UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição
Experimental
Área de Bromatologia

Caracterização do fruto de cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.) e
efeito da destanização sobre o potencial funcional *in vitro*

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Maria Cecília Rocha Sanches

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez

São Paulo

2013

Maria Cecília Rocha Sanches

Caracterização do fruto de cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.) e
efeito da destanização sobre o potencial funcional *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Dedico este trabalho ao meu marido,
Diego, aos meus pais, Edison e Maria
do Rocio, e a minha irmã, Maria
Elize, por estarem sempre ao meu lado,
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Maria Inés Genovese, minha orientadora, por toda a dedicação, compreensão, estímulo e exigência para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Angelo Jacomino, pela colaboração, ao Douglas Bello, família Nagai e a empresa Banasil, pela parceria.

Aos meus pais, Edison e Maria do Rocio, meus exemplos de amor, carinho, dedicação e respeito ao próximo. Vocês me deram um enorme incentivo para conseguir concluir esse trabalho. A minha irmã, Maria Elize, por estar presente (mesmo distante) no meu coração, pela amizade, força, apoio, motivação e carinho.

Ao meu marido e companheiro, Diego, meu grande exemplo de profissionalismo, comprometimento e responsabilidade. Obrigada pelo apoio, confiança, amizade, estímulo, amor e por estar sempre ao meu lado, juntamente com sua família, Tia Arlete, Tio Camilo, Charles, Yara e Maria Fernanda.

Aos meus cunhados Pablo e Flávia, pela recepção sempre agradável na etapa final do meu mestrado.

Aos meus amigos especiais que enriqueceram minha experiência e foram meus companheiros de laboratório, dividindo alegrias, tristezas, conversas e almoços durante esses anos: Gabriela, Diully, Helena, Rafaela, Marcela, Alice, Thiago, Santiago, Renata, Samires, Carlos, Flavia, Geórgia, Killian por terem me apoiado e me ajudado neste trabalho. A querida Joana, pela agradável companhia e por cuidar do laboratório. A técnica Tatiana, pela parceria.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental que em algum momento auxiliaram e contribuíram para minha formação.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Ao CNPq pela bolsa no período de mestrado e a Fapesp pelo suporte financeiro ao laboratório.

A todos o meu profundo agradecimento!

SANCHES, M.C.R. **Caracterização do fruto de cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.) e efeito da destanização sobre o potencial funcional *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RESUMO

A espécie *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum é popularmente conhecida como “cambuci”. É uma das diversas espécies brasileiras de Myrtaceae com fruto comestível e ocorre nos estados de Minas Gerais e São Paulo, principalmente na Serra do Mar. Os frutos possuem intenso aroma agradável e são importantes fontes de compostos fenólicos. Apesar do excelente sabor e aroma do cambuci, a alta adstringência dos frutos, devido ao elevado conteúdo de taninos, reduz a sua aceitabilidade e aplicabilidade na indústria alimentícia. Uma maneira eficaz para remoção da adstringência é submeter o fruto a um processo de destanização, tal como atualmente utilizado para o caqui. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade dos frutos provenientes de uma mesma região e de diferentes regiões, caracterizar frutos em diferentes estádios de maturação, avaliar a eficiência de tratamentos de destanização e determinar o efeito da destanização sobre o potencial funcional, através da determinação do teor e perfil de compostos fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* e inibição das enzimas do metabolismo de carboidratos. Os tratamentos testados foram: câmaras de etileno, câmara de etanol, ambiente anóxico, etanol no cálice e imersão em etanol. Os resultados mostram que frutos de uma mesma localidade apresentam variações no tamanho e na acidez. Frutos de diferentes regiões apresentaram variação significativa nos teores de fenólicos totais, minerais e na capacidade antioxidante. Com a maturação não foi observado grande variação no teor de sólidos solúveis totais e nem na acidez, porém o conteúdo de fenólicos decresce do estágio mais jovem para o mais maduro. Os processos de destanização com vapor e imersão em etanol foram os mais eficientes na redução do conteúdo de taninos, no entanto esses processos reduziram a capacidade antioxidante e a capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase dos frutos.

