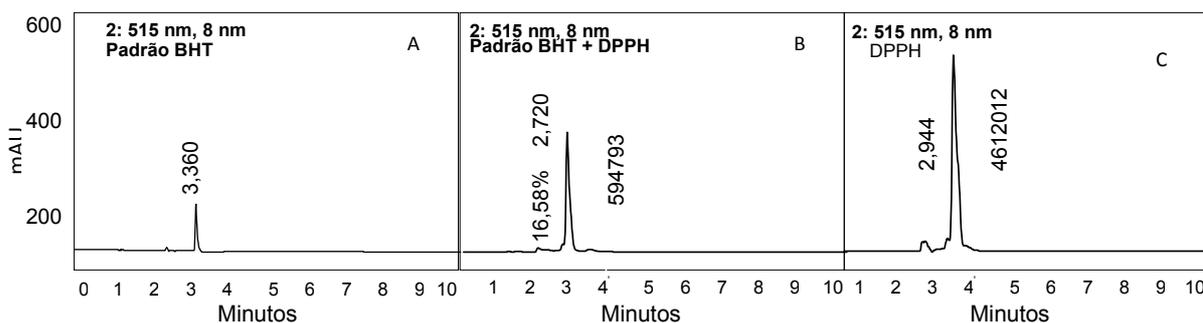
A Figura 56 mostra o cromatograma do padrão ácido salicílico antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 56:** Cromatograma 27, a 515nm do padrão ácido salicílico antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão ácido salicílico apresentou uma pequena redução obtendo uma área de 3.551.267 no tempo de 2,961 minutos (Figura 56). Isto significa que um pequeno número de moléculas de DPPH foram seqüestradas pelo padrão ácido salicílico, logo apresenta um baixo percentual de atividade antioxidante.

A Figura 57 mostra o cromatograma do padrão BHT antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 57:** Cromatograma 28, a 515nm do padrão BHT antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do padrão BHT apresentou uma grande redução obtendo uma área de 594.793 no tempo de 2,720 minutos (Figura 57). Isto significa que um grande número de moléculas de DPPH foram seqüestradas pelo padrão BHT, logo apresenta alta atividade antioxidante.

Em todos os perfis cromatográficos após a reação com o DPPH, houve pequena diferença nos tempos de retenção apresentados antes e após da reação com o DPPH. Isso ocorre porque há possivelmente uma interação das substâncias presentes nas amostras com o radical DPPH.

Com os resultados das áreas do pico do DPPH após a reação com os padrões calculou-se a porcentagem de atividade antioxidante (conforme item 4.4.3 – Material e Método), os quais estão descritos na Tabela 11 em ordem decrescente de porcentagem de atividade antioxidante.

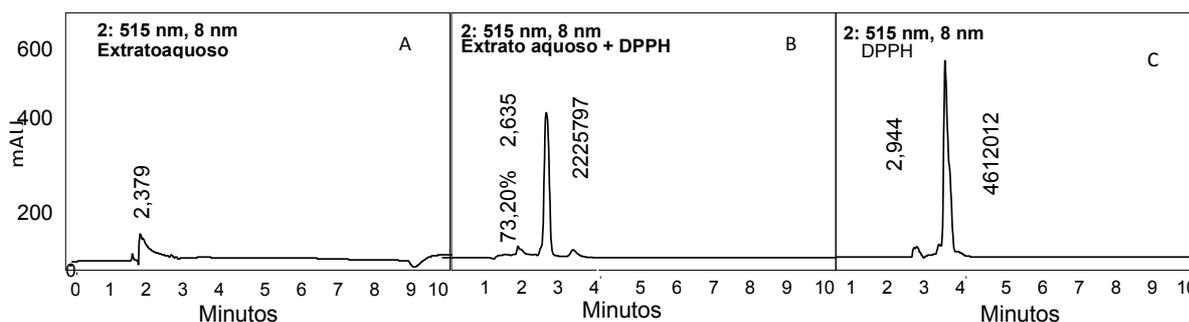
**Tabela 11** – Atividade antioxidante dos padrões analisados por CLAE.

Padrões fenólicos	Tr	Área	Área%	AA (%)
Quercetina	2,650	213.782	4,88	95,36
Ácido ascórbico	2,645	594.793	13,58	88,06
BHT	2,720	726.190	16,58	87,10
Ácido gálico	2,944	836.507	19,10	81,86
Rutina	2,560	937.404	21,40	79,67
Ácido salicílico	2,961	3.551.267	48,01	22,99
Ácido benzóico	2,961	3.953.022	51,43	14,28
Ácido ftálico	2,952	4.086.928	53,47	11,38

Tr: tempo de retenção / Área %: área percentual / AA (%): porcentagem de atividade antioxidante.

De acordo com a análise por CLAE, os padrões mais ativos foram a quercetina, o ácido ascórbico, o BHT, o ácido gálico e a rutina. Os padrões ácido benzóico, ácido ftálico e ácido salicílico não apresentaram atividade antioxidante. Estes resultados obtidos corroboram com aqueles obtidos a partir da análise espectrofotométrica (capítulo Resultados e Discussões – item 6.4 – página 59).

