**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca,
semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**

Juliana Infante

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2013**

Juliana Infante
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha
de espécies frutíferas nativas do Brasil**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Infante, Juliana

Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e
folha de espécies frutíferas nativas do Brasil / Juliana Infante.- - versão revisada
de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
113 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Compostos fenólicos 2. ORAC 3. Radical ânion superóxido 4. Frutíferas nativas
I. Título

CDD 664.06
I43c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

Às pessoas mais amadas e queridas da minha vida,
que com muito carinho, amor e paciência
sempre estiveram e estarão ao meu lado, ensinando-me a cada dia ser
um pouco melhor
aos meus guerreiros e melhores pais: Agdo Henrique e Geny,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de vir ao mundo em uma ótima família, cujo amor e compreensão foram fundamentais ao caminho traçado até aqui.

Aos meus irmãos Ismael e Zé Henrique pelas “brigas”, risadas, brincadeiras e por serem estímulos a continuidade de meus estudos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela estrutura física e a reconhecida qualidade de seus docentes e funcionários possibilitando minha formação acadêmica e a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Matias de Alencar pela confiança, compreensão e atenção, permitindo meu desenvolvimento desde os primeiros passos da iniciação científica. Por possibilitar o convívio com pessoais mais do que especiais do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental.

Às colegas e amigas de trabalho: Maria Augusta, Heloísa, Patrícia, Priscilla, Valéria, Ana, Keity, Lucimara, Lú Mourão e Iva pela ajuda, discussões e companheirismo. Em especial à Adna que com muito carinho e dedicação sempre esteve disposta a contribuir com todos, dividindo seu conhecimento e acalmando nos tempos de dificuldades.

À Margarida pelo carinho, compreensão, apoio e agradável companhia nas várias vezes em que “optamos” por ficar até tarde trabalhando, pelos sábados e domingos compartilhados.

Aos amigos que a universidade me trouxe e que em diferentes momentos foram muito importantes, cada qual com seu jeito de ser, me alegraram e deram forças dividindo alegrias e angústias. Jamais serão esquecidos: Apilase, Kurik-k, Trianon, Traks, Gustavo, Spinho e Skuna.

Ao “Sítio do Bello” e ao senhor Sergio Sartori, proprietário da “Estância das Frutas” pelas amostras utilizadas neste projeto.

Aos funcionários do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pela simpatia e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

"A natureza é sábia e justa.
O vento sacode as árvores, move os galhos,
para que todas as folhas tenham o seu momento de ver o sol"

Humberto de Campos

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Mata Atlântica: uma rica fonte de recursos ameaçada.....	19
2.2 Potencial bioativo nos gêneros <i>Eugenia</i> e <i>Garcinia</i>	23
2.3 Compostos fenólicos	24
2.3.1 Síntese	25
2.3.2 Classificação	27
2.3.3 Propriedades biológicas	28
2.3.3.1 Antimicrobiana.....	28
2.3.3.2 Antiestrogênica e estrogênica	29
2.3.3.3 Anti-inflamatória	30
2.3.3.4 Antiproliferativa.....	31
2.3.3.5 Atividade antioxidante	31
2.4 Estresse oxidativo	34
2.5 Métodos para avaliação da atividade antioxidante.....	38
2.5.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu.....	41
2.5.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	42
2.5.3 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	43
2.5.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)	44
2.5.5 Sequestro do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Matéria-prima: obtenção e tratamentos iniciais	49
3.2 Extratos das espécies nativas brasileiras.....	50
3.3 Atividade Antioxidante	50
3.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu.....	50
3.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	51
3.3.3 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	51
3.3.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio	52
3.3.5 Sequestro do radical ânion superóxido	53
3.4 Composição fenólica dos extratos das espécies nativas brasileiras	54

3.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).....	54
3.4.1.1 Purificação dos extratos (SPE)	54
3.4.1.2 Derivatização da amostra – formação de derivados do trimetilsilil (TMS).....	56
3.4.1.3 Injeção e análise da composição fenólica por CG/EM.....	57
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	57
3.5 Análise estatística	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu	61
4.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	63
4.3 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	67
4.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio	70
4.5 Sequestro do radical ânion superóxido.....	73
4.6 Correlação entre as respostas antioxidantes.....	76
4.7 Identificação de compostos fenólicos antioxidantes nos extratos vegetais.....	77
4.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).....	77
4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	85
5 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	97

RESUMO

Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente, folha de espécies frutíferas nativas do Brasil

O Brasil possui uma imensa diversidade biológica, na qual muitos compostos bioativos podem ser encontrados e utilizados em benefício à sociedade. No entanto, processos de degradação do ambiente e introdução de espécies exóticas têm contribuído ao conhecimento e uso limitados de muitas plantas nativas, sendo pequena a quantidade de estudos sobre sua composição química e potencial biológico. A prevenção de doenças crônicas constantemente vem sendo associada à atividade antioxidante de metabólitos secundários dos vegetais, principalmente os fenólicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e composição fenólica de cinco espécies frutíferas nativas do Brasil (*G. brasiliensis*, *E. leitonii*, *E. involucrata*, *E. brasiliensis* e *E. myrcianthes*). Os métodos capacidade de redução do Folin-Ciocalteu, autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC), sequestro dos radicais livres DPPH e ânion superóxido foram aplicados na determinação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folha, casca, semente e polpa das espécies selecionadas. As amostras demonstraram significativa atividade antioxidante e, em alguns casos, superior as frutas comumente consumidas pela população brasileira. Em geral, folhas apresentaram as maiores atividades, mas o destaque foi a semente de *E. leitonii* que exibiu os melhores resultados em quatro dos cinco métodos utilizados: 120,67 mg AG.g⁻¹ na redução do reagente Folin; 7,08 μ mol Trolox.g⁻¹ no β -caroteno; EC₅₀ de 0,26 mg.mL⁻¹ e 0,07 mg.mL⁻¹ no sequestro do ânion superóxido e DPPH, respectivamente; 514,75 μ mol Trolox.g⁻¹ no ORAC para o qual a folha de *E. involucrata* obteve o maior valor (1393,3 μ mol Trolox.g⁻¹). Os extratos das espécies nativas também demonstram efeito antioxidante contra radicais de relevância biológica, como peróxido e superóxido. Por meio de CG-EM e CLAE acoplado a arranjo de fotodiodos, os principais compostos fenólicos encontrados nos extratos vegetais foram catequina, epicatequina e ácido gálico. Este trabalho demonstrou o grande potencial antioxidante das frutíferas nativas brasileiras, evidenciando assim possível efeito positivo em sistemas biológicos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; ORAC; Radical ânion superóxido; Frutíferas nativas

ABSTRACT

Phenolic composition and antioxidant activity of pulp, peel, seed and leaf of Brazilian native fruitful species

Brazil has a great biodiversity, in which many bioactive compounds can be found and used to benefit the society. However, environmental degradation processes and introduction of exotic species have contributed to limited use and knowledge of many native plants, reflecting in few studies about chemical composition and biological potential. The prevention of chronic diseases has been constantly associated with the antioxidant activity of plants secondary metabolites, mainly the phenolics. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity and the phenolic composition of five Brazilian native fruitful species (*G. brasiliensis*, *E. leitonii*, *E. involucrata*, *E. brasiliensis* e *E. myrcianthes*). The methods of Folin-Ciocalteu reducing capacity, co-oxidation of β -carotene/linoleic acid system, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), DPPH and superoxide free radical scavenging were used to determine the antioxidant activity of ethanolic extracts of leaf, peel, seed and pulp of the selected species. The samples showed significant antioxidant activity and, in some cases, it was superior to fruits commonly consumed by Brazilian population. In general, leaves presented the highest activities, but the seed of *E. Leitonii* stood out exhibiting the best results in four of the five methods: 120.67 mg GA.g⁻¹ in the Folin reducing; 7.08 μ mol Trolox.g⁻¹ in the β -carotene; EC₅₀ of 0.26 mg.mL⁻¹ and 0.07 mg.mL⁻¹ in the superoxide and DPPH scavenging, respectively; 514.75 μ mol Trolox.g⁻¹ in the ORAC, for which the *E. Involucrata* leaf had the highest value (1393.3 μ molTrolox.g⁻¹). The extracts of native species also demonstrate antioxidant effect against radicals of biological relevance, such as peroxy and superoxide. By GC-MS and HPLC coupled to a photodiode array, the major phenolic compounds found in the plant extracts were catechin, epicatechin and gallic acid. In this study, Brazilian native fruitful presented high antioxidant potential, showing a possible positive effect on biological systems.

Keywords: Phenolic compounds; ORAC; Superoxide anion radical; Native fruitful

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas e tem na fruticultura um importante segmento do agronegócio, no qual há alta rentabilidade e expressiva mão de obra, aproximadamente 5,6 milhões de empregos diretos (FACHINELLO et al., 2011). Contudo, esse quadro não tem sido decorrente da valorização de produtos advindos da flora nativa, constando-se pela sua pequena participação no setor econômico e à falta de plantios organizados com forte tendência ao desaparecimento graças à exploração não sustentável (SILVA-JÚNIOR; BEZERRA; LEDERMAN, 1999).

Dados oficiais da produção de frutas nativas brasileiras são limitados e representaram em torno de 8 % das frutas exóticas produzidas no país em 2011. Contribuindo a este valor o açaí, mangaba, umbu, goiaba e principalmente abacaxi e maracujá que responderam por 6,5 % deste total. Ressalta-se que, açaí, mangaba e umbu ainda são classificados como produtos de extração vegetal. Neste mesmo ano, a produção e comercialização nacional centraram-se em frutas cujas origens são as regiões da Ásia, África e América Central: laranja, banana, melancia, mamão, uva e manga (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

Apesar destes números, as espécies nativas podem e já começam a ser inseridas em importantes atividades lucrativas, as quais merecem contínuo estímulo.

O mercado de cosméticos talvez seja o que mais tenha contribuído a essa inserção, sendo a vantagem competitiva do Brasil a imensa diversidade de sua flora. A necessidade em agregar atributos de diferenciação associada ao aumento na procura por produtos naturais e oriundos dos nossos ecossistemas atraiu a atenção de empresas para os ingredientes (extratos vegetais e óleos) obtidos do açaí, andiroba, buriti, castanha do Pará, copaíba, cupuaçu, muru-muru, maracujá e pitanga (SERVICO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008; BRANDÃO; GONCALVES, 2006; FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006). Acrescenta-se, que em alguns casos, são as propriedades antioxidantes que estão sendo exploradas, por exemplo, na formulação de cosméticos anti-sinais tendo estes por objetivo retardar o aspecto de envelhecimento da pele.

Ao utilizar esses recursos de maneira racional, projetos como o RECA (Reflorestamento Econômico Consorciado Adensado), além de gerarem matéria-prima a uma das maiores empresas de cosméticos do país, também tem promovido a geração de renda e melhoria na qualidade de vida da comunidade local (HERON, 2010).

No setor alimentício, a projeção nacional e internacional do açaí, provavelmente, o transformou no maior caso de sucesso entre as frutas nativas em termos de vendas e popularidade.

Embora corresponda a um dos alimentos mais consumidos no norte do Brasil, foi somente a partir da década de 90 que o seu consumo passou a ser estimulado nas demais regiões do país. Os meios de comunicação em massa exerceram significativo impacto nessa divulgação tendo, inicialmente, como foco o caráter energético da fruta (MONTEIRO, 2006). Atualmente, o açaí veicula a imagem de alimento saudável em decorrência de seus compostos antioxidantes; ele compõe e com destaque o grupo das superfrutas, as quais têm forte apelo ao consumidor devido não só às características sensoriais, mas a elevada relevância nutricional, o valor antioxidante e benefícios que pode promover à saúde. Este argumento muito utilizado nas ações de *marketing* tem alavancado as vendas em países como Estados Unidos, Alemanha, Austrália, Rússia e Japão.

No entanto, na maioria dos casos, o país ainda tem demonstrado ineficiência no que se refere à agregação de valor aos poucos produtos nativos que começa a utilizar. Estimativas apontam que a valorização dos produtos derivados do açaí, nos EUA, atinge 600% sobre o preço da polpa a eles vendida. Montante possível de ser revertido para o Brasil caso houvesse maiores investimentos e interesse dos empresários na instalação de agroindústrias nos pólos produtores (BRASIL, 2013).

A possibilidade de outros países lucrarem com o uso de recursos brasileiros, internamente ainda subutilizados, tem se tornado preocupante ao Ministério do Meio Ambiente que deu início ao projeto intitulado “Plantas do Futuro”. A intenção é divulgar junto a produtores/indústrias e pesquisadores os potenciais econômicos de espécies desconhecidas ou de uso apenas regional. Pretendendo-se, dessa forma, evitar que casos como o da goiaba serrana (*Acca sellowiana*) se repita. Esta fruta que parece ser altamente aromática tem sido utilizada na fabricação de doces, geléias, biscoitos, óleos e até espumantes na Nova Zelândia,

onde há densos programas de melhoramento genético e expressiva área cultivada. Apesar de nativa da Mata Atlântica, no Brasil a goiaba serrana é negligenciada (ROMEIRO, 2007; CARDOSO, 2009).

Estudos científicos evidenciam relevantes propriedades biológicas nesta fruta, como antibacteriana, antitumoral e anti-inflamatória (VUOTTO et al., 2000; BONTEMPO et al., 2007; ROSSI et al., 2007). De acordo com recente revisão de Weston (2010), há cinco patentes para aplicação comercial de seus extratos. Três delas americanas, referindo-se à formulação de um suplemento dietético contendo inibidores naturais da ciclooxigenase, que dessa forma, aliviariam a dor em processos inflamatórios. As outras duas são japonesas indicando o uso do extrato como antioxidante e para suprimir a absorção de colesterol.

A dimensão do real valor das plantas nativas, incluindo o aroma, sabor, a composição nutricional e fitoquímica, é indispensável ao lançamento de produtos inovadores. No entanto, a subutilização dessas plantas ocasionou baixa popularidade entre a própria população brasileira que frequentemente desconhece o caráter exótico dos alimentos comumente presentes em sua dieta. O hábito alimentar instituído ao longo de todos esses anos culminou em dois fatores: precária produção de alimentos nativos, muitas vezes, incapaz de atender a demanda industrial (quantidade e qualidade) e escassos estudos agronômicos envolvendo produção, melhoramento genético e vida pós-colheita.

Essa ausência de conhecimento associada à ampla diversidade brasileira, por sua vez, prejudica a investigação da composição química de determinados vegetais no que diz respeito à quantificação e identificação de substâncias bioativas. Podendo estas influenciar positivamente a valorização dos produtos nacionais implicando em boas oportunidades de negócio para o país.

Dentre as substâncias presentes em frutas, hortaliças e outros vegetais que vem despertando crescente interesse e necessitam ser pesquisadas, citam-se os ácidos fenólicos e os flavonoides. Estudos epidemiológicos os têm relacionado à menor incidência de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo quando presentes em quantidades significativas na dieta, mostrando serem capazes de interferir de modo positivo na prevenção de processos inflamatórios e no desenvolvimento de cânceres de mama, colón e útero. Propriedades estas atribuídas à alta atividade antioxidante exibida por esses compostos, à capacidade de modulação de enzimas

e pelo fato de alguns deles se comportarem como estrógenos no organismo humano (JACKSON, 2003; MARGETTS; BUTTRISS, 2003).

A demanda por produtos benéficos a saúde e o questionamento sobre possíveis efeitos carcinogênicos de alguns antioxidantes sintéticos alimentícios têm assim impulsionado os setores público e privado na busca de novas tecnologias e matérias-primas, viabilizando o uso de antioxidantes naturais. Neste sentido a utilização da flora nativa, sobretudo as espécies frutíferas, representa um caminho interessante e promissor sob diferentes aspectos, capazes de envolver a conservação ambiental em conjunto ao desenvolvimento econômico.

Pelo fato de serem nativas, estas espécies seriam adaptadas as condições edafoclimáticas onde naturalmente se desenvolvem e, deste modo, a exigência em agroquímicos se reduziria possibilitando baixos custos de implantação e manutenção de pomares (AGOSTINI-COSTA et al., 2006). Desde que aliada à adequada orientação técnica, salienta-se também o benefício que o emprego dessas plantas poderia proporcionar sobre o manejo sustentável dos remanescentes florestais, contribuindo à recuperação dos ecossistemas que foram afetados pelo desmatamento e acentuado extrativismo (FRANZON, 2009).

Desejando ampliar as informações disponíveis sobre as espécies frutíferas nativas do Brasil diante das implicações acima mencionadas, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante *in vitro* e identificar compostos fenólicos que podem contribuir a essa atividade em cinco espécies nativas ainda pouco conhecidas.

Foram avaliadas não somente as porções comestíveis, mas outras frações como casca e semente, as quais resultariam de possível aplicação comercial das polpas destas frutas. Procurou-se assim demonstrar o potencial antioxidante desses 'subprodutos', o que favoreceria sua aplicação em atividades econômicas e minimizaria o impacto ambiental decorrente dos resíduos gerados pela indústria. Também foram analisadas as folhas das respectivas espécies, que pelo fato de ser um órgão altamente exposto às condições de estresse oxidativo, presumiu-se dispor de compostos com alta atividade antioxidante, permitindo a comparação com os demais materiais. Além disso, sabe-se que muitas folhas são utilizadas pela medicina popular na forma de chás para alívio de algumas enfermidades sugerindo, deste modo, a presença de substâncias bioativas dentre as quais poderiam ser encontradas aquelas com capacidade antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mata Atlântica: uma rica fonte de recursos ameaçada

Eugenia involucrata, *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia myrcianthes*, *Eugenia leitonii* e *Garcinia brasiliensis*, objetos de estudo deste trabalho, são todas espécies frutíferas pertencentes ao domínio fitogeográfico 'Mata Atlântica'.

Originalmente este domínio ocupava uma vasta e diversificada região do Brasil percorrendo desde o litoral nordestino até o estado do Rio Grande do Sul, totalizando 13,04% do território nacional. Diferenças de latitude, altitude e condições climáticas resultaram em enorme biodiversidade, sendo identificadas 17.691 espécies de plantas e 1.361 de vertebrados entre mamíferos, aves, répteis e anfíbios (CÂMARA, 2005; FORZZA et al., 2010a).

A Mata Atlântica possui ainda o impressionante número de 7.335 espécies endêmicas de plantas vasculares, contribuindo com 41% do total exibido pelo Brasil e superando até mesmo países inteiros como Estados Unidos, Peru e Índia, cujos números são respectivamente iguais a 4.036, 5.676 e 6.113. Neste quesito o Brasil se destaca apresentando a maior diversidade do mundo enquanto os demais citados ocupam da 7ª a 9ª posição entre os megadiversos. Demonstra-se, portanto, a significativa contribuição da Mata Atlântica à diversidade do planeta (FORZZA et al., 2010a).

O número de espécies, o alto grau de endemismo da flora (aproximadamente 40%) e, sobretudo, a ameaça de extinção foram responsáveis pela inclusão deste domínio aos *hotspots* de biodiversidade mundial (CÂMARA, 2005). *Hotspots* são áreas ameaçadas que juntas abrigam expressivo patrimônio biológico, mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

Se por um lado a conservação da Mata Atlântica tem sido reconhecida mundialmente, as atividades instituídas no Brasil visando o seu crescimento econômico foram e continuam precárias quanto à preservação da diversidade. De acordo com levantamento realizado pelo INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) em 2011, da extensão original compreendida em 1.315.460 km², restam 13,32% de remanescentes florestais, sendo somente 7,9% distribuídos em

fragmentos representativos à conservação da biodiversidade, ou seja, acima de 100 ha (INPE, 2012).

Essa forte fragmentação das áreas bem conservadas somada aos processos de degradação têm colocado em risco a sustentabilidade da biodiversidade a longo prazo, prejudicando a sociedade no que se refere aos serviços ambientais prestados pela Mata Atlântica, dentre os quais está o fornecimento de fitofármacos, recursos genéticos e bioquímicos (GUEDES; SEEHUSEN, 2011).

As florestas tropicais podem ser consideradas como imensas bibliotecas, cujo rico acervo constitui-se de metabólitos vegetais que variam na sua complexidade química e na atividade biológica. Muitos ainda sem serem descobertos, já podem estar desaparecendo assim como os saberes da população sobre o uso das plantas que os produzem. Situação desoladora, pois isso ocorre em velocidade maior que os estudos da composição química sobre espécies nativas brasileiras podem alcançar (KAPLAN; FIGUEIREDO, 2006).

Ações antrópicas como especulação imobiliária, turismo predatório, pressão demográfica, atividade madeireira, ciclos econômicos relacionados às *commodities* pau-brasil, cana-de-açúcar, café e pecuária, marcaram mais de 500 anos de exploração desenfreada e hoje culminaram na ameaça de extinção a quase 1.200 espécies vegetais, das quais 265 se encontram em estado crítico de perigo. Embora somente a uma pequena fração destas espécies tenha sido atribuído algum uso, é possível nela encontrar substâncias com interessantes potenciais bioativos como óleo essencial com atividade bactericida e anti-inflamatória em *Calypttranthes restingae*; alcaloides com atividade antitumoral em *Hippeastrum striatum*; rutina em *Dimorphandra wilsonii* e flavonoides em *Solanum jabrense* (CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFLORA, 2013).