PALAVRAS CHAVE: remoção da adstringência, cambuci e capacidade antioxidante.

SANCHES, M.C.R. **Characterization of the cambuci fruit (*Campomanesia phaea* O. Berg.) and deastringency effect on the *in vitro* functional potential.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ABSTRACT

The specie *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum is popularly known as "cambuci". It is one of several Brazilian species of Myrtaceae with edible fruit and occurs in the states of Minas Gerais and São Paulo, especially in the mountains of the sea. The fruits have an intense aroma and are important sources of phenolic compounds. Despite the excellent flavor and aroma of cambuci, high astringency of the fruit, due to the high tannin content, reduces its acceptability and applicability in the food industry. An effective way to astringency removal is to submit the fruit to a deastringency process, as currently used for the persimmon. The aim of this study was to evaluate the variability of the fruits from the same region and from different regions, characterize fruits in different maturation stages, evaluate the efficiency of treatments to astringency removal, and determine the effect of astringency removal about the functional potential, by determining the content and profile of phenolic compounds, antioxidant capacity, and *in vitro* inhibition of enzymes of carbohydrate metabolism. Treatments tested for removing the astringency were: ethylene chamber, ethanol chamber, anoxic environment, ethanol in the cup, and immersion in ethanol. The results showed that fruit in the same locality exhibit variations in size and acidity. Fruits from different regions showed significant variation in levels of total phenolics, minerals and antioxidant capacity. During maturation it was not observed a wide variation in the content of total soluble solids and acidity, but the phenolic content decreased from the younger stage to the more mature stage. The processes of detannization with ethanol steam and dipped in ethanol were the most effective in reducing the tannin content, however these processes led to reduced antioxidant capacity and capacity of inhibition of the enzymes α -amylase and α -glucosidase in fruits.

KEYWORDS: astringency removal, cambuci, and antioxidant capacity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cambuci	1
1.2 Compostos bioativos fenólicos	3
1.2.1 Flavonoides	4
1.2.2 Ácido elágico e derivados	6
1.2.3 Taninos, proantocianidinas e procianidinas	8
1.3 Remoção da adstringência	12
1.3.1 Aplicação de etanol	13
1.3.2 Aplicação de etileno	14
1.3.3 Armazenamento em ambiente com baixo teor de oxigênio	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais	18
3.2 Métodos	20
3.2.1 Diâmetro, altura e firmeza	20
3.2.2 Acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST) e pH	21
3.2.3 Determinação da umidade	21
3.2.4 Determinação de fibras totais	22
3.2.5 Composição mineral	23
3.2.6 Determinação da atividade inibitória da enzima α -amilase <i>in vitro</i>	23
3.2.7 Determinação da atividade inibitória da enzima α -glicosidase <i>in vitro</i>	25
3.2.8 Atividade respiratória e produção de etileno	26
3.2.9 Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	27
3.2.9.1 Extração	27
3.2.9.2 Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)	27

3.2.9.3	Sequestro de radicais livres - DPPH*	28
3.2.9.4	Determinação do poder redutor do ferro – método FRAP	29
3.2.10	Quantificação das proantocianidinas e taninos totais	29
3.2.10.1	Método do n-butanol acidificado	29
3.2.10.2	Método DMAC	30
3.2.10.3	Teor de taninos totais.	31
3.2.11	Determinação de flavonoides e ácido elágico livre e total	32
3.2.11.1	Extração dos flavonoides e ácido elágico livre	32
3.2.11.2	Extração de ácido elágico total	32
3.2.11.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD)	33
3.2.12	Determinação de Vitamina C	34
3.2.13	Determinação da polifenoloxidase	34
3.2.14	Processo de destanização	35
3.2.14.1	Tratamentos	36
3.3	Análise dos resultados	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Variabilidade entre frutos de cambuci colhidos em um mesmo plantio comercial	39
4.2	Variabilidade do cambuci de diferentes municípios	41
4.2.1	Composição centesimal	41
4.2.2	Composição de minerais	42
4.2.3	Tamanho, peso, sólidos solúveis totais e acidez titulável	44
4.2.4	Teores de fenólicos totais, vitamina C, proantocianidinas e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	45
4.2.5	Identificação e teores de flavonoides	47
4.2.6	Teores de ácido elágico livre e total	48
4.3	Caracterização do cambuci em seis estágios de maturação	50
4.3.1	Taxa respiratória e produção de etileno	54
4.3.2	Proantocianidinas e taninos totais	56
4.3.3	Ácido elágico livre e total	58

