Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Avaliação da atividade antioxidante em
extratos de frutas típicas do Cerrado
brasileiro**

Flávia Cristina de Oliveira Angella

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos
para a obtenção do título de
mestre em ciências.

Área de concentração: Química
Analítica e Inorgânica

Orientador: Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos
2014

DEDICATÓRIA

Ao Ricardo, pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor e apoio mesmo distantes.

A minha avó, pelo amor e orações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel R. Cardoso pela paciência, compreensão e ensinamentos.

A todo o grupo da inorgânica e analítica pelo apoio e simpatia. Principalmente a Leandro, Andressa, Natália e Sílvia pelo tempo desprendido me ajudando com meus ensaios.

A empresa “Sítio do Bello”, pelo fornecimento das polpas.

A Centroflora pelo apoio e incentivo aos estudos.

Aos meus amigos da Centroflora que me ajudaram e deram força ao longo do percurso.

A Patrícia, minha querida amiga, pela companhia e por me receber em sua casa em minhas estadas em São Carlos.

A toda minha família (avós, tios, tias, primos, primas, sogro, sogra, cunhado, cunhadas) pelo apoio e pelo compartilhamento das alegrias e preocupações.

EPÍGRAFE

“Conto ao senhor é o que eu sei e o senhor não sabe; mas principal quero contar o
que eu não sei se sei, e que pode ser que o senhor saiba.”

Riobaldo – Grande Sertão: Veredas
João Guimarães Rosa

RESUMO

A alimentação deve fornecer nutrientes essenciais em equilíbrio. A carne é uma perfeita fonte de proteína e fornece ferro, zinco e várias vitaminas, no entanto a carne vermelha e produtos à base de carne também mantêm o risco da indução de estresse oxidativo, por meio da formação catalisada de radicais livres por ferro durante a digestão. Uma dieta equilibrada deve ser inspirada pela natureza. Com a evolução, a natureza teve que lidar com o estresse oxidativo em um ambiente com um aumento da concentração de oxigênio e exposição à luz UV variando sazonalmente. Carotenoides têm sido considerados protetores do sistema responsável pela fotossíntese, suprimindo o oxigênio ativado e captando os radicais livres, evitando que estruturas sensíveis sejam destruídas. Polifenóis, onipresentes no reino vegetal, tornaram-se essenciais para a proteção contra luz UV, controle de metais livres e danos mecânicos, quando tocotrienóis e tocoferóis associam-se a membranas promovendo sua proteção. Um desafio hoje é entender o mecanismo por trás das várias classes de protetores contra o estresse oxidativo e, especialmente, sua interação sinérgica e usar esse entendimento para melhorar a nossa dieta. As diferentes classes de compostos bioativos, incluindo captadores de radicais livres, supressores do estado excitado, quelantes de metais e reguladores de genes mantêm uma diversidade estrutural e funcional apenas parcialmente compreendida e explorada. Nesse momento é importante um olhar mais atento para essa biodiversidade em relação à composição dos nossos alimentos com foco em um consumo seguro de carne, como parte de uma dieta equilibrada. O Brasil em sua rica e vasta flora detém alguns dos maiores recursos botânicos não explorados do mundo. Hoje o desafio científico é fazer a ingestão de carne vermelha mais segura, e ainda uma fonte confiável de ferro e outros minerais. Olhando para este desafio, o presente trabalho visou selecionar frutas pouco exploradas do Cerrado brasileiro como uma fonte de antioxidantes na dieta. Frutas do Cerrado foram primeiramente selecionadas com base nas características sensoriais, os frutos selecionados foram avaliados pelas concentrações totais de fenóis, flavonoides, taninos, glicídios, antocianinas e ácido ascórbico. Suas propriedades antioxidantes foram investigadas com base na capacidade de captar radicais 1-hidroxietila e reduzir o pigmento hipervalente de carne (ferrilmioglobina) no sistema modelo.

ABSTRACT

Human food must supply essential nutrients in balance. Meat is a perfect protein source and supplies iron and zinc and many vitamins, although red meat and meat products also hold the risk of inducing oxidative stress through iron-catalyzed formation of free radicals during digestion. A balanced diet should be inspired by nature. Through evolution, nature has had to deal with oxidative stress in an atmosphere with an increasing oxygen content and UV light exposure with seasonal variations. Carotenoids merged as protectors of the photosynthetic apparatus to quench activated oxygen and to scavenge free radicals otherwise destroying sensitive structures. Polyphenols, ubiquitous in the plant kingdom, became essential for surface protection against UV light, control of free metals and mechanical damage, while tocotrienols and tocopherols became associated with membranes promoting their protection. A challenge today is to understand the mechanism behind the various classes of protectors against oxidative stress and especially their synergic interaction and to use this understanding to improve our diet. The different classes of bioactive compounds including free radical scavengers, excited-state quenchers, metal chelators and gene regulators hold a structural and functional diversity only partly understood and explored. It has become time for a closer look into this biodiversity in relation to the composition of our food with focus on a safe meat intake as part of a balanced diet. Brazil holds some of the world's largest unexploited botanical resources in the rich and to a large degree unexplored flora. Today scientific challenge is to make red meat intake safer but still a trustworthy source of iron and other minerals. Looking into this challenge, the present work aim to select underexplored fruits from the brazilian Cerrado as a source of dietary antioxidants. Fruits from the Cerrado were first selected based on the sensorial characteristic, the selected fruits were evaluated with their total content of polyphenols, flavonoids, tannins, glycosides, anthocyanins, and ascorbic acid. They were further investigated for their antioxidant properties based on the ability to scavenge 1-hydroxyethyl radical and to reduce the biological relevant hypervalent meat pigment (ferrylmyoglobin) in model system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo catalítico da atividade de pseudo peroxidase da mioglobina, onde ilustra a formação da perferrilmioglobina e ferrilmioglobina. O composto Heme-Fe(III) representa a metamioglobina, o Composto I a perferrilmioglobina e o Composto II a ferrilmioglobina. AH representa uma espécie antioxidante ou então um substrato oxidável ou uma estrutura sensível à oxidação.....	22
Figura 2 – Foto ilustrativa do fruto inteiro de cagaita.....	24
Figura 3 – Foto ilustrativa do fruto inteiro de coquinho-azedo.....	25
Figura 4 – Foto ilustrativa do fruto inteiro e partido de panã.	26
Figura 5 – Ilustração da reação do ácido gálico com o íon de molibdênio (VI), do reagente de Folin Ciocalteu.....	31
Figura 6 – Formação do íon complexo flavonoide-Al(III), em solução metanólica de cloreto de alumínio. Exemplo: A é complexo morina-Al(III) (1:1) e B é complexo quercetina-Al(III) (1:2).	32
Figura 7 – Formação do complexo tanino-proteína, onde R representa a molécula de tanino, no exemplo, ácido tânico.	34
Figura 8 – Proposta do mecanismo químico da reação colorimétrica para pentoses (xilose) – Figura A e para hexoses (galactose) – Figura B.	35
Figura 9 – Estrutura química das antocianinas formadas em função do pH, em meio aquoso.....	36
Figura 10 – Ilustração da reação da oxidação do ácido ascórbico.....	37
Figura 11 – Reação de formação do aduto de spin radical(4-POBN/CH(CH ₃)OH)•.	38
Figura 12 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 179,1479) que correspondem à presença de monossacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.....	46
Figura 13 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 341,2885) que correspondem à presença de dissacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	47
Figura 14 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 503,4291) que correspondem à presença de trissacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	49
Figura 15 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 175,1162) que correspondem à presença de ácido ascórbico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	50
Figura 16 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 301,2278) que correspondem à presença de quercetina. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	52
Figura 17 – Cromatograma de íon extraído (m/z 169,1116) que corresponde à presença de ácido gálico, da amostra de cagaita.	53

Figura 18 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 133,0795) que correspondem à presença de ácido málico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	54
Figura 19 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 163,1501) que correspondem à presença de ácido cumárico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	55
Figura 20 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 193,1761) que correspondem à presença de ácido ferúlico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.	57
Figura 21 – Cromatograma de íon extraído (m/z 301,1847) que corresponde à presença de ácido elágico, da amostra de cagaita.	58
Figura 22 – Espectros de ressonância paramagnética de elétrons do aduto radical 4-POBN-HER decorrente das reações: controle (em azul), e amostras de cagaita nas concentrações $2,15 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em laranja), $2,48 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em vermelho) e $3,46 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em roxo)...	59
Figura 23 – Gráfico obtido pela cinética de competição para a amostra de cagaita, a concentração da amostra é dado em g L^{-1}	60
Figura 24 – Espectros de absorção de UV da metamioglobina (MbFe(III)) e ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O).	63
Figura 25 – Curvas de decaimento da banda de absorção em 580 nm, em quatro diferentes concentrações de uma amostra de coquinho-azedo.	64
Figura 26 – Gráfico de k_{obs} versus concentração de fenóis totais expressos em ácido gálico do extrato de coquinho-azedo (amostra hidroalcoólica). ...	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos antioxidantes.....	16
Tabela 2 – Condições do gradiente utilizado na eluição.	38
Tabela 3 – Quantidades obtidas de polpas liofilizadas e as respectivas umidades, para cada fruta investigada.	41
Tabela 4 – Concentração em porcentagem (m/m) de fenóis totais, taninos totais, glicídios totais e de ácido ascórbico nas polpas avaliadas.....	42
Tabela 5 – Compostos identificados nas amostras através da espectrometria de massas de alta resolução e os respectivos desvios da massa molecular encontrada e teórica, expressos em ppm.	45
Tabela 6 – Valores da constante de velocidade aparente da reação dos extratos com o radical 1-hidroxietila calculada com a concentração em massa do extrato e pela concentração molar de fenóis (equivalentes em ácido gálico).	61
Tabela 7 – Valores da constante da cinética de redução da ferrilmioglobina calculada com a concentração em massa do extrato e pelas concentrações molares de fenóis (equivalente em ácido gálico) e ácido ascórbico.	65
Tabela 8 – Constante de velocidade de reação de redução da ferrilmioglobina, a 25°C e pH 7,4 por compostos antioxidantes.	67
Tabela 9 – Nome, espécie, ocorrência das frutas avaliadas, e o resultado da avaliação sensorial descritiva.....	78
Tabela 10 – Resultados das análises realizadas nas polpas de frutas exóticas.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WHO - *World Health Organization*

UV - Ultravioleta

DPPH[•] - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

ABTS^{•+} - Cátion radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

SOD - Superóxido dismutase

CAT - Catalase

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NADH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

RONS - *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

FOSHU - *Foods for Specified Health Use*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