De acordo com Guedes e Seehusen (2011), a biodiversidade é a chave para a bioprospecção de novos compostos bioativos capazes de serem aplicados em formulações medicamentosas e, pesquisas envolvendo essa perspectiva podem aumentar o valor econômico atribuído aos ecossistemas. Lembrando que a valoração constitui um importante caminho à redução da degradação.

Estudos recentes com frutíferas encontradas na Mata Atlântica têm gerado resultados otimistas quanto à possível aplicação em benefício à saúde humana, podendo ser citados alguns deles:

Gonçalves (2008), segundo o qual a polpa do fruto cambuci apresenta alta atividade inibitória sobre a α -amilase e α -glicosidase, enzimas cuja inibição parece ser uma efetiva estratégia terapêutica no tratamento da Diabetes mellitus tipo 2, evitando picos de hiperglicemia por retardar e prolongar o tempo de digestão dos carboidratos;

Medina et al. (2011) no qual extratos de frutos de araçá demonstraram atividade antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis*; atividade antiproliferativa contra células cancerígenas *in vitro* e, atividade antioxidante aumentando a sobrevivência de leveduras após exposição ao peróxido de hidrogênio, sendo quantificados altos níveis de compostos fenólicos nestes extratos, principalmente (-)-epicatequina;

Victoria et al. (2012) com óleo essencial de folhas de pitangueira que inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, duas importantes bactérias patogênicas, além de ter exibido atividade antifúngica contra *Candida lipolytica*;

Borges et al. (2013) com polpa dos frutos de juçara, cujos extratos ricos em antocianinas exibiram efeito próximo ao do ácido gálico sobre a porcentagem de células viáveis após a indução de estresse oxidativo. Salienta-se que este último fruto tem se tornado uma alternativa promissora no uso da *Euterpe edulis*, até então, utilizada somente para a extração de palmito acarretando a morte da planta. Fato este que somado ao seu lento crescimento a fez vulnerável ao processo de extinção.

Os fitoquímicos presentes nos vegetais da Mata Atlântica também têm despertado o interesse, acadêmico e industrial, para o desenvolvimento de novos produtos. No sentido de popularizar as espécies por enquanto subexploradas e conquistar novos mercados, vêm sendo realizadas pesquisas como a adição de óleos essenciais com potencial olfativo e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante) em formulações cosméticas (ERENO, 2011) e adição da polpa de juçara em iogurtes focando a identificação e quantificação de compostos bioativos no produto final (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP, 2013).

Investimentos na ordem de R\$ 15 milhões de uma empresa farmacêutica em pesquisas de instituições públicas brasileiras resultaram, após sete anos, no lançamento do primeiro anti-inflamatório fitoterápico feito a partir do extrato de uma planta nativa, a *Cordia verbenacea*, encontrada na floresta atlântica. O

produto (Acheflan) que está no mercado desde 2005 foi totalmente desenvolvido no Brasil desde os estudos agrônômicos, químicos, fitoquímicos até a sua formulação (FAPESP, 2005).

Para Kaplan e Figueiredo (2006) além do desenvolvimento de produtos com atividades terapêuticas, a comercialização de outras substâncias extraídas de plantas como carotenoides e fenólicos poderia favorecer a sustentabilidade da biodiversidade. O retorno financeiro tanto dos medicamentos à base de extratos naturais como dessas substâncias evidenciam, segundo os autores, a importância econômica da prospecção química no reino vegetal.

Com a exploração da diversidade biológica a indústria, mesmo que lentamente, tem percebido a possibilidade de se aproveitar comercialmente dessa riqueza, passando a reconhecer o imenso valor da biodiversidade (KAPLAN; FIGUEIREDO, 2006). A descoberta desse 'novo mundo' fez com que outros fatores também assumissem importância na valorização das espécies nativas. Aroma, sabor e aparência peculiares das frutas genuinamente brasileiras têm desempenhado papel fundamental na sua introdução no setor de produtos alimentícios. A elaboração de geléias, sorvetes, sucos, polpas e molhos tem se tornado bastante atraente, principalmente por estas frutas serem altamente perecíveis e apresentarem características adequadas ao processamento.

Pouco conhecidas pelos próprios brasileiros o cambucá, cambuci, grumixama, pitanga, uvaia e araçá estão entre as matérias-primas sobre as quais alguns empresários começam a apostar para atender a crescente procura dos mercados nacional e internacional por produtos diferenciados (SÍTIO DO BELLO, 2013; HOMERO, 2012).

Aliando o cultivo destas espécies ao conceito de agricultura orgânica, algumas iniciativas pretendem atuar indiretamente na melhoria do solo e no reflorestamento da Mata Atlântica com espécies nativas e não com o eucalipto, uma planta exótica muito utilizada para recuperação de áreas degradadas. Acrescenta-se que nestes projetos também podem ser observadas parceiras com pequenos agricultores ou cooperativas de modo a qualificá-los como fornecedores por meio de treinamentos e melhoria das práticas agrícolas. Atrelando ao produto a imagem de um modelo de desenvolvimento econômico sustentável.

2.2 Potencial bioativo nos gêneros *Eugenia* e *Garcinia*

Entre as angiospermas identificadas no Brasil, “*Eugenia*” representa o segundo maior gênero em número de espécies totais (356) e endêmicas (274) estando, inclusive, entre os mais ricos do planeta. Além disso, a riqueza combinada da família a qual pertence (Myrtaceae) com a da Melastomataceae é considerada uma característica peculiar da flora brasileira (FORZZA et al., 2010b).

Populações mais tradicionais têm utilizado plantas pertencentes ao gênero *Eugenia* como métodos alternativos contra o reumatismo, artrite, diabetes, dores, diarréias e febres. Impulsionando, assim, a comprovação científica dos efeitos sobre a saúde e a descoberta dos possíveis compostos ativos e mecanismos de ação.

Ensaios têm sugerido que óleos essenciais, extratos (puros ou fracionados) e compostos isolados como ácidos fenólicos, flavonoides e terpenoides provenientes de sementes, polpas e, principalmente de folhas, teriam potencial aplicação no tratamento de diversas enfermidades devido às interessantes propriedades encontradas: antimicrobiana (CECÍLIO et al., 2012; VICTORIA et al., 2012; SOUZA et al., 2004), anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2009; PIETROVSKI et al., 2008), anti-hiperglicêmico e anti-hipertrigliceridêmico (SHARMA; BALOMAJUMDER; ROY, 2008; ARAI et al., 1999), anti-depressivo (VICTORIA et al., 2013; COLLA et al., 2012), antinociceptiva (AMORIM et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009), antioxidante (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; REYNERTSON et al., 2008; SILVA et al., 2007; EINBOND et al., 2004; VELÁZQUEZ et al., 2003), antimutagênica (NERI-NUMA et al., 2013) e, apoptótica (YOO et al., 2005; YANG; LEE; YEN, 2000). Em *Eugenia jambolana*, por exemplo, estudos demonstrando potencial de ação na maioria das atividades acima relacionadas reforçam o extensivo uso da planta na milenar prática Ayurveda (CHATTERJEE et al., 2012; BAG et al., 2012; BALIGA et al., 2011; LI et al., 2009).

No gênero *Garcinia*, por outro lado, encontram-se poucas espécies nativas brasileiras, o que não o impediu de fazer parte da medicina popular visando à cicatrização de feridas, tratamento de úlceras, doenças urinárias e de tumores. Também é utilizado pela Ayurveda em casos de infecções, edemas, disenteria, sangramento de hemorroidas, tumores, problemas cardíacos, doenças de pele como erupções cutâneas e queimaduras (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013).

Espécies de *Garcinia* constituem ricas fontes de metabólitos secundários como ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas e benzofenonas que têm sido reportados em folhas, sementes e pericarpos. Nestes compostos isolados e/ou nos extratos desses materiais, várias são as pesquisas atribuindo os seguintes potenciais bioativos: anti-inflamatório e antinociceptivo (LEE et al., 2013; SANTA-CECÍLIA et al., 2011; CUI et al., 2010; CASTARDO et al., 2008), antioxidante (JANTAN; SAPUTRI, 2012; OKOKO, 2009; YU et al., 2007; MACKEEN et al., 2000); antimicrobiano (PEDRAZA-CHAVERRI et al., 2008; SELVI; JOSEPH; JAYAPRAKASHA, 2003) incluindo ação sobre o vírus HIV (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013); hipolipidêmico (KOSHY; ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2001); antiproliferativa e apoptótico (GAO et al., 2012; LIN et al., 2012; WANG et al., 2012; MOONGKARNDI et al., 2004); inibidor da α -glucosidase (FOUOTSA et al., 2012; RYU et al., 2011) e da agregação plaquetária (JANTAN; SAPUTRI, 2012).

2.3 Compostos fenólicos

O termo 'compostos fenólicos' designa uma ampla classe de substâncias orgânicas, entre as quais se encontram os ácidos fenólicos, fenilpropanóides, xantonas, flavonoides e taninos. Sintetizados pelo metabolismo secundário de vegetais, quimicamente apresentam em comum um anel aromático e hidroxilas como substituintes. Mais de 8000 estruturas tem sido relatadas e, na maioria das vezes, encontradas conjugadas a açúcares e ácidos orgânicos. Hidroxilas e açúcares aumentam a solubilidade em água, já outros grupamentos como metil têm efeito oposto, tornando a estrutura mais lipofílica (CROZIER, 2003).

Industrialmente, extratos vegetais ricos em compostos fenólicos podem ser aplicados na fabricação de cosméticos fotoprotetores (DAL'BELO, 2008), tintas, aditivos alimentícios (conservantes e corantes), antibióticos, anti-inflamatórios e medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares e hipertensão (BRAVO, 1998).

Embora muitas questões ainda precisam ser elucidadas, sobretudo quanto à absorção, metabolismo e a biodisponibilidade destes compostos, estudos têm sugerido relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a incidência de patologias desencadeadas pelo estresse oxidativo, como as doenças

coronarianas, diabetes, câncer e doença de Parkinson (DORNAS et al., 2007; MANACH et al., 2004; YOUNG, WOODSIDE, 2001).

2.3.1 Síntese

Compostos fenólicos são sintetizados a partir de hidratos de carbono pela via do ácido chiquímico ou a partir do aminoácido aromático fenilalanina pela rota biossintética dos fenilpropanoides (Figura 1). Junto aos terpenoides e alcalóides, representam os três principais grupos de metabólitos secundários de plantas, cujas funções não estão diretamente relacionadas à fotossíntese, respiração, crescimento ou desenvolvimento do organismo (metabólitos primários), mas sim ao seu sistema de defesa (CROZIER, 2003).

Figura 1 – Esquema simplificado das rotas biossintéticas envolvidas na produção de compostos fenólicos

Fonte: Adaptado de Crozier (2003).

Devido à ação de atração ou repulsão que exercem sobre os organismos, estruturas fenólicas estão envolvidas na atração de polinizadores e dispersores de sementes, na proteção contra a herbivoria e ao ataque de patógenos

(HERNÁNDEZ et al., 2009). Fenóis, terpenoides e alcaloides também são considerados os principais grupos com ação alelopática (KIM; JOHSON; LEE, 2005).

Temperatura, umidade e exposição à luz ultravioleta constituem fatores bióticos dos quais os metabólitos secundários podem proteger o vegetal. Do mesmo modo, estes metabólitos são de fundamental importância quando consideradas as funções vitais da própria planta, como a fotossíntese e a respiração aeróbica cujos subprodutos, as espécies reativas de oxigênio, podem afetar a integridade dos tecidos vegetais (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Pelo fato de representarem uma interface química entre plantas e o ambiente, a síntese de fenólicos em termos de quantidade, proporção e estrutura é afetada por condições ambientais tais como estresse hídrico, temperatura e intensidade de radiação solar. Correlação positiva tem sido observada entre estes dois últimos fatores e a produção de antocianinas e flavonoides, que são principalmente acumulados em tecidos superficiais e utilizados como filtros UV na proteção contra a fotodestruição (COHEN, KENNEDY, 2010).

Há também relatos da influência da cultivar, da idade, do desenvolvimento da planta e dos diferentes órgãos vegetais; tecidos mais novos, por exemplo, tendem a apresentar maior taxa metabólica de ácidos fenólicos (COHEN, KENNEDY, 2010). Verificou-se ainda que frutos submetidos ao ataque de insetos exibiam atividade antioxidante maior quando comparados aos que foram protegidos com embalagem plástica (VIZZOTTO; GOMES; PEREIRA, 2008).

Ao longo dos anos, têm-se levantado algumas hipóteses para explicar a ocorrência diferencial das substâncias de defesa entre as diversas plantas existentes. Uma delas se concentra na taxa de crescimento dos vegetais e na disponibilidade de recursos (nutrientes e água). Baseando-se na relação custo/benefício, para plantas de rápido desenvolvimento presentes em habitats ricos em recursos o crescimento vegetativo seria mais rentável que o investimento na defesa contra herbivoria. Já para plantas com menores taxas de crescimento ou em ambientes pobres, a estratégia de sobrevivência seria a alocação dos recursos para a produção de compostos de defesa. Sugere-se também que, para plantas de vida longa, esta produção seria de maior relevância em termos quantitativos ao contrário das plantas de vida curta que parecem empenhar-se qualitativamente na síntese dos compostos de defesa (ALBUQUERQUE; RAMOS; MELO, 2012).

2.3.2 Classificação

A classificação dos compostos fenólicos pode ser feita em razão do número e arranjo dos átomos de carbono presentes no esqueleto principal da molécula. Originando, desta forma, dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (Figura 2).

Na classe dos não flavonoides, as substâncias de maior relevância na dieta são os ácidos gálico e elágico (representantes da subclasse: ácidos fenólicos de estrutura química C₆-C₁); ácidos cafeico e ferúlico (hidroxinamatos: C₆-C₃) e o resveratrol (estilbenos: C₆-C₂-C₆). As substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides caracterizam-se por possuir 15 átomos de carbono organizados em dois anéis aromáticos que se conectam a uma ponte de três carbonos, formando a estrutura C₆-C₃-C₆ (CROZIER, 2003).

ácidos fenólicos

hidroxinamatos

estilbenos

flavonoides

Figura 2 - Estrutura básica das classes dos compostos fenólicos
Fonte: Adaptado de Crozier (2003)

Os flavonoides são ainda distribuídos em seis classes: antocianinas, flavonols, flavonas, flavononas, flavanols e isoflavonas.

As antocianinas são pigmentos dominantes em muitas frutas e, de acordo com o pH do meio e a presença de grupos hidroxila e metoxila em sua molécula, conferem cores que variam do vermelho intenso ao violeta e azul; quanto

maior a presença de hidroxilas mais a cor tende ao azul, já no caso das metoxilas a cor se aproxima do vermelho (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

A subclasse flavonols, na qual se incluem a quercetina, miricetina e o kaempferol, representa os flavonoides mais comumente encontrados nos alimentos, sendo as principais fontes o vinho tinto, chás, brócolis e cebolas. Flavonas são bastante comuns em frutas e vegetais, principalmente em frutas cítricas e cereais como milho e trigo. Naringenina e hesperetina são exemplos de flavononas encontradas em laranjas. Em flavanols são citados: a catequina e epicatequina, adquiridas pelo consumo de chá verde, vinhos tintos e chocolates. E por fim, as isoflavonas cujas principais moléculas a genisteína, daidzeína e gliceteína, fazem-se presente em leguminosas como a soja e seus derivados (PINHEIRO; CASÉ, 2009).

2.3.3 Propriedades biológicas

Dentre as propriedades dos compostos fenólicos, sobretudo dos flavonoides, crescente atenção tem sido atribuída àquelas potencialmente benéficas ao organismo humano. Sendo alguns exemplos, as ações: antimicrobiana, antiestrogênica e estrogênica, anti-inflamatória, antiproliferativa e antioxidante; sobre as quais, a seguir, encontram-se breves descrições.

2.3.3.1 Antimicrobiana

Streptococcus mutans, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, influenza A, HSV-1 e HSV-2 (herpes), Adenovírus, *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* são algumas das bactérias, vírus e fungos que tem demonstrado sensibilidade à ação de compostos fenólicos (DAGLIA, 2012).

Sobre a atividade antifúngica desses compostos, levantam-se hipóteses como o comprometimento no metabolismo do folato, com consequente inibição da produção de ergosterol (componente da membrana celular de fungos); redução na formação de hifas e biofilmes (BANSAL et al., 2013).

Na atividade antiviral, por serem capazes de se ligarem tanto às glicoproteínas de vírus como aos seus receptores, os fenólicos basicamente previnem que a membrana desses agentes infecciosos se funda à membrana de

células hospedeiras. Ligam-se, por exemplo, à hemaglutinina no vírus influenza e às moléculas CD4 das células T que são receptores da gp120 (proteínas do HIV) (BANSAL et al., 2013; DAGLIA, 2012).

Já a atividade antibacteriana envolve a atuação direta sobre o micro-organismo bem como o sinergismo com antibióticos e a supressão dos fatores de virulência (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Na ação direta, o metabolismo energético, a síntese de ácido nucleico e da parede celular podem ser prejudicados afetando a sobrevivência e multiplicação da bactéria. Os mecanismos parecem incluir: inibição de enzimas e danos na membrana citoplasmática (perfuração e/ou redução da fluidez) que interferem negativamente na geração de ATP e no transporte de solutos para dentro da célula. Estes danos, possivelmente, seriam ocasionados por espécies reativas de oxigênio formadas a partir da oxidação de flavonoides com a ação conjunta da superóxido dismutase (CUSHNIE; LAMB, 2011).

No sinergismo, destaca-se a inativação de enzimas como a PBP-2a, forma resistente da PBP, ambas envolvidas na produção da parede celular e alvo de antibióticos. Quanto aos fatores de virulência, a supressão envolveria a inativação de enzimas como a urease em *H. pylori* e a inibição da secreção de substâncias como a α -toxina e a coagulase em *S. aureus*. Acrescenta-se ainda a capacidade dos fenólicos em neutralizar algumas toxinas, bloqueando a interação com seu receptor; e de reduzir a formação de biofilmes e a adesão bacteriana ao “quebrarem” o *quorum-sensing* (CUSHNIE; LAMB, 2011).

2.3.3.2 Antiestrogênica e estrogênica

Embora a estrutura dos compostos fenólicos não seja esteroidal, alguns deles como as lignanas e principalmente as isoflavonas são conhecidos por se comportarem de modo similar ao estrogênio humano 17 β -estradiol.

Estudos têm revelado que em grupos populacionais onde a ingestão de isoflavonas não é limitada, há redução na incidência de cânceres de mama, próstata e cólon além de menor perda de massa óssea na pós-menopausa. Podendo estes efeitos, parcialmente, serem explicados devido à capacidade de ligação desses fenólicos aos receptores do estrógeno. Desempenhando, assim, funções agonistas imitando o 17 β -estradiol em tecido ósseo e funções antagonistas bloqueando e

alterando os receptores deste hormônio em órgãos como mama e útero (ESTEVEZ; MONTEIRO, 2001; LE MARCHAND, 2002; PINHEIRO; CASÉ, 2009).

2.3.3.3 Anti-inflamatória

O processo inflamatório surge como resposta do organismo na tentativa de defender e reparar o dano tecidual quando submetido a uma agressão (trauma, ferimento, presença de agentes infecciosos como bactérias ou vírus); caracterizando-se pela vermelhidão, dor, calor e inchaço no local afetado.

A sensibilidade periférica é decorrente do acúmulo de mediadores químicos entre eles as prostaglandinas que por meio do envio de sinais à medula, torna a dor generalizada. Sabe-se que a síntese desta substância envolve estímulos químicos, físicos e ação das enzimas fosfolipase e ciclooxigenase (COX). A enzima COX existe sob três diferentes formas, encontrando-se a do tipo 2 em tecidos como cérebro, intestino, rim, glândula tireóide, testículo e pâncreas. Sua expressão sofre aumento de 20 vezes ou mais quando quadros inflamatórios são estabelecidos, o que tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças neurológicas como Doença de Alzheimer (KUMMER; COELHO, 2002).

Flavonoides estão entre as substâncias capazes de reduzir a produção de prostaglandinas diminuindo a intensidade do processo inflamatório, seja por meio da inibição da ciclooxigenase ou da fosfolipase. Além disso, podem inibir a síntese de outros mediadores inflamatórios como os leucotrienos produzidos pelas enzimas lipoxigenases (LOX) (LE MARCHAND, 2002; YOON; BAEK, 2005). Salienta-se que o desequilíbrio homeostático desses mediadores pode resultar em arteriosclerose, doenças cardiovasculares, derrames, distúrbios respiratórios, artrite e desordens inflamatórias do intestino (SILVA et al., 2002).

A possibilidade de inibição tanto da LOX quanto da COX surge como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias, uma vez que, a ação sobre apenas uma das enzimas poderia potencializar a atividade da outra, visto ambas utilizarem o mesmo substrato: o ácido araquidônico (YOON; BAEK, 2005).

Além da inibição dessas enzimas, compostos fenólicos exibem outros mecanismos nos quais estão inclusos: inibição da síntese de moléculas de adesão; inibição da síntese de citocinas inflamatórias como o $TNF\alpha$ e as interleucinas: IL-1 β ,

IL-6 e IL-8, sendo esta última o principal quimioatrativo de neutrófilos humanos (SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010; RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006); redução na produção de óxido nítrico como consequência direta da menor expressão de enzimas iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (YOON; BAEK, 2005).