4.3.4	Flavonoides	59
4.3.5	Ácido sirínico	61
4.4	Efeito dos tratamentos de destanização	62
4.4.1	Proantocianidinas e taninos totais	64
4.4.2	Sólidos solúveis totais, pH, acidez e firmeza	69
4.4.3	Perda de matéria fresca	72
4.4.4	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	73
4.4.5	Flavonoides	78
4.4.6	Ácido elágico livre, total e ácido sirínico	81
4.4.7	Efeito dos compostos fenólicos purificados na atividade enzimática da α -amilase e da α -glicosidase	83
4.4.8	Atividade da polifenoloxidase	88
5	CONCLUSÃO	91
6	REFERÊNCIAS	93
7	ANEXOS OBRIGATÓRIOS	
	Curriculum Lattes	
	Ficha do Aluno	
8	APÊNDICES	
	Cromatogramas	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Frutos jovens do cambuci (<i>Campomanesia phaea</i>)	2
Figura 2 -	Cambuci (<i>Campomanesia phaea</i>). (A) ramo com flores e botão aberto. (B) botão da flor fechado. (C) corte longitudinal do ovário mostrando dois lóculos. (D), corte transversal do ovário mostrando 12 lóculos e 2 óvulos visíveis em cada. (E) fruto maduro. (F) semente com parede locular glandular que serve como um falso revestimento da semente. (G) embrião espiral com grandes hipocotilédones e pequenos cotilédones. Fonte: KAWASAKI (1997).	3
Figura 3 -	Estrutura básica dos flavonoides.	4
Figura 4 -	Estruturas das principais classes de flavonoides.	5
Figura 5 -	Estruturas dos derivados conjugados de ácido elágico encontrados em framboesa (MULLEN <i>et al.</i> , 2003).	6
Figura 6 -	A - Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxiidifênico.	9
Figura 7 -	Procianidina C, um tanino condensado.	10
Figura 8 -	Cambuci maduro, á direita, com as quinas mais arredondadas, cambuci mais jovem à esquerda.	19
Figura 9 -	Valores médios para a taxa respiratória ($\text{mL de CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (A) e produção de etileno ($\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (B) do cambuci nos estágios 4, 5 e 6 da maturação.	55
Figura 10 -	Teor de proantocianidinas pelos métodos do n-butanol (A) (mg eq. tanino quebracho/100 g b.s.) e DMAC (B) (mg eq. Procianidina B1/100 g b.s.) e teor de taninos totais (C) pelo método de precipitação protéica (mg eq. ac. tânico/100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).	57
Figura 11 -	Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011, (A) teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq. ácido tânico/ 100g b.s), (B) teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg eq. tanino quebracho/ 100 g b.s.) e (C) teor de proantocianidinas pelo método DMAC (mg eq.	65

procianidina B1/ 100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Figura 12 - Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no 66
estádio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011, (A)
teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg
eq. tanino quebracho/ 100 g b.s.), (B) teor de proantocianidinas
pelo método DMAC (mg eq. procianidina B1/ 100 g b.s.) e (C)
teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq.
ácido tânico/ 100g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes
diferem entre si ($p<0,05$).

Figura 13 - Teor de proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 5 de 67
maturação, em Paraibuna em 28/04/2011. Teor de
proantocianidinas avaliado pelo método do butanol acidificado
(mg eq. Tanino Quebracho/ 100 g b.s.). Médias seguidas de letras
diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Figura 14 - Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no 69
estádio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 04/05/2012, (A)
teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg
eq. tanino quebracho/100 g b.s.), (B) teor de proantocianidinas
pelo método DMAC (mg eq. procianidina B1/ 100 g b.s.) e (C)
teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq.
ácido tânico/ 100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes
diferem entre si ($p<0,05$).