BR - Brasil

ESI - *Electrospray Ionization*

HER- Radical 1-hidroxietila

4-POBN - α -4-piridil-tert-butilnitrona-N-óxido

RPE - Ressonância Paramagnética de Elétrons

ND - Não detectado

DPR - Desvio Padrão Relativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Antioxidantes	14
1.1.1 <u>Radicais</u>	17
1.2 Alimentos funcionais	18
1.3 Compostos fenólicos e carotenoides	19
1.4 A relação entre compostos bioativos e o trato-gastrointestinal	20
1.5 Frutas do Cerrado	23
1.5.1 <u>Cagaita</u>	23
1.5.2 <u>Coquinho-azedo</u>	24
1.5.3 <u>Panã</u>	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Reagentes	28
3.2 Equipamentos	28
3.3 Seleção das frutas e produção dos extratos	29
3.4 Análises dos extratos	30
3.4.1 <u>Caracterização físico-química das polpas liofilizadas</u>	30
3.4.1.1 <i>Teor de fenóis totais</i>	30
3.4.1.2 <i>Teor de flavonoides totais</i>	31
3.4.1.3 <i>Teor de taninos totais</i>	32
3.4.1.4 <i>Teor de glicídios totais</i>	34
3.4.1.5 <i>Teor de antocianinas totais</i>	35
3.4.1.6 <i>Teor de ácido ascórbico</i>	36
3.4.1.7 <i>Avaliação do perfil químico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas</i>	37
3.4.2 <u>Avaliação da atividade e capacidade antioxidante</u>	38
3.4.2.1 <i>Reatividade frente ao radical 1-hidroxietila</i>	38
3.4.2.2 <i>Cinética de desativação da ferrilmioglobina</i>	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterização físico-química das polpas liofilizadas	41

4.2 Resultados da reatividade dos extratos de frutas do Cerrado frente ao radical 1-hidroxietila	59
4.3 Resultados da cinética de desativação da ferrilmioglobina.....	62
5 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO A.....	78

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais é associado a um baixo risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e de acidente vascular cerebral. A Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*) recomenda o consumo mínimo de cinco porções de frutas e vegetais por dia, e o padrão de ingestão desses alimentos é relacionado ao indicador de hábitos saudáveis. (1)

Frutas e vegetais são ricos em vitaminas, minerais e fibras, além de conter metabólitos secundários potencialmente bioativos, os fitoquímicos. (2)

A homeostasia do sistema endógeno de defesa antioxidante é sensível à influência de fatores externos tais como o fumo, a poluição, a radiação UV, a alimentação e a ocorrência de processos fisiopatológicos (envelhecimento, obesidade, inflamação e isquemia). Reconhecidamente os compostos bioativos provenientes da dieta podem ajudar a superar o desbalanço redox e também promover a proteção e a prevenção ou redução dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. (3)

Compostos bioativos podem apresentar propriedades antioxidantes, que exercem ação protetora contra a evolução de processos redox, degenerativos, que induzem doenças tais como câncer, a arteriosclerose e o envelhecimento precoce. Dentre as principais classes e substâncias bioativas em frutas e vegetais, pode-se destacar a Vitamina C, a Vitamina E, os polifenóis, os alcaloides e os carotenoides. Os antioxidantes provenientes da dieta são muito importantes no controle dos radicais gerados pelo estresse oxidativo *in vivo*. Embora os compostos bioativos, individualmente, possam proporcionar ação antioxidante, quando em conjunto, o sinergismo atua de forma eficiente contra o desbalanço redox no organismo. (4,5,6,7)

Sinergismo antioxidante pode ser definido pelo efeito da interação entre compostos bioativos e/ou compostos bioativos e macronutrientes proporcionando um efeito antioxidante superior ao efeito antioxidante esperado para as espécies individualmente e superior a um simples efeito aditivo. (8)

O Brasil possui em seu território uma vasta biodiversidade, que equivale a cerca de 24 % do total das plantas superiores existentes no mundo. O Brasil possui cinco biomas: a Amazônia, a Mata Atlântica, o Pantanal, a Caatinga e o Cerrado. O Cerrado se localiza ao centro dos biomas, é o segundo maior, ocupando aproximadamente 25 % do território nacional, e está distribuído pelos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e o Distrito Federal. (9)

Muitas espécies de plantas superiores nativas do Cerrado produzem frutas com características sensoriais únicas e com alta concentração de nutrientes e compostos secundários bioativos, essas frutas possuem um importante papel, tanto por sua comercialização na economia local, bem como nutricional. (10,11)

1.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são utilizados no cotidiano desde a antiguidade, quando no Egito utilizava-se de extratos de plantas ricas em polifenóis para auxiliar na preservação dos corpos dos mortos. (12)

Antioxidantes são definidos como substâncias químicas de origem natural ou sintética que são capazes de inibir ou retardar a oxidação de um substrato ou de estruturas sensíveis, quando presentes em concentrações ínfimas comparadas a substância oxidável. Em um aspecto mais amplo, antioxidantes são considerados também como substâncias que promovem o reparo de estruturas sensíveis, bem como sua ação como sinalizador celular induzindo a expressão de antioxidantes endógenos.

Na literatura, em especial na área de ciência dos alimentos, é comum utilizar o termo atividade antioxidante para descrever as propriedades redutoras das substâncias em investigação. Entretanto, o emprego deste termo é muitas vezes utilizado de forma inadequada. Assim, é válido definir de maneira clara a terminologia empregada para descrever substâncias com propriedades antioxidantes.

Em relação à nomenclatura, o termo capacidade antioxidante está relacionado à termodinâmica do processo, ou seja, a viabilidade da reação e a extensão com a qual ela ocorre (estequiometria). A atividade antioxidante por sua vez está relacionada com a cinética do processo, ou seja, intimamente relacionada com a constante de velocidade específica da reação. Portanto é importante que a substância em análise apresente uma boa capacidade antioxidante, no entanto, é muito mais crucial que esta substância apresente um elevado valor de atividade antioxidante. Este fato é de suma importância já que a grande maioria dos processos redox em alimentos e em meio biológico ocorrem com elevadas constantes de velocidade de reação, da ordem de 10^4 a $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Assim, uma substância que apresente um alto valor de capacidade antioxidante, porém com baixo valor de atividade não pode ser considerado um antioxidante em alimentos ou sistemas biológicos visto que cineticamente não competirá com o alvo biológico pela reação com o oxidante.

Desta maneira, pode-se apenas realizar comparações entre dois antioxidantes, se a metodologia utilizada para a avaliação das propriedades antioxidantes trata separadamente da capacidade e da atividade antioxidante com alvos oxidantes de relevância ou miméticos em alimentos ou sistemas biológicos.

Frequentemente, as técnicas eletroquímicas apresentam grande potencial para caracterização de antioxidantes, pois além de avaliarem as características físico-químicas, e fornecerem o potencial redox elas também fornecem o número de elétrons envolvidos, a influência de prótons, além de constantes de velocidade de reação. Entre as principais técnicas estão a voltametria cíclica e de pulso diferencial, a coulometria, bem como técnicas acopladas. (13)

Os métodos espectrofotométricos são em geral baseados na avaliação da capacidade antioxidante monitorada pela redução dos radicais DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS•⁺ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)). Outro método espectrofotométrico, comumente utilizado é o monitoramento da evolução de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em sistemas modelo de peroxidação lipídica. (13)

Os antioxidantes estão presentes naturalmente em conjunto, e suas interações são significativas para os seus reais efeitos, podem então ocorrer duas diferentes interações com resultados opostos: sinergismo e antagonismo. O sinergismo é a potencialização dos efeitos e antagonismo é a redução do efeito final desejado pela interação entre antioxidantes e/ou antioxidante e macronutrientes. Por exemplo, a interação entre o beta-caroteno e o alfa-tocoferol foi avaliada em um modelo de peroxidação de membrana, a combinação das moléculas resultou em uma inibição da peroxidação lipídica significativamente maior que a soma das inibições observadas individualmente. Como exemplo de antagonismo, podemos citar a interação de compostos fenólicos com proteínas do leite, onde a associação do composto fenólico com a proteína promove uma significativa diminuição da atividade antioxidante observada. (14,15,16)

A Tabela 1 apresenta a classificação dos antioxidantes, baseada em sua natureza, força e mecanismo de ação.

Tabela 1 – Classificação dos antioxidantes.

(continua)

Classificação de acordo com a sua natureza	
<i>Antioxidantes enzimáticos:</i>	Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR).
<i>Antioxidantes não enzimáticos:</i>	<div> Metabólicos: Glutatona reduzida (GSH), ácido lipoico, L-arginina, coenzima Q₁₀, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas com alta afinidade por metais, transferrina, etc. </div> <div> Nutrientes: Vitamina C, vitamina E, carotenoides, metais alcalinos, flavonoides, ácidos graxos, ômega 3 e ômega 6, etc. </div>
Classificação de acordo com a sua origem	
<i>Antioxidantes endógenos:</i>	Bilirrubina, glutatona, ácido lipoico, N-acetil cisteína, NADPH e NADH, ubiquinona (coenzima Q ₁₀), ácido úrico, enzimas (SOD, CAT, GPx, GR).
<i>Antioxidantes exógenos:</i>	Vitamina C, vitamina E, carotenoides e oxicarotenoides (licopeno e luteína), polifenóis (flavonoides, flavonas, flavonóis e proantocianidinas).

(conclusão)

Classificação de acordo com seu mecanismo de ação

Sistema catalítico para neutralizar ou desviar RONS: SOD, CAT e GPx.

Complexação de íons metálicos: Ferritina, ceruloplasmina e compostos fenólicos do tipo catecol.

Antioxidantes que atuam via transferência de elétrons ou átomo de H: Vitamina C, vitamina E, ácido úrico, glutathione e flavonoides.

Desativadores de oxigênio singlete excitado e/ou atuação como filtro interno para radiação luminosa: Carotenoides, antocianinas e polifenóis.

RONS: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Fonte: SEN, S.; CHAKRABORTY, R. The role of antioxidants in human health. In: ANDREESCU, S.; HEPEL, M. **In Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy**. Washington, DC: ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2011. Cap. 1. (17)

1.1.1 Radicais

Os radicais são definidos como moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados em seu orbital de fronteira ($S \neq 0$). São geralmente instáveis, com tempo de meia-vida curto ($t_{1/2} < 1$ ms) e quimicamente reativos, podendo ocasionar danos em biomoléculas e estruturas sensíveis. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS, do inglês *reactive oxygen and nitrogen species*) é um termo coletivo que inclui radicais de oxigênio e moléculas não radicais, que atuam como agentes oxidantes ou são precursores de radicais em meio biológico (Ex. HOCl, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂). (8,18)

A geração de radicais pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos, membranas e moléculas de DNA) está relacionado com seu local de formação. Em um organismo vivo, a existência de um desequilíbrio em favor da geração excessiva de radicais, ou em detrimento da velocidade de remoção destas espécies reativas, é conhecida como estresse oxidativo. Em longo prazo, o estresse oxidativo no ambiente celular,

pode causar severos problemas metabólicos e estar envolvida na origem e no desenvolvimento de numerosas doenças, tais como o câncer. (19)

Os radicais podem também ser formados nos alimentos promovendo a perda de valor nutricional, a formação de substâncias potencialmente tóxicas e a formação de pró-oxidantes. Os pró-oxidantes quando ingeridos pela dieta, podem promover a geração de radicais no trato gastrointestinal e por sua vez ocasionar lesões a estruturas sensíveis a oxidação e modificações em biomoléculas induzindo o processo de tumorigênese.