2.3.3.4 Antiproliferativa

Resumidamente, a proliferação celular corresponde à multiplicação da molécula de DNA seguido de divisão celular. Trata-se de importante processo para o desenvolvimento do organismo, pois além de promover o seu crescimento, quando em equilíbrio com apoptose, permite que células danificadas sejam substituídas. No entanto, alterações genéticas levam à hiperproliferação e desregulada apoptose em células cancerosas, ocasionando a formação de tumores.

Compostos fenólicos têm demonstrado agir seletivamente sobre essas células desempenhando ação antiproliferativa por mecanismos, dentre os quais, citam-se: inibição de proteínas reguladoras do ciclo e da proliferação celular como p53, p21, p27, ciclina A e D1, tirosina quinase e proteína quinase C; bloqueio da ativação da via MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), as quais migram para o núcleo fosforilando moléculas responsáveis pela transcrição genética (WANG; STONER, 2008; LE MARCHAND, 2002; REN et al., 2003). Fenólicos também atuam reduzindo a biossíntese de poliamina através da ação sobre a ornitina descarboxilase e inibindo enzimas pró-oxidativas como COX, LOX e xantina oxidase cuja atividade gera espécies reativas de oxigênio, que são considerados importantes catalisadores nas etapas de surgimento e progressão de tumores (REN et al., 2003).

Os efeitos antiproliferativo, apoptótico e a possível diferenciação em células cancerosas associados à atividade antioxidante e a capacidade dos fenólicos em induzir interrupções no ciclo celular, possibilitando o reparo de erros ocorridos durante a síntese do DNA, são propriedades que podem explicar a ação anticarcinogênica desses compostos (REN et al., 2003)

2.3.3.5 Atividade antioxidante

A palavra 'antioxidante' é aplicada a qualquer substância capaz de regenerar um substrato oxidado ou prevenir sua oxidação, desde que este efeito

seja atingido a uma concentração relativamente baixa a do substrato (HALLIWELL, 2000).

Os antioxidantes mais ativos e frequentemente encontrados em vegetais são os compostos fenólicos. No processo oxidativo, eles podem evitar o desenvolvimento da reação em cadeia decompondo os produtos primários da oxidação a compostos não reativos e, em alguns casos, por quelar íons metálicos (Cu^{2+} e Fe^{2+}) que atuam como catalisadores da oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As propriedades moleculares dos fenólicos os permitem serem bons sequestradores de espécies reativas. Na peroxidação lipídica, por exemplo, a proteção do sistema é garantida pela afinidade dos radicais peroxila aos polifenóis que é maior quando comparada a afinidade por moléculas lipídicas (BRAVO, 1998). Essa capacidade dos fenóis pode ser atribuída a sua facilidade na doação de átomos de hidrogênio e elétrons aos agentes oxidantes, que entre outros fatores, é determinada pela reatividade dos grupos substituintes no seu anel aromático: metila, metoxila, amino e hidroxila. A presença e a posição de cada um desses grupos diminuem de modo desigual os valores de entalpia da ligação O-H e do potencial de ionização da molécula (PI) resultando em distintas atividades entre as diversas estruturas fenólicas existentes. Grupamentos ésteres, no entanto, também podem estar presentes nas moléculas fenólicas tornando-as mais eletrofílica devido à capacidade de aceitação de elétrons. Dessa forma, eles aumentam os valores de PI e da entalpia de ligação diminuindo a habilidade redutora, ou seja, o poder antioxidante da estrutura fenólica (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

A quantificação das energias envolvidas nos processos de transferência de elétrons e hidrogênio tem sido objetivo de alguns estudos que buscam identificar os principais mecanismos pelos quais os fenólicos inativariam os oxidantes e, a partir disso, predizer as estruturas mais favoráveis a esta ação. O interesse aumenta, principalmente, devido à possibilidade de desenho e síntese de novas moléculas antioxidantes com efeitos farmacológicos específicos.

Os mecanismos que têm sido propostos são: (a) transferência de átomos de hidrogênio; (b) perda de prótons (H^+) seguida da transferência de elétrons; (c) transferência de elétrons acoplada a de prótons (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismos propostos para os polifenóis no sequestro de radicais livres
 Fonte: adaptado de Wright, Johnson e Dilabio (2001); Stepanić et al. (2013).

Apesar do resultado final ser o mesmo, as cinéticas e possibilidade de reações secundárias são diferentes e devem ser consideradas. Segundo relatos, durante a transferência de elétrons, o cátion proveniente do antioxidante pode ser capaz de atacar outras moléculas exercendo efeitos nocivos sobre o sistema (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

No trabalho de Wright, Johnson e Dilabio (2001), as determinações realizadas no estado gasoso apontam a transferência de hidrogênio como o mecanismo predominante na ação dos fenólicos. Sendo um dos menores valores de entalpia de ligação e de PI encontrado para o estilbeno piceatannol, um antioxidante mais potente que o resveratrol. Porém para Stepanić et al. (2013), quando os cálculos são realizados em fase aquosa, dependendo do pH, sugere-se que a perda sequencial de prótons (H^+) na transferência de elétrons possa ser um mecanismo concorrente ou dominante sobre a transferência de hidrogênios.

Além da influência do número e posição dos grupamentos, a composição do meio reacional e o potencial de redução dos compostos envolvidos também precisam ser citados (ANDERSEN; LAURIDSEN; SKIBSTED, 2003).

Mais do que a habilidade redutora, para um bom antioxidante é importante que o radical resultante da sua interação com agentes de oxidação possua baixa reatividade para que não sejam observadas reações adicionais com lipídios, por exemplo. A estabilidade dos radicais fenólicos é mantida pelo deslocamento dos elétrons entre os átomos que compõem o anel aromático, ou seja, por ressonância.

No organismo, o acúmulo de biomoléculas danificadas pelos agentes oxidativos pode ser essencial ao processo de envelhecimento (BEHL; MOOSMANN, 2002; BIANCHI; ANTUNES, 1999) e desenvolvimento de doenças como câncer (WANG; MAZZA, 2002), enfermidades cardiovasculares e circulatórias causadas pelo estresse oxidativo (STOCLET et al., 2004).

Entre os mecanismos nos quais os polifenóis parecem estar envolvidos na prevenção de algumas destas doenças, destaca-se a proteção das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) contra a oxidação e a manutenção do fator NF- κ B na sua forma inativa devido, em ambos os casos, a modulação do status redox intracelular (VIRGILI; SCACCINI, 2003).

A forma oxidada da LDL apresenta alta afinidade por receptores dos macrófagos localizados no endotélio que, de modo descontrolado, passam a fagocitá-las. Tornando-se células espumosas, os macrófagos são capazes de deslocar a camada endotelial acarretando na obstrução ou rompimento do vaso sanguíneo. Já o fator NF- κ B quando ativado se desloca do citoplasma ao núcleo regulando a transcrição de vários genes como aqueles envolvidos no processo de aterosclerose (VIRGILI; SCACCINI, 2003), na produção do fator de necrose tumoral e das enzimas ciclooxigenase, óxido nítrico sintase e superóxido dismutase. Alguns estudos relacionam a forma ativa do fator NF- κ B a lesões do mal de Parkinson, à regulação do humor, à sensibilidade ao estresse e à apoptose celular (GLEZER et al., 2000).

Vários são os estímulos que ativam o fator NF- κ B, entre eles neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, irradiação ultravioleta, COX tipo 2, produtos provenientes de vírus e bactérias. No entanto, de acordo com Glezer et al. (2000), independente do estímulo espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular estão envolvidos nessa ativação. Atuando o Ca^{2+} como um mensageiro secundário.

Tanto em células vegetais como animais, um dos alvos das espécies reativas de oxigênio é a Ca^{2+} -ATPase, cuja inibição contribui ao aumento no nível de Ca^{2+} citoplasmático, efeito que parece ser comum nos danos celulares causados por tais espécies (BARTOSZ, 1997).

2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo reflete a condição em que a produção de agentes oxidantes se sobressai diante das defesas antioxidantes presentes no meio.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são os oxidantes a que os organismos e alimentos frequentemente estão submetidos.

Nestes grupos se encontram os radicais livres e as moléculas não radicalares, as quais diferentemente dos primeiros não apresentam elétrons desemparelhados, mas em decorrência do seu caráter eletrofílico também possuem habilidade em atrair para si os elétrons. Tratam-se, assim, de estruturas altamente instáveis que podem rapidamente reagir com substâncias com alta densidade de elétrons como as regiões de insaturações dos ácidos graxos (NOVELLI, 2005). Atacam ainda todas as outras classes de biomoléculas incluindo os demais lipídeos, proteínas, DNA, RNA, membranas plasmáticas, nucleares e mitocondriais prejudicando as funções vitais do organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Hidroperóxido (ROOH), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$) e peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) pertencem ao grupo das ROS. Já as espécies reativas de nitrogênio compreendem o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As espécies reativas são produtos intermediários de reações denominadas oxirredução, onde a transferência de elétrons ocorre em mais de uma etapa até a estabilização dos substratos envolvidos. A oxidação de lipídeos e a respiração aeróbica constituem exemplos típicos desta reação (ARAÚJO, 1994; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Na figura 4, um esquema simplificado demonstra que o oxigênio ao mesmo tempo em que permite às células vegetais e animais uma eficiente produção energética, participa de reações secundárias que levam a formação de espécies reativas. Segundo McCord (2000) isso se deve a combinação de dois fatores:

- 1) O oxigênio em reações não enzimáticas é capaz de aceitar apenas um elétron de cada vez, embora ele necessite de quatro para se tornar uma molécula de menor energia livre (H_2O). Isso decorre da sua distribuição eletrônica não convencional que constitui uma barreira cinética à transferência, em uma única etapa, do par de elétrons com spin correspondentes. Esta barreira, no entanto, é ultrapassada pela enzima citocromo oxidase, responsável pela redução de 98% do oxigênio que metabolizamos. O tempo de contato da molécula de oxigênio com os quatro centros redox desta enzima seria suficiente para a inversão do spin de um de seus elétrons, tornando-os anti-paralelos e possibilitando o emparelhamento.

2) Na cadeia transportadora de elétrons parece haver pelo menos dois locais (complexo I e ubiquinona) em que 1 a 2% do total do fluxo de elétrons possa escapar e reduzir diretamente o oxigênio, diminuindo assim a ação da citocromo oxidase (último complexo da cadeia respiratória).

A completa redução do oxigênio sem a presença de intermediários também é afetada por danos na mitocôndria em condições fisiopatológicas ou durante alguma disfunção mitocondrial em que o fluxo de elétrons é prejudicado (KALYANARAMAN, 2013).

Figura 4 – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
Fonte: adaptado de Bartosz (1997) e Kalyanaraman (2013)

Radiações gama e ultravioleta, cigarros, dieta e exercícios físicos exaustivos representam outras importantes vias de surgimento das espécies reativas no organismo (BIANCHI; ANTUNES, 1999; VINÃ et al., 2000).

Porém, o maior problema é quando o quadro de estresse oxidativo é estabelecido, já que em condições normais há um equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e antioxidantes nas células. Aliás, quando presentes em quantidades adequadas, as espécies reativas participam de importantes mecanismos como regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, relaxamento do músculo liso e fagocitose. Na presença de patógenos, enzimas

especializadas como a NADPH oxidase são estimuladas e produzem o superóxido, que embora seja um fraco microbiocida leva a formação de substâncias mais potentes como o $\text{HO}^\bullet$. Em indivíduos com deficiência nesta enzima (doença rara), a produção de superóxido, ácido hipocloroso e outros antimicrobianos em células fagocitárias é afetada e, assim, sérias infecções são ocasionadas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KALYANARAMAN, 2013). Portanto, a finalidade do sistema de defesa antioxidante não seria a completa remoção das ROS, mas o controle dos seus níveis permitindo que desempenhem funções úteis ao organismo ao mesmo tempo minimizando os danos oxidativos ocasionados por essas espécies (HALLIWELL, 2008).

A utilização das espécies reativas e a elaboração de sistemas antioxidantes parecem ser as formas pelas quais os organismos se adaptaram à ameaça do oxigênio em uma atmosfera que passou de redutora a fortemente oxidante graças ao surgimento das algas fotossintetizantes (BARTOSZ, 1997).

Sistemas enzimáticos constituídos por superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase são responsáveis pela dismutação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (resultados da ação de espécies reativas sobre moléculas orgânicas). Contudo, em organismos superiores, ao converter o peróxido de hidrogênio em água a glutathione parece ter suplantado a necessidade da catalase (NOVELLI, 2005; McCORD, 2000).

A defesa contra as espécies reativas também tem forte contribuição de antioxidantes de baixo peso molecular como ácido ascórbico, α -tocoferol e compostos fenólicos (NOVELLI, 2005; McCORD, 2000).

Nos alimentos, os fatores fundamentais na formação de espécies reativas são o tratamento térmico; absorção de energia de irradiação como as radiações ionizantes aplicadas na esterilização de alimentos; reação com íons metálicos como ferro e cobre presentes em alguns equipamentos industriais e agrícolas.

Depois da deterioração microbiana, a segunda causa mais importante da deterioração de alimentos é a oxidação lipídica que, além de promover alterações sensoriais com o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis no produto, modifica a sua composição nutricional não só pela degradação de ácidos graxos essenciais, mas por que outras moléculas como os carotenóides e vitaminas A e D são afetadas (REGITANO-d'ARCE, 2006). A peroxidação lipídica também

representa importante problema a ser contornado pelas indústrias processadoras de carne, principalmente na produção de embutidos emulsionados. Lipídeos oxidados ao interagirem com proteínas miofibrilares desencadeiam reações de polimerização e cisão da cadeia polipeptídica, interferindo negativamente na solubilização e funcionalidade destas moléculas (TRINDADE, 2006).

2.5 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Inicialmente, os métodos para a avaliação da atividade antioxidante podem ser divididos em dois grandes grupos devido à presença ou ausência de substratos lipídicos no meio, tais como ácidos graxos e lipoproteínas. Essa característica é muito importante, pois os lipídios participam ativamente do processo oxidativo em matrizes alimentícias, durante etapas de processamento e armazenamento, e em matrizes biológicas sob condições fisiopatológicas ou mesmo fisiológicas. Tornando-se extremamente relevantes as interações dos lipídeos com os antioxidantes, oxidantes e com as espécies por eles geradas.

Ao contrário dos métodos DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, o envolvimento de substratos lipídicos é observado em testes como de Shall, Rancimat, TBARS e autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

De acordo com as possíveis reações de sequestro dos radicais livres, sugerem-se ainda dois mecanismos pelos quais os principais métodos antioxidantes se baseiam e podem ser classificados: transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons.

Na transferência de hidrogênio, um dos fatores determinantes na eficiência dos antioxidantes é a energia associada à quebra homolítica de sua ligação (O-H). Quanto menor este valor, maiores serão a fragilidade da ligação e a velocidade de reação com radicais livres. Outro ponto fundamental no processo se refere à energia envolvida na adição do hidrogênio à molécula oxidante, pois as diferenças entre as energias na quebra e formação de ligações definem o quão endotérmica ou exotérmica é uma reação e indicam se ela é termodinamicamente favorável (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

Considerando as energias de ligações do radical peroxila, do α -tocoferol e do hidroxibenzeno, que em valores aproximados são respectivamente iguais a 88 kcal.mol⁻¹, 77 kcal.mol⁻¹ e 88 kcal.mol⁻¹, o sequestro do peroxila seria

mais favorável e rápido pelo α -tocoferol. Isso porque o saldo energético dessa reação seria de $-11 \text{ kcal.mol}^{-1}$ enquanto a outra seria termoneutra. Levanta-se, então, a questão da seletividade existente entre antioxidantes e radicais (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

ORAC e TRAP podem ser citados como métodos fundamentados nesse tipo de mecanismo, cujas reações são independentes de pH e solvente. É comum a estes ensaios a participação competitiva da sonda (substância sobre a qual a reação é monitorada) com o antioxidante pelos radicais presentes (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

No segundo mecanismo sugerido, as energias se referem àquelas necessárias à retirada e adição de elétrons. Sendo a reatividade fortemente influenciada pelo potencial de ionização da molécula redutora e pela afinidade eletrônica do oxidante. Pelo fato da transferência de elétrons ser facilitada com a perda de prótons (H^+) do antioxidante para o meio, outros fatores como pKa (constante de dissociação), pH, energia de desprotonação e de hidratação do cátion formado também são importantes (GÜLÇİN, 2012; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Exemplos desse mecanismo são os ensaios de 'capacidade de redução do Folin-Ciocalteu', 'FRAP', 'DPPH' e 'ABTS'. Nos quais as reações têm como sonda o próprio oxidante e como interferentes os valores de pH. São muito sensíveis aos ácidos ascórbico e úrico, substâncias importantes à manutenção redox do plasma (GÜLÇİN, 2012; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

É possível que nos sistemas biológicos e até mesmo nos próprios métodos citados as transferências de elétrons e de hidrogênio ocorram em paralelo, porém em razões diferentes. O predomínio de um mecanismo sobre outro dependerá de fatores ambientais bem como das estruturas e propriedades químicas do substrato de teste e dos agentes sequestrantes, para os quais a solubilidade exerce significativo impacto (STEPANIĆ et al., 2013).

Sabendo-se que distintos são os mecanismos de ação dos compostos, a reatividade das moléculas e a influência da composição do meio, a avaliação antioxidante sob diferentes abordagens é altamente recomendável.

Diante dessa necessidade, vários métodos têm sido desenvolvidos no intuito de identificar extratos ou substâncias naturais potencialmente antioxidantes e benéficas à saúde. Nos quais nítidos são os esforços para tornar as condições dos

testes *in vitro* cada vez mais próximas às observadas em organismos e produtos alimentícios, sobretudo ao que se refere às espécies reativas, ao pH e temperatura.

Nessa tentativa de aproximação, vários grupos têm utilizado em suas pesquisas espécies reativas biologicamente relevantes tais como hidroxila, peroxila, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, ácido hipocloroso e peroxinitrito. Contudo, ainda não se tem disponível uma metodologia conveniente para uma rápida quantificação antioxidante reunindo todas as formas pelas quais um composto pode exercer a sua atividade. O que significa dizer que a aplicação de um único método dificilmente irá traduzir de modo satisfatório o comportamento de uma amostra.

A enorme divergência entre os resultados obtidos em trabalho de Duarte-Almeida et al. (2006) com extratos de frutas, exemplifica claramente como a adoção de apenas um método conduziria a conclusões equivocadas sobre a amostra estudada. Na emulsão com ácido linoleico a porcentagem de inibição de oxidação foi de 90 % para extratos de açaí enquanto os de acerola atuaram como pró-oxidante. No entanto, quando submetidos ao teste de DPPH, atividade antioxidante da acerola foi significativamente alta e 3 vezes superior à do açaí. Ao que, em ambos os casos, foi atribuído ao expressivo teor de ácido ascórbico na acerola. Este ácido possui habilidade em doar prótons e elétrons e, assim, gera o ascorbila, um radical que parece não interferir na análise com o DPPH, mas na presença de substratos lipídicos pode contribuir à oxidação.

Dentre os 22 compostos fenólicos testados por Tabart et al. (2009), poucos exibiram atividades antioxidantes comparáveis nos seis métodos aplicados (redução do Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH, ORAC, sequestro do radical superóxido e hemólise de células sanguíneas). Sendo interessante o desempenho do kaempferol-3-O-glucosídeo, cuja atividade antioxidante foi extremamente baixa, estando entre os piores valores frente aos radicais ABTS e DPPH. Mas na proteção de células contra o estresse oxidativo foi um bom antioxidante e na inativação do radical peroxila, esteve entre os quatro compostos de maior atividade.

Outro exemplo seria a ação do β -caroteno sobre a peroxidação de substratos lipídicos. Em solução micelar aquosa, este carotenóide inibiu a degradação do ácido linoleico, mas mesmo quando empregue em maiores concentrações, não foi capaz de inibi-la nos ácidos α e γ linolênico. A explicação foi baseada nas polaridades dos radicais produzidos e na sua conseqüente distribuição

no sistema. Ao contrário do peroxila formado pelo ácido linoleico, aqueles provenientes do linolênico possuiriam maior polaridade, tendo se acumulados na interface lipídeo-água. Nesta região, parecem ser inacessíveis ao β -caroteno que se encontraria no interior da micela, dificultando o seu efeito sobre o processo oxidativo (EL-AGAMEY et al., 2004).

A seguir, encontra-se uma breve descrição dos métodos utilizados no presente trabalho para a avaliação das amostras das espécies nativas brasileiras: redução do Folin-Ciocalteu, sequestro do DPPH, autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, ORAC e sequestro do radical ânion superóxido.