Figura 15 - Perda de matéria fresca após destanização dos frutos colhidos, (A) 72
no estágio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011
(teste 2) e (B) dos frutos de Mogi das Cruzes, colhidos no estágio
4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4). Os resultados estão
expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$). Médias
seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Figura 16 - Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em 74
Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste
1). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (μmol eq.
catequina/ 100g b.s), (B) capacidade de seqüestro do DPPH (μ

moles eq. trolox/ 100 g b.s.) e (C) capacidade redutora do ferro (mmoles eq. trolox/ 100 g b.s.). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Figura 17 - Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em 75
Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol eq. catequina/ 100g b.s.}$), (B) capacidade de seqüestro do DPPH ($\mu\text{ moles eq. trolox/ 100 g b.s.}$) e (C) capacidade redutora do ferro (mmoles eq. trolox/ 100 g b.s.). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Figura 18 - Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em 75
Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol eq. catequina/ 100g b.s.}$), (B) capacidade de seqüestro do DPPH ($\mu\text{ moles eq. trolox/ 100 g b.s.}$) e (C) capacidade redutora do ferro (mmoles eq. trolox/ 100 g b.s.). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos locais de produção dos cambucis utilizados nos experimentos.	19
Tabela 2 -	Características físicas e químicas de cambucis colhidos em tamanhos disitintos no Sítio do Bello, Paraibuna – SP, e analisados imediatamente após a colheita.	40
Tabela 3 -	Teores de umidade (%), cinzas (g/100 g b.s.), lipídeos (g/100 g b.s.), proteína (Nx5,75) (g/100 g b.s.), carboidratos (g/100 g b.s.) e calorias (Kcal/100 g b.s.) dos frutos provenientes de distintas regiões.	42
Tabela 4 -	Teor de minerais de frutos de cambuci de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes , Paraibuna e Paranapiacaba (b.s.).	43
Tabela 5 -	Características físicas e químicas de cambucis colhidos em tamanhos disitintos nos município de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba, analisados imediatamente após a colheita.	45
Tabela 6 -	Teor de fenólicos totais (mg eq. de catequina/100 g b.s.), teor de taninos totais (mg eq. ac. Tânico/ 100 g b.s.), teor de vitamina C (mg/100 g b.s.), teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg eq. de tanino quebracho/100 g b.s.) e DMAC (mg eq. de prociadina B1/100 g b.s.), capacidade de sequestro do DPPH [·] (μmol eq. de Trolox/100 g b.s.) e poder redutor do ferro FRAP (mmol eq. de Trolox/100 g amostra b.s.) dos frutos de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba.	47
Tabela 7 -	Composição e teor de flavonoides (mg/100 g b.s.) presentes nos frutos de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba.	48
Tabela 8 -	Teores de ácido elágico livre e total do cambuci de três regiões de São Paulo (mg/100 g amostra b.s.).	49
Tabela 9 -	Características físicas e químicas de cambucis oriundos de Mogi	52

das Cruzes colhidos em seis estádios de maturação.