1.2 Alimentos funcionais

O termo alimento funcional surgiu na década de 80, no Japão, e foi definido como alimento processado que contém componentes que proporcionam funções específicas no corpo. Porém o conceito é mais antigo, em 1969, na Conferência de Alimento, Nutrição e Saúde, o tema foi discutido devido às preocupações desde a deficiência de nutrientes a supernutrição. (7,20)

FOSHU, *Foods for Specified Health Use*, é um programa implementado pelo Governo Japonês, promovendo suporte para pesquisa de ingredientes naturais para uma dieta que forneça funções específicas no organismo, tanto nos mecanismos de defesa biológicos como prevenção e tratamento de doenças, melhorando condicionamento físico, mental ou condições gerais de saúde. (21)

Por exemplo, na Coreia, os alimentos funcionais são definidos como suplementos para uma dieta normal, com doses mensuráveis. Nos Estados Unidos, são definidos como alimentos em sua forma inteira, fortificados ou enriquecidos, que fornecem benefícios comprovados à saúde. Na China, alimento funcional é definido como alimento que possui funções especiais como regulador metabólico, mas que não sejam utilizados como tratamento terapêutico. (20)

A política governamental do Canadá em alimentos funcionais e nutracêuticos define como alimentos funcionais os alimentos com aparência normal, consumidos numa dieta convencional, no entanto que proporcionam benefícios fisiológicos e/ou

reduzem os riscos de doenças. A política governamental do Canadá também define nutracêuticos como produtos isolados ou purificados de um alimento, geralmente comercializados na forma de preparado farmacêutico e não têm seu uso associado ao alimento, porém proporcionam benefícios fisiológicos ou proteção contra doenças crônicas. (22,23)

A legislação brasileira não define alimentos funcionais ou nutracêuticos, mas é possível reivindicar que um alimento possua atividades funcionais para saúde. Neste caso ele será classificado como alimento com propriedades funcionais e/ou alegações de saúde. Dentre as instruções para esse tipo de alimento são permitidas alegações funcionais relacionadas com o papel fisiológico no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo ou alegações sobre a manutenção geral da saúde e a redução de risco de doenças, porém não é permitido alegar que os alimentos façam referência à cura ou à prevenção de doenças. (21,24)

1.3 Compostos fenólicos e carotenoides

Compostos fenólicos típicos que possuem propriedades antioxidantes incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, como os flavonoides, tocoferóis, tocotrienóis e taninos. Compostos fenólicos são definidos como espécies aromáticas com pelo menos uma hidroxila ligada ao anel benzênico. Antioxidantes fenólicos são geralmente antioxidantes primários que promovem a remoção ou inativação de radicais. (25,26,27)

Como exemplo, pode-se citar a ingestão de chá verde e dietas ricas em frutas que contêm taninos e a sua associação com a atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, cicatrizante e até como inibidor da transcriptase reversa em HIV. (28)

Em alimentos funcionais uma das classes mais citadas são os carotenoides, pigmentos naturais, responsáveis pela maioria das cores do amarelo ao vermelho de frutas e flores. Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula. A diversidade das moléculas é atribuída a

processos de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de oxigênio como heteroátomo, ou a combinação destes processos. A cadeia poliênica pode ter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas e o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula. Todas são baseadas em sete diferentes grupos terminais, dos quais somente quatro (β , ϵ , κ , e ψ) são encontradas em carotenoides de vegetais superiores. (29,30,31)

Os animais são incapazes de sintetizar carotenoides no organismo, portanto os mesmos devem ser obtidos através da dieta. A maioria dos carotenoides não possui atividade de pró-Vitamina A, com exceção do beta-caroteno, alfa-caroteno e da beta-criptoxantina. Os carotenoides atuam como pigmentos maculares e possuem outras propriedades antioxidantes, além da atividade de pró-Vitamina A. (29,30,31)

Os carotenoides são divididos em duas categorias: carotenos que são compostos somente de carbono e hidrogênio e as xantofilas que apresentam o oxigênio como heteroátomo na forma de hidroxila, grupos ceto e epóxi. Os carotenoides são geralmente moléculas lipofílicas, que se acumulam em membranas e tecidos lipídicos. (29)

Os carotenoides geralmente atuam como antioxidantes de duas formas: desativando o $^1O_2^*$ e captando ou reduzindo radicais alcoxila e peroxila. (32)

1.4 A relação entre compostos bioativos e o trato-gastrointestinal

A dieta humana é uma complexa mistura de oxidantes, pró-oxidantes e antioxidantes, e o trato gastrointestinal o local de maior impacto do estresse oxidativo ocasionado pela dieta inapropriada. Em alguns tipos de dieta, determinados nutrientes e outros constituintes do alimento são associados com o risco e incidência de vários tipos de câncer, como exemplo, o alto consumo de carne vermelha tem sido associado ao aumento na incidência do câncer colorretal. O processo carcinogênico está ligado a peroxidação lipídica, citotoxicidade dos

produtos secundários da oxidação e a danos ao DNA proporcionados por espécies oxidantes reativas e produtos secundários da oxidação ocasionando a lesão celular e de estruturas sensíveis. (33,34,35)

Entre os oxidantes derivados da dieta, os hidroperóxidos derivados de lipídeos, proteínas e outras pequenas moléculas oxidadas são um grande grupo de compostos que induz o estresse oxidativo no trato gastrointestinal, o que leva a situações de inflamação e potencialmente a tumorigênese. Produtos cárneos contêm grande quantidade de espécies responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio: a hemoglobina e a mioglobina. A mioglobina é monomérica e possui apenas um grupo heme, acredita-se que seus derivados oxidados, as espécies de ferro hipervalente, são as principais espécies oxidantes no trato-gastrointestinal e que por sua vez deturparam o balanço redox, oprimindo as defesas celulares. (35,36)

A oxidação de heme-Fe(III) (metamioglobina) a espécies de ferro de alto estado de oxidação (ferro hipervalente) podem ocorrer na presença de peróxidos. A reação ocorre através da transferência de um elétron entre a espécie heme-Fe(III) e o peróxido, para completar a ligação um elétron do centro metálico é deslocado, portanto o Fe é oxidado a íon complexo de Fe(IV). A geração de espécies de ferro hipervalente, perferrilmioglobina ($\text{MbFe(IV)=O}^{\bullet+}$, cátion radical do íon complexo de Fe(IV)), pode ocorrer pela oxidação via 2 elétrons da metamioglobina com o peróxido de hidrogênio presente no sistema digestivo. As espécies de ferro hipervalente (perferrilmioglobina e ferrilmioglobina), possuem alto potencial redox, e são capazes de induzir processos de formação de radicais e lesão a estruturas sensíveis a oxidação. A Figura 1 ilustra o esquema da reação de formação da perferril- e ferril- mioglobina. (16,36,37)

Figura 1 – Ciclo catalítico da atividade de pseudo peroxidase da mioglobina, onde ilustra a formação da perferrilmioglobina e ferrilmioglobina. O composto Heme-Fe(III) representa a metamioglobina, o Composto I a perferrilmioglobina e o Composto II a ferrilmioglobina. AH representa uma espécie antioxidante ou então um substrato oxidável ou uma estrutura sensível à oxidação.

Fonte: LIBARDI, S. H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, p. 29, 2010. (38)

É observado que durante a oxidação dos alimentos, como carnes vermelhas, também ocorre oxidação de vitaminas e nutrientes, porém na presença de antioxidantes oriundos de plantas, o acúmulo de produtos de lipídios oxidados é reduzido e diminui a degradação de proteínas, lipídeos, vitamina E, beta-caroteno e em menor quantidade, a vitamina C. Esse fato aumenta a quantidade das vitaminas que alcançam o trato gastrointestinal e podem ser absorvidas através da mucosa intestinal e transportadas pelo sangue até os órgãos de interesse. Os antioxidantes no estômago podem, indiretamente, diminuir os hidroperóxidos e compostos citotóxicos, isso teria um efeito sinérgico na característica antioxidativa do plasma. Esse balanço entre pró-oxidação e antioxição no estômago tem impacto importante na saúde humana. (39)

Na ausência de compostos antioxidantes, a mioglobina atua como catalisador, levando os hidroperóxidos a radicais. Os antioxidantes podem atuar tanto reduzindo os radicais gerados bem como reduzindo os estados hipervalentes

de ferro-heme, perferil- e ferrilmioglobina, inibindo a oxidação e modificação de biomoléculas e estruturas sensíveis.

1.5 Frutas do Cerrado

As frutas selecionadas para o presente trabalho foram: *Eugenia dysenterica* DC. da família Myrtaceae, conhecida como cagaita ou cagaiteira; *Butia capitata* (Mart.) Bécc. var. *capitata* Bécc. da família Arecaceae, conhecido como coquinho-azedo, coqueiro cabeçudo, cabeçudo, coco-azedinho ou butiá e *Annona crassiflora* Mart. da família Annonaceae, conhecida por araticum, marolo, coração-de-boi ou panã. (40)

1.5.1 Cagaita

A família Myrtaceae é uma importante família composta por 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, dentre elas, algumas plantas bem conhecidas por possuírem atividade específica na cultura popular, como o eucalipto (*Eucalyptus globulus*); o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*); a goiabeira (*Psidium guajava*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*), dentro dessa família estão também a cagaiteira (*Eugenia dysenterica*). (41)

A cagaiteira é tradicionalmente conhecida por seus frutos que possuem ação laxativa e suas folhas, que antagonicamente, possuem ação antidiarreica. As folhas, além do efeito antidiarreico, e a casca são utilizadas popularmente contra diabetes e icterícia. Também é considerada uma das corticeiras do Cerrado. Foi verificado que o óleo essencial das folhas possui atividade antifúngica e foi constatada atividade alelopática em extratos aquosos das folhas. (42,43,44)

A polpa da cagaita apresenta grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados (linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3)) e concentração de Vitamina C superior a concentrações encontradas na banana e na maçã. É uma fonte de folatos

e uma pequena fonte de pró-vitamina A, devido à baixa concentração de carotenoides. (11,45)

O fruto de *E. dysenterica* é ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Foto ilustrativa do fruto inteiro de cagaita.

Fonte: CARDOSO, L. D. M. et al. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, 44, p. 2152, 2010. (11)

1.5.2 Coquinho-azedo

A família Arecaceae, antigamente denominada Palmae, é a família das palmeiras, possui grande destaque por conter algumas espécies bem conhecidas, a principal delas é o açaí (*Euterpe oleracea*), dentre as outras estão: o buriti (*Mauritia flexuosa*); a guariroba (*Syagrus oleracea*); o murmurú (*Astrocaryum ulei*); a pupunheira (*Bactris gasipaes*); a bacabinha (*Oenocarpus minor*); o tucumã (*Astrocaryum tucuma*); o jerivá (*Syagrus romanzoffiana*); a juçara (*Euterpe edulis*) e os butiás (*Butia* spp.), dentre eles o coquinho-azedo (*Butia capitata*). (46)

A polpa de coquinho-azedo, comparada a frutas tropicais normalmente consumidas apresenta elevados teores de gordura, fibra dietética, pró-vitamina A (carotenoides), vitamina C, compostos fenólicos, e sais de potássio. (47)

A Figura 3 ilustra os frutos da *B. capitata*.