2.5.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu

Neste método, como o próprio nome diz, avalia-se a capacidade da amostra em promover a redução do reagente Folin-Ciocalteu, uma solução de íons complexos poliméricos de natureza química não completamente conhecida. Sabe-se, no entanto, que nesta solução são encontrados átomos de molibdênio (Mo) no estado de oxidação 'VI', os quais na presença de agentes redutores tais como os compostos fenólicos parecem ser capazes de receber um elétron formando complexos azuis em decorrência da mudança do seu estado de oxidação para 'V' (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Esta reação envolve a transferência de elétrons e os produtos dela resultante podem ser detectados entre 740 a 765 nm, faixa onde se dá a máxima absorbância (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

De acordo com Oliveira et al. (2009a), para a redução do molibdênio pelos compostos fenólicos é necessário que estes estejam na sua forma desprotonada, ou seja, como ânions fenolatos o que é favorecido sob condições alcalinas.

Embora este método tenha recebido a denominação de "teor de fenólicos totais" e muitos trabalhos o tem utilizado dessa forma, sabe-se que o desenvolvimento do complexo de coloração azul não é exclusivo aos compostos fenólicos e várias são as substâncias com tal habilidade: aminas aromáticas, ácido ascórbico, ácidos orgânicos e Fe (II). Portanto, a menos que esses interferentes sejam removidos da amostra, não é adequado atribuir a este método tal designação,

por isso, ele tem sido proposto como uma forma de mensuração da capacidade de redução da amostra (MAGALHÃES et al., 2008).

Apesar dessas implicações, a redução do Folin-Ciocalteu possui significativa utilidade, tratando-se de um ensaio operacionalmente simples, reprodutível, relativamente barato e tem apresentado boa correlação com o método ORAC (MAGALHÃES et al., 2008), o qual avalia a atividade antioxidante frente a ação do radical peroxila.

2.5.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

O DPPH (Difenil-1-picriidrazil) é uma substância orgânica que contém em sua estrutura um átomo de nitrogênio com um elétron desemparelhado, apesar disso, trata-se de um radical relativamente estável. Sua cor característica, o roxo intenso de absorção máxima a 517 nm, é progressivamente alterada para o amarelo na presença de agentes redutores (GÜLÇİN, 2012); utilizando-se deste artifício é que muitos trabalhos tem avaliado a atividade antioxidante de extratos vegetais.

A redução deste radical envolve tanto a transferência de elétrons como a de prótons, a depender da composição e estrutura dos antioxidantes/amostras e das características dos meios testados. Na presença de metanol e etanol, solventes normalmente utilizados, a reação está mais associada à transferência de elétrons enquanto a transferência de átomos de hidrogênio representa uma via secundária de menor importância. Já em meios apolares o inverso pode ser verdadeiro, visto que a taxa de transferência de hidrogênio dos antioxidantes ao radical aumenta quanto menor a habilidade do solvente em estabelecer ligações de hidrogênio (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2003).

Apesar de orgânico, o DPPH não apresenta semelhanças com os radicais da peroxidação lipídica como o peroxila, que é altamente reativo. Portanto, entre essas reações, diferenças de cinética e consequentemente de eficiência antioxidante podem ser encontradas para uma mesma amostra (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

É um método que apresenta simplicidade na execução necessitando apenas de um espectro UV-visível e o reagente (DPPH) é facilmente disponível, estando pronto para o uso após diluição desejada. Por estas vantagens, mostra-se útil no *screening* antioxidante de amostras.

2.5.3 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

De acordo com Laguerre, Lecomte e Villeneuve (2007), o método de autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico representa uma das estratégias para a determinação da atividade antioxidante de uma molécula ou extrato frente à oxidação lipídica. As demais incluem: padrão de consumo de oxigênio na etapa de iniciação do processo oxidativo e determinação dos produtos primários e secundários da oxidação, tais como os hidroperóxidos, malonaldeído e compostos voláteis (alcoóis, cetonas e aldeídos).

Neste método, oxigênio e calor atuam como iniciadores da oxidação do ácido graxo (substrato lipídico) presente no meio reacional, o qual é constituído por água aerada, β -caroteno e ácido linoleico. Utilizando geralmente temperatura em torno de 50 °C durante 2 horas, radicais com predominância do peroxila são formados e podem atacar a estrutura poliênica do carotenóide acarretando na perda de coloração do sistema, que é espectrofotometricamente monitorada a 470 nm.

Compostos fenólicos por meio de uma reação de complexação com os radicais lipídicos podem inibir essa degradação do β -caroteno. O mecanismo proposto sugere que o hidrogênio fenólico, através de pontes de hidrogênio, se ligaria ao radical peroxila e, assim, um próton seria transferido ao par iônico no radical. Acoplado a isso, ter-se-ia o movimento de um elétron do oxigênio fenólico ao orbital incompleto no radical lipídico, de tal forma que o elétron se deslocaria entre dois orbitais não ligantes (DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2010).

Pode-se dizer que a atividade antioxidante neste sistema é determinada por meio da comparação entre duas reações químicas competitivas. Uma delas se refere a do composto ou extrato de interesse que foi adicionado ao meio reacional, enquanto a outra é a reação do próprio β -caroteno, que devido à presença de duplas ligações conjugadas se torna uma substância muito sensível ao ataque de radicais livres. O sequestro destes radicais pelo β -caroteno também se dá pela formação de um radical aduto [β -caroteno - ROO $\cdot$] que ocorre na ausência de um antioxidante mais forte que este carotenoide (YAMAUCHI; TSUCHIHASHI; KATO, 1998; DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2010).

Uma das críticas ao método é a geração de radicais ser bastante inespecífica, podendo formar radicais com diferentes reatividades e consequentemente afetar a reprodutibilidade da análise (CHAILLOU; NAZARENO,

2006). No entanto, sua importância não deve ser negligenciada, uma vez que, os radicais presentes neste método podem estar envolvidos na oxidação lipídica em alimentos e em organismos vivos.

2.5.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

Atualmente, o ORAC tem sido considerado um dos métodos mais relevantes aos sistemas biológicos. Isso porque mensura a capacidade da amostra em inibir reações de oxidação induzidas por uma espécie reativa de oxigênio pertencente ao grupo de radicais livres denominados 'peroxila' (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Diferentes peroxilas ($\text{ROO}^\bullet$) constantemente exercem ação sobre o organismo humano. Metabolicamente, uma das vias de geração deste radical é a ação de radicais hidroxilas sob grupos susceptíveis da cadeia lipídica (grupo metilênico alílico) resultando na abstração de átomos de hidrogênio com posterior adição de oxigênio no carbono radicalar formado. Uma vez presente, o peroxila facilmente pode atacar proteínas de membrana e ainda outros lipídios desencadeando reação em cadeia, na qual significativa quantidade de radicais livres é produzida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Para a avaliação da atividade antioxidante por meio do método ORAC, fazem-se necessárias uma fonte controlável de radicais peroxila, normalmente o AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) diidrocloreto), e uma sonda fluorescente (fluoresceína), cuja intensidade do sinal emitido diminui à medida que sua estrutura é atacada por esses radicais. Na presença de agentes antioxidantes a degradação da sonda pode ser evitada a depender da concentração dos agentes envolvidos bem como de suas afinidades ao peroxila (HUANG; OU; PRIOR, 2005). De acordo com Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), neste caso o mecanismo antioxidante se baseia na transferência de átomos de hidrogênio.

Nas condições citadas acima é possível que a atividade de compostos lipofílicos como os carotenóides sejam ignoradas, já que tanto o AAPH como a fluoresceína são de natureza hidrofílica. A fim de contornar essa limitação tem sido realizadas adaptações ao método com uso de solventes orgânicos de menor polaridade; sondas lipofílicas como C_{11} -BODIPY (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3^a,4^a-diazas-indacene-3-undecanoic acid) e, espécies geradoras

de peroxila também lipofílicas: AMVN ((2,2' – azobis (2,4 dimetilvaleronitrila)) e AIBN (2,2'-azobisisobutironitrila) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; RODRIGUES et al., 2012). Tornando-se, particularmente interessante ao se considerar a existência de antioxidantes menos polares em matrizes alimentícias que podem ter valor ORAC subestimado pelo método tradicional.

Diferentemente de alguns métodos, o ORAC permite a análise não só de amostras botânicas como também biológicas; as condições de pH e temperatura no ensaio estão próximas às fisiológicas (HUANG; OU; PRIOR, 2005) e a determinação do dano oxidativo não se baseia em medidas de absorbância reduzindo, portanto, a interferência da coloração da amostra no resultado final.

Como vantagem do ORAC sobre o método de branqueamento do β -caroteno, que também utiliza radicais peroxila, pode-se citar a sua maior reprodutibilidade, contribuindo para isso o fato da fluoresceína ser mais estável em relação ao carotenóide. Este por si só é sensível ao calor e passível de sofrer isomerização gerando produtos de diferentes reatividades quando exposto a temperatura usada na análise (CHAILLOU; NAZARENO, 2006). Acrescenta-se ainda a inespecificidade da degradação térmica do ácido linoleico na produção dos radicais em que não somente radicais peroxila são obtidos.

2.5.5 Sequestro do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O ânion superóxido nada mais é do que oxigênio molecular após a redução por um elétron, configurando um radical livre por assim apresentar um elétron desemparelhado. Para avaliar a capacidade de uma amostra em sequestrá-lo estão disponíveis na literatura métodos em que o radical é gerado por via enzimática ou não enzimática. Tal classificação se deve ao agente que atuará como catalisador da transferência de elétrons ao oxigênio. Citando os dois métodos mais utilizados, têm-se como catalisadores a enzima xantina oxidase e o reagente fenazina metassulfato (PMS).

A princípio estes métodos foram desenvolvidos visando o estudo de amostras contendo superóxido dismutase e hoje são aplicados a uma variedade de extratos vegetais a fim de identificar moléculas com ação semelhante a esta enzima.

Utilizando o sistema xantina oxidase, a oxidação do substrato (xantina) gera ácido úrico, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido como produtos finais da

reação (ALVES et al., 2010). Atuando a xantina como doadora de elétrons e o oxigênio como acceptor dos mesmos.

Já no método não enzimático, de acordo Rao (1989), os elétrons que reduzirão o oxigênio são provenientes da molécula de NADH. No esquema feito pelo autor, esses elétrons seriam transferidos aos cátions provenientes do PMS (MP^+) dando origem ao MPH. Os quais, participando de uma reação de oxirredução com o oxigênio levaria à formação de MPH^+ e do radical ânion superóxido (Figura 5).

Figura 5 -Esquema proposto por RAO (1989) para a geração do radical superóxido
Fonte: Rao (1989)

Em ambos os casos, uma das maneiras de se determinar a atividade antioxidante é através do monitoramento da concentração do formazan, substância que apresenta absorção máxima a 560 nm e cuja produção é decorrente da ação do $O_2^{\bullet-}$ sobre azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}), que representa a sonda da análise (MAGALHÃES et al., 2008).

A comparação das absorbâncias entre o meio controle e as soluções contendo antioxidantes reflete a inibição de formação do cromóforo e, portanto, a capacidade de sequestro do radical. Deste modo, a presença de agentes sequestrantes do ânion superóxido, tais como a enzima superóxido dismutase (SOD), o ácido ascórbico e os compostos fenólicos acarretaria em menor produção do formazan e, conseqüentemente menor absorbância em relação ao controle.

Em experimento, Nishikimi e Rao (1972) observaram que a adição da enzima SOD inibia a redução do NBT^{2+} no sistema com NADH e PMS sob condições aeróbicas, chegando a 95% de inibição quando utilizado 9,4 unidades da enzima.

Indicando que apenas 5% da redução do azul de nitrotetrazólio foram devido à sua ação direta com o PMS reduzido.

Entretanto, estudos comprovaram que alguns compostos fenólicos e extratos de frutas, vegetais, ervas e especiarias, além de exibirem atividade sequestrante do radical, também são capazes de evitar a sua formação via inibição da enzima xantina oxidase (COS et al., 1998; DEW; DAY; MORGAN, 2005; ÖZYÜREK et al., 2009).

Características favoráveis ao método se referem ao uso de um radical biológico para análise da atividade antioxidante de compostos isolados ou misturas complexas, ao pH próximo ao fisiológico e a rapidez da análise, já que o tempo de estabilização da reação é significativamente pequeno estando entre 5 e 10 minutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima: obtenção e tratamentos iniciais

Frutas nativas brasileiras e suas respectivas folhas: *Garcinia brasiliensis* (bacupari-mirim), *Eugenia brasiliensis* (grumixama), *Eugenia myrcianthes* (ubajaí) e *Eugenia leitonii* (araçá-piranga) foram coletadas entre outubro de 2011 a março de 2012 na propriedade “Estância das Frutas” localizada na cidade de Rio Claro. A espécie *Eugenia involucrata* (cereja do rio grande) foi adquirida em dezembro de 2011 da empresa “Sítio do Bello” na cidade de Paraíbuna. Ambos os pomares em regiões do estado de São Paulo. A figura 6 ilustra o aspecto visual das frutas analisadas.

Garcinia brasiliensis
(bacupari-mirim)

Eugenia myrcianthes
(ubajaí)

Eugenia leitonii
(araçá-piranga)

Eugenia involucrata
(cereja do rio grande)

Eugenia brasiliensis
(grumixama)

Figura 6 - Aspecto visual das frutas coletadas nas cidades de Rio Claro e Paraíbuna - SP

Após a coleta, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas com gelo e imediatamente transportados ao Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ. Frutos de *E. involucrata* foram congelados para o transporte devido à distância da empresa “Sítio do Bello” ao laboratório. Já as folhas estiveram durante todo o percurso à temperatura ambiente.

As frutas adquiridas foram selecionadas, lavadas em água corrente e as frações polpa e semente foram separadas, com exceção da *E. leitonii* e *G. brasiliensis*, das quais também foi possível a separação das cascas. Para as demais espécies, a remoção da fina película de recobrimento acarretaria em baixo rendimento do material, dificultando assim a execução das análises posteriores. Além disso, elas normalmente são consumidas junto às polpas.

O material foi congelado, liofilizado e armazenado a -20°C até o momento da extração.

3.2 Extratos das espécies nativas brasileiras

Os extratos foram obtidos em triplicata, conforme descrito por Bloor (2001) com adição de 10 mL de etanol 80 % (v/v) a 1,0 g do material liofilizado. A extração foi conduzida em banho ultrassom (180 W) por 30 minutos, sob vibração constante e temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos e, após a filtração, o sobrenadante (extrato bruto) foi recuperado e utilizado para as análises químicas (avaliação da atividade antioxidante e composição fenólica).

3.3 Atividade Antioxidante

3.3.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu

Para a avaliação das amostras das espécies nativas, o ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. No procedimento, os extratos foram diluídos e uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi transferida para tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10 %). A mistura

permaneceu em repouso por 5 minutos, sendo posteriormente acrescidos 2,0 mL de carbonato de sódio a 4 %. Após duas horas, ao abrigo da luz, foram feitas as leituras de absorbância a 740 nm. Nestas mesmas condições, substituiu-se o volume da amostra por soluções de ácido gálico em concentrações crescentes de 10, 20, 40, 60 e 80 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), obtendo-se assim as curvas de calibração ($R^2 > 0,99$). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama de material liofilizado.

3.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

Na avaliação da capacidade de sequestro do radical livre DPPH, 500 μL da amostra foram misturados a 3,0 mL de etanol 99 % e 300 μL de solução de DPPH 0,5 mM. Leituras espectrofotométricas foram realizadas a cada vinte minutos, durante aproximadamente 2 horas (tempo de estabilização da reação) no comprimento de onda de 517 nm. O meio reacional permaneceu a temperatura ambiente com a menor incidência possível de luz. A análise foi conduzida em duplicata e os resultados expressos em EC_{50} , ou seja, a concentração mínima necessária para que a amostra reduzisse a 50 % o radical DPPH inicial da reação.

Para tanto, fez-se necessária a utilização de diferentes concentrações dos extratos. Isso, por sua vez, permitiu a construção de gráficos, nos quais estas concentrações foram alocadas no eixo das abscissas e a atividade antioxidante (após a estabilização da reação eq.(1)) no eixo das ordenadas. Com estes gráficos, equações de regressão linear foram obtidas ($R^2 \geq 0,99$) e o EC_{50} calculado.

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad (1)$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco (DPPH substituído pelo solvente da extração)

Ac = absorbância do controle (amostra substituída pelo solvente de extração)

3.3.3 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo o método descrito por Emmons, Peterson e Paul (1999), com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

À 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40 foram adicionados 3 mL de uma solução de β -caroteno em clorofórmio ($1 \text{ mg} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$). Em seguida, este solvente foi evaporado sob uma corrente de gás nitrogênio e ao resíduo obtido foram adicionados 100 mL de água destilada e previamente aerada por 30 minutos. A mistura foi submetida à agitação em vortex formando uma emulsão. Alíquotas de 3 mL desta emulsão foram, então, misturadas à 50 μL da amostra, do padrão (Trolox) ou do solvente de extração (controle). A reação foi desenvolvida a 50°C em banho-maria ao longo de duas horas e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 470 nm após este período.

As curvas de calibração utilizaram como padrão o Trolox e foram construídas a partir da regressão linear ($R^2 \geq 0,96$) entre a atividade antioxidante (eixo das ordenadas) e as concentrações do padrão: 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 e 0,01 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) (eixo das abscissas). Os resultados foram expressos em equivalentes μmol Trolox por grama de material liofilizado.

Para o cálculo da atividade antioxidante, fez-se uso da eq.(2):

$$AA(\%) = \frac{(DRc - DRa)}{DRc} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle = $(\ln(i/f)/120)$

DRa = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato = $(\ln(i/f)/120)$

“i” e “f” = absorbâncias inicial no tempo 0 e final no tempo 120min, respectivamente

3.3.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio

A determinação da atividade antioxidante pelo ORAC, baseou-se no trabalho de Chisté et al. (2011). Sendo adicionados em microplacas, na seguinte ordem: 30 μL do extrato devidamente diluído, 60 μL de fluoresceína 508,25 mM e 110 μL de AAPH 76 mM. Para a obtenção da curva padrão ($R^2 > 0,99$), o volume do extrato foi substituído por soluções de Trolox nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM e 400 μM .

A mistura foi mantida a 37°C para promover a termodecomposição do AAPH e, por consequência a geração de radicais peroxila, enquanto isso o sinal da

fluorescência foi monitorado a cada 1 minuto até o completo decaimento para todas as amostras (aproximadamente 2 horas). Para tanto, os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram de 485 nm e 528 nm, respectivamente.

Os resultados, expressos em equivalente a μmol de Trolox por grama em base seca, foram determinados por meio da diferença entre os valores obtidos para amostra e seu controle no que diz respeito à área sob a curva do decaimento da fluorescência (intensidade X tempo) eq. (3).

$$\frac{AUC_{\text{amostra}} - AUC_{\text{controle}}}{AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{controle}}} \quad (3)$$

Todos os extratos e as soluções foram diluídos em tampão fosfato 75 mM (pH = 7,4). A importância do tampão se deve ao fato de haver significativa diminuição na intensidade da fluorescência quando o pH está entre valores menores que 7 (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

3.3.5 Sequestro do radical ânion superóxido

Neste método, o radical ânion superóxido foi gerado por via não enzimática conforme em Chisté et al. (2011). A 50 μL da amostra em cinco diferentes concentrações foram adicionados 100 μL de NADH (498 μM), 100 μL de NBT (129 μM) e 50 μL de PMS (16,2 μM). Controles foram conduzidos nas mesmas condições, sendo o volume da amostra substituído por tampão fosfato de potássio a 19 mM (pH = 7,4), no qual todos os extratos foram diluídos.

A cada um minuto durante intervalo de 10 minutos (estabilização do sistema) leituras de absorbância a 560 nm foram obtidas e os resultados expressos em EC_{50} , ou seja, a concentração mínima necessária para inibir em 50 % a redução do sal tetrazólio (NBT) em relação ao controle (eq. 4). Este valor foi obtido por regressão linear entre as concentrações utilizadas do extrato e a % de inibição da redução do NBT exibida por cada uma.

$$\frac{(\text{Absorbância controle}_{\text{final}} - \text{Absorbância da amostra}_{\text{final}}) \times 100}{(\text{Absorbância controle}_{\text{final}})} \quad (4)$$

3.4 Composição fenólica dos extratos das espécies nativas brasileiras

Espectrômetro de massas e o detector de arranjo de fotodiodos foram os instrumentos utilizados com o propósito de identificar as substâncias fenólicas que tenham contribuído à atividade antioxidante exibida pelos extratos. Porém, para viabilizar essa identificação, técnicas de separação de compostos foram aplicadas: cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência.

Cromatografia gasosa é um método de separação de gases ou substâncias volatilizáveis caracterizada por possuir um gás inerte como fase móvel. Afinidades distintas dos solutos pela fase estacionária e o emprego de temperaturas adequadas fazem com que as substâncias, ao longo da coluna cromatográfica, migrem de modo diferencial uma das outras. Chegando a tempos diferentes ao detector, que neste caso é o espectrômetro de massas (BONATO, 2006). Já na cromatografia líquida de alta eficiência, o mecanismo de separação envolve não somente a afinidade pela fase estacionária, mas também pela fase móvel (um líquido que percorre a coluna sob alta pressão) e o detector acoplado pode ser o arranjo de fotodiodos (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

3.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Pelo fato da cromatografia gasosa ser uma técnica aplicada a compostos na sua forma volátil, as amostras precisaram ser submetidas ao processo de derivatização (item 3.4.1.2). Objetivando-se a melhoria da sensibilidade dos processos de separação e identificação, fez-se necessária a purificação das amostras (item 3.4.1.1) para eliminar/reduzir substâncias que pudessem atenuar o sinal produzido pelo analito. Neste tipo de material, cuja matriz é altamente complexa, moléculas como as de açúcares que frequentemente estão presentes em grandes quantidades podem prejudicar a análise.