Tabela 10 -	Umidade (%) e quantidade de suco (%) (v/m) de seis estádios de maturação do cambuci.	54
Tabela 11 -	Firmeza (kg/cm^2), teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$), pH e acidez titulável (% ácido cítrico) do cambuci coletado no estágio 4 após sete dias.	56
Tabela 12 -	Teor de ácido elágico livre e total do cambuci em diferentes estádios de maturação ($\text{mg}/100 \text{ g b.s.}$).	58
Tabela 13 -	Composição e conteúdo de flavonoides do cambuci em diferentes estádios de maturação ($\text{mg}/100 \text{ g b.s.}$).	60
Tabela 14 -	Teor de derivados ácido siríngico do cambuci em diferentes estádios de maturação ($\text{mg}/100 \text{ g b.s.}$).	61
Tabela 15 -	Teor de proantocianidinas ($\text{mg eq. tanino quebracho}/100 \text{ g base úmida}$) do cambuci, caju e caqui.	62
Tabela 16 -	Processos de destanização realizados em cambuci em cada um dos quatro testes.	63
Tabela 17 -	Procedência, qualidade e estágio de maturação dos cambucis antes dos tratamentos de destanização.	63
Tabela 18 -	Teores de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$), pH e acidez titulável (% ácido cítrico) após destanização dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011 (testes 1) e em 04/05/2012 (teste 4).	70
Tabela 19 -	Firmeza, expressa em kg/cm^2 após destanização dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011 (testes 1), dos frutos colhidos, no estágio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011 (teste 2) e dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 04/02/2012 (teste 4).	71
Tabela 20 -	Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> (capacidade de sequestro do $\text{DPPH}^{\cdot}$, capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos	76

destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1).

Tabela 21 -	Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> (capacidade de sequestro do DPPH [·] , capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos destanizados colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2).	77
Tabela 22 -	Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> (capacidade de sequestro do DPPH [·] , capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).	78
Tabela 23 -	Teor de flavonoides (mg/100 g b.s.) após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).	80
Tabela 24 -	Teor de ácido elágico livre (mg/100 g b.s.), total (mg/100 g b.s.) e ácido siríngico (mg/100 g b.s.) após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação, em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação, em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação, em 04/05/2012 (teste 4).	82
Tabela 25 -	Atividade inibitória de α -amilase de extratos purificados em C18 obtidos a partir dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).	86

Tabela 26 -	Atividade inibitória de α -glicosidase de extratos purificados em C18 obtidos a partir dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).	87
Tabela 27 -	Atividade da enzima polifenoloxidase (U/mL/min) em frutos destanizados, em dois estádios de maturação, estágio 4 e 6, analisados no dia da coleta e 24 h após o tratamento.	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cambuci

A espécie *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum é popularmente conhecida como “cambuci” ou “cambucizeiro”, tendo como sinonímia botânica a designação de *Paivaea langsdorffii* Berg (VALLILO *et al.*, 2005). É uma das diversas espécies brasileiras de Myrtaceae com fruto comestível (Centro de Pesquisas Eco-Naturais – Cepen, 2010), e a semelhança deste com as panelas de barro feitas antigamente pelos índios provavelmente originou o nome “Cambuci”, derivado da palavra tupi-guarani para pote de barro (KAWASAKI, 1997).

O cambucizeiro ocorre nos estados de Minas Gerais e São Paulo, principalmente na Serra do Mar. Antigamente era bastante abundante na cidade de São Paulo, tendo inclusive dado origem ao nome do bairro Cambuci. Hoje em dia é uma das espécies da Mata Atlântica em risco de extinção. A altura do seu tronco varia de 3 a 5 m, e seu diâmetro, de 20 a 30 cm. De acordo com Vallilo *et al.* (2005) durante os meses de agosto a novembro apresenta uma floração branca e sua frutificação ocorre nos meses de janeiro e fevereiro. No entanto de acordo com levantamento realizado pelo produtor Douglas Bello, proprietário do Sítio do Bello (www.sitiodobello.com.br) a frutificação do cambuci varia de ano para ano.

As folhas desta espécie possuem alto teor de óleo essencial, rico em linalol (11,1%), óxido de cariofileno (11,8%), betacariofileno (6,3%), betasselineno (6,3%) e alfacadinol (1,9%), constituintes de elevado valor comercial para a indústria farmacêutica e de cosméticos (ADATI, 2001).

Os frutos maduros são rombóides, verdes, carnosos, suculentos, extremamente aromáticos e muito utilizados no preparo de sucos, sorvetes e bebidas alcoólicas pela população local (“pinga de cambuci”). Medem, geralmente, de 5 a 6 cm de diâmetro na região mediana, por 3 a 4,5 cm de altura (**Figura 1**). Possuem intenso aroma agradável e doce, dando a eles um grande potencial como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas. Além das propriedades aromáticas, os frutos contêm ácido ascórbico, que dependendo do ponto de maturação, fatores ambientais, manipulação e estocagem, pode chegar a cerca de 30 mg/100 g de fruto fresco (VALLILO *et al.*, 2005). Além disso, parecem ser importante fonte de compostos fenólicos (GENOVESE *et al.*, 2008). A descrição botânica da *Campomanesia phaea* é apresentada na **Figura 2**.