Figura 3 – Foto ilustrativa do fruto inteiro de coquinho-azedo.

Fonte: Autoria própria.

1.5.3 Panã

A família Annonaceae possui grande variedade de frutas exóticas com formato típico, como a fruta-do-conde (*Annona squamosa*), a graviola (*Annona muricata*) e a panã (*Annona crassiflora*). (48)

A. crassiflora, panã, destaca-se pelo sabor de seus frutos, sendo utilizada na medicina alternativa por suas propriedades antifúngica e antibacteriana. Suas sementes são utilizadas, tradicionalmente, no tratamento de picadas de cobra, e também há relatos de sua atividade alelopática contra ervas daninhas. (49,50,51)

A polpa de *A. crassiflora* é reportada como sendo rica em carotenoides, polifenóis, tocoferóis, flavonoides, vitaminas e minerais. (52)

A Figura 4 ilustra o fruto da *A. crassiflora*.

Figura 4 – Foto ilustrativa do fruto inteiro e partido de panã.

Fonte: CARDOSO, L. D. M. et al. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, 68, p. 127, 2013. (53)

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais foram avaliar a atividade antioxidante de polpas de três frutas típicas do Cerrado brasileiro: a cagaita, o coquinho-azedo e a panã.

Objetivos específicos:

- 1) Seleção de frutas do Cerrado com potencial aplicação como alimento funcional;
- 2) Dosagem do teor de compostos bioativos: fenóis totais, incluindo flavonoides, taninos, antocianinas, glicídios e ácido ascórbico;
- 3) Determinação da atividade antioxidante dos extratos aquosos e hidroalcoólicos, frente ao radical 1-hidroxietila e frente a espécies de ferro hipervalente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Catalase de fígado bovino, mioglobina de coração de cavalo (pureza < 90 %) e α -4-piridil-1-óxido-N-tert-butilnitrona foram obtidas da Sigma-Aldrich. O reagente de Folin Ciocalteu, solução de iodo 0,1 N, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido clorídrico, cloreto férrico e peróxido de hidrogênio de grau analítico foram obtidos da Merck; o metanol e a acetonitrila de grau HPLC foram obtidos da Merck e utilizados sem prévio tratamento. O carbonato de sódio, ácido acético, ácido sulfúrico, amido, cloreto de alumínio, fenol, tungstato de sódio dihidratado, ácido fosfomolibdico, de grau analítico foram obtidos da Synth. Os sais NaCl, K₂HPO₄ e KH₂PO₄ (grau analítico) e o etanol (grau HPLC) foram obtidos da J.T. Baker. Os padrões primários de quercetina, glicose e ácido tânico foram obtidos da Farmacopeia Americana (USP) e o ácido gálico foi obtido da Chromadex. A água de alta pureza utilizada (18,2 M Ω cm⁻¹) foi primeiramente destilada e deionizada em sistema Milli-Q (Millipore) ou USF (Elga Analítica).

3.2 Equipamentos

- Cromatógrafo de ultraeficiência, modelo UPLC Acella Thermo Scientific acoplado a espectrômetro de massas de ultra-alta resolução LTQ – Orbitrap Velos Thermo Scientific Mass Spectrometer.

- Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico; espectrofotômetro Hitach, modelo U-350, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm com 2 compartimentos, no qual os experimentos foram realizados com temperatura controlada por banho termostático da Nova Ética, modelo 521/3D, e exatidão de 0,1 °C, espectrofotômetro de leitor de placas Thermo Scientific, modelo Multiskan GO.

- Espectrômetro de ressonância paramagnética de elétrons Bruker Biospin GmbH, modelo EMX plus operando na banda-X, com controle de temperatura (298 K), utilizando capilar de quartzo de 1 mm de diâmetro interno.

3.3 Seleção das frutas e produção dos extratos

Foi realizada uma prévia avaliação entre 10 polpas comerciais de frutas exóticas brasileiras. Nessa avaliação foi considerado como critério de seleção o teor de fenóis totais calculados como equivalente em ácido gálico (Método de Folin Ciocalteu) e as características sensoriais, objetivando o potencial comercial das polpas. Os dados avaliados são exibidos no Anexo A.

As polpas comerciais selecionadas (a cagaita, o coquinho-azedo e a panã) foram obtidas na forma congelada. A polpa de panã foi obtida da empresa Sítio do Bello Frutas Nativas, localizada em Paraibuna (São Paulo – BR). As polpas de cagaita e coquinho foram produzidas pela Cooperativa dos Agricultores Familiares e Agroextrativistas Grande Sertão Ltda., localizada em Montes Claros (Minas Gerais – BR). As polpas, após serem adquiridas, foram liofilizadas e estocadas a temperatura ambiente até análise.

Como critério de comparação foi produzido *in house* um extrato aquoso a partir de frutos frescos de coquinho-azedo, obtidos na cidade de Salto de Pirapora (São Paulo – BR). Os frutos foram lavados em água corrente, e com auxílio de um agitador vertical, ficaram sob agitação com água até despulparem e foram posteriormente filtrados. O extrato foi concentrado em concentrador industrial a vácuo (Bernauer, com capacidade de 50 L), a temperatura de 65° C ($\pm$ 5° C). O concentrado foi então liofilizado e estocado a temperatura ambiente até análise.

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados por dissolução das polpas liofilizadas com solução hidroalcoólica (etanol: água 1:1, v/v) através de agitação. A parte insolúvel foi retirada por filtração e foram utilizados nas análises os extratos na forma de solução na ausência de material particulado.

3.4 Análises dos extratos

3.4.1 Caracterização físico-química das polpas liofilizadas

Após a obtenção das polpas liofilizadas foi iniciada a análise da composição química em termos do teor de fenóis totais, incluindo flavonoides, taninos, antocianinas, glicídios e ácido ascórbico. Adicionalmente, foi realizada a avaliação do perfil químico das amostras por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

O teor de umidade foi determinado em todas as polpas pela perda de massa por dessecação a temperatura de 105 °C, até massa constante, em pesa filtro de vidro em estufa de secagem.

3.4.1.1 *Teor de fenóis totais*

A determinação dos fenóis totais, calculados como equivalente de ácido gálico, foi realizada pelo método de Folin Ciocalteu. O método de Folin Ciocalteu utiliza, como reagente, uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6. O método então se baseia pela redução dos íons complexos de Mo e W pelos compostos fenólicos, que são no caso, os agentes redutores, produzindo os chamados azul de molibdênio e azul de tungstênio, nos quais a média do estado de oxidação dos íons metálicos está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras via espectrofotometria de absorção no UV-vis. A Figura 5 ilustra a reação em questão. (54)

Figura 5 – Ilustração da reação do ácido gálico com o íon de molibdênio(VI), do reagente de Folin Ciocalteu.

Fonte: DE OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 697, 2009. (55)

O ensaio consiste na adição de 5 mL do Reagente de Folin Ciocalteu: H_2O (1:2, v/v) em um balão volumétrico de 100 mL com 50 mL de água e 5 mL de solução do extrato (preparada com 0,5 g da polpa liofilizada em 100 mL de água destilada, dissolvido por aquecimento por 2 h a 60 °C), adicionando-se posteriormente 10 mL de carbonato de sódio 20% (m/v) e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume do balão. Após 30 min de reação, é realizada a medição da absorbância em 700 nm, utilizando solução com o mesmo preparo, sem adição da amostra como referência. O cálculo do teor de fenóis totais, em equivalentes de ácido gálico, é efetuado utilizando a absorbância da amostra em 700 nm e uma solução de calibração construída com padrão analítico de ácido gálico, na faixa de concentração de 1 a 9 mg L^{-1} . (56)

3.4.1.2 Teor de flavonoides totais

A análise de flavonoides totais, calculados em equivalentes de quercetina, foi realizada por complexação seletiva com íons de alumínio. Neste método, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em meio de metanol, promovendo um deslocamento da banda referente à transição $\pi\text{-}\pi^*$ do espectro

eletrônica de absorção do flavonoide para região de menor energia. A Figura 6 ilustra a reação. O método consiste na extração da amostra em metanol (0,4 g da polpa liofilizada em 25 mL de metanol) com aquecimento a 45 °C por 40 min, adição de 5 mL dessa solução em outro balão volumétrico de 25 mL, onde são adicionados 0,5 mL de cloreto de alumínio 2 % (m/v) em metanol. O volume é aferido com metanol, e a leitura da absorbância da amostra em realizada em 425 nm após 30 min de reação. O teor de flavonoides totais é então obtido através de uma curva de calibração externa construída com padrão analítico de quercetina, na concentração de 2 a 10 mg L⁻¹. (57)

Figura 6 – Formação do íon complexo flavonoide-Al(III), em solução metanólica de cloreto de alumínio. Exemplo: A é complexo morina-Al(III) (1:1) e B é complexo quercetina-Al(III) (1:2).

Fonte: GUTIERREZ, A. C.; GEHLEN, M. H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al³⁺. **Spectrochimica Acta Part A**, n. 58, p. 89, 2002. (58)

3.4.1.3 Teor de taninos totais

A análise de taninos totais em termos de equivalentes de ácido tânico foi realizada através do método de Folin Denis. O método de Folin Denis é muito similar ao método de fenóis totais, descrito anteriormente, as diferenças são: o reagente utilizado é o de Folin Denis (preparado com 50 g de tungstato de sódio dihidratado, 10 g de ácido fosfomolibdico, 25 mL de ácido fosfórico e água destilada em

quantidade suficiente para completar o volume em balão de 500 mL, aquecimento da solução por 2 h a 100 °C). Utiliza-se uma solução de carbonato de sódio saturada (35 %, m/v) e a leitura de absorbância é realizada em 630 nm. Neste caso, utiliza-se o ácido tânico para construção da curva de calibração externa. (59)

O teor de taninos totais foi também realizado pelo método de fenóis não adsorvidos por pó de pele. O pó de pele é obtido a partir de peles *in natura*, que depois de lavadas e cortadas são descarnadas e divididas em pedaços menores que 1,5 mm de espessura. Depois são lavadas novamente com água destilada, levemente curtidas com solução de cromo trivalente por algumas horas a temperaturas amenas ou não-curtidas, são então secas, cortadas em pedaços menores e moídas em um pó fino e volumoso. (60)

As amostras dos extratos foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: as polpas foram extraídas em água a 60°C por 2 h, e os extratos hidroalcoólicos foram apenas diluídos em água destilada. Primeiramente foi avaliado o teor de fenóis totais, no qual uma alíquota de 2 mL da solução amostra foi adicionada em balão volumétrico de 25 mL juntamente com 10 mL de água, a reação ocorreu com a adição de 1 mL do reagente Folin Ciocalteu e carbonato de sódio (10,7 %; m/v) em quantidade suficiente para completar o volume do balão. A leitura da absorbância foi realizada em 760 nm após 30 min de reação.