3.4.1.1 Purificação dos extratos (SPE)

Entre os métodos de purificação mais empregados, citam-se a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (SPE) que tem como vantagem sobre a primeira: a rapidez, a reprodutibilidade e as menores quantidades necessárias de solvente e de amostra (STALIKAS, 2007).

Na SPE, a amostra foi forçada a se deslocar através de uma fase sólida extratora, constituída de um composto orgânico hidrofóbico que recobre ou está quimicamente ligado à sílica granulada. Forças de van der Waals entre a fase sólida e os compostos de interesse os extraíram da amostra, mantendo-os no interior do cartucho, do qual puderam ser posteriormente desalojados com uso do solvente metanol. Este processo de separação é baseado em mecanismos de partição e adsorção (SKOOG et al., 2007).

Para a purificação dos extratos das espécies nativas, adotou-se o seguinte procedimento (Figura 7):

Inicialmente, os extratos obtidos conforme item 3.2 foram submetidos à rotaevaporação à 50 °C para a eliminação do etanol, sendo em seguida rediluídos com água até o volume original. Após filtração, ajustou-se o pH para 2 com solução de HCl 5M. Alíquotas de 7 mL das amostras, assim preparadas, foram aplicadas em cartuchos SPE-LC18 (Supelco, 2 gramas) já condicionados com metanol e água ácida (pH 2).

Visando principalmente a remoção de açúcares, as amostras foram “lavadas” com 30 mL de água ácida. Posteriormente, a fração de interesse foi eluída com metanol 100% e transferida a um *vial* silanizado, onde foi concentrada sob corrente de gás nitrogênio e submetida à liofilização. Em seguida procedeu-se o processo de derivatização.

Figura 7 -Etapas de purificação dos extratos

3.4.1.2 Derivatização da amostra – formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

O processo de derivatização, como etapa anterior à cromatografia gasosa, torna-se imprescindível quando se considera não volátil e termicamente instável a natureza do material a ser analisado.

Trata-se de uma reação química entre a amostra e o reagente derivatizante, na qual, os grupos hidroxilas presentes na amostra são convertidos em éteres ou ésteres (substâncias voláteis), transformando o analito em derivados com propriedades compatíveis ao tipo de cromatografia utilizado (BONATO, 2006).

Na derivatização, a quantidade de 100µL do reagente N-metil-N-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida (MSTFA) foi adicionado às frações recuperadas por SPE. Após homogeneização, a reação foi conduzida em estufa a 70 °C durante 10 minutos, em seguida o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) foi rediluído em hexano (de 600 a 800 µL). O sobrenadante foi transferido para outro *vial* e injetado no CG-EM.

3.4.1.3 Injeção e análise da composição fenólica por CG/EM

As amostras derivatizadas foram submetidas à análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu QP2010 Plus). O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão de 1 ml.min⁻¹, enquanto a fase estacionária foi uma coluna capilar (RTX5MS 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). O detector (espectrômetro de massas) operando no modo “*scanning*” (m/z 40-800) monitorou a separação dos compostos.

No cromatógrafo, o injetor esteve a 280 °C e o volume de injeção foi de 0,3 µL no modo “*splitless*”. A programação da temperatura iniciou em 80 °C durante 1 minuto. À taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ atingiu 250 °C (1 minuto), passando à 300 °C (5 minutos) à taxa de 6 °C.min⁻¹, à 310 °C (5 minutos) à taxa de 15 °C.min⁻¹, à 320 °C (10 minutos) à taxa de 20 °C.min⁻¹, totalizando 40 minutos de análise.

No espectrômetro de massas as temperaturas envolvidas na fonte de ionização e na interface foram respectivamente iguais a 200 °C e 280 °C.

Com esta técnica para cada substância que compõe a amostra um espectro de massas foi obtido, o qual correspondeu aos sinais gerados por razões m/z (massa/carga) dos íons moleculares e/ou dos fragmentos advindos da quebra de ligações químicas do analito pela fonte de ionização do equipamento.

A integração das áreas dos picos foi realizada por meio do software LabSolutions-GCMS e a identificação dos compostos fenólicos foi por comparação dos dados obtidos em CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) com o de padrões fenólicos contidos na biblioteca Wiley® 8 e com os seguintes padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições das amostras: ácidos ferúlico, gálico, siríngico, cafeico, vanílico, sinápico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, (-)-epicatequina, resveratrol, kaempferol, luteolina, miricetina e quercetina.

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

Na preparação das amostras analisadas em CLAE as seguintes etapas foram cumpridas antes da injeção no cromatógrafo: obtenção dos extratos etanólicos (item 3.2), rotaevaporação, liofilização e diluição em metanol 100 %. Sendo as concentrações finais das amostras iguais a: 1,0 % para as folhas, com exceção da *Eugenia involucrata* que estava a 0,5 %; 1,5 % para as cascas e sementes, exceto

para semente de *Eugenia myrcianthes* que estava a 2,0 %; 3,0 % para as polpas de *Eugenia involucrata* e *Eugenia brasiliensis* e 5,0 % para as demais polpas.

A metodologia utilizada para a separação dos compostos fenólicos foi baseada no trabalho de Makhotkina e Kilmartin (2012), com algumas modificações. Vinte microlitros de soluções metanólicas contendo de 0,5 % a 5 % do extrato liofilizado foram injetados em um cromatógrafo líquido. A fase estacionária utilizada foi uma coluna em fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 30 °C durante o experimento. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico em água 0,1 % e (B) acetonitrila; com vazão de 0,7 mL.min⁻¹. O gradiente iniciou em 0 % do solvente B, passando a 10 % de B em 10 minutos, 15 % de B aos 20 minutos, 20 % de B aos 35 minutos, 50 % de B aos 55 minutos e 100 % de B aos 64 minutos, permanecendo nesta condição até os 80 minutos, chegando novamente a 0% de B aos 90 minutos.

Para a identificação das substâncias fenólicas presentes nas amostras foi utilizado o detector de arranjo de fotodiodos, no qual a luz que passa pela cela da amostra é dispersa por uma grade holográfica e os comprimentos de onda (λ) resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos, gerando espectros de absorção a vários λ simultaneamente (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Desta forma, possibilitou-se a comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção (250 a 600 nm) com os de padrões autênticos de fenólicos.

Curvas padrões foram construídas para quantificar os compostos identificados: as áreas dos picos cromatográficos corresponderam à variável dependente (eixo y) enquanto as concentrações dos fenólicos responsáveis por essa resposta foram consideradas como variável independente (eixo x). Os resultados foram expressos em µg do composto fenólico por mg de extrato liofilizado (µg.mg⁻¹) e análise foi conduzida em triplicata.

Os limites de quantificação para cada composto identificado foram determinados de acordo com a eq.(5):

$$LQ = 10 \times (s/a) \quad (5)$$

Onde: a = média dos coeficientes angulares

s = desvio padrão dos coeficientes lineares

Estes coeficientes, por sua vez, foram obtidos a partir de regressões lineares das curvas utilizadas na quantificação.

3.5 Análise estatística

Para os ensaios de atividade antioxidante, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Fazendo-se uso do software SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002), a separação entre as médias foi realizada aplicando o teste de *Tukey* ao nível de 5 % de probabilidade.

Para as cinco metodologias de atividade antioxidante pelas quais os extratos foram avaliados, aplicou-se ainda a Correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Capacidade de redução do Folin-Ciocalteu

Na Tabela 1, expressa em equivalente ao ácido gálico (AG), encontra-se a capacidade dos extratos na redução do reagente Folin-Ciocalteu.

Dentro de cada espécie, exceto para *E. leitonii*, nota-se que a folha foi a fração com o melhor efeito redutor. No entanto, com o equivalente a 120,67 mg AG.g⁻¹, a semente da referida espécie apresentou o maior resultado entre todos os materiais, cerca de 3 a 16 vezes superiores encontrados nas polpas, cascas e inclusive nas demais sementes.

Os resultados deste método representaram o primeiro indício de que a semente em questão se trata de um material com alta atividade antioxidante.

Tabela 1 - Capacidade redutora dos extratos das espécies nativas - método Folin-Ciocalteu

Espécies	Equivalentes mg ácido gálico.g ⁻¹ *			
	folha	casca	Semente	Polpa
<i>G. brasiliensis</i>	60,71±2,01 ^{aD}	36,35±1,66 ^{bA}	20,31±0,65 ^{cC}	7,04±0,13 ^{dD}
<i>E. leitonii</i>	88,62±2,43 ^{bB}	36,08±1,24 ^{cA}	120,67±4,38 ^{aA}	15,18±0,79 ^{dC}
<i>E. involucrata</i>	70,19±1,88 ^{aC}	..	22,75±0,50 ^{bC}	18,36±0,66 ^{cB}
<i>E. brasiliensis</i>	73,25±3,41 ^{aC}	..	42,60± 1,9 ^{bB}	26,69±1,22 ^{cA}
<i>E. myrcianthes</i>	100,29±3,29 ^{aA}	..	11,34±0,49 ^{cD}	17,80±0,89 ^{bB}

* valores das médias das triplicatas. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

.. não se aplica

Nas duas espécies em que foi possível a análise das cascas, ambas exibiram o mesmo poder redutor, o qual também significativo e no caso da *G. brasiliensis* superior ao da sua polpa e semente, já para *E. leitonii* somente superior à polpa.

Entre as sementes e polpas das espécies avaliadas, as primeiras se sobressaíram, mas relação inversa foi verificada para *E. myrcianthes*.

Com algumas exceções, pode-se então definir a seguinte tendência quanto à habilidade redutora: folha > semente > polpa (Figura 8).

Figura 8 - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu dos extratos (mg AG/g)

Diferentemente do observado neste trabalho, os valores encontrados para folhas e sementes estiveram muito próximos no estudo de Pacifico et al. (2011). Contudo, os achados destes autores corroboram com a ordem acima citada: em uvas *Vitis x labruscana* cv. 'Isabella' o equivalente a ácido gálico para folha, semente, casca e polpa foram aproximadamente iguais a 830; 790; 380 e 250 mg AG.100g⁻¹ de matéria fresca, respectivamente.

Assim como nas plantas nativas aqui analisadas, outras pesquisas apontam a polpa como a fração de menor capacidade redutora. Em *Eugenia stipitata*, espécie originária da região amazônica e popularmente conhecida como araçá boi, o equivalente a ácido gálico na polpa foi 6 vezes menor em relação a sua casca, enquanto para frutos de cupuaçu e seriguela as polpas chegaram a ser 12 e 19 vezes inferiores as suas respectivas sementes (GARZÓN et al., 2012; OMENA et al., 2012; CALDERÓN; JAIMES; VILLANOVA, 2011).

Algumas das polpas avaliadas neste projeto foram iguais ou melhores às variedades de amora, framboesa e morango no estado maduro, cuja capacidade de redução variou de 9,46 a 15,30 mg AG.g⁻¹ de matéria seca (WANG; LIN, 2000). Para 3 das 4 variedades de kiwi analisadas por Parket al. (2011) o equivalente em ácido gálico esteve abaixo de 10 mg.g⁻¹ em base seca. Jambolão e murta em trabalho de Rufino et al. (2010) exibiram 11,17 e 20,55 mg AG.g⁻¹ e segundo os autores, junto ao açaí, estas frutas apresentam potencial de aplicação em práticas econômicas, pois possuem consideráveis quantidades de antocianinas e atividade antioxidante. Os valores encontrados na porção comestível de *E. leitonii* (casca e

polpa) também superaram os determinados para frutos de açaí: 32 mg AG.g⁻¹ (KANG et al., 2012; RUFINO et al., 2010).

Considerando, ainda, as frutas mais comuns e presentes na dieta dos brasileiros, destaca-se a importância de estudos mais detalhados sobre os produtos nacionais ainda pouco consumidos. De acordo com Prado (2009), as polpas de abacaxi, manga, maracujá, melão e goiaba exibiram entre 1,26 a 5,60 equivalentes a mg AG.g⁻¹, estando relativamente inferiores aos descritos na Tabela 1, até mesmo para a *G. brasiliensis*, amostra com a menor capacidade redutora (7,04 mg.g⁻¹). Além destas, Prado (2009) também avaliou polpas de pitanga, fruta nativa pertencente ao gênero *Eugenia*, cuja capacidade redutora (11,5 mg.g⁻¹) esteve acima das demais mencionadas. Demonstrando não ser surpreendente a significativa atenção que esta fruta vem recebendo nos últimos anos no que se refere a suas propriedades bioativas.

4.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

Na figura 9, as curvas representam as velocidades da redução do radical livre DPPH, sendo a legenda referente às concentrações expressas em grama de material liofilizado por mL de solvente (g.mL⁻¹). Em função da diferença de atividade antioxidante entre as amostras, as suas concentrações para o cálculo do EC₅₀ também foram distintas.

Visualmente, verificou-se que a taxa de sequestro do radical livre ocorreu mais rapidamente nos primeiros 20 minutos de reação, apesar deste comportamento não ter sido tão pronunciado nos extratos de casca e polpa de *G. brasiliensis*. Neste período, para a maioria das amostras, as interações entre antioxidantes e radicais contribuíram com 70 % até 90 % na atividade antioxidante final (dados não mostrados). Sabendo-se ainda que nas máximas concentrações utilizadas, as atividades estiveram em torno de 80 % (% de sequestro do radical em relação ao controle), consideram-se os vegetais avaliados como materiais de significativa habilidade no sequestro do DPPH, capazes de reagir rapidamente com o radical. No entanto, significativa queda de absorbância após esses 20 minutos pode ainda ser observada em polpa e folha de *E. involucrata* e nas frações *G. brasiliensis*.

Figura 9-Cinética da reação dos compostos das espécies nativas sobre o radical livre DPPH

(continua)

Figura 9-Cinética da reação dos compostos das espécies nativas sobre o radical livre DPPH

(conclusão)

As atividades antioxidantes em valores de EC_{50} , ou seja, na concentração mínima necessária para promover a redução de 50 % do radical DPPH, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de EC₅₀ (mg.mL⁻¹) para os extratos de espécies nativas brasileiras

Espécies	EC ₅₀ mg.mL ⁻¹ *			
	Folha	Casca	Semente	Polpa
<i>G.brasiliensis</i>	0,20±0,002 ^{cA}	0,43±0,008 ^{bA}	0,39±0,001 ^{bcB}	2,79±0,100 ^{aA}
<i>E.leitonii</i>	0,11±0,002 ^{cC}	0,31±0,009 ^{bB}	0,07±0,001 ^{dD}	0,79±0,008 ^{aC}
<i>E.involucrata</i>	0,19±0,001 ^{cA}	..	0,35±0,010 ^{bB}	0,99±0,020 ^{aB}
<i>E.brasiliensis</i>	0,14±0,004 ^{cB}	..	0,20±0,004 ^{bC}	0,47±0,003 ^{aD}
<i>E.myrcianthes</i>	0,08±0,003 ^{cD}	..	0,74±0,021 ^{aA}	0,60±0,009 ^{bD}

* valores das médias das duplicatas. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

.. não se aplica

Nota-se que as concentrações utilizadas no ensaio foram bastante reduzidas evidenciando, portanto, a alta atividade antioxidante das amostras. Para os extratos de maiores atividades: semente de *E. leitonii* e folha de *E. myrcianthes* foram necessários, por exemplo, 0,07 mg.mL⁻¹ e 0,08 mg.mL⁻¹, respectivamente. As demais folhas e a semente de *E. brasiliensis* aparecem em seguida com concentrações também pequenas variando de 0,11 a 0,2 mg.mL⁻¹. Até mesmo o maior valor, a polpa de *G. brasiliensis*, foi melhor ao de algumas amostras com reconhecida atividade antioxidante (PRADO, 2009).

Comparativamente ao método de capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu, algumas relações se repetiram: a semente de *E. leitonii* apresentou não só o melhor resultado, mas se destacou às demais amostras e, exceto para *E. myrcianthes*, a polpa foi a fração de menor atividade antioxidante principalmente em *G. brasiliensis*. A ordem decrescente do potencial redutor para a maioria das espécies também permaneceu a mesma com folha > semente > polpa. No entanto, neste caso, a casca de *G. brasiliensis* não obteve resultados melhores em relação à sua semente.

Rockenbach et al. (2011a), em trabalho visando o aproveitamento dos subprodutos vinícolas brasileiros, verificaram que entre as 7 variedades coletadas, apenas na 'Isabel' a casca mostrou-se superior à semente; as demais variedades eram compostas de frutos de Pinot Noir, Sangiovese, Negro Amaro, Carbenet Sauvignon e Primitivo.

A atividade antioxidante mensurada em *Citrus myrtifolia* foi também maior em folhas, seguida pela semente e suco (BARRECA et al., 2011). Já em experimento de Razali et al. (2012), apesar dos valores encontrados para os extratos

metanólicos de folha serem ligeiramente superiores aos da semente não houve, entre eles, diferença significativa.

Em trabalho de Pacifico et al. (2011) as sementes foram muito melhores às folhas em relação ao sequestro do radical livre DPPH, pois exibiram a mesma atividade antioxidante em quantidade de amostra 3 vezes menor; polpas, porém continuaram a ser as amostras de menor capacidade redutora.

Considerando mais uma vez as polpas analisadas por Prado (2009), foi possível observar que também neste método elas apresentam capacidade redutora inferior às frutas nativas do presente estudo. Os valores para EC₅₀ foram: manga (8,0mg.mL⁻¹), abacaxi (7,0 mg.mL⁻¹), melão (6,14 mg.mL⁻¹), goiaba (2,36 mg.mL⁻¹), maracujá (1,62 mg.mL⁻¹) e pitanga (1,19 mg.mL⁻¹).

4.3 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico

No método de branqueamento do β-caroteno, as maiores atividades antioxidantes foram encontradas nos extratos provenientes dos seguintes materiais: casca de *G. brasiliensis*, folha de *E. involucrata* e semente de *E. leitonii*, os quais apresentaram valores entre 7,08 a 7,23 μmol Trolox/g material liofilizado. Já as menores atividades estiveram compreendidas entre 0,75 a 1,59 μmol de Trolox.g⁻¹, correspondendo aos extratos de polpa e casca de *Eugenia Leitonii*; polpa e semente de *E. myrcianthes* (Tabela 3).

Tabela 3 – Inibição do descoramento do β-caroteno em sistema de autoxidação do ácidolinoleico

Espécies	Equivalentes μmol Trolox.g ⁻¹ *			
	folha	casca	Semente	polpa
<i>G.brasiliensis</i>	4,25±0,44 ^{cC}	7,23±0,78 ^{aA}	5,68±0,40 ^{bB}	3,51±0,22 ^{cB}
<i>E.leitonii</i>	3,01±0,48 ^{bD}	1,10±0,07 ^{cB}	7,08±0,48 ^{aA}	0,75±0,02 ^{cD}
<i>E.involucrata</i>	7,18±0,56 ^{aA}	..	3,38±0,27 ^{cC}	4,56±0,42 ^{bA}
<i>E.brasiliensis</i>	5,43±0,37 ^{aB}	..	3,89±0,05 ^{bC}	4,24±0,10 ^{bA}
<i>E.myrcianthes</i>	5,27±0,29 ^{aBC}	..	1,13±0,02 ^{cD}	1,59±0,06 ^{bC}

* valores das médias das triplicatas. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

.. não se aplica

Em geral, pode-se dizer que os extratos se comportaram de modo bastante satisfatório, pois para se atingir atividades em torno de 50 % (% de inibição

da oxidação em relação ao controle) foram necessárias diluições na ordem de 1:20 a 1:150, depender do extrato. Porcentagens ainda maiores poderiam ser obtidas caso menores diluições fossem utilizadas. Porém neste estudo, procurou-se obter curva padrão de Trolox cuja atividade antioxidante respondesse linearmente à concentração empregada, não sendo isso observado para atividades acima de 65 %. Deste modo, as amostras precisaram ser diluídas para que suas respostas no ensaio pudessem ser explicadas pela equação resultante das curvas de Trolox.

Apesar do fato dos melhores resultados não terem sido nos extratos de polpas, a atividade antioxidante por eles exibida, variando de 0,75 a 4,56 em equivalentes a $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, foi bastante relevante quando comparada a algumas folhas e sementes. Valores próximos a estes também foram encontrados por Gonçalves (2008) em polpas de frutas nativas e exóticas; em $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$: buriti (0,14); maná-cubiu (0,43); cupuaçu (0,93); uxi (1,03); granadilla (1,04); abiu (1,41); carambola (1,53); maracujá doce (1,61); bacuri (1,66); tucumã (1,9); araçá (2,62) e araçá boi (2,68).

O comportamento das polpas de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* cuja coloração foi do vermelho ao roxo intenso sugeriu, por sua vez, a possibilidade da maior quantidade de pigmentos com capacidade antioxidante, tais como antocianinas, ter contribuído significativamente aos maiores valores exibidos por estas polpas em relação às demais.

Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005), verificaram que no sistema β -caroteno/ácido linoleico as antocianinas malvidina, ciandina e pelargonidina, em concentração de 10 μM , foram capazes de inibir a oxidação entre 53 % a 65 %, sendo superiores ao antioxidante sintético BHT que na mesma concentração inibiu apenas 34 %. Além disso, açaí, amora e casca de maçã foram as melhores amostras inibidoras da oxidação (74 a 80 %) e a polpa da goiaba vermelha foi quase 4 vezes superior à goiaba branca.

Significativa correlação ($r = 0,764$) entre antocianinas e atividade antioxidante por este método foram encontradas por Katalinić et al. (2004) em amostras de vinhos tintos.

Entre os extratos de bagaços de uvas a 100 ppm analisadas por Rockenbach et al. (2011b), a melhor atividade antioxidante (41 %) foi observada na variedade Bordeaux, embora tenha ela apresentando menores teores em quercetina, rutina, kaempferol e catequina, e que diferentemente das outras

variedades, não foram detectados epicatequina e t-resveratrol, substâncias reconhecidas pela expressiva atividade antioxidante. Contudo, o teor de antocianinas foi superior, especialmente em relação à variedade Isabel, a qual demonstrou a menor habilidade no sequestro de radicais livres (34 %).

Analisando dentro de cada espécie, verifica-se certa similaridade de comportamento entre *E. myrcianthes*, *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, nas quais a ordem decrescente de atividade antioxidante foi: folha, polpa e semente. Já em *G. brasiliensis* quem se sobressaiu foi a casca e para *E. Leitonii*, a semente obteve o maior valor (Figura 10).

Figura 10 - Inibição da oxidação do β -caroteno ($\mu\text{mol Trolox/g}$)

Os resultados do teste de autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, quando comparados aos obtidos nos ensaios com DPPH e Folin-Ciocalteu, trouxeram algumas discrepâncias.

Dentro do grupo de amostras analisadas, a casca de *G. brasiliensis*, por exemplo, exibiu atividade intermediária, entretanto, na inibição da peroxidação lipídica apresentou os maiores teores em equivalentes ao padrão Trolox. Do mesmo modo a polpa mereceu atenção, pois sua atividade antioxidante era muito reduzida em relação às demais amostras. Contudo, neste método demonstrou bons resultados sendo comparável a semente de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*. Amostras estas em que significativa capacidade antioxidante foi determinada nos dois testes anteriormente discutidos.

Referente ainda à *G. brasiliensis*, sua semente também mostrou melhor resultado neste ensaio, inclusive, foi superior à semente de *E. brasiliensis* o que não havia ocorrido até então. Foi ainda a primeira vez que algumas polpas exibiram efeito similar ou superior a folhas e cascas.

Quanto à semente de *E. leitonii*, embora ela continue entre as amostras de melhores resultados, o valor por ela exibido não foi tão discrepante como o verificado nos outros ensaios. Mesmo assim, a cada análise foi sendo observada a significativa capacidade de sequestro de radicais livres que essa semente possui.

As diferenças encontradas entre os métodos podem ser explicadas considerando as distintas afinidades dos antioxidantes pelas substâncias oxidantes utilizadas nos ensaios, bem como pelo mecanismo de ação envolvido e a composição do meio reacional. Este último, no branqueamento do β -caroteno acoplado à oxidação do ácido linoleico, é constituído por uma emulsão do tipo óleo em água e, como tal, apresenta três importantes partes: fase aquosa; gotículas lipídicas; interface óleo-água (fase descontínua).

Deste modo, a eficácia dos antioxidantes dependerá não só de sua habilidade no sequestro de radicais livres, mas principalmente de sua capacidade de estar no local exato onde as espécies reativas se encontram e podem atacar as moléculas lipídicas. Portanto, são considerados cruciais a mobilidade, o coeficiente de partição e a localização dos antioxidantes, propriedades estas influenciadas pela sua polaridade e estrutura química (SHAHIDI; ZHONG, 2011).

Compostos antioxidantes polares tendem a se concentrar na região aquosa, enquanto os apolares e os anfifílicos com baixo HLB (balanço hidrofílico - lipofílico) possuem maior afinidade pelas gotículas, estando em seu interior somente as substâncias altamente hidrofóbicas, restando às demais a região da interface. Grupos volumosos presentes na estrutura também afetam à proteção à oxidação à medida que interferem na mobilidade dos antioxidantes aos centros reativos na emulsão (SHAHIDI; ZHONG, 2011).

4.4 Capacidade de absorção de radicais oxigênio

A capacidade das amostras no sequestro de radicais peroxila foi comparada àquela demonstrada pelo padrão Trolox, permitindo à atividade

antioxidante ser expressa como equivalentes a $\mu\text{mol Trolox}$ por g de material liofilizado ($\mu\text{mol ET.g}^{-1}$) (Tabela 4).

As atividades antioxidantes foram classificadas como baixa quando compreendidas entre 69,67 a 284,88 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$; moderada entre 321,74 a 514,75 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ e alta a partir de 664,31 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$. Destacando-se neste último intervalo a folha de *E. involucrata*, pois o equivalente a Trolox para esta amostra foi de 1393,3 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, ou seja, 1,6 vezes maior que a segunda melhor amostra (folha de *G. brasiliensis*).

Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ORAC expressa em $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$

Espécies	Equivalentes $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ *			
	Folha	casca	semente	polpa
<i>G.brasiliensis</i>	887,69±29,95 ^{aB}	475,02±12,2 ^{bA}	284,88±9,86 ^{cB}	69,67±2,81 ^{dD}
<i>E.leitonii</i>	417,71±16,71 ^{bD}	331,06±4,32 ^{cB}	514,75±21,54 ^{aA}	102,82±7,81 ^{dC}
<i>E.involucrta</i>	1393,30±69,62 ^{aA}	..	168,66±4,93 ^{cD}	321,74±9,78 ^{bB}
<i>E.brasiliensis</i>	757,32±34,74 ^{aC}	..	211,84±9,33 ^{cC}	477,45±23,25 ^{bA}
<i>E.myrcianthes</i>	644,31±25,44 ^{aC}	..	96,24±4,70 ^{bE}	127,62±5,78 ^{bC}

* valores das médias das triplicatas. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

.. não se aplica

De acordo com os dados, verificou-se ainda que a polpa de *G.brasiliensis* voltou a ser a amostra de menor capacidade antioxidante (69,67 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$) e, em concordância aos outros ensaios, *E. brasiliensis* foi a melhor entre as polpas (477,45 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$).

Avaliando 40 cultivares de mirtilo, Wang, Chen e Ehlenfeldt (2011) encontraram valores ORAC que variaram de 196 a 528 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ (equivalentes Trolox/g) em base seca. Já em goiabas o valor ORAC foi de 86,97 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ (PATTHAMAKANOKPORN et al., 2008). Em outro estudo, Wu et al. (2004) encontraram para manga 54,75 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$, uva 64,28 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$, cereja 169,75 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$, maçãs entre 164 a 294 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ e morango 401,91 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$.

Segundo Hongyan et al. (2012), a atividade antioxidante de vegetais altamente pigmentados tem sido maior às correspondentes cultivares não pigmentadas e em frutas como mirtilo, amora, cereja e morango as antocianinas seriam um dos principais contribuintes à essa superior atividade.

Em trabalho de Reynertson et al. (2008) *E. brasiliensis* apresentou o segundo maior teor em antocianinas (8,37 mg.g⁻¹ em base seca) quando comparada a outras 12 espécies de coloração vermelho/roxo pertencentes à família Myrtaceae. Também foram identificados em sua polpa o ácido elágico, miricetina, quercetina e rutina.

No presente estudo, a única antocianina identificada tanto nos extratos de *E. brasiliensis* como de *E. involucrata* foi a cianidina 3-o-glicosídeo (item 4.7.2). Esta exibiu a maior atividade antioxidante no método ORAC dentre as 14 antocianinas testadas por Wang, Cao e Prior (1997), sendo 3,5 vezes mais forte que o padrão Trolox. Os autores também observaram que a expressiva atividade era influenciada pelo número de grupos OH substituintes no anel B e pela glicosilação da antocianina, cujo efeito dependeria da aglicona a que foi adicionado e do tipo de açúcar envolvido. Estes açúcares ao conferirem diferentes estruturas moleculares afetariam a estabilidade do radical formado pelas antocianinas após a doação de seu átomo de H.

Em *G. brasiliensis* folha > casca > semente > polpa e de modo similar ao teste de branqueamento do β -caroteno para *E. myrcianthes*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* a ordem decrescente quanto à atividade antioxidante foi: folha, polpa e semente enquanto para *E. leitonii* semente > folha > casca > polpa. Portanto, exceto para *E. leitonii*, a folha correspondeu à fração com maior capacidade no sequestro de radicais livres.

A alta atividade desse material talvez possa ser explicada pelo papel exercido no metabolismo das plantas. Entre suas funções, a folha é a responsável pela conversão da energia luminosa em energia química (síntese de moléculas de glicose), utilizada nas mais variadas reações bioquímicas e, inclusive pelos órgãos/tecidos incapazes de realizar a fotossíntese. Para isso, ela dispõe de clorofila (pigmento fotossintetizante) em um grande número de cloroplastos, onde o processo fotossintético ocorre. A clorofila, por sua vez, parece ser a principal fonte de oxigênio singlete nas células vegetais (EDREVA, 2005; BARTOSZ, 1997).

Juntos, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e íons metálicos como Fe²⁺ participam da reação de Fenton gerando radicais hidroxila (OH^{*}), que devido à alta reatividade são considerados os mais deletérios às células (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Outras fontes geradoras de radicais livres também se fazem presentes como a cadeia transportadora de elétrons durante o processo respiratório, comum aos demais tecidos das plantas.

Compreende-se, portanto, que a forte exposição às espécies reativas culminou na necessidade de agentes capazes de inativá-los garantindo, assim, a sobrevivência do organismo. Este sistema de defesa constitui-se de enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular, entre eles: ácido úrico, ácido fólico, flavonoides, ácidos fenólicos, polifenóis, tocoferóis e carotenoides (BARTOSZ, 1997).

Embora os agentes oxidantes envolvidos no ORAC sejam do tipo peroxila, é importante salientar que são distintos aos presentes no teste de branqueamento do β -caroteno. A diferenciação é decorrente das moléculas iniciadoras de radicais livres, as quais têm influência direta sobre as propriedades destes oxidantes, especialmente na sua solubilidade interferindo assim na sua localização no meio reacional.

No sistema com β -caroteno, os radicais são resultantes da degradação de um ácido graxo e, portanto, correspondem a um peroxila lipídico. Já no ORAC é a degradação do AAPH, uma molécula hidrofílica, responsável pelo aparecimento dos radicais. Diante do exposto, é natural que diferenças sejam encontradas entre esses dois métodos quanto à eficácia dos antioxidantes.

O ORAC foi o único método no qual a melhor atividade antioxidante não foi exibida pela semente de *E. leitonii*, a qual esteve 2,7 vezes abaixo da melhor amostra, sendo também inferior às folhas de *G. brasiliensis*, *E. brasiliensis* e *E. myrcianthes*. Este fato demonstrou que as características dos compostos presentes nas folhas favoreceram estes materiais no meio hidrofílico (ORAC) de modo mais pronunciado ao observado no meio emulsionado (autooxidação do β -caroteno/ácido linoleico), onde os compostos da semente de *E.leitonii* foram comparáveis ou superiores a outras amostras, mas não inferiores.

4.5 Sequestro do radical ânion superóxido

No sequestro do radical ânion superóxido, os menores valores correspondem às maiores atividades antioxidantes, pois foram expressos em EC₅₀.

Em geral as folhas estiveram entre os melhores resultados (0,37 a 0,95 mg.mL⁻¹), porém o menor valor encontrado ainda foi nos extratos da semente de *E. leitonii*, para os quais o EC₅₀ atingiu 0,26 mg.mL⁻¹. Semente de *E. myrcianthes* (6,28 mg.mL⁻¹) e polpa de *G. brasiliensis* (7,44 mg.mL⁻¹) foram as amostras que menor capacidade demonstraram na desativação do superóxido (Tabela 5).

Embora a reatividade química deste radical seja limitada, sua existência se torna muito preocupante ao se considerar as espécies que ele é capaz de gerar: radical hidroxila (HO•) e oxigênio singlete (¹O₂).

O tempo de meia vida do radical hidroxila é de apenas 10⁻⁹ segundos, traduzindo-se em uma espécie extremamente reativa e que dificilmente pode ser sequestrada *in vivo* (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Por rapidamente atacar as moléculas em células próximas ao local em que foi gerado, uma das estratégias de defesa dos sistemas biológicos é evitar a sua formação.

Tanto o radical hidroxila quanto o oxigênio em sua forma singlete causam danos oxidativos em lipídeos, proteínas e DNA. Tendo o ¹O₂ muita facilidade para atacar substâncias cujas estruturas possuem regiões de insaturações como carotenoides e ácidos graxos insaturados (GÜLÇİN, 2012).

Tabela 5 – Capacidade dos extratos de espécies nativas no sequestro do radical ânion superóxido

Espécies	EC ₅₀ mg.mL ⁻¹ *			
	Folha	Casca	Semente	Polpa
<i>G.brasiliensis</i>	0,95±0,061 ^{cA}	1,56±0,11 ^{cA}	2,34±0,035 ^{bB}	7,44±0,45 ^{aA}
<i>E. leitonii</i>	0,48±0,005 ^{cB}	1,04±0,11 ^{bB}	0,26±0,010 ^{cD}	2,68±0,33 ^{aC}
<i>E.involucrata</i>	...	..	1,11±0,040 ^C	...
<i>E.brasiliensis</i>	0,40±0,003 ^{bBC}	..	0,59±0,020 ^{bD}	2,15±0,15 ^{aC}
<i>E.myrcianthes</i>	0,37±0,023 ^{cC}	..	6,28±0,330 ^{aA}	4,02±0,33 ^{bB}

* valores das médias das triplicatas. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

.. não se aplica

... não disponível

As polpas não apresentaram o mesmo desempenho verificado nos testes de sequestro de radicais peroxila, sendo a fração de menor atividade antioxidante como pode ser observado em quatro das cinco espécies avaliadas.

No trabalho de Oliveira et al. (2009b) com os extratos de polpa, semente e folha de *Ficus carica*, este último foi o único material a sequestrar o radical ânion superóxido exibindo também o melhor resultado frente ao radical óxido

nítrico. A este comportamento os autores atribuíram, parcialmente, à maior quantidade de compostos fenólicos presente, uma vez que, a contribuição de ácidos orgânicos não poderia ser ignorada.

Embora em outras análises o teor de pigmentos tenha sido a hipótese levantada para o ótimo desempenho da polpa de *E. brasiliensis*, neste método ele parece não ser o diferencial, pois os dados para essa espécie ($2,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) não diferiram aos da polpa de *E. leitonii* ($2,68 \text{ mg.mL}^{-1}$). Além disso, a *E. involucrata*, polpa de forte coloração vermelha, não foi capaz de chegar aos 50 % de inibição de redução do NBT, ficando apenas nos 35 %.

Ao contrário das altas atividades antioxidantes demonstradas nos métodos ORAC e no sistema com β -caroteno, a folha de *E. involucrata* exibiu baixa capacidade no sequestro de radicais superóxido, inviabilizando o cálculo do EC_{50} . À concentração de $0,72 \text{ mg.mL}^{-1}$ a máxima atividade atingida por essa folha foi de 47 %, contudo em concentrações maiores a esta, acentuada queda no efeito antioxidante pode ser observada (Figura 11).

Figura 11 - Efeito da concentração sobre a atividade antioxidante para a folha de *E.involucrata*

Semelhante efeito da concentração sobre a atividade antioxidante foi encontrado por Silva et al. (2013): extratos de semente de pimenta quando aplicados a $0,05 \text{ mg}$ de extrato liofilizado/mL exibiram 45 % de atividade, porém essa porcentagem foi diminuindo com o aumento da concentração da amostra, chegando a menos de 10 % à 1 mg.mL^{-1} . Segundo os autores, este comportamento sugere a presença de altas concentrações de compostos antioxidantes.

Nos resultados obtidos no item 4.7.2, verifica-se que no extrato da folha de *E. involucrata* os fenólicos identificados foram a catequina e a epicatequina, os quais inclusive se encontram em quantidades muito maiores ao de outras amostras.

Compostos estes que, sob determinadas condições, parecem ser capazes de produzir radical ânion superóxido.

De acordo com Mochizuki et al. (2002), substâncias do grupo das catequinas são bons sequestradores de $O_2^{\bullet-}$. No entanto, nessa reação produzem peróxido de hidrogênio e quinonas que podem facilmente promover a redução do oxigênio molecular resultando na formação do radical ânion superóxido. Estudos também revelam que a estabilidade no grupo das catequinas é afetada por fatores que incluem pH, temperatura, níveis de antioxidantes, oxigênio e íons metálicos. Assim, a autooxidação seria favorecida sob condições neutras ou ligeiramente básicas, nas quais a reação com o oxigênio molecular seria catalisada por traços de íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{3+} e inibida por íons borato, os quais têm sido propostos como parte do mecanismo de defesa das plantas contra a autooxidação de fenóis (MOCHIZUKI et al., 2002; SANG et al., 2007).

Apesar disso, não seria correto afirmar que o comportamento do extrato da folha de *E. involucrata* seja decorrente da maior quantidade de catequina e epicatequina, até porque não são as únicas substâncias presentes. Contudo, esse efeito bem como dos compostos identificados merece ser melhor avaliado. Em nosso laboratório, ensaios com 50 a 200ppm de (-)-epicatequina não resultaram em qualquer atividade antioxidante frente ao radical superóxido, sendo os resultados obtidos iguais aos do controle (dados não mostrados).

4.6 Correlação entre as respostas antioxidantes

Com o intuito de verificar a existência de correlação entre as metodologias utilizadas no presente trabalho, aplicou-se o teste de Pearson (Tabela 6).

Tabela 6 – Correlação entre as respostas antioxidante obtidas por diferentes métodos

Métodos	Coeficiente de correlação (r)			
	β -caroteno/ácido linoleico	ORAC	Ânion superóxido	Folin-Ciocalteu
DPPH [*]	-0,25	-0,46	0,85	-0,58
Folin-Ciocalteu	0,53	0,60	-0,69	
Ânion superóxido	-0,43	-0,64		
ORAC	0,64			

De acordo com o coeficiente de Pearson, classificam-se como fortemente correlacionadas as respostas obtidas pelos métodos nos quais $|0,8 \leq r < 1|$; moderadamente para $|0,5 \leq r < 0,8|$ e, fracamente correlacionadas para $|0,1 \leq r < 0,5|$. Dessa forma, observa-se que para maioria dos casos se obteve correlação moderada, com exceção do DPPH* X β -caroteno em que o valor de r encontrado foi de apenas -0,25. A maior correlação, por sua vez, ocorreu entre as atividades antioxidantes mensuradas pelo sequestro dos radicais DPPH* e ânion superóxido.

O fato de alguns coeficientes assumirem valores negativos significa que enquanto umas variáveis aumenta a outra diminui, o que está de acordo quando consideramos a análise de EC_{50} , pois quanto menor este valor maior a atividade antioxidante, já para os outros métodos a atividade antioxidante é maior quanto maior forem os resultados encontrados.

A classificação da correlação como moderada pode ter como causa às distintas características de cada amostra aliado às propriedades intrínsecas das diferentes metodologias, tais como mecanismos de ação, composição do meio reacional e as moléculas sobre as quais os antioxidantes atuam (já discutidas anteriormente).

4.7 Identificação de compostos fenólicos antioxidantes nos extratos vegetais

4.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Nos extratos purificados das espécies nativas, os dois principais compostos fenólicos encontrados foram ácido gálico e (-)-epicatequina, estando presentes em 15 e 14 amostras, respectivamente. Com exceção da polpa e folha de *E. myrcianthes* e polpa de *G. brasiliensis*, as porcentagens destes dois compostos foram bastante expressivas. Quando somadas chegaram a representar em torno de 70 % da área total do cromatograma.

É interessante observar que apesar de abundante, nas polpas a epicatequina só foi encontrada em *E. brasiliensis* e *E. leitonii* (Tabela 7). Já o ácido gálico esteve presente em todas menos na polpa de *G. brasiliensis*, aliás, esta foi a única na qual não foi possível encontrar estruturas fenólicas. Foi ela também que apresentou a menor atividade antioxidante em praticamente todos os métodos, sugerindo a significativa contribuição destas substâncias na atividade das outras

amostras. Mesmo com a ausência de epicatequina e ácido gálico, a polpa de *G. brasiliensis* demonstrou bom efeito antioxidante na autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Desta forma, outros compostos, fenólicos ou não, podem ter exibido melhor desempenho neste método.

A identificação de maior variedade de compostos fenólicos ocorreu na folha de *E. myrcianthes*, estando presentes: (-)-epicatequina, ácido gálico, ácido sinápico, kaempferol, quercetina e miricetina. Curioso notar que este foi o único extrato no qual ácido gálico e (-)-epicatequina não foram os predominantes, mas sim a miricetina. Fato este que não impediu que o extrato estivesse entre os melhores resultados nos ensaios com DPPH, Folin-Ciocalteu e radical ânion superóxido.