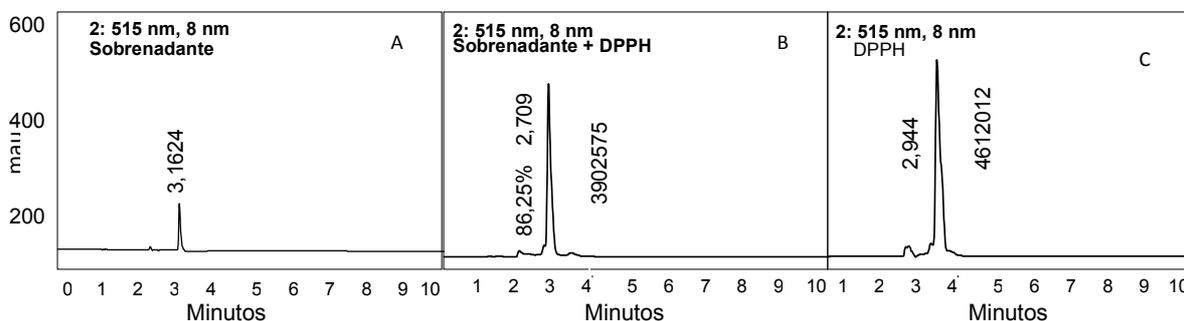
A partir dos resultados obtidos dos padrões, as amostras foram submetidas à análise de atividade antioxidante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Com isso, a Figura 58 mostra o cromatograma do extrato aquoso antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 58:** Cromatograma 29, a 515 nm do extrato aquoso antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do extrato aquoso apresentou uma redução intermediária obtendo uma área de 2.225.797 no tempo de 2,635 minutos (Figura 58), logo o extrato aquoso apresenta atividade antioxidante.

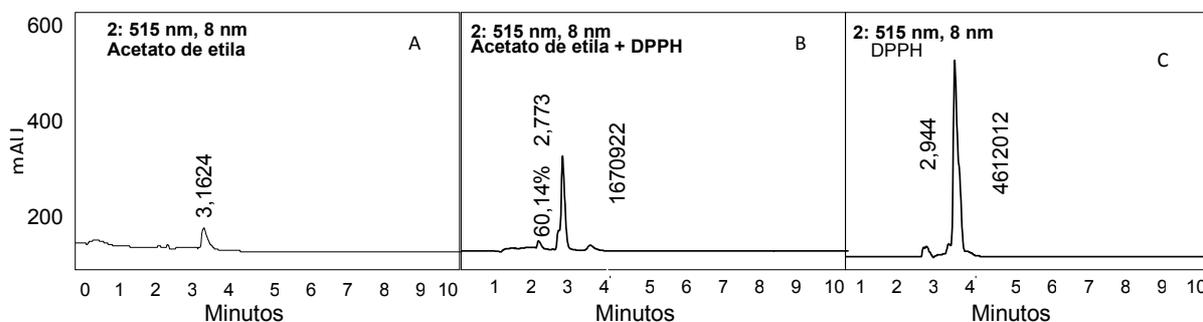
A Figura 59 mostra o cromatograma do sobrenadante antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 59:** Cromatograma 30, a 515 nm do sobrenadante dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença do sobrenadante apresentou uma pequena redução obtendo uma área de 3.902.575 no tempo de 2,709 minutos (Figura 59), logo apresenta baixa atividade antioxidante.

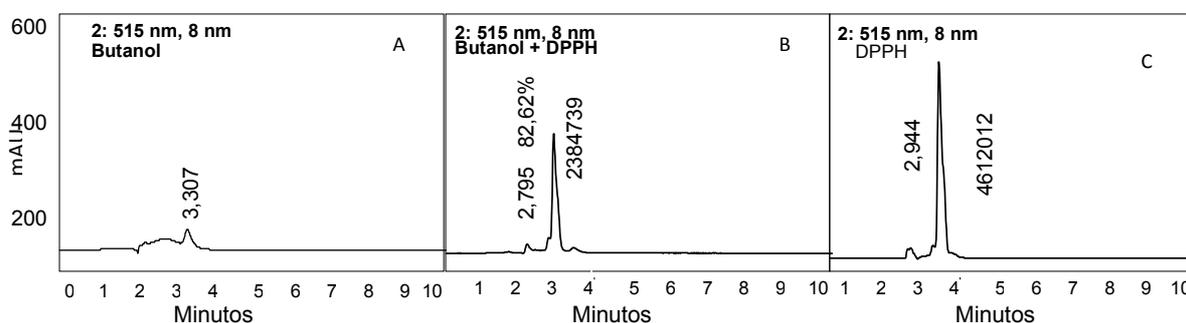
A Figura 60 mostra o cromatograma da fração em acetato de etila antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 60:** Cromatograma 31, a 515 nm da fração em acetato de etila dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença da fração em acetato de etila apresentou uma redução intermediária obtendo uma área de 1.670.922 no tempo de 2,613 minutos (Figura 60), logo esta fração possui atividade antioxidante.