Figura 1. Frutos jovens do cambuci (*Campomanesia phaea*).

Figura 2. Cambuci (*Campomanesia phaea*). (A) ramo com flores e botão aberto. (B) botão da flor fechado. (C) corte longitudinal do ovário mostrando dois lóculos. (D), corte transversal do ovário mostrando 12 lóculos e 2 óvulos visíveis em cada. (E) fruto maduro. (F) semente com parede locular glandular que serve como um falso revestimento da semente. (G) embrião espiral com grandes hipocotilédones e pequenos cotilédones. Fonte: KAWASAKI (1997).

1.2. Compostos bioativos fenólicos

Através da alimentação obtemos macro e micronutrientes, e ainda compostos bioativos com atividades promotoras da saúde, como é o caso da capacidade antioxidante. Esta característica está relacionada aos teores de vitaminas A, C e E, carotenóides, e compostos fenólicos – como os flavonóides – presentes em alimentos de origem vegetal, por se tratarem de metabólitos secundários de plantas. Alimentos ditos funcionais, como o chá verde, vinho, soja, frutas vermelhas e chocolate, possuem, além da capacidade antioxidante, atividades antiinflamatória e/ou hipocolesterolêmica (SEIFRIED *et al.*, 2007; RICE-EVANS *et al.*, 1996; GERMAN & DILLARD, 2005).

Os compostos fenólicos compõem a maior categoria dentre os agentes fitoquímicos, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes compostos são derivados das vias bioquímicas do ácido chiquímico e fenilpropanoídico.

Os fenólicos subdividem-se em três grupos principais: os flavonóides, os ácidos fenólicos, e os taninos. Os flavonóides possuem estrutura molecular C6-C3-C6 com diversas variações, e são compostos muito encontrados na natureza. Estes grupos estão distribuídos na natureza em frutas como o morango, a uva, a maçã e nas nozes. Os ácidos fenólicos abrangem os ácidos benzóicos e derivados (hidroxibenzóico, vanílico, gálico, etc.) e os ácidos cinâmicos e derivados (cumárico, caféico, ferúlico, clorogênico, etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular e são divididos em três classes: taninos hidrolisáveis (taninos gálicos e taninos elágicos), taninos condensados (também conhecidos como proantocianidinas), e os taninos complexos, de distribuição mais limitada na natureza (KING & YOUNG, 1999; COS *et al.*, 2003).

1.2.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos bioativos encontrados amplamente nos alimentos e caracterizados por sua estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6) composta por quinze átomos de carbono (**Figura 3**) (HERTOG *et al.*, 1992). Os flavonoides subdividem-se em diversas classes incluindo antocianinas, flavonas, flavanois, flavanonas, isoflavonas e flavonois (**Figura 4**).

Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.

Figura 4. Estruturas das principais classes de flavonoides.

A ação biológica benéfica dos flavonoides é devida à habilidade sequestradora de radicais livres, redução da formação destes radicais e estabilização de membranas pelo decréscimo de sua fluidez. Os dois primeiros efeitos protegem contra danos por oxidação de moléculas como DNA, lipídios (como a LDL) e proteínas; o último efeito reduz a mobilidade de radicais livres na bicamada lipídica e, conseqüentemente, inibe a peroxidação das membranas das células endoteliais (ENGLER & ENGLER, 2004; GERMAN & DILLARD, 2005).

A oxidação nos sistemas biológicos é uma consequência da ação dos radicais livres no organismo. Tais radicais originam-se de fontes exógenas, substâncias com as quais entramos em contato, ou de fontes endógenas, substâncias originárias de processos biológicos do próprio organismo (ERENEL *et al.*, 1993; RICE-EVANS & BURDON, 1993).