Em outros extratos, também foram encontrados ácido cinâmico, ácido protocatequínico, ácido vanílico, ácido *m*-cumárico, ácido *p*-cumárico e 6,7 - dihidroxicumarina- β -D-glucopiranosídeo.

Para os extratos da polpa de *G. brasiliensis* não foi possível a identificação de qualquer composto fenólico, assim como não foi possível identificar algumas substâncias presentes nas demais amostras. As prováveis causas seriam a desconhecida estrutura ou simplesmente por não estarem entre os padrões utilizados ou entre os pertencentes à biblioteca do equipamento. Outra possibilidade se refere a uma característica inerente da técnica de quem nem todas as substâncias podem ser adequadamente silanizadas, o que pôde ser observado durante o experimento, pois a solubilização em hexano do produto derivatizado nem sempre era total.

Ainda que existam limitações, o emprego de CG-EM foi muito útil no sentido de elucidar alguns dos fenólicos presentes nas amostras, sobre as quais poucos estudos estão disponíveis.

Tabela 7 – Composição fenólica nos extratos purificados das espécies nativas brasileiras pelo método CG-EM

Compostos	Área																
	Espécies frutíferas nativas do Brasil																
	<u><i>Garcinia brasiliensis</i></u>				<u><i>Eugenia brasiliensis</i></u>			<u><i>Eugenia involucrata</i></u>			<u><i>Eugenia myrcianthes</i></u>			<u><i>Eugenia leitonii</i></u>			
	folha	Casca	Sement e	polpa	folha	semente	polpa	folha	semente	Polpa	folha	semente	polpa	folha	casca	semente	polpa
Ácido cinâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	-	-	-	-
Ácido vanílico	3,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido protocate- quínico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> - cumárico	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>m</i> - cumárico	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-	0,83	-	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico	44,8	4,86	8,32	-	69,4	45,56	9,02	-	42,42	24,55	4,67	33,89	6,68	13,36	42,2	12,04	51,31
Ácido sinápico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
6,7 –dihidroxi cumarina β-D- gluco piranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-
(-)- epicatequina	34,9	74,16	25,33	-	7,1	26,58	29,38	49,43	33,52	-	0,76	14,23	-	31,25	22,77	63,36	39,01
Kaempferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	4,05	-	-	-	-	-	-
Miricetina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,31	-	-	-	-	-	-

Tabela 8 – Tempos de retenção e fragmentos mais presentes nos espectros de massa dos compostos fenólicos silanizados identificados nos extratos purificados

Compostos	Dados do CG-EM		
	tempo de retenção	Íons	
Ácido cinâmico	7,77	205(100), 131(89,6), 161(66,4), 103(56,8), 206(28); 220(M+)	
Ácido vanílico	8,88	297(100), 312(66,8), 267(62,8), 253(45,2), 223(40,4); 312(M+)	
Ácido protocatequínico	9,17	370(38), 193(84,8), 355(21,6), 194(13,2), 311(10,8), 371(M+)	
Ácido <i>p</i> -cumárico	9,8	293 (100), 308(85), 219(75,2), 249(62,4), 294(26,4); 308(M+)	
Ácido <i>m</i> -cumárico	9,8	308(77,2), 293(57,2), 249(18), 139(17,2), 294(15,6); 308(M+)	
Ácido gálico	9,89	281(100), 458(93,2), 443(36,4), 282(26,8), 283(11,6); 458(M+)	
Ácido sinápico	11,7	368(100), 338(83,2), 353(49,6), 369(28,4), 323(25,2); 369 (M+)	
6,7 – dihidroxicumarina- β -D-glucopiranoside	14,3	361(38), 217(21,2), 169(18,8), 147(18,8), 271(11,2); 438(M+)	
(-)-epicatequina	17,2	368(100), 355(46), 369(34,4), 650(23,6), 370(16,4); 650(M+)	
Kaempferol	19,34	559(100), 560(53,2), 561(24,8), 562(8), 487(7,2); 573(M+)	
Quercetina	20,6	647(100), 648(62,4), 649(36,8), 650(11,2), 575(11,6); 662(M+)	
Miricetina	21,64	735(100), 736(66,8), 737(41,86), 738(16,8), 647(14,4); 749(M+)	

Visualmente, os cromatogramas obtidos permitiram verificar que os processos de purificação e de derivatização aliados às características intrínsecas da amostra resultaram em números distintos e reduzidos de picos (Figura 12).

Figura 12 - Cromatogramas de extratos purificados obtidos por CG-EM

(continua)

Figura 12 - Cromatogramas de extratos purificados obtidos por CG-EM

(continuação)

Figura 12 - Cromatogramas de extratos purificados obtidos por CG-EM

(conclusão)

O fato dos compostos fenólicos terem sido as moléculas mais abundantes nos extratos purificados (Tabela 3 e Figura 12) revela, de certa forma, que a etapa de purificação dos extratos por SPE e análise por CG-EM foi seletiva e eficiente ao concentrá-los e identificá-los.

No que diz respeito aos dois principais compostos fenólicos identificados, sabe-se que a epicatequina pertence à classe dos flavonoides e da subclasse flavan-3-ols, caracterizado por uma estrutura não planar devido à saturação no C3, que neste caso é por um grupo hidroxil (Figura 13) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Figura 13 -Estrutura química da (-)- epicatequina
Fonte: Crozier; Jaganath; Clifford, 2009.

Estudos têm associado aos flavanols a capacidade de atuar direta e indiretamente como antioxidantes, a depender da concentração em que atingem o tecido alvo. No trato digestivo as concentrações a nível micromolar poderiam ser suficientes para o sequestro de radicais livres e metais que desencadeiam as reações oxidativas. Já no sangue e em outros órgãos, devido aos processos de

absorção e metabolismo no trato gastrointestinal, as concentrações seriam na ordem nanomolar de modo que a relação entre as características químicas dos flavonols e seus efeitos no organismo seria explicada por interações químicas mais complexas e específicas (FRAGA; OTEIZA, 2011).

Considerando a (-)-epicatequina, essas interações incluiriam a inibição da atividade de determinadas enzimas geradoras de radicais livres, tais como a NADPH oxidase, visando à regulação da sinalização celular e função vascular, nesta última devido à interferência indireta nos níveis de óxido nítrico. Além disso, há possibilidade de interação com os receptores de membranas, que em ratos teve como efeito a limitação do tamanho do infarto do miocárdio após severa injúria isquêmica. Em células do intestino (-)-epicatequina, junto a outros fenólicos, também pode diminuir o aumento transitório de oxidantes associados à sinalização de ativação do $\text{TNF}\alpha$ (fator de necrose tumoral) (FRAGA; OTEIZA, 2011).

No entanto, para outros autores a fácil oxidação dos polifenóis e a possível interação com íons metálicos, muitas vezes não absorvidos no trato gastrointestinal, poderia levar à produção de espécies reativas como o superóxido e peróxido de hidrogênio. Contudo, esse efeito pró-oxidante teria seus benefícios, pois através da imposição de um leve grau de estresse oxidativo os níveis de defesas antioxidantes endógenas poderiam ser aumentados levando à proteção celular (HALLIWELL, 2008).

Quanto ao ácido gálico, trata-se do ácido fenólico mais comum e, diferentemente da (-)-epicatequina ele pertence à classe dos não-flavonóides, já que sua estrutura é $\text{C}_6 - \text{C}_1$.

As propriedades terapêuticas do ácido gálico e seus derivados compreendem as atividades antitumoral, antimicrobiana, antiviral e antioxidante. De acordo com Locatelli, Filippin-Monteiro e Creczynski-Pasa (2013), estes compostos podem ser considerados uma alternativa promissora para o tratamento do câncer, quer seja na forma isolada ou em combinação com drogas antitumorais potencializando seus efeitos. Ressalta-se também a sua seletiva citotoxicidade, já que em células normais a concentração de ácido gálico necessária para induzir a apoptose é maior quando comparada a indução em células tumorais.

4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

No estudo das espécies nativas, os compostos presentes nos cromatogramas das amostras foram confrontados com os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides (Sigma-Aldrich): ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, miricetina, mangiferina, (-)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina “green tea”, (-)-epigallocatequina galato, quercetina, quercetina-3- β -D-glicosídeo, mirtilin (delfinidina-3-o-glicosídeo), kuromanin (cianidina-3-o-glicosídeo), peonidin (peonidina-3-o-glicosídeo), oenin (malvidina-3-o-glicosídeo) e petunidin (mirtilidina).

De acordo com os tempos de retenção e os espectros de absorção destes 17 compostos, apenas cinco puderam ser identificados e quantificados nos extratos vegetais: ácido gálico, (-)-catequina, (-)-epicatequina, kuromanin e quercetina-3- β D-glicosídeo.

Similarmente à análise por CG-EM, não foi possível a identificação de qualquer composto fenólico no extrato da polpa de *G. brasiliensis*. Não sendo também possível nos extratos da folha e polpa de *E. myrcianthes* e da semente de *E. Leitonii*, a qual demonstrou maior atividade antioxidante na maioria dos métodos aplicados. Evidencia-se, portanto, a necessidade de futura otimização na separação das substâncias que compõe o extrato dessa semente, a fim de que sejam identificados outros contribuintes à sua alta capacidade de sequestro de radicais livres além daqueles que a técnica de CG-EM permitiu encontrar. Otimização esta que poderia envolver não só uma melhor seleção da fase móvel, diminuindo a força do gradiente, mas também a aplicação de métodos de purificação (fracionamento e isolamento bioguiado), concentrando os fenólicos e aumentando os sinais por eles gerados. O que não foi possível para este trabalho.

Na figura 14 são apresentados os cromatogramas obtidos em CLAE a 280 nm, faixa onde compostos fenólicos, em maior ou menor intensidade, normalmente absorvem. Neles, verifica-se que para algumas amostras o método poderia ser otimizado, pois muitos constituintes aparentemente co-eluíram e por isso a dificuldade de identificação.

Nítidas diferenças foram observadas entre os resultados gerados por essa técnica e os obtidos em CG-EM, demonstrando se tratarem de métodos complementares e não excludentes.

Como a diferença mais visível, pode-se citar os fenólicos epicatequina e ácido gálico. Embora eles estivessem presentes em praticamente todos os cromatogramas gerados por CG-EM, somente foram encontrados em cinco dos cromatogramas obtidos por CLAE. Nestes casos, sugere-se que a maior sensibilidade do CG-EM aliada ao processo de purificação facilitou a identificação de substâncias que se encontram em concentrações muito reduzidas nos extratos. Lembrado que em CLAE, os extratos não foram submetidos a qualquer processo de purificação, sendo utilizados da mesma forma como foram aplicados nas análises de atividade antioxidante, com a única diferença que precisaram ser concentrados.

Relação inversa pode ser verificada para kuromanin e catequina, pois foram somente identificadas com cromatografia líquida e não por CG-EM, talvez o processo de derivatização para esses compostos não tenha sido eficiente e/ou a temperatura, normalmente empregue nesta técnica, tenha prejudicado a sua análise.

Figura 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies nativas brasileiras a 280 nm

(continua)

Figura 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies nativas brasileiras a 280 nm

(continuação)

Figura 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies nativas brasileiras a 280nm

(continuação)

Figura 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies nativas brasileiras a 280 nm

(continuação)

Figura 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies nativas brasileiras a 280 nm (conclusão)

Para a quantificação dos compostos identificados, fez-se uso dos seguintes comprimentos de onda (máxima absorção): 280 nm para ácido gálico, (-)-catequina e (-)-epicatequina; 350 nm para quercetina-3- β D-glicosídeo e 520 nm para kuromanin.

Os limites de quantificação (LQ) para cada uma dessas substâncias foram: ácido gálico ($2,0 \times 10^{-3}$ μg), (-)-catequina ($9,8 \times 10^{-2}$ μg), (-)-epicatequina ($3,2 \times 10^{-2}$ μg), kuromanin ($4,49 \times 10^{-1}$ μg) e quercetina-3- β -D-glucosídeo ($4,0 \times 10^{-3}$ μg).

No volume e concentração de amostra injetada no cromatógrafo, as menores quantidades encontradas para estes compostos estiveram bem acima dos LQ's, aproximadamente 5 a 18 vezes superior. O que garantiu maior confiabilidade nas quantificações.

Considerando os extratos liofilizados, a concentração de ácido gálico variou de 0,01 a 1,32 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, apresentando a folha de *E. brasiliensis* o maior valor. Já a folha de *E. involucrata* exibiu a maior concentração em catequina (14,51 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) e epicatequina, cujo teor de 62,80 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ foi bastante expressivo, em torno de 30 vezes superior aos demais extratos em que este fenólico foi identificado (folha, casca e semente de *G. brasiliensis*). Quercetina-3- β -D glicosídeo esteve presente apenas em *E. brasiliensis* (polpa) e na semente e polpa de *E. involucrata* (Tabela 9).

Tabela 9 – Quantificação dos fenólicos identificados nos extratos vegetais por CLAE com arranjo de fotodiodos

Compostos	µg de compostos fenólicos/mg de extrato liofilizado*								
	<i>Eugenia involucrata</i>			<i>Eugenia brasiliensis</i>			<i>Eugenia myrcianthes</i>		
	Folha	Semente	Polpa	folha	semente	Polpa	folha	semente	Polpa
Ácido gálico	-	0,31 ± 0,02	-	1,32 ± 0,11	0,78 ± 0,02	-	-	0,27 ± 0,001	-
(-)-catequina	14,51 ± 0,67	-	-	-	4,83 ± 0,08	1,05 ± 0,02	-	-	-
kuromanin	-	-	11,3 ± 0,2	-	-	12,7 ± 0,1	-	-	-
(-)-epicatequina	62,80 ± 2,42	-	-	-	-	-	-	-	-
quercetina-3-β-D glicosídeo	-	0,24 ± 0,002	1,13 ± 0,005	-	-	0,11 ± 0,004	-	-	-
	<i>Garcinia brasiliensis</i>				<i>Eugenia leitonii</i>				
	Folha	Casca	Semente	polpa		Folha	casca	semente	Polpa
Ácido gálico	-	-	-	-		-	-	-	0,01 ±0,001
(-)-catequina	-	-	-	-		5,22 ±0,22	2,10 ± 0,03	-	0,43 ± 0,01
(-)-epicatequina	1,90± 0,12	2,73 ± 0,03	1,83± 0,13	-		-	-	-	-

Tanto na polpa de *E. brasiliensis* como na de *E. involucrata*, o principal composto identificado foi a 'cianidina-3-o-glicosídeo' (kuromanin), tendo essas polpas apresentado teores muito próximos: $11,3 \mu\text{g.mg}^{-1}$ e $12,7 \mu\text{g.mg}^{-1}$, respectivamente. Para alguns ensaios como, inibição de oxidação de LDL (lipoproteínas de baixa densidade), tal antocianina foi altamente antioxidante e comparável a compostos como catequina, quercetina e Trolox (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003).

Na figura 15, pode-se notar que a estrutura das antocianinas é completamente conjugada e essa característica permite o movimento de elétrons resultando em radicais muito estáveis após reação de oxirredução, tornando-se particularmente interessante e importante ao minimizar a ocorrência de reações secundárias entre o radical formado e moléculas vitais ao organismo (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003).

Esta alta estabilidade, por sua vez, pode ter favorecido tais amostras, sobretudo contra a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, onde apresentaram melhores resultados frente às outras polpas.

Onde:

R1 = OH; R2 = H; R3 e R4 = H

Figura 15 - Estrutura da cianidina (forma aglicona do kuromanin)
Fonte: Kähkönen e Heinonen (2003)

De acordo com os resultados encontrados para as cinco espécies neste estudo, não se pode atribuir relação entre o acúmulo de um composto fenólico específico e os tecidos vegetais analisados. Ou seja, exceto para a antocianina, não se pode afirmar que um determinado composto tenha maior tendência em se concentrar em tecidos de reserva, tecidos mais externos ou na polpa. No trabalho, verificou-se que essa predominância depende de cada espécie, uma vez que,

distintas são as condições climáticas a que são submetidas e a capacidade da resposta metabólica a elas (tipo e intensidade).

É importante ressaltar que os compostos antioxidantes identificados neste trabalho, seja por CG-EM ou CLAE, talvez não sejam os únicos responsáveis pela atividade antioxidante exibida pelos extratos analisados. Outras substâncias pertencentes ou não à família dos fenólicos podem também contribuir de modo sinérgico ou antagônico.

Extratos de plantas podem variar qualitativa e quantitativamente não só em composição de antioxidantes, mas também de ácidos que modificam o pH do sistema. A concentração de hidrogênios pode, em alguns casos, acelerar a taxa de reação entre fenóis e determinados radicais, como os peróxila (DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2010).

De qualquer forma, pôde-se verificar que os extratos dos materiais advindos de espécies nativas possuem quantidades consideráveis de compostos fenólicos com significativa atividade antioxidante.

5 CONCLUSÕES

- Verificou-se que as polpas de frutas nativas exibiram atividades antioxidantes superiores a de frutas mais comuns e presentes no dia-a-dia dos brasileiros. Além disso, polpas e demais frações das plantas demonstram bons resultados no sequestro de radicais livres com relevância ao sistema biológico, tais como o peróxido e superóxido, apresentando significativo efeito antioxidante em meio contendo substrato lipídico.

- Os diferentes métodos revelaram habilidades distintas entre as 17 amostras, tornando evidente que aplicação de apenas um deles geraria conclusões equivocadas para a maioria das frações analisadas.

- Em geral folhas apresentam maiores atividades antioxidantes em relação às demais frações de suas respectivas espécies.

- Sementes e cascas também possuem significativa capacidade antioxidante, principalmente a semente de *E. leitonii*, a qual devido a regularidade dos ótimos resultados nos cinco métodos aplicados, pode ser considerada a amostra de melhor capacidade no sequestro de radicais livres.

- Notou-se que na inativação de radicais peróxido, polpas de coloração vermelha a roxo intenso foram melhores às de polpa amarela levantando a hipótese de maior participação das antocianinas nestes métodos.

- A aplicação conjunta das técnicas de identificação foi muito importante à medida que os dados se complementaram permitindo, em alguns casos, que substâncias não identificadas por uma técnica o fossem pela outra.

- Observou-se que *G. brasiliensis*, *E. leitonii*, *E. involucrata*, *E. brasiliensis* e *E. myrcianthes* possuem compostos de expressiva atividade antioxidante. Sugerindo a necessidade de maiores investigações quanto ao potencial bioativo bem como na aplicabilidade em formulações alimentícias de modo a divulgar e estimular o consumo dos produtos genuinamente brasileiros.

Espera-se que, por meio de estudos como este, a sociedade como um todo possa obter maiores retornos com o uso e valorização adequada de seus recursos naturais disponíveis.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: _____.(Ed.). **Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. Cap. 1, p. 12-24.
- ALBUQUERQUE, U. L.; RAMOS, M. A.; MELO, J. G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 140, p. 197-201, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIM, A.C.L.; LIMA, C.K.F.; HOVELL, A.M.C.; MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, Jena, v. 16, p. 923–928, 2009.
- ANDERSEN, M.L.; LAURIDSEN, K.; SKIBSTED, L.H. Optimizing the use of phenolic compounds in foods. In: JOHNSON, I.; WILLIAMSON, G. **Phytochemical functional foods**. New York: CRC Press, 2003. chap. 16, p. 315-340.
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 68, p. 307-314, 1999.
- ARAÚJO, J.M.A. **Oxidação de lipídios**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 22p.
- BAG, A.; BHATTACHARYYA, S.K.; PAL, N.K.; CHATTOPADHYAY, R.R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, Jena, v. 167, p.352-357, 2012.
- BALIGA, M.S.; BHAT, H.P.; BALIGA, B.R.V.; WILSON, R.; PALATTY, P.L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 1776–1789, 2011.
- BANSAL, S.; CHOUDHARY, S.; SHARMA, M.; KUMAR, S.S.; LOHAN, S.; BHARDWAJ, V.; SYAN, N.; JYOTI, S. Tea: a native source of antimicrobial agents. **Food Research International**, Barking, v.53, p. 568-584, 2013.
- BARBOSA, D.B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill (*Anacardiaceae*)**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; CARISTI, C.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. **Food Chemistry**, London, v.129, p.1504-1512, 2011.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativos: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v.19, n.1, p. 47-64, 1997.

BEHL, C.; MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 33, p. 182-191, 2002.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 25, p.3-14, 2001.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHIELLO, A.; MANZO, F.; CARAFA, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S.; COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FELICETTO, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R. de.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. Feijoa sellowiana derived natural flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, p.1902-1914, 2007

BORGES, G.S.C.; GONZAGA, L.V.; JARDINI, F.A; MANCINI-FILHO, J.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, Barking, v.51, p. 363-369, 2013.

BONATO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. cap. 8, p. 203-270.

BRANDÃO, V.B.; GONÇALVES, A.C.V. **Brasil inovador: o desafio empreendedor: 40 histórias de sucesso de empresas que investem em inovação**. 2006. Disponível em: < <http://www.finep.gov.br/dcom/brasilinovador.pdf> >. Acesso em: 08 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Pará, terra do açaí: oportunidade de investimentos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/34RO/App_Banco_Mundial_Fruticultura.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2013

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CALDERÓN, J.C.; JAIMES, L.C.; HERNÁNDEZ, E.G.; VILLANOVA, B.G. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, Barking, v.44, p.2047-2053, 2011.