A Figura 61 mostra o cromatograma da fração butanólica antes e depois da reação com DPPH.



**Figura 61:** Cromatograma 32, a 515 nm da fração butanólica dos frutos de pitangueira antes e depois da reação com DPPH.

O pico do radical DPPH na presença da fração butanólica apresentou uma redução intermediária obtendo uma área de 2.384.739 no tempo de 2,795 minutos (Figura 61), logo esta fração apresenta atividade antioxidante.

Com os resultados das áreas do pico do DPPH após a reação com as amostras calculou-se a porcentagem de atividade antioxidante, os quais estão descritos na Tabela 12 em ordem decrescente de porcentagem de atividade antioxidante.

**Tabela 12** - Atividade antioxidante do extrato aquoso, sobrenadante e frações dos frutos de pitangueira analisados por CLAE.

Amostras	Tr	Área	Área %	AA (%)
Acetato de etila	2,773	1.670.922	60,14	63,77
Extrato aquoso	2,635	2.225.797	73,20	51,73
Butanol	2,795	2.384.739	82,62	48,29
Sobrenadante	2,709	3.902.575	86,25	15,38

De acordo com o método por CLAE, as amostras que apresentaram atividade antioxidante foram a fração em acetato de etila seguida do extrato aquoso (Tabela 12), portanto este dado corrobora, parcialmente com os

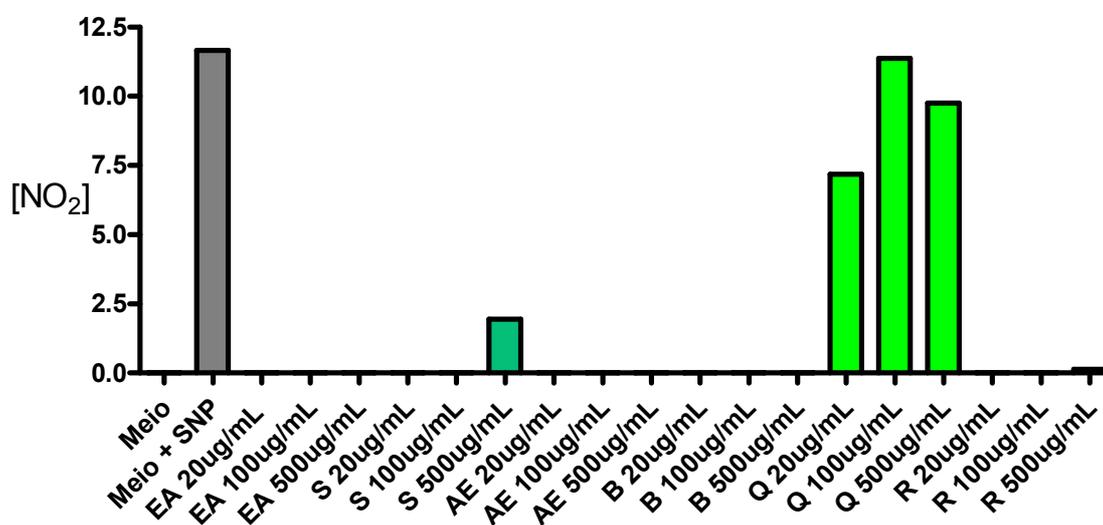
resultados obtidos pelos métodos qualitativo e espectrofotométrico (capítulo Material e Método – item 6.3 e 6.4, respectivamente).

Sabe-se que o método espectrofotométrico – colorimétrico não é aplicável a alimentos coloridos, devido à interferência de pigmentos, podendo dar um resultado falso positivo (Yamaguchi et al., 1998). Por isso, o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método recomendável, por possuir algumas vantagens como especificidade e sensibilidade (Odrozola-Serrano et al., 2007).

### 6.6 - Análise da atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio (SNP).

O experimento com o doador de óxido nítrico (NO), nitroprussiato de sódio (SNP) foi utilizado com o objetivo de verificar se a inibição da produção de NO, se deu por intermédio do seqüestro do NO produzido.

A partir da curva padrão, obtiveram-se os resultados da análise de seqüestro de NO (Gráfico 5).



EA - Extrato aquoso; S – sobrenadante; AE – fração acetato de etila; B – fração butanólica; Q – padrão quercetina; R – padrão rutina.

**Gráfico 5:** Seqüestro de NO doado por SNP

Os padrões utilizados foram a quercetina e rutina, onde a rutina seqüestrou totalmente o óxido nítrico doado em todas as concentrações.

Foi possível observar no Gráfico 5 que nas duas menores concentrações todas as amostras seqüestraram totalmente o óxido nítrico doado pelo nitroprussiato de sódio.

As amostras que obtiveram seqüestro total nas três concentrações foram o extrato aquoso, a fração em acetato de etila e a fração butanólica dos frutos de pitangueira. O sobrenadante dos frutos de pitangueira apresentou um menor seqüestro na maior concentração.