O teor de taninos é então determinado pela diferença de concentração de fenóis totais subtraindo-se o teor de fenóis não adsorvidos pelo pó de pele. Para determinar a concentração dos fenóis não adsorvidos pelo pó de pele, 10 mL da solução da amostra é agitada por 1 h com 0,1 g de pó de pele e depois filtrada, uma alíquota do filtrado é utilizada para reação conforme o procedimento descrito acima. Para a quantificação, foi feita uma curva de calibração externa com ácido tânico na faixa de 1 a 9 mg L⁻¹.

A Figura 7 ilustra esquematicamente a complexação dos taninos com as proteínas do pó de pele.

Figura 7 – Formação do complexo tanino-proteína, onde R representa a molécula de tanino, no exemplo, ácido tânico.

Fonte: EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8140, 2010. (61)

3.4.1.4 Teor de glicídios totais

O teor de glicídios totais foi determinado utilizando-se o método de fenol-ácido sulfúrico. As amostras foram extraídas por aquecimento a 60 °C por 2 h e filtradas. Uma alíquota de 1 mL de cada solução foi transferida a um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL da solução de Fenol a 5% (m/v) e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura resultante foi agitada e após 30 min de reação foi realizada a leitura da absorbância a 490 nm. A quantificação foi realizada com uma curva de calibração externa, utilizando a glicose como padrão analítico, na faixa de concentração de 10 a 60 mg L⁻¹. (62)

O método consiste na forte coloração gerada por produtos de degradação da glicose em meio fortemente ácido e a compostos poliaromáticos; porém a estrutura química dos derivados formados permanece ainda pouco explorada. A Figura 8 ilustra o mecanismo proposto por Soares (2009) para desenvolvimento da cor no método fenol-ácido sulfúrico. (63)

Figura 8 – Proposta do mecanismo químico da reação colorimétrica para pentoses (xilose) – Figura A e para hexoses (galactose) – Figura B.

Fonte: SOARES, C. M. **Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 60, 2009. (63)

3.4.1.5 Teor de antocianinas totais

O método para quantificação espectrofotométrica de antocianinas em equivalentes cianidina-3-glicosídeo consistiu na adição de 95 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 % (v/v) em 3 g de polpa liofilizada, após banho ultrassônico de 30 min, a amostra foi filtrada para balão volumétrico de 100 mL e o volume aferido com a mesma solução. Uma alíquota de 10 mL da solução resultante foi transferida para um balão de 50 mL e o volume completado com solução de ácido clorídrico 0,1 % (v/v) em metanol. A absorbância foi registrada em 528 nm. A curva de calibração externa foi construída com padrão analítico de cianidina-3-glicosídeo.

O método de análise consiste no fato de que em soluções aquosas, as antocianinas apresentam diferentes estruturas em função do pH da solução. De modo geral, em meio extremamente ácido, as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico. Com

aumento do pH a estrutura vai se alterando para uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (praticamente incolor). Em valores de pH acima de 6, tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinoidais podem formar a espécie *cis*-chalcona. A formação desta ocorre com a ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. Com a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas *cis* e *trans*, apresentando coloração amarelada. A Figura 9 ilustra as principais estruturas das antocianinas em função do pH do meio. (64,65)

Figura 9 – Estrutura química das antocianinas formadas em função do pH, em meio aquoso.

Fonte: MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008. (65)

3.4.1.6 Teor de ácido ascórbico

A determinação do teor de ácido ascórbico (vitamina C) foi realizada por método titulométrico baseado na reação entre o ácido ascórbico, amido e o iodo (referência (66) com alterações). Para tanto, foi transferido 0,5 g de cada amostra de

polpa liofilizada para um erlenmeyer, foram adicionados 100 mL de água e deixado em banho ultrassônico por 30 min, foi então adicionado 10 mL de solução de ácido acético 10 % (v/v) e 5 mL de solução indicadora de amido 5 % (m/v). A solução contendo o extrato foi titulada com solução de iodo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para o cálculo foi utilizada a relação: cada mL de iodo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ é equivalente a 8,806 mg de ácido ascórbico. Como a titulação ocorre em meio ácido, o equilíbrio da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico é deslocado no sentido da formação da vitamina C, o que diminui a oxidação pelo oxigênio do ar durante o processo (reação ilustrada na Figura 10).

Figura 10 – Ilustração da reação da oxidação do ácido ascórbico.

Fonte: TANAKA, D. L. **Influência da desidratação por spray drying sobre o teor ácido ascórbico no suco de acerola (*Malpighia spp*)**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Professor Júlio De Mesquita Filho". Araraquara, p.13, 2007. (67)

3.4.1.7 Avaliação do perfil químico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

O perfil químico dos extratos hidroalcoólicos foi avaliado por cromatografia de ultraeficiência, utilizando como detector espectrômetro de massas, a ionização foi por ESI com detecção em modo negativo. A coluna utilizada foi uma Hypersil Gold, C18 (dimensões: 50 x 2 mm; tamanho de partícula de 1,9 μm), fluxo da fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção foi de 10 μL . A fase móvel consiste em gradiente de água (A) e metanol (B). O gradiente utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições do gradiente utilizado na eluição.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	97,0	3,0
1,4	91,0	9,0
4,0	84,0	16,0
15,0	50,0	50,0
15,5	3,0	97,0
18,0	3,0	97,0
19,0	97,0	3,0
21,0	97,0	3,0

3.4.2 Avaliação da atividade e capacidade antioxidante

3.4.2.1 *Reatividade frente ao radical 1-hidroxietila*

O radical 1-hidroxietila (HER) é formado na reação de Fenton na presença de 2 mol L^{-1} de etanol. O radical HER por sua vez é aprisionado pela armadilha química, α -4-piridil- -tert-butilnitrona N-óxido (4-POBN), de acordo com a Figura 11.

Figura 11 – Reação de formação do aduto de spin radical (4-POBN/CH(CH₃)OH)•.

Fonte: DE ALMEIDA, N. E. C. et al. Reactivity of beer bitter acids toward the 1-hydroxyethyl radical as probed by spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR) and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 59, p. 4186, 2011. (68)

A abordagem utilizada para estimar as constantes de velocidade de segunda ordem de captação do radical 1-hidroxietila foi à cinética de competição. O 4-POBN

competem com os compostos de interesse pela captação do radical 1-hidroxietila. O método consistiu em seguir a cinética de competição: volumes diferentes da solução das amostras foram adicionados a 60 µL de solução aquosa de cloreto férrico (II), $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, levemente acidificada (pH 4) e 1 mL de uma solução de 4-POBN ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a 6% de etanol (1 mol L^{-1}). Após desgaseificação do meio reacional com argônio, adicionou-se 60 µL solução de H_2O_2 30% ($5,9 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi monitorada pela formação do aduto radical $(4\text{-POBN/CH}(\text{CH}_3)\text{OH})^\bullet$ após decorrido 1 minuto da adição do peróxido de hidrogênio. As soluções utilizadas dos extratos foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: as polpas liofilizadas foram extraídas em água a 60°C por 2 h, e os extratos hidroalcoólicos foram apenas adequadamente diluídos em água ultrapurificada. (69)

É interessante ressaltar que o aduto radical $(4\text{-POBN/CH}(\text{CH}_3)\text{OH})^\bullet$, foi monitorado por espectrômetro de ressonância paramagnética de elétrons (RPE). Os parâmetros instrumentais utilizados no RPE foram: campo magnético central: 3.378 G; varredura de 100 G; frequência de MW: ~9,53 GHz; atenuação de potência: 23 dB (1 mW); modulação da frequência: 100 KHz; modulação da amplitude: 1 G, constante de tempo 64 s e tempo de conversão de 64 s. (69)

3.4.2.2 Cinética de desativação da ferrilmioglobina

A cinética de desativação da ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O) foi acompanhada espectrofotometricamente. Primeiramente foi preparada uma solução do pigmento hipervalente MbFe(IV)=O , ferrilmioglobina. O método consistiu no preparo de uma solução $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ da proteína metamioglobina (MbFe(III)) em tampão fosfato $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com pH 7,4 e força iônica 0,32 ajustada com NaCl, a qual foi submetida a purificação em coluna recheada com Sephadex G-25 de dimensões 5 x 1 cm. Após o procedimento de purificação, a concentração analítica de MbFe(III) foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{525\text{nm}} = 7,70 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O pigmento hipervalente, MbFe(IV)=O , foi então gerado por oxidação da metamioglobina (MbFe(III)) com peróxido de hidrogênio em excesso (1:3) e a reação de oxidação foi terminada após 3 minutos com a adição de 10 µL de uma solução contendo 47,4

mg mL⁻¹ de catalase. A concentração da ferrilmioglobina foi calculada espectrofotometricamente segundo a Equação 1, a seguir:

(Equação 1)

$$[\text{MbFe(IV)=O}] = -62(A_{490\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + 242(A_{650\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) - 123(A_{580\text{nm}} - A_{700\text{nm}})$$

Onde: [MbFe(IV)=O] é a concentração da ferrilmioglobina em $\mu\text{mol L}^{-1}$, $A_{490\text{nm}}$ é a absorbância da solução registrada em 490 nm, $A_{700\text{nm}}$ é a absorbância em 700 nm, $A_{650\text{nm}}$ é a absorbância em 650 nm e $A_{580\text{nm}}$ é a absorbância em 580 nm.

Durante a cinética de desativação da ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O), o decaimento da espécie ferrilmioglobina foi monitorado em 580 nm, na presença de crescentes concentrações da solução dos extratos para obtenção das constantes observadas de pseudoprimeira ordem (k_{obs}), as soluções utilizadas dos extratos foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: as polpas liofilizadas foram extraídas em água a 60°C por 2 h, e os extratos hidroalcoólicos foram apenas adequadamente diluídos em água ultrapurificada. (38)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química das polpas liofilizadas

A Tabela 3 apresenta a quantidade obtida de polpa e a massa da polpa liofilizada com os respectivos teores de umidade, para cada fruta investigada. A amostra de coquinho-azedo 1 é a amostra preparada *in house*, 2 e 3 são as polpas comerciais liofilizadas.

Tabela 3 – Quantidades obtidas de polpas liofilizadas e as respectivas umidades, para cada fruta investigada.

	Quantidade de Polpa (g)	Quantidade de Polpa Seca (g)	Umidade (%)
Cagaita 1	500	34,7	10,3
Cagaita 2	400	4,7**	13,6
Coquinho-azedo 1	*	63,3	6,1
Coquinho-azedo 2	400	39,1	5,9
Coquinho-azedo 3	400	39,9	6,6
Panã 1	400	109	9,2
Panã 2	400	83,7	3,6

*Produzido a partir de 700 g de fruta fresca.