CÂMARA, I.G. Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (Ed.). **Mata atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Tradução de E.R. Lamas. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. cap. 4, p. 31-42.

CARDOSO, J.H. **Cultivo e conservação da feijoa: uma homenagem a um agricultor guardião**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 26p.

CASTARDO, J.C.; PRUDENTE, A.S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, G.L.; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. Anti inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 118, p. 405–411, 2008.

CECÍLIO, A.B.; FARIA, D.B. de.; OLIVEIRA, P.C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D.A.; SOBRAL, M.E.G.; DUARTE, M.G.R.; MOREIRA, C.P.S.; SILVA, C.G.; ALMEIDA, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 141, p. 975-981, 2012.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA. **Livro vermelho da flora brasileira**. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/plataforma2/book/>>. Acesso em: 08 maio 2013.

CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 22, p. 8397-8402, 2006.

CHATTERJEE, K.; ALI, K.M.; DE, D.; PANDA, D.K.; GHOSH, D. antidiabetic and antioxidative activity of ethyl acetate fraction of hydromethanolic extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn through *in-vivo* and *in-vitro* study and its chromatographic purification. **Free Radicals and Antioxidants**, Santiago, v. 2, n. 1, p. 21-30, 2012.

CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; BRAGAGNOLO. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, London, v.127, p.419-426, 2011.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, n. 7, p. 620-643, 2010.

COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.A.; BRIGHENTE, I.M.C, RODRIGUES, A.L.S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 143, p. 720–731, 2012.

COS, P; YING, L; CALOMME, M; HU, J.P; CIMANGA, K; POEL, B.V; PIETERS, L; VLIETINCK, A.J; BERGHE, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, n. 1, p.71-76, 1998.

CROZIER, A. Classification and biosynthesis of plants and secondary products: an overview. In: GOLDBERG, G. (Ed). **Plants: diet and health**. Iowa: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003, chap. 2, p. 27-48.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Report**, Cambridge, v.26, n.8, p.956-1096, 2009.

CUI, J.; HU, W.; CAI, Z.; LIU, Y.; LI, S.; TAO, W.; XIANG, H. New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 95, p.166–172, 2010.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.38, p.99-107, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.23, p. 174-181, 2012.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. 2008. 191p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DAWIDOWICZ, A.L.; OLSZOWY, M. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by b-carotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.231, p. 835-840, 2010.

DEW, T.P.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n.16, p.6510-6515, 2005.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J. dos; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método do sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.106, p.119-113, 2005.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, London, v.84, p. 23–28, 2004.

EL-AGAMEY, A; LOWE, G.M; MCGARVEY, D.J; MORTENSEN, A; PHILLIP, D.M; TRUSCOTT, G; YOUNG, A.J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.430, p.37-48, 2004.

EMMONS, C.L., PETERSON, D.M., PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

ERENO, D. Pesquisadores externos contribuem com inovação da Natura. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n.183, p.67-71, maio 2011.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Revisão: efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n. 1, p. 43-52, 2001.

FACHINELLO, J.C; PASA, M.S; SCHMTIZ, J.D; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n. esp. 1, p. 109-120, 2011.

FERRO, A.F.P.; BONACELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**, São Carlos, v.13, n.3, p. 489-501, 2006.

FORZZA, C.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A..L.; CARVALHO-JÚNIOR, A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.da; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S. de.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. Síntese da diversidade brasileira. In: FORZZA, C.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. (Ed.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010a.v.1, p. 21-42.

FORZZA, C.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; COSTA, A.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MARTINELLI, G.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; QUEIROZ, L.P.; STEHMANN, J.R.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. As angiospermas do Brasil. In: FORZZA, C.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. (Ed.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010b. v. 1, p. 21-42.

FOTI, M.C; DAQUINO, C; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solution. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v.69, p.2309-2314, 2004.

FOUOTSA, H.; LANNANG, A.M.; MBAZOA, C.D.; RASHEED, S.; MARASINI, B.P.; ALI, Z.; DEVKOTA, P.; KENGFAK, A.E.; SHAHEEN, F.; CHOUDHARY, M.I.; SEWALD, N. Xanthonic inhibitors of α -glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.5, p.236-239, 2012.

FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Dietary flavonoids: role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.51, p.813-823, 2011.

FRANZON, R.C. **Frutíferas nativas do Cerrado tem potencial para exploração**. 2009. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/131/>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Da natureza para a farmácia**: anti-inflamatório feito com extrato de planta da Mata Atlântica está pronto para entrar no mercado. 2005. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2005/04/01/da-natureza-para-a-farmacia/>>. Acesso em: 15 maio 2013.

_____. **Deteção e identificação de compostos bioativos em iogurtes probióticos contendo frutos nativos do Brasil e fibras de subprodutos industriais**. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/24240/deteccao-e-identificacao-de-compostos-bioativos-em-iogurtes-probioticos-contendo-frutos-nativos-do-b/>>. Acesso em: 10 maio 2013.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do *hotspot* Mata Atlântica: uma síntese. In: _____. (Ed.). **Mata atlântica**: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Tradução de E.R. Lamas. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. cap. 1, p. 3-11.

GAO, X.; YU, T.; CUI, M.; PU, J.; DU, X.; HAN, Q.; HU, Q.; LIU, T.; LUO, K.Q.; XU, H. Identification and evaluation of apoptotic compounds from *Garcinia oligantha*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v.22, p.2350-2353, 2012.

GARZÓN, G.A; NARVÁEZ-CUENCA, C.E; KOPEC, R.E; BARRY, A.M; RIEDL, K.M; SCHWARTZ, S.J. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of arazá (*Eugenia spicata* McVaugh), an amazonian fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.60, p.4709-4717, 2012.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 22, n.1, p. 26-30, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GUEDES, F.B.; SEEHUSEN, S.E. (Org.). **Pagamentos por serviços ambientais na mata atlântica: lições aprendidas e desafios**. Brasília: Ministério do meio Ambiente, 2011. 275p.

GUIMARÃES, A.G.; MELO, M.S.; BONFIM, R.R.; PASSOS, L.O.; MACHADO, S.M.F.; RIBEIRO, A.S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.19, n.4, p.883-887, 2009.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, New York, v.86, p.345-391, 2012.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 5, p. 489–499, 2012.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular diseases: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

_____. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.476, p.107-112, 2008.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; BREUSEGEM, F.V.; MUNNÉ-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 3, 2009.

HERON, W.J. **Projeto Reça obtém certificação orgânica internacional: preservar ecossistema também gera lucro, conforme mostram produtores que fornecem espécies alimentícias da Amazônia e matéria-prima para cosméticos**. 2010.

Disponível em:

<<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10231755>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

HOMERO, V. **O exotismo das frutas da Mata Atlântica**. 2012.

Disponível: <http://www.faperj.br/boletim_interna.phtml?obj_id=7918>. Acesso em: 15 maio 2013.

HONGYAN, L.; DENG, Z.; ZHU, H.; HU, C.; LIU, R.; YOUNG, J.C.; TSAO, R. Highly pigmented vegetables: anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food Research International**, Barking, v.46, p.250-259, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.6, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **INPE e SOS Mata Atlântica divulgam novos dados do Atlas**. Disponível em: <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=2923>. Acesso em: 08 maio 2013.

JACKSON, M. Potential mechanisms of action of bioactive substances found in foods. In: GOLDBERG, G. (Ed). **Plants: diet and health**. Iowa: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003, chap. 4, p. 65-75.

JANTAN, I.; SAPUTRI, F.C. Benzophenones and xanthenes from *Garcinia cantleyana* var. cantleyana and their inhibitory activities on human low-density lipoprotein oxidation and platelet aggregation. **Phytochemistry**, Kidlington, v.80, p. 58-63, 2012.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia de líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.cap. 9, p. 273-397.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.628-633, 2003.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, Amsterdam, v.1, p.244-257, 2013.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* M.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, London, v.133, p.671-677, 2012.

KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R. O valor da diversidade química das plantas. In: GARAY, I.; BECKER, B.K. **Dimensões humanas da biodiversidade: o desafio de novas relações sociedade-natureza no século XXI**. Petrópolis: Vozes, 2006. cap. 4, p. 263-279.

KATALINIĆ, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chemistry**, London, v.86, p.593-600, 2004.

KIM, Y.O.; JOHSON, J.D.; LEE, E.J. Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three *Phytolaccaceae* species in South Korea. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 5, p. 1175-1186, 2005.

KOSHY, A.S.; ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, London, v.72, p.289-294, 2001.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S.K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, Milano, v.89, p.86-125, 2013.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v.52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.46, p.244-282, 2007.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 296-301, 2002.

LEE, L.T.; TSAI, Y.F.; HU, N.Y.; WANG, C.W.; HUANG, K.K.; HSIAO, J.K.; SHIH, Y.C.; MUNEKAZU, I. Anti-arthritis effect of mangostins from *G. Mangostana*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, [s.l.], v. 3, p. 227-232, 2013.

LI, L.; ADAMS, L.S.; CHEN, S.; KILLIAN, C.; AHMED, A.; SEERAM, N.P. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 826-831, 2009.

LIN, K.W.; HUANG, A.M.; YANG, S.C.; WENG, J.R.; HOUR, T.C.; PU, Y.S.; LIN, C.N. Cytotoxic and antioxidant constituents from *Garcinia subelliptica*. **Food Chemistry**, London, v.135, p.851-859, 2012.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.60, p.233-239, 2013.

MACKEEN, M.M.; ALI, A.M.; LAJIS, N.H.; KAWAZU, K.; HASSAN, Z.; AMRAN, M.; HABSAH, M.; MOOI, L.Y.; MOHAMED, S.M. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, p. 395-402, 2000.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, p.1-19, 2008

MAKHOTKINA, O.; KILMARTIN, P.A. The phenolic composition of Sauvignon blanc juice profiled by cyclic voltammetry. **Electrochimica Acta**, New York, v. 38, n.30, p.188-195, 2012.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Ann Arbor, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARGETTS, B.; BUTTRISS, J. Epidemiology linking consumption of plant foods and their constituents with health. In: GOLDBERG, G. (Ed). **Plants: diet and health**. Iowa: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003, chap. 3, p. 49-64.

MARTINEZ-CORREA, H.A.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEIXORO, C.A.; OLIVEIRA, A.L.; CABRAL, F.A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 55, p. 998–1006, 2011.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, New York, v.108, n.8, p.652-659, 2000.

MEDINA, A.L.; HASS, L.I.R.; CHAVES, F.C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R.C.; SILVA, W.P.da.; NORA, L.; ROMBALDI, V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, London, v.128, p.916-922, 2011.

MOCHIZUKI, M.; YAMAZAKI, S.; KANO, K.; IKEDA, T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1569, p.35-44, 2002.

MOONGKARNDI, P.; KOSEM, N.; KASLUNGKA, S.; LUANRATANA, O.; PONGPAN, N.; NEUNGTON, N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis

by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.90, p.161-166, 2004

MONTEIRO, S. Açaí de fruta exótica a vedete de consumo. **Frutas & Derivados**, v. 1, p. 29-33, 2006. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x_files/revista02.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.

NERI-NUMA, I.A.; CARVALHO-SILVA, L.B.; MORALES, J.P.; MALTA, L.G.; MURAMOTO, M.T.; FERREIRA, J.E.C.; CARVALHO, J.E.de.; RUIZ, A.L.T.G.; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, Barking, v. 50, p. 70–76, 2013.

NISHIKIMI, M.; RAO, N.A. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical research communications**, Orlando, v.46, n. 2, p.849-854, 1972.

NOVELLI, E.L.B. Radicais livres e estresse oxidativo. In: _____. **Nutrição e vidasaudável**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2005. cap. 6, p. 93-114.

OKOKO, T. In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 2620–2623, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIN, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009a.

OLIVEIRA, A.P.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; SILVA, B.M.; TAVARES, F.; ANDRADE, P.B. *Ficus carica* L.: metabolic and biological screening. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.57, p.2841-2846, 2009b.

OMENA, C.M.B.; VALENTIN, I.B.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; MANO, C.M.; BECHARA, E.J.H.; SAWAYA, A.C.H.F.; TREVISAN, M.T.S.; COSTA, J.G. da; FERREIRA, R.C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts os peel, pulp and seeds os exotic brazilian fruits. **Food Research International**, Barking, v.49, p.334-344, 2012.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of animproved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

ÖZYÜREK, M.; BEKTAŞOĞLU, B.; GÜÇLÜ, K.; APAK R. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.636, p.42-50, 2006.

PACIFICO, S.; D'ABROSCA, B.; SCOGNAMIGLIO, M.; GALLICCHIO, M.; POTENZA, N.; PICCOLELLA, S.; RUSSO, A.; MONACO, P.; FIORENTINO, A. Metabolic profiling of strawberry grape (*Vitis x labruscana* cv. 'Isabella') components by nuclear magnetic resonance (NMR) and evaluation of their antioxidant and antiproliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 7679-7687, 2011.

PARK, Y.S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; NAMIESNIK, J.; SUHAJ, M.; CVIKROVÁ, M.; MARTINCOVÁ, O.; WEISZ, M.; GORINSTEIN, S. Comparison of the contents of bioactive compounds and the level of antioxidant activity in different kiwifruit cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.24, p.963-970, 2011.

PATTHAMAKANOKPORN, O.; PUWASTIEN, P.; NITITHAMYONG, A.; SIRICHAKWAL, P.P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.21, p.241-248, 2008.

PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; OROZCO-IBARRA, M.; PÉREZ-ROJAS, J.M. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 3227-3239, 2008.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.A.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 60, p. 479-487, 2008.

PINHEIRO, A.; CASÉ, F. Flavonoides. In: DOLINSKY, M. **Nutrição funcional**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 3, p. 134-156.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.10, p. 4290-4302, 2005.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical pharmacology**, New York, v. 72, p. 1439-1452, 2006.

RAO, U.M. Source of superoxide anion radical in aerobic mixtures consisting of NAD[P]H, 5-methylphenazinium methyl sulfate and nitroblue tetrazolium chloride. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.7, p. 513-519, 1989.

RAZALI, N.; MAT-JUNIT, S.; ABDUL-MUTHALIB, A.F.; SUBRAMANIAM, S.; ABDULAZIZ, A. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics

from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. **Food Chemistry**, London, v.131, p.441-448, 2012.

REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos: ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 6, p. 243-295.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Research Review**, [s.l.], v.23, n. 4, p. 519-534, 2003.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Analytical Methods**, London, v.109, p.883-890, 2008.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E.A.G. Pigmentos. In: _____. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia; Edgard Blücher, 2007. cap. 5, p.145-168.

ROCKENBACH, I.I.; GONZAGA, L.V.; RIZELIO, V.M.; GONÇALVES, A.E.S.S.; GENOVESE, M.I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinífera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, Barking, v.44, p. 897-901, 2011a.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinífera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, London, v.127, p.174-179, 2011b.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L.R.B.; CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure-activity relationship. **Food Chemistry**, London, v.135, p.2103-2111, 2012.

ROSSI, A.; RIGANO, D.; PERGOLA, C.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; BRAMANTI, P.; SENATORE, F.; SAUTEBIN, L. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by an acetonic extract from *Feijoa sellowiana* Berg. fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 13, p. 5053-5061, 2007.

ROMEIRO, T. **Plantas do futuro**. 2007. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/6582>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, London, v.121, p.996-1002, 2010.

RYU, H.W.; CHO, J.K.; CURTIS-LONG, M.J.; YUK, H.J.; KIM, Y.S.; JUNG, S.; KIM, Y.S.; LEE, B.W.; PARK, K.H. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthenes from *Garcinia mangostana*. **Phytochemistry**, Kidlington, v.72, p.2148-2154, 2011.

SANG, S.; YANG, I.; BUCKLEY, B.; HO, C.T.; YANG, C.S. Autoxidative quinine formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: Studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.43, p.362-371, 2007.

SANTA-CECÍLIA, F.V.; FREITAS, L.A.S; VILELA, F.C.; VELOSO, C.C.; ROCHA, C.Q.da.; MOREIRA, M.E.C.; DIAS, D.F.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M.H. dos. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 670, p. 280–285, 2011.

SELVI, A.M.; JOSEPH, G.S.; JAYAPRAKASHA, G.K. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. **Food Microbiology**, London, v. 20, p. 455-460, 2003.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Antioxidants and the immune system: flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.69, p. 273-278, 2010.

SERVICO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cosméticos a base de produtos naturais**: relatório completo estudos de mercado SEBRAE; ESPM. [s.l.] 2008. 100p.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.59, n.8, p.3499-3504, 2011.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, p. 2376–2383, 2008.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; RESS, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, London, v. 101, p. 1012–1018, 2007.

SILVA, L.R.; AZEVEDO, J.A.; PEREIRA, M.J.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B. Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.53, p.240-248, 2013.

SILVA, R.R.da; OLIVEIRA, T.T.de; NAGEM, T.J.; LEÃO, M.A. Revisão: efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 127-133, 2002.

SILVA-JÚNIOR, J.F.; BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E. Recursos genéticos e melhoramento de fruteiras nativas e exóticas em Pernambuco. In: QUEIRÓZ, M.A.de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em:

<www.cpatssa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/fruteirasnativas.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2010.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Orlando, v. 299, p. 152–178, 1999.

SÍTIO DO BELLO. **O projeto**. Disponível em: <<http://www.sitiodobello.com.br/index0.htm>>. Acesso em: 15 maio 2013.

SKOOG, I.; WEST, D.M.; HOLLER, J.; CROUCH, S.R. Introdução às separações analíticas. In: _____. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2007. cap.30, p.863-898.

SOUZA, G.C.de.; HAAS, A.P.S.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, p. 135–143, 2004

STALIKAS, C.D. Review: extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS 9.0**. Cary, 2002.

STEPANIĆ, V.; TROŠELJ, K.G.; LUČIĆ, B.; MARKOVIĆ, Z.; AMIĆ, D. Bond dissociation free energy as general parameter for flavonoid radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v.141, p.1562-1570, 2013.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 500, p. 299-313, 2004.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; JEAN-OLIVIER, D.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, London, v. 113, p.1226-1233, 2009.

TRINDADE, M.A. Utilização de pré-cura de carne mecanicamente separada de frango (CMS) e suas vantagens. In: CASTILHO, C.J.C. **Qualidade da carne**. São Paulo: Varela, 2006. cap. 5, p. 89-100.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 91–97, 2003.

VICTORIA, F.N.; BRAHM, A.S.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 544, p. 105–109, 2013.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L; PERIN, G.; JACOB, R.G; ALVES, D.; SILVA, W.P.da; MOTTA, A.S.da. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.50, p. 2668-2674,2012.

VINÃ, J.; GIMENO, A.; SASTRE, J.; DESCO, C.; ASENSI, M.; PALLARDÓ, F.V.; CUESTA, A.; FERRERO, J.A.; TERADA, L.S.; REPINE, J. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats:role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. **IUBMB Life**, London, v.49, p.539-544, 2000.

VIRGILI, F.; SCACCINI, C. Nutritional phenolics and cardiovascular disease. In: JOHNSON, I.; WILLIAMSON, G. **Phytochemical functional foods**. New York: CRC Press, 2003. chap. 2, p. 5-14.

VIZZOTTO, M.; GOMES, C.B.; PEREIRA, M.C. Compostos fenólicos totais e atividadeantioxidante em frutas de pessegueiro cv. Ametista submetidos a diferentes manejos de pragas e de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA,20., 2008, Vitória.**Anais...** Vitória: INCAPER; Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1CD-ROM.

VUOTTO, M.L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M.T.L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 13, p. 197-201, 2000.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins.**Journal of Agriculturaland Food Chemistry**, Easton, v.45, n.2, p.304-309, 1997.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the prodution of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p. 4183-4189, 2002.

WANG, L.S.; STONER, G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention.**CancerLetters**, Amsterdam, v. 269, p. 281–290, 2008.

WANG, S.Y.; CHEN, H.; EHLENFELDT, M.K. Antioxidant capacities vary substantially among cultivars of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **InternationalJournal of Food Science and Technology**, Oxford, v.46, p.2482-2490, 2011.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WANG, J.J.; SHI, Q.H.; ZHANG, W.; SANDERSON, B.J.S. Anti-skin cancer properties of phenolic-rich extract from the pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 3004-3013, 2012.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, London, v. 121, n. 4, p. 923-926, 2010.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal American Chemical Society**, Washington, v.123, n.6, p.1173-1183, 2001.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p. 4026-4037, 2004.

YAMAUCHI, R.; TSUCHIHASHI, K.; KATO, K. Oxidation products of β -carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 1301-1306, 1998.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.157, p. 65-75, 2000.

YOO, C.B.; HAN, K.T.; CHO, K.S.; HA, J.; PARK, H.J.; NAM, J.H.; KIL, U.H.; LEE, K.T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 225, p. 41–52, 2005.

YOON, J.H.; BAEK, S.J. Review: molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v.46, n. 5, p. 585-596, 2005.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, New Jersey, v. 54, p. 176-186, 2001.

YU, L.; ZHAO, M.; YANG, B.; ZHAO, Q.; JIANG, Y. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, London, v. 104, p.176–181, 2007.