O perfil de atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio foi diferente dos outros métodos analisados. Isto pode ser justificado porque os radicais livres utilizados para estas análises foram diferentes, sendo o óxido nítrico para a análise do nitroprussiato de sódio e o DPPH para as demais análises, por isso esses resultados não foram passíveis de comparação.

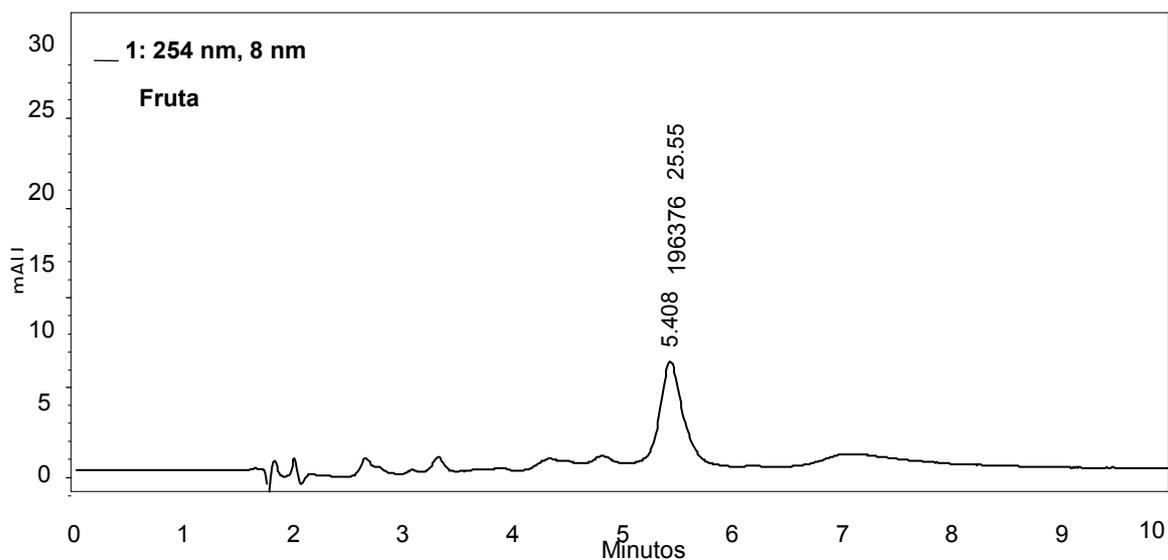
## **6.7 - Determinação do Teor de Vitamina C (Ácido Ascórbico)**

### **6.7.1 - Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

O método titulométrico referido no Material e Métodos (item 4.5.2) não foi o indicado para realizar a análise de vitamina C para os frutos de pitangueira por apresentarem cor vermelha, a qual interfere na hora de verificar o ponto de viragem do incolor para o róseo.

Diante desta problemática, a análise de vitamina C foi realizada apenas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

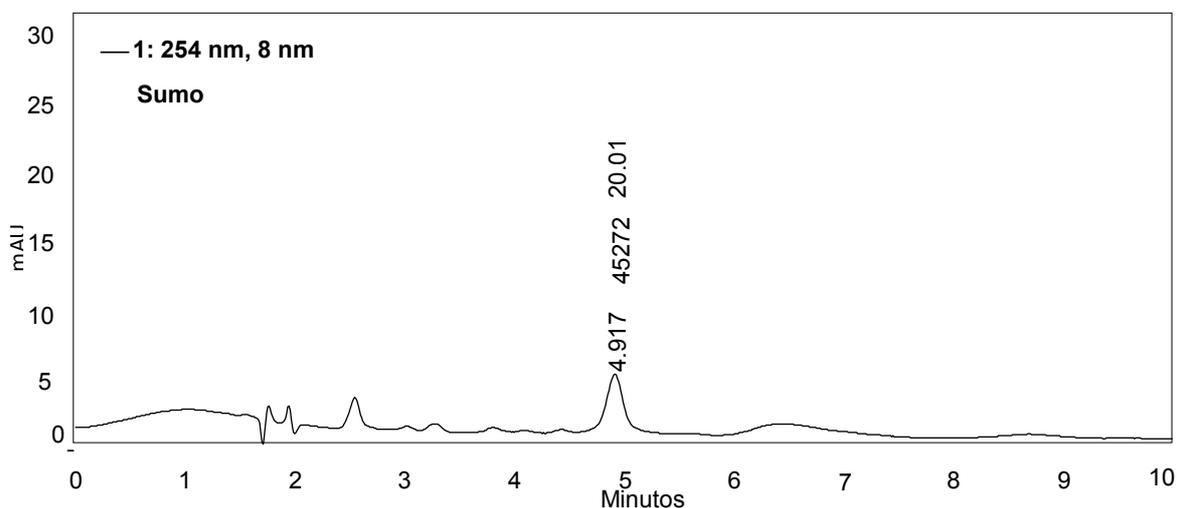
A Figura 62 mostra o cromatograma do perfil químico de vitamina C nos frutos de pitangueira.



**Figura 62:** Cromatograma 33, perfil químico a 254 nm de vitamina C dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

A partir deste cromatograma pode-se verificar que há presença de um pico com tempo de retenção em 5,408 minutos, com área de 196376 (25,55%).