**Ocorreu perda de massa durante a etapa de liofilização.

A Tabela 4 sumariza os dados coletados para os teores de fenóis totais, taninos totais, glicídios totais e de ácido ascórbico para cada liofilizado de polpa de fruta investigado.

Tabela 4 – Concentração em percentagem (m/m) de fenóis totais, taninos totais, glicídios totais e de ácido ascórbico nas polpas avaliadas.

	Fenóis Totais (%)	Taninos Totais – Folin Denis (%)	Taninos Totais – pó de pele (%)	Glicídios Totais (%)	Ácido Ascórbico (%)
Cagaita 1	3,77	2,43	1,68	57,7	1,00
Cagaita 2	2,62	2,56	1,08	62,3	0,80
Coquinho-azedo 1	0,92	0,88	0,26	76,0	0,35
Coquinho-azedo 2	1,74	1,70	0,50	29,6	0,37
Coquinho-azedo 3	1,69	1,69	0,37	28,2	0,54
Panã 1	3,07	3,10	1,26	50,4	0,55
Panã 2	0,63	0,57	0,70	49,6	0,81

Nas polpas analisadas não foram detectadas as presenças de antocianinas e flavonoides, limite de detecção de 0,05 mg L⁻¹ e 0,04 mg L⁻¹ respectivamente.

Ao avaliar os resultados de taninos totais obtidos pelo método de Folin Denis, observa-se que os valores são muito próximos aos valores de fenóis totais. Isto se deve em grande parte pela pouca seletividade do método empregado, fato este que demonstra que para taninos o método de Folin Denis é inadequado.

Foram calculadas as médias e os desvios padrão relativo (DPR) dos teores dos fenóis totais, taninos totais, glicídios totais e de ácido ascórbico para cada espécie de fruta, considerando as duas amostras de cada, sendo que cada uma foi analisada em duplicata: para o teor de fenóis totais a média da cagaita é 2,64% (DPR: 3,4%); o coquinho-azedo (apenas amostras 2 e 3 – devido a mesma origem) é 1,72% (DPR: 2,7%); e a panã é 1,85% (DPR: 76%); para o teor de taninos totais (pelo método do pó de pele) a média da cagaita é 1,38% (DPR: 25%); do coquinho-azedo é 0,44% (DPR: 18%); e da panã é 0,98% (DPR: 34%); para o teor de glicídios totais a média da cagaita é 64,1% (DPR: 7,1%); do coquinho-azedo é 29% (DPR: 4,6%); e da panã é 50,3% (DPR: 5,2%) e para o teor de ácido ascórbico a média da cagaita é 0,98% (DPR: 12%); do coquinho-azedo é 0,46% (DPR: 22%); e da panã é 0,68% (DPR: 22%).

Em linhas gerais observa-se uma baixa variabilidade dos teores dos analitos investigados em função da sazonalidade da coleta, as pequenas variabilidades observadas entre as polpas da mesma fruta podem ser relacionadas a fatores pedoclimáticos, com exceção das amostras de panã que apresentam uma grande variabilidade entre as diferentes amostras no teor de fenóis totais, taninos e ácido ascórbico, e amostra de coquinho azedo 1, que apresenta um elevado teor de glicídios totais (76%) com relação às amostras de coquinho-azedo 2 e 3 (aproximadamente 29%), fato este possivelmente relacionado ao procedimento de preparo da polpa, onde o preparo *in house* da polpa 1 pode ter proporcionado uma menor quantidade de material celulósico (fibras) com relação ao processo industrial.

Os resultados obtidos para o teor de taninos totais, empregando-se a complexação dos taninos com pó de pele, apresentam-se significativamente inferiores ao teor de fenóis totais. Observa-se pela Tabela 4 que o teor de taninos representa ao redor de 33% do teor de fenóis totais. A polpa de panã, no entanto, apresenta uma maior proporção de taninos, 76% do total de compostos fenólicos.

O teor de ácido ascórbico, apesar da variabilidade, apresenta-se na mesma ordem de grandeza para as polpas investigadas, as polpas de cagaita apresentam em média o dobro do teor de ácido ascórbico em comparação às amostras de coquinho-azedo e panã.

Avaliando todas as frutas investigadas, a amostra com maior teor de fenóis totais, taninos totais e de ácido ascórbico foi a cagaita, com 3,2% de fenóis, 1,4% de taninos totais e 0,9% de ácido ascórbico respectivamente. As amostras de panã e de coquinho-azedo apresentam teores similares de fenóis totais, taninos totais, ácido ascórbico e glicídios totais.

O perfil químico qualitativo das amostras de extratos de frutas, analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas está descrito na Tabela 5. Observa-se que os compostos detectados foram positivamente identificados com acuracidade de massa abaixo de 5 ppm.

Os principais compostos identificados foram: monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos, ácido ascórbico, quercetina, ácido gálico, ácido málico, ácido cumárico, ácido ferúlico e o ácido elágico.

Nas amostras de coquinho-azedo e panã foram identificados todos os compostos citados acima, exceto o ácido elágico e o ácido gálico. Na amostra 1 da cagaita foram identificados todos os compostos citados e na amostra 2, apenas os ácido cumárico e o ácido ferúlico não foram detectados.

Tabela 5 – Compostos identificados nas amostras através da espectrometria de massas de alta resolução e os respectivos desvios da massa molecular encontrada e teórica, expressos em ppm.

Compostos	Massa exata		Cagaita 1	Cagaita 2	Coquinho-azedo 1	Coquinho-azedo 2	Coquinho-azedo 3	Panã 1	Panã 2
	teórica	(Dalton)							
Monossacarídeo (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,1559		0,57	0,23	0,57	0,14	0,06	0,06	0,48
Dissacarídeo (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	342,2965		1,11	0,04	0,31	1,20	0,62	-1,21	-1,12
Trissacarídeo (C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆)	504,4371		0,52	- 0,45	- 0,45	- 0,15	0,94	-0,39	0,33
Ácido ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	176,1259		4,27	3,66	3,66	0,96	3,48	2,44	3,60
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	302,2357		2,31	2,62	2,41	2,31	2,91	2,21	3,02
Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)	170,1195		2,29	3,55	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido málico (C ₄ H ₆ O ₅)	134,0874		0,39	0,04	0,27	0,50	0,50	0,84	0,15
Ácido cumárico (C ₉ H ₈ O ₃)	164,1580		3,57	ND	3,10	0,11	0,86	3,75	3,10
Ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)	194,1840		3,30	ND	4,01	2,51	3,53	2,26	3,46
Ácido elágico (C ₁₄ H ₆ O ₈)	302,1926		1,73	2,23	ND	ND	ND	ND	ND

ND – Não detectado

As Figuras 12 a 21 ilustram os espectros de massa obtidos para cada substância.

Figura 12 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 179,1479) que correspondem à presença de monossacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 13 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 341,2885) que correspondem à presença de dissacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 14 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 503,4291) que correspondem à presença de trissacarídeo. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 15 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 175,1162) que correspondem à presença de ácido ascórbico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 16 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 301,2278) que correspondem à presença de quercetina. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 17 – Cromatograma de íon extraído (m/z 169,1116) que corresponde à presença de ácido gálico, da amostra de cagaita.

Figura 18 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 133,0795) que correspondem à presença de ácido málico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 19 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 163,1501) que correspondem à presença de ácido cumárico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 20 – Cromatogramas de íon extraído (m/z 193,1761) que correspondem à presença de ácido ferúlico. A) corresponde a amostra de cagaita, B) amostra de coquinho-azedo e C) amostra de panã.

Figura 21 – Cromatograma de íon extraído (m/z 301,1847) que corresponde à presença de ácido elágico, da amostra de cagaita.

4.2 Resultados da reatividade dos extratos de frutas do Cerrado frente ao radical 1-hidroxietila

Um dos métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante dos extratos das frutas foi a reatividade frente ao radical 1-hidroxietila. Este método consiste na cinética de competição pelo radical 1-hidroxietila entre os compostos bioativos e a armadilha química 4-POBN.

A Figura 22 ilustra o espectro de RPE com crescentes concentrações de extrato, exemplificado pela amostra de cagaita nas concentrações de $2,15 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$, $2,48 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ e $3,46 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$. É possível observar a redução da intensidade do sinal referente ao aduto de spin 4-POBN-HER radical proporcionalmente ao aumento da concentração adicionada de extrato.

Figura 22 – Espectros de ressonância paramagnética de elétrons do aduto radical 4-POBN-HER decorrente das reações: controle (em azul), e amostras de cagaita nas concentrações $2,15 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em laranja), $2,48 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em vermelho) e $3,46 \times 10^5 \text{ mol}_{\text{fenóis}} \text{ L}^{-1}$ (em roxo).

Pela variação da área do duplete central de transição dos espectros de ressonância paramagnética de elétrons é possível obter um gráfico que relaciona a redução da área do duplete central e a concentração da amostra adicionada. Através da abordagem de cinética de competição, o gráfico da Figura 23 proporciona a constante aparente da reação pela Equação 2:

(Equação 2)

$$\left(\frac{F}{1-F}\right) \times k_2 \times [4\text{POBN}] = k_2' \times [\text{Fenóis}]$$

Na equação acima, F representa o percentual de captação do radical pelos antioxidantes dos extratos, k_2 representa a constante de velocidade específica da reação entre o radical e o 4-POBN, [4POBN] consiste na concentração da armadilha química, k_2' é a constante de velocidade aparente da reação do radical e os antioxidantes do extrato, [Fenóis] representa a concentração de fenóis totais expressos em termos de equivalentes de ácido gálico. O valor utilizado para k_2 foi de $3,1 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (69)

Figura 23 – Gráfico obtido pela cinética de competição para a amostra de cagaita, a concentração da amostra é dado em g L^{-1} .

Pelo gráfico da Figura 23 obtém-se que a constante de velocidade aparente da reação do radical para o extrato de cagaita foi de $1,44 \cdot 10^4 \text{ L g}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

As amostras de coquinho-azedo 1 e 2 foram analisadas apenas como extrato hidroalcoólico, os extratos aquosos precipitaram no meio reacional, provavelmente pela concentração de glicídios, que são insolúveis em meio etanólico, a amostra panã 2 foi também analisada apenas como extrato hidroalcoólico. A amostra coquinho-azedo 3 foi analisada somente como extrato aquoso e as amostras panã 1 e cagaita 1 foram analisadas nas duas formas de extrato, aquoso e hidroalcoólico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores da constante de velocidade aparente da reação dos extratos com o radical 1-hidroxietila calculada com a concentração em massa do extrato e pela concentração molar de fenóis (equivalentes em ácido gálico).