A Figura 63 mostra o cromatograma do perfil químico de vitamina C no sumo dos frutos de pitangueira.

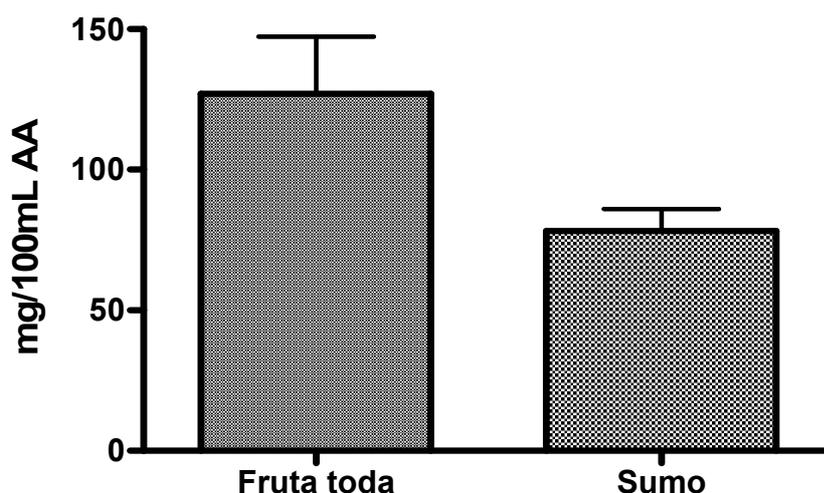


**Figura 63:** Cromatograma 34, perfil químico a 254 nm de vitamina C do sumo dos frutos de pitangueira avaliado por CLAE.

De acordo com a Figura 63 se pode verificar que há presença de um pico com tempo de retenção em 4,917 minutos, com área de 45272 (20,01%).

A partir das áreas obtidas por CLAE do padrão ácido ascórbico em várias concentrações foi calculada a curva padrão para vitamina C.

A partir da curva padrão de vitamina C, as áreas obtidas das amostras foram lançadas na curva padrão para obtenção da concentração de vitamina C em 100mL do fruto e sumo.



**Gráfico 6:** Resultados obtidos de vitamina C nas amostras estudadas (n = 3).

De acordo com o Gráfico 6, a fruta apresentou uma maior concentração de vitamina C (127,12 mg AA / 100 g) comparada ao sumo (78,16 mg AA / 100 g).

Lima e colaboradores (2000) detectaram um teor de vitamina C em pitangas avermelhadas de 72,80 mg / 100g, Mélo, Lima e Nascimento (2000) reportaram valores de vitamina C de 42,9 mg / 100g em frutos maduros, enquanto Villachica (1996) encontrou um teor de vitamina C de 14 mg / 100g.

Em comparação com os resultados da literatura, a fruta e o sumo de pitangueira apresentaram um valor maior de vitamina C do que aqueles relatados em trabalhos anteriores. Isto pode ser explicado pelos diversos fatores que afetam a síntese e retenção do ácido ascórbico, tais como: variedade e fatores ambientais (Dib Taxi, 2001).

De acordo com a literatura, a pitanga não é considerada uma rica fonte de vitamina C, comparada às frutas ricas em ácido ascórbico, destacando-se a acerola com teor de 1.790 mg/100g de ácido ascórbico, seguida do caju, com suas variedades amarela e vermelha, a goiaba, a manga e as frutas cítricas (Oliveira, 2006).

A diferença na concentração da vitamina C do sumo em comparação aos frutos pode ser em virtude da manipulação dos frutos para extração do sumo, gerando um maior contato dos frutos com o oxigênio, podendo levar a uma degradação da vitamina C. Logo, a forma de extração do sumo nos alimentos também pode interferir nos resultados de ácido ascórbico.

### 6.8 - Determinação de Taninos e Fenóis Totais

A tabela abaixo sumariza os resultados obtidos das análises de taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

**Tabela 13** - Dados obtidos nas análises de taninos hidrolisáveis e taninos condensados dos frutos de pitangueira.

Amostra	Taninos Hidrolisáveis (%)	Taninos Condensados (%)
Pitanga	Não detectados	0,02025

Os taninos hidrolisáveis não foram detectáveis para estas amostras. Porém, para a família Myrtaceae esses taninos são encontrados principalmente nas espécies do gênero *Eucalyptus* sp (Mueller-Harvey, 2001).

O tipo de extração pode ser um fator limitante para a observação do conteúdo fenólico das fontes vegetais (Agostini-Costa *et al.*, 2003). Talvez, este fato possa ter influenciado na detecção dos taninos hidrolisáveis por estar diluídos (pequenas concentrações) na fruta.

Com relação aos teores de fenóis totais nos frutos de pitangueira, a Tabela 14 mostra os resultados.

**Tabela 14** - Dados obtidos na análise de fenóis totais dos frutos de pitangueira.

<b>Amostras</b>	<b>Fenóis Totais (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>Pitanga</b>	74,76

O teor de fenóis totais encontrado nos frutos de pitangueira (74,76  $\mu\text{g/ml}$ ) encontra-se abaixo do valor reportado por Lopes e colaboradores (2005), que foi de  $80,32 \pm 3,37$  mg ácido tânico/100g e por Guimarães et al. (1983), que foi de 122 mg/100g, para frutos provenientes do Estado de Pernambuco.

Observa-se baixa concentração de fenóis totais nos frutos de pitangueira, que pode ser devido à metodologia de extração, que é um fator limitante para a observação do conteúdo fenólico das plantas (Agostini-Costa et al., 2003).

Trabalhos na literatura relatam uma relação direta entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante. Os polifenóis poliméricos são antioxidantes mais potentes do que os fenólicos monoméricos. Isto significa que os taninos condensados e hidrolisáveis possuem maior habilidade antioxidante (Moure et al., 2001).

Portanto, a atividade antioxidante apresentada pelos frutos de pitangueira pode ser devido à presença de ácido ascórbico, devendo assim também, ser resultado das substâncias fenólicas presentes.

## 7) RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho se avaliou o perfil químico dos frutos de pitangueira, a atividade antioxidante, o teor de vitamina C e de taninos e fenóis totais, o que em tese pode justificar seu uso como alimento funcional. A partir do sobrenadante (S), oriundo do extrato aquoso dos frutos de pitangueira originaram-se as seguintes frações: diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e butanol (FB). O conhecimento do perfil químico do extrato, do sobrenadante e das frações possibilitou a quantificação dos flavonóides quercetina e rutina. De acordo com os resultados a fração em acetato de etila apresentou um maior potencial antioxidante. Para a análise do teor de vitamina C, a fruta apresentou uma maior concentração de vitamina C comparada ao sumo. Para a análise de taninos e fenóis totais não foram detectados taninos hidrolisáveis, e os teores de taninos condensados e fenóis totais apresentaram baixas concentrações. Sendo assim, este trabalho permitiu conhecer o perfil químico das substâncias polares dos frutos de pitangueira até então pouco estudadas e avaliar sua atividade antioxidante. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

O extrato aquoso, o sobrenadante e as frações foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A partir da co-cromatografia verificou-se a presença dos flavonóides quercetina e rutina nas frações em acetato de etila e butanólica nos frutos de pitangueira.

De acordo com a análise qualitativa de atividade antioxidante a fração em acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante nas placas cromatográficas reveladas com DPPH.

Para a análise espectrofotométrica de atividade antioxidante, as frações em acetato de etila e butanólica na concentração de 0,1mM apresentaram um percentual de atividade antioxidante maior que 80%, na concentração de 0,6mM apenas a fração em acetato de etila apresentou atividade antioxidante.

De acordo com o método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, as amostras que apresentaram atividade antioxidante foram a fração em acetato de etila seguida do extrato aquoso, portanto este dado corrobora parcialmente com os resultados obtidos pelos métodos qualitativo e espectrofotométrico.

Pela análise da atividade antioxidante pelo método do nitroprussiato de sódio, as amostras que obtiveram seqüestro total nas três concentrações foram o extrato aquoso, a fração em acetato de etila e butanólica dos frutos de pitangueira. O perfil de atividade antioxidante por este método foi diferente dos outros métodos analisados porque o radical livre utilizado para esta análise foi diferente.

A concentração de vitamina C foi maior para os frutos comparada ao sumo dos frutos de pitangueira. Em comparação com os resultados da literatura, a fruta e o sumo apresentaram um valor maior de vitamina C. Isto pode ser explicado pelos diversos fatores que afetam a síntese e retenção do ácido ascórbico.

Não foram detectados taninos hidrolisáveis nos frutos de pitangueira e os teores de taninos condensados e fenóis totais apresentaram baixas concentrações, ou seja, a capacidade antioxidante do extrato aquoso não está relacionada a esse fator somente. Portanto, a atividade antioxidante apresentada pode ser devido à presença de ácido ascórbico, devendo assim também, ser resultado das substâncias fenólicas presentes nos frutos de pitangueira.

## 8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO (2001). *J. Ethno-veterinary medicine*. Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacol*, Limeric. 77: 19-24.

AGOSTINI-COSTA, T. S., LIMA, A., LIMA, M .V. (2003). Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*. 26: 763-765.

AJAIKUMAR, K. B. et al. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne. 96:171-76.

ALI, S. S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A., & BORA, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International* 41, 1–15.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; ABAD, B.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. (2004) Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:2938-2952

AMIÉ, D., DAVIDOVIÉ-AMIÉ, D., DRAGO BESLO, D. TRINAJSTI, N. (2003). Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croat. Chem. Acta* 76 (1) 55–61.

ANGELO, P. M.; JORGE, N.(2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1):1-9.

- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. (1999). Improving effects of extracts of *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *Journal of Ethnopharmacol*, Limeric.68: 307-314.
- ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. (2000). Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. *Acta bot. bras.*14: 301-315.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. (2007). Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Lat. Am. J. Pharm.* 26(1): 76-81.
- AURICCHIO, M. T.; & BACCHI, E. M. (2003). Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 62(1): 55-61.
- BENDICH, A.; LANGSETH, L. (1995). The health effects of vitamin C supplementation, a review. *Journal American College Nutrition*. 14: 124-136.
- BENLLOCH, R.; FARRÉ, R.; FRIGOLA, A. (1993). A quantitative estimation of ascorbic acid and isoascorbic acid by HPLC: application to citric juices. *Journal of Liquid Chromatography*. 16: 3113-3122.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JR, J. F. da; LEDERMAN, I. E. (2000). Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Jaboticabal: FUNEP. 30 p. (Série Frutas Nativas, 1).
- BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2:906-916.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; (1995). *Lebensm. - Wiss. Technol.*, 28, 25.
- BROINIZI, P. R. B., ANDRADE-WARTHA, E. R S., SILVA, A. M. O., NOVOA, A. J. V., TORRES, R. P., AZEREDO, H. M. C., ALVES, R. E., MANCINI-FILHO, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(4): 890-896.
- BRUNETON, J.; (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha.
- CABRITA, M. J.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. (2003). Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. *I Seminário Internacional de Vitivinicultura*. Ensenada, México. 3: 61-100.
- CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K. & DYATMYKO, W. (1998). Use of on-flow LC/1H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene,

lignans, and a tocopherol derivative. *Journal of Natural Products*, 61: 1497-1501.

CHANDRASEKAR, D., MADHUSUDHANA, K., RAMAKRISHNA, S., DIWAN, P.V. (2006). Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 460–464

CHISOLM, G.M.; STEINBERG, D.(2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free radical biology and medicine* 28(12): 1815 – 1826.

CONSOLINI, A.E., BALDINI, O.A., AMAT, A.G. (1999). Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J. Ethnopharmacol.* 66: 33-39.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. (2002). Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacol, Limeric.* 81: 57-63.

CUNNIFF, P. (1998). Official methods of analyses. Ed 16<sup>th</sup>, Maryland, Gaithersburg- Washington: AOAC International. 1(45): 16-18.

DEGÁSPARI, C.; WASZCZYNSKYJ, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba. 5(1): 33-40.

DIB TAXI, C. M. A. Suco de camu-camu (*Myrciaria dubia*) microencapsulado obtido através de secagem por atomização. 2001. 166p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

EINBOND, L.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, Barking. 84: 1306–1313.

EVANS, J.P.; WHITEMAN, M.; TREDGER, J.M.; HALLIWELL, B. (1997). Antioxidant properties of s-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 1002-1008.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. (1999). Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford 8(1): 17-25.

FIGUEIREDO, P. S. F.; OLIVEIRA, R. F.; SILVA, J. G.; ALCANFOR, S. K. B.; ROMEIRO, L. A. S. (2006). Avaliação do Perfil Antioxidante da Quercetina e Quercetina-Cu(II) e sua relação com logP. *Anais da 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, São Paulo.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. *Free Radical Biol. Med.* 29: 1106-1114.

GONÇALVES, A. E. S. S. (2008). Avaliação da capacidade antioxidante de frutos e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. 72(3): 353-358.

GUIMARÃES, F. A.; HOLANDA, L. F. F.; MAIA, G. A.; MOURA FÉ, J. A. Contribuição tecnológica ao processamento e conservação da polpa de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 17, n. 1, p. 01-13, 1983.

HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford. v. 33 n. 7 p. 601-617.

HAVSTEEN, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* v. 96 p. 67-202.

HELDT, H. (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, University Press: Oxford.

HOFFMANN-RIBANI, R. (2006). Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

HOFFMANN-RIBANI, R., HUBER, L. S., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2009). Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 263–268.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folks medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 97(7): 1027-1031.

HOLLMAN PCH, KATAN MB. (1999). Dietary flavonoids:intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* . 37 (9/10): 937-42.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L.(2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

HUANG, G. C., CHOW, J. M., SHEN, S. C., YANG, L. Y., LIN, C. W., CHEN, Y. C. (2007) Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and

lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *International Immunopharmacology*. 7:1054–1063.

KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., MORALES, M. T., FETT, R. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, Santa Maria. 36(4): 1283-1287.

LEE, M-H.; CHIOU, J-F.; YEN, K-Y.; YANG, L-L. (2000). EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Letters*, Amsterdam. 154: 131-136.

LEE, M-I., NISHIMOTO, S., YANG, L-L., YEN, K-Y., HATANO, T., YOSHIDA, T., OKUDA, Y. (1997). Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry*, 44:1343-1349.

LEE SJ, UMANO K, SHIBAMOTO T, LEE KG. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant. properties. *Food Chem*; 91(1): 131-7.

LIMA, M. S., RÉVILLION, J. P. P., PADULA, A. D. (2009). Estratégias competitivas e de desenvolvimento de produtos lácteos funcionais: estudos de caso em empresas agroindustriais da região Sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S.; NASCIMENTO, P. P. (2000). Estudo comparativo das características físico-químicas de duas seleções de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). In: Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 5.22, Fortaleza.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. (2002). Fenólicos e carotenoides totais em pitanga *Scientia agricola*, Piracicaba.59(3): 447-450.