	Constante de velocidade	
	$\text{L g}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\text{L mol}_{\text{fenóis}}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Coquinho-azedo 1 hidroalcoólico	$2,8 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^9$
Coquinho - azedo 2 hidroalcoólico	$1,1 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^8$
Coquinho - azedo 3	$1,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^8$
Panã 1	Pró-oxidante	
Panã 1 hidroalcoólico	Pró-oxidante	
Panã 2 hidroalcoólico	$1,7 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^8$
Cagaita 1	$2,3 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^8$
Cagaita 1 hidroalcoólico	$1,1 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^9$

De maneira geral, observa-se que os extratos das polpas de frutas investigadas reagem com alta constante de velocidade da ordem de $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em termos de fenóis totais. Esta elevada atividade antioxidante é superior à reatividade de lipídios insaturados com o radical 1-hidroxietila ($k \approx 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o ácido linoleico). Desta forma, pode-se assumir que tais extratos de polpa de fruta

apresentam atividade antioxidante e podem proteger estruturas sensíveis à oxidação em meio biológico e alimentos.

A exceção observada, é para a polpa de panã 1, nesse caso observa-se uma atividade pró-oxidante na geração de radicais em um sistema do tipo Fenton. Uma provável explicação para este fato pode estar relacionado ao maior teor de fenóis totais neste extrato, os quais podem atuar como redutores de íons de Fe(III) catalisando a reação de Fenton, ou então ao elevado teor de ácido ascórbico, conforme a reação exemplificada a seguir:

4.3 Resultados da cinética de desativação da ferrilmioglobina

O outro método utilizado, para avaliar a atividade antioxidante das polpas das frutas, foi a cinética de redução da ferrilmioglobina. A concentração da metamioglobina é calculada espectrometricamente em 525 nm, após a oxidação com peróxido de hidrogênio é formada a espécie perferrilmioglobina que decai naturalmente a espécie ferrilmioglobina, esta última estável por horas. A Figura 24 ilustra o espectro eletrônico de absorção da metamioglobina, na concentração de $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e da ferrilmioglobina, na concentração $8,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com pH 7,4 e força iônica 0,32 ajustada com NaCl. É possível visualizar as bandas características dos dois diferentes estados de oxidação.

Figura 24 – Espectros de absorção de UV da metamioglobina (MbFe(III)) e ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O).

A reação foi monitorada com quatro diferentes concentrações de cada extrato de amostra de fruta, para elaboração de uma curva de decaimento em função da concentração do extrato, as curvas foram feitas em duplicata para cada amostra. O monitoramento do decaimento da banda de absorção em 580 nm (referente à ferrilmioglobina) aumenta linearmente com o aumento da concentração do redutor, que no caso são as soluções de extrato de fruta. Na Figura 25, está exemplificada uma curva de decaimento obtida, com uma amostra de coquinho-azedo, foram utilizadas quatro concentrações do extrato, as concentrações de fenóis totais expressos em ácido gálico obtidas no meio reacional foram: $1,40 \cdot 10^{-4}$ (Conc. 1), $1,68 \cdot 10^{-4}$ (Conc. 2), $1,96 \cdot 10^{-4}$ (Conc. 3) e $2,25 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Conc. 4).

Figura 25 – Curvas de decaimento da banda de absorção em 580 nm, em quatro diferentes concentrações de uma amostra de coquinho-azedo.

Através das curvas de decaimento obtidas é calculada a constante de velocidade observada, através do método de ajuste não linear, pela Equação 3 a seguir:

(Equação 3)

$$y = A_0 e^{-k_{obs}x} + C$$

Onde y é variável dependente do tempo t em s, A_0 é a absorbância inicial referente a concentração da espécie ferrilmioglobina, k_{obs} é a constante de velocidade observada para a redução da espécie ferrilmioglobina, x é variável independente tempo (t) e C é a absorbância no infinito para a reação.

A constante de velocidade bimolecular é o coeficiente angular da reta do gráfico de k_{obs} versus concentração do extrato (mol L^{-1}), para avaliação, foram feitas as retas baseadas nas concentrações de fenóis totais expressos em ácido gálico e ácido ascórbico. O gráfico apresentado na Figura 26 ilustra a reta obtida para o

coquinho-azedo, neste exemplo a constante de velocidade obtida foi $2,07 \cdot 10^1$ $\text{L mol}_{\text{fenóis}}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Figura 26 – Gráfico de k_{obs} versus concentração de fenóis totais expressos em ácido gálico do extrato de coquinho-azedo (amostra hidroalcoólica).

As amostras de coquinho-azedo 1 e 2, panã 1 e cagaita foram analisadas como extratos aquosos e hidroalcoólicos, para as amostras coquinho-azedo 3, panã 2 e cagaita 2 foram analisadas somente o extrato aquoso. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores da constante da cinética de redução da ferrilmioglobina calculada com a concentração em massa do extrato e pelas concentrações molares de fenóis (equivalente em ácido gálico) e ácido ascórbico.

(continua)

	Constante $k_{25^\circ\text{C}}$		
	$\text{L g}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{L mol fenóis}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{L mol ác. ascórbico}^{-1} \text{s}^{-1}$
Coquinho-azedo 1	$3,65 \cdot 10^{-4}$	6,92	$1,95 \cdot 10^1$
Coquinho-azedo 1 hidroalcoólico	$7,30 \cdot 10^{-4}$	$2,44 \cdot 10^1$	$3,93 \cdot 10^1$
Coquinho-azedo 2	$3,04 \cdot 10^{-3}$	$8,47 \cdot 10^1$	$1,53 \cdot 10^2$

(conclusão)

	Constante $k_{25^{\circ}\text{C}}$		
	$\text{L g}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{L mol fenóis}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{L mol ác. ascórbico}^{-1} \text{s}^{-1}$
Coquinho-azedo 2 hidroalcoólico	$4,52 \cdot 10^{-3}$	$7,81 \cdot 10^1$	$2,31 \cdot 10^2$
Coquinho-azedo 3	$1,79 \cdot 10^{-2}$	$1,91 \cdot 10^2$	$6,12 \cdot 10^2$
Panã 1	$3,07 \cdot 10^{-3}$	8,60	$4,76 \cdot 10^1$
Panã 1 hidroalcoólico	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$3,13 \cdot 10^1$	$1,11 \cdot 10^2$
Panã 2	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$3,35 \cdot 10^1$	$2,51 \cdot 10^1$
Cagaita 1	$8,43 \cdot 10^{-3}$	$4,29 \cdot 10^1$	$1,58 \cdot 10^2$
Cagaita 1 hidroalcoólico	$1,39 \cdot 10^{-2}$	$1,19 \cdot 10^2$	$2,59 \cdot 10^2$
Cagaita 2	$3,96 \cdot 10^{-2}$	$7,63 \cdot 10^1$	$2,38 \cdot 10^2$

Os extratos foram potentes redutores da ferrilmioglobina e pode-se concluir que são bons antioxidantes em sistemas de oxidação mediados por espécies hipervalente de ferro-heme como o que ocorre no sistema gastro intestinais em dietas ricas em carne vermelha. No entanto, não foi possível identificar uma correlação entre a constante de velocidade de redução da ferrilmioglobina com relação aos teores de fenóis totais, ácido ascórbico e massa do extrato. Este fato sugere que a constante de velocidade de redução da ferrilmioglobina e a atividade antioxidante do extrato estão relacionadas à presença e concentração individual ou a presença de poucas substâncias bioativas no extrato e não aos teores totais de compostos fenólicos.

Para a comparação dos valores obtidos, a Tabela 8 contém constantes da reação de redução da ferrilmioglobina obtidas nas mesmas condições para compostos redutores (antioxidantes) conhecidos. A apigenina é, dos compostos relacionados abaixo, a substância com maior constante de velocidade de reação, todavia a amostra de coquinho-azedo 3 superou este valor apresentando uma constante de velocidade de reação expressa em teor de fenóis totais de $1,91 \cdot 10^2 \text{ L mol}_{\text{fenóis}}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Tabela 8 – Constante de velocidade de reação de redução da ferrilmioglobina, a 25°C e pH 7,4 por compostos antioxidantes.

Composto	$k_{25^{\circ}\text{C}}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Ácido Clorogênico	0,43
Epicatequina	93 ± 4
Catequina	119 ± 10
Rutina	105 ± 1
Hesperitina	42 ± 1
Apigenina	125 ± 6
Naringenina	$14,5 \pm 0,5$
Crisina	< 1

Fonte: KROGER-OHLSSEN, M. V. **Pseudoperoxidase activity of myoglobin**. Ph. D. Thesis - Department of Dairy and Food Science, Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg, p. 27-31, 1999. (70)

Conclui-se através dos resultados obtidos que os extratos de frutas do Cerrado são potentes antioxidantes e seu consumo concomitante com carnes vermelhas irá auxiliar na prevenção de câncer de colo de intestino, através da redução do efeito deletério da presença de ferro-heme na dieta rica em carne vermelha. (71)

5 CONCLUSÃO

Os extratos de cagaita e coquinho-azedo apresentam baixa variabilidade nos teores de fenóis totais, taninos totais, glicídios e ácido ascórbico, sugerindo pouca influencia de fatores pedoclimáticos nestas espécies frutíferas do Cerrado. No entanto, os extratos obtidos dos frutos de Panã apresentam uma elevada variabilidade nos teores totais de fenóis, taninos, glicídios e ácido ascórbico. O método de Folin Denis frequentemente utilizado para a determinação de taninos totais se mostrou inadequado e pouco seletivo frente à diferenciação de compostos fenólicos de baixa massa molecular e taninos, ao contrário do método analítico empregando-se o pó de pele. Os extratos das frutas coquinho-azedo e cagaita apresentaram elevada reatividade frente ao radical 1-hidroxietila com constante de velocidade de captação do radical próxima ao limite da difusão em meio aquoso. A elevada reatividade destes extratos sugere a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, tais como o ácido ferúlico identificado por LC-MS, e compostos fenólicos prenilados e/ou elevado teor de terpenos, uma vez que flavonoides e compostos fenólicos sem hidrogênios alílicos em sua estrutura molecular apresentam baixa reatividade com o radical 1-hidroxietila (da ordem de $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Os extratos de coquinho-azedo e cagaita em função de sua elevada reatividade frente ao radical 1-hidroxietila sugerem estas frutas como potenciais fontes de compostos bioativos na proteção hepática frente aos efeitos deletérios do consumo de etanol e em patologias tais como a hepatite-C. Contrariamente, no ensaio frente ao radical 1-hidroxietila o extrato de panã se mostrou pró-oxidativo o que sugere a presença de espécies altamente redutoras, em elevada concentração, capazes de reduzir íons férricos em ferroso atuando assim como catalisadores do processo oxidativo do tipo Fenton e desta forma podendo promover um estresse oxidativo no trato gastrointestinal. Com relação à atividade antioxidante dos extratos de frutas investigados frente à espécie de ferro hipervalente, ferrilmioglobina, biologicamente relevante em dietas ricas em carne vermelha, todos os extratos se mostraram reativos e capazes de reduzir a espécie ferrilmioglobina a metamioglobina, com constante de velocidade da ordem de $10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, constante de velocidade esta, comparável com flavano-3-ols que são uma classe de compostos polifenólicos conhecidamente eficientes em termos de sua atividade