LOPES, A. S. (2005). Pitanga e Acerola: Estudo de processamento, estabilidade e formulação de néctar misto. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. de A.; MENEZES, H. C. de. (2005). Estabilidade da Polpa de Pitanga sob Congelamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(3):553-559.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS. M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.

MAGINA, M. D. A. (2008). Estudo fitoquímico e biológico de espécies do Gênero *Eugenia*. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

MARIOD, A. A., IBRAHIM, R. M., ISMAIL, M., ISMAIL, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab

(*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118: 120–127.

MÉLO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, P. P. (2000). Temperatura no armazenamento de pitanga. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 629-634.

MELO, E. A., MACIEL, M. I. S., ARROXELAS, V. L., LIMA, G., LEAL, F. L. L., CAETANO, A. C. S., NASCIMENTO, R. J. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(3): 639-644.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. (2001). Em *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed..

MEOTTI, F. C. (2006). *Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos in vivo e in vitro*. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAUJO, E. L., AMORIM, E. L. C. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. 28:892-896.

MORAES, F. P., COLLA, L. M. (2006). Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 3(2), 109-122.

MOREIRA, D. L. (2000). Métodos de análise e dosagem de taninos condensados, taninos gálicos e fenóis totais. NPPN-UFRJ.

MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J. DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J., PARAJÓ, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72: 145-171.

MUELLER-HARVEY, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science Technology* v. 91 p. 3-20.

NACZK M, SHAHIDI F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 1054 (1/2): 95-111.

NEGRI, G.(2005). Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(2): 122-142.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; HERNANDEZ-JOVER, T.; MARTIN-BELLOSO, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry* 105, 1151–1158.

OLIVEIRA, D. B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro- RJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.

OLIVEIRA, F. M. N. (2006). *Secagem e armazenamento da polpa de pitanga*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

O'PREY, J.; BROWN, J.; FEMING, J.; HARRISON, P.R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemistry Pharmacology*, 66:2075-2088.

PAIVA, S. R.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. (2002). Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. *Revista Floresta e Ambiente* 9(1):153 – 157.

PERES, R. G. (2007). Aplicações de CE-DAD E HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 201p.

PIMENTEL CVMB, FRANCKI VM, GOLLÜCKE APB. (2005). Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela.

PRIOR, R. L.; WU, X. SCHAICH, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4290-4302.

QUEIROZ, C. R. A.A., MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A. (2002). Caracterização dos Taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Rev. Árvore* 26(4) Viçosa.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, v. 755-760.

RIBOLI, E., & NORAT, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal for Clinical Nutrition*, v. 78, p. 559–569.

RIGHETTO, A. M. (2003). Caracterização físico-química e estabilidade de suco de acerola verde microencapsulado por atomização e liofilização. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

ROESLER, R., MALTA, L. G., CARRASCO, L. C., HOLANDA, R. B., SOUZA, C. A. S., PASTORE, G. M. (2007) Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:53-60.

SCHAPOVAL, E.E.S., SILVEIRA, S.M., ALICE, C.B., HENRIQUES, A.T. (1994). Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J. Ethnopharmacol.*, 44:137-142.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., THEODULOZ, C., FRANCO, L., FERRO, E., ROJAS DE ARIAS.(1987). Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 21:183-186.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S. & COSTA, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal Ethnopharmacology*, **96**: 563-568.

SIMÕES, C. M. O. (1999). Farmacognosia da planta ao medicamento. 1ª ed. Editora da UFSC. Santa Catarina, 1104p.

SLUSARCZYK, S., HAJNOS, M., SKALICKA-WOZ'NIAK, K., MATKOWSKI, A. (2009). Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry* 113: 134–138.

SOARES (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr*; 15 (1): 71-81.

SOUSA, C. M. M., ROCHA E SILVA, H., VIEIRA JR. G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L. S., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDAO, M. S., & CHAVES, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351 - 355.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M de; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plants extracts. *Fitoterapia*, Milano. 74: 91-97.

VILLACHICA, H. (1996). Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. *Tratado de Cooperacion Amazonica*. p. 228-213.

VIZZOTTO, M. (2006). Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate à doenças. *III Simpósio nacional do morango II Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul*. p. 29 – 34.

WADSWORTH, T. L.; KOOP, D. R. (2001). Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions* v. 137 p. 43–58.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTMEIN, B. O.; ADEOYE, A. O. (1988). Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Medica*, Stuttgart. 54: 546-549.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMARU, H.; MATOBA, T.; TERAU, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v.62 n.6 p. 1201 – 1204.

YOKOMIZO, A. & MORIWAKI, M. (2005). Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 69: 693-699.

ZAMUDIO, L. H. B. (2007). Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-camu *Myrciaria dubia* (H. B. K.) em diferentes estágios de maturação do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa. Monografia (Especialização em Nutrição Humana). Universidade de Brasília. Distrito Federal. Brasília.

ZANFINI, A., CORBINI, G., LA ROSA, C., DREASSI, E. (2010). Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in synthetic mixtures. *Food Science and Technology*, v.43, p. 67–72.