antioxidante in vivo. Com respeito à proteção do trato-gastrointestinal contra os efeitos deletérios do alto consumo de carne vermelha, todos os extratos investigados se demonstram uma eficiente fonte dietética de compostos bioativos para a proteção gastrointestinal e potenciais alimentos funcionais na redução da probabilidade de incidência de câncer de cólon em populações com elevado consumo de carne vermelha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAUCHET, L.; MONTAYE, M.; RUIDAVETS, J-B.; ARVEILER, D.; KEE, F.; BINGHAM, F.; FERRIERES, J.; HAAS, B.; EVANS, A.; DUCIMETIERE, P.; AMOUYEL, P.; DALLONGEVILLE, J. Association between the frequency of fruit and vegetable consumption and cardiovascular disease in male smokers and non-smokers. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 64, p. 578–586, 2010.
2. PENNINGTON, J. A. T.; FISHER, R. A. Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23, p. 411-418, 2010.
3. 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**. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.
4. BARCIA, M. T.; JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; ZAMBIAZI, R. C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Semina: Ciências Agrárias**, 31, p. 381-390, 2010.
5. KITTS, D. D. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. **Trends in Food Science & Technology**, 8, p. 198-203, 1997.
6. HUNTER, D. C. Fruit-based functional foods II: the process for identifying potential ingredients. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 43, p. 2123-2129, 2008.
7. ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.
8. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals Biology and Medicine**. 4th. ed. New York: Oxford University Press, 2007.
9. ARTICULAÇÃO PACARI. **Farmacopéia popular do Cerrado**. Goiás: (s.n.), 2009. 15-21 p.

10. SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1973, 2008.
11. CARDOSO, L. D. M.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, 44, p. 2151–2154, 2010.
12. GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 393, p. 561–564, 2010.
13. BORGES, L. L. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, 7, n. 12, p. 1-20, 2011.
14. STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, 24, p. 345–351, 2003.
15. BECKER, E. M.; LEIF, G. E.; SKIBSTED, H. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. **Food Chemistry**, 103, p. 1288–1296, 2007.
16. LIBARDI, S. H. L.; BORGES, J. C.; SKIBSTED, L. H.; CARDOSO, D. R. Deactivation of ferrylmyoglobin by vanillin as affected by vanillin binding to β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, p. 6202–6208, 2011.
17. SEN, S.; CHAKRABORTY, R. The role of antioxidants in human health. In: ANDREESCU, S.; HEPEL, M. **In Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy**. Washington, DC: ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2011. Cap. 1.
18. HALLIWELL, B. Food-derived antioxidants: how to evaluate their importance in food and in vivo. In: CADENAS, E.; PACKER, L. **Handbook of Antioxidants**. 2nd. ed. New York: CRC Press, 2001.

19. SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 227-236, abr./jun. 2004.
20. SUN-WATERHOUSE, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, p. 899–920, 2010.
21. SILVEIRA, T. F. V.; VIANNA, C. M. D. M.; MOSEGUI, G. B. G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1189-1202, 2009.
22. HEALTH CANADA. **Therapeutic products programme and the food directorate from the health protection branch**. (S.l.). 1998.
23. SHI, J.; MAZZA, G.; LE MAGUER, M. **Functional foods - biochemical and processing aspects**. Boca Raton: CRC Press, v. 2, 2002.
24. STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T. de; GOMES, R. C.; AMARAL, M. da P. H. do; CARVALHO, A. F. de; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, 2007. Disponível em. Acesso em 17 de setembro de 2011.
25. ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian Cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.
26. ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do Cerrado. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
27. HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81, p. 268S–76S, 2005.
28. MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

29. RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2007.
30. JOHNSON, I.; WILLIAMSON, G. **Phytochemical functional foods**. Cambridge: CRC Press, 2003.
31. HURST, W. J. **Method of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 102-118 p.
32. HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 476, p. 107–112, 2008.
33. BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; SIMONETTI, R. G.; GLUUD, C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, 364, p. 1219-1228, 2004.
34. FERGUSON, L. R. Meat and cancer. **Meat Science**, 84, p. 308–313, 2010.
35. ISHIKAWA, S.-I.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: A possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, 54, p. 1182–1191, 2010.
36. LORRAIN, B.; DANGLES, O.; GENOT, C.; DUFOUR, C. Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, p. 676–683, 2010.
37. GIULIVI, C.; CADENAS, E. Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 2, p. 269–279, 1998.
38. LIBARDI, S. H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2010.

39. GORELIK, S. Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p. 3397-3402, 2005.
40. PEREIRA, B. A. S.; SILVA, M. A. Reserva Ecológica do IBGE. **Lista de nomes populares de plantas nativas**. Disponível em: <<http://www.recor.org.br/publicacoes/plantas-nativas.html>>. Acesso em: 06 setembro 2011.
41. COUTO, R. O. D.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. de. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI, n. 3, p. 59-69, 2009.
42. COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; SILVA, M. do R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, 72, p. 111–117, 2000.
43. GIOTTO, A. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; SILVA, J. G. P. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 600-602, 2007.
44. SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* dc.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 330-334, 2001.
45. MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C. **Cagaiteira**. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 1-21. 2008. (Boletim Técnico - n.º 78).
46. SCHWARTZ, E.; FACHINELLO, J. C.; BARBIERI, R. L.; SILVA, J. B. da. Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 736-745, 2010.
47. FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; SILVA, L. C. R. da; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 827-829, 2008.
48. ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of

- major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, 104, p. 1048–1054, 2007.
49. CORRÊA, P. G.; DAS CHAGAS, M. G. S.; PIMENTEL, R. M. M.
Caracterização morfoanatômica foliar de *Annona crassiflora* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 816-818, jul. 2007.
 50. TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S.G.
Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira Botânica**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
 51. INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.;
GUILHON, G.M.S.P; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R.
Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.
 52. DRAGANO, N. R. V.; VENANCIO, V. P. de; PAULA, F. B. de A.; LUCIA, F. D.;
FONSECA, M. J. de O.; AZEVEDO, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant Foods for Human Nutrition**, 65, p. 319-325, 2010.
 53. CARDOSO, L. de M.; OLIVEIRA, D. da S.; BEDETTI, S. de F.; MARTINO, G. S. D.;
PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, 68, p. 121–134, 2013.
 54. SOUSA, C. M. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
 55. DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.;
BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
 56. AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16th. ed. Arlington, Va: (s.n.), 1995.
 57. FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap. 198.

58. GUTIERREZ, A. C.; GEHLEN, M. H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al^{3+} . **Spectrochimica Acta Part A**, n. 58, p. 83–89, 2002.
59. AOAC. Official Methods of AOAC International. Arlington, Va: (s.n.), 1995. Cap. 26, Método 26.1.37, p. 16.
60. DA SILVA, I. V. **Utilização de hidrolisado proteico de couro como produto recorrente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.
61. EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 2010.
62. FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. p. 51.
63. SOARES, C. M. **Estudo químico da alga Lithothamnion calcareum e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2009.
64. AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA. Spectrophotometric assay for the quantification of anthocyanins in bilberry raw material. **American Herbal Pharmacopoeia**. Disponível em: <http://www.herbal-ahp.org/analytic_guide.htm>. Acesso em: 18 setembro 2011.
65. MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
66. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Aditivos. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Cap. V, p. 169-170.
67. TANAKA, D. L. **Influência da desidratação por spray drying sobre o teor ácido ascórbico no suco de acerola (Malpighia spp)**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Professor Júlio De Mesquita Filho". Araraquara. 2007.

68. DE ALMEIDA, N. E. C.; HOMEM-DE-MELLO, P.; DE KEUKELEIRE, D.; CARDOSO, D. R. Reactivity of beer bitter acids toward the 1-hydroxyethyl radical as probed by spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR) and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 59, p. 4183-4191, 2011.
69. DE ALMEIDA, N. E. C. **Reatividade de iso- α -ácidos e seus derivados hidrogenados frente ao radical 1-hidroxila: implicações na perda de qualidade sensorial da cerveja**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2011.
70. KROGER-OHLSSEN, M. V. **Pseudoperoxidase activity of myoglobin**. Ph. D. Thesis - Department of Dairy and Food Science, Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg. 1999.
71. LIBARDI, S. H.; PINDSTRUP, H.; CARDOSO, D. R.; SKIBSTED, L. H. Reduction of ferrylmyoglobin by hydrogen sulfide. Kinetics in relation to meat greening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 61, p. 2883–2888, 2013.

ANEXO A

As polpas de frutas exóticas foram obtidas congeladas e foram analisadas logo após o descongelamento da polpa. A seguir na Tabela 9, as características sensoriais da polpa observadas e na Tabela 10 os resultados das análises realizadas.

Tabela 9 – Nome, espécie, ocorrência das frutas avaliadas, e o resultado da avaliação sensorial descritiva.

Nome popular	Espécie	Ocorrência	Avaliação sensorial
Araçá	<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	Cerrado	Odor agradável e sabor regular.
Cagaita	<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	Cerrado	Odor agradável com presença de nota floral e sabor regular.
Cambuci	<i>Paivaea langsdorffii</i> O. Berg	Mata Atlântica	Odor e sabor agradável, com nota levemente ácida.
Coquinho-azedo	<i>Butia capitata</i> (Mart.) Becc.	Cerrado	Odor agradável e sabor adocicado e levemente ácido.
Jussara	<i>Euterpe edulis</i> Mart.	Mata Atlântica	Odor e sabor agradável, característico de açai.
Murici	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	Floresta Amazônica	Odor e sabor não agradável, com nota forte ácida.
Panã	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Cerrado	Odor agradável e suave e sabor agradável e adocicado.
Seriguela	<i>Spondias mombin</i> L.	Cerrado e Caatinga	Odor imperceptível e sabor suave com nota levemente ácida.
Umbu	<i>Spondias tuberosa</i> Arr.	Caatinga	Odor agradável e sabor com nota forte ácida.
Uvaia	<i>Eugenia uvalha</i> Cambess.	Mata Atlântica	Odor agradável e frutado e sabor regular com nota ácida.

Tabela 10 – Resultados das análises realizadas nas polpas de frutas exóticas.

Nome popular	pH	Brix (°)	Resíduo seco (%)	Ácido asc órbico (%)	Fenóis totais (%)
Araçá	4,1	8,0	8,4	1,21	0,21
Cagaita	3,3	8,0	8,1	1,02	0,14
Cambuci	3,6	7,5	8,4	0,78	0,21
Coquinho-azedo	4,1	4,5	3,8	1,05	0,22
Jussara	5,2	5,0	15	1,40	0,35
Murici	3,7	6,0	9,4	1,66	0,06
Panã	4,8	17	24	1,31	0,53
Seriguela	3,3	15	22	1,36	0,02
Umbu	2,7	10	12	1,38	0,15
Uvaia	3,5	5,0	4,5	0,95	0,14