A ação antioxidante ocorre tanto pela inibição da formação dos radicais quanto pela eliminação dos radicais formados. A neutralização se dá pela doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a cadeia reacional. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente à primeira atuação, sequestrando radicais livres e quelando metais (NAKAMURA *et al.*, 2003; PIETTA, 2000; ROBARDS *et al.*, 1999; HOLLMAN & KATAN, 1999).

Em relação à composição de flavonoides do cambuci, apenas compostos da sub-classe dos flavonóis foram encontrados: derivados glicosilados de quercetina (2,8 mg/100 g b.u.) e em menor concentração, de caempferol (50 µg/ 100 g b.u.) (GENOVESE *et al.*, 2008).

1.2.2. Ácido elágico e derivados

O ácido elágico é um composto fenólico encontrado em nossa dieta principalmente em morango, framboesa e amora (TOMÁS-BARBERÁN & CLIFFORD, 2000). O ácido elágico pode ocorrer na forma livre, glicosilada (e.g. ácido elágico-4-arabinosídeo na framboesa) (**Figura 5**), ou ligado como tanino elágico, esterificado com glicose (BATE-SMITH, 1972; HADDOCK *et al.*, 1982; MAAS *et al.*, 1991).

Figura 5. Estruturas de derivados conjugados de ácido elágico encontrados em framboesa (MULLEN *et al.*, 2003).

Taninos elágicos são compostos fenólicos de alto peso molecular solúveis em água e com capacidade de precipitação de proteínas e alcalóides (SANTOS-BUELGA & SCALBERT, 2000). São ésteres do ácido hexahidroxi-difênico e um poliol, geralmente glicose e ácido quínico (HASLAM, 1989). Os monômeros de taninos elágicos podem ser oxidados nas plantas e formar dímeros, trímeros e tetrâmeros com pesos moleculares de até 4000 Da.

Existe um interesse particular na determinação das quantidades de ácido elágico presentes em frutos devido a crescentes evidências de seus efeitos quimiopreventivos. Estudos com animais utilizando carcinógenos químicos têm demonstrado que a administração do ácido elágico através da dieta inibe o desenvolvimento de cânceres de esôfago, fígado e pulmão, dependendo do tipo de composto utilizado. A aplicação tópica de ácido elágico também demonstrou diminuir a incidência de câncer de pele induzido quimicamente, em camundongos (HANNUM, 2004).

Em ratos, o ácido elágico administrado na dieta inibiu o desenvolvimento de câncer de esôfago induzido por N-nitrosometilbenzilamina (NMBA) em 25 a 50% e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas foram reduzidas (MANDAL & STONER, 1990).

Em estudo realizado por Kresty *et al.* (1998), a administração de framboesas liofilizadas a ratos tratados previamente com NMBA inibiu eventos carcinogênicos de iniciação e pós-iniciação como evidenciado pela diminuição na incidência e multiplicidade de tumores, inibição da formação de adutos de DNA, redução dos índices proliferativos, e inibição da formação de lesões pré-neoplásicas.

Diversos estudos também já relataram as propriedades antioxidantes *in vitro* dos taninos elágicos e do ácido elágico (GIL *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2001; MULLEN *et al.*, 2002; SRINIVASAN *et al.*, 2002). Priyadarsini *et al.* (2002) testaram a

atividade antioxidante do ácido elágico através da medida da habilidade de inibição da peroxidação lipídica induzida pela irradiação gama em microsossomos. O ácido elágico mostrou atividade antioxidante através do sequestro de ROS (reactive oxygen species) e RNS (reactive nitrogen species), tais como radicais hidroxila, peroxila, NO₂ e peroxinitrila, com constantes de velocidade comparáveis aos de antioxidantes conhecidos tais como as vitaminas C e E. Elagitaninos como sanguina H-6 e lambertianina C (presentes em altas concentrações em framboesa, amora-preta e morango) apresentam alta atividade antioxidante, podendo exercer efeitos protetores ao passarem pelo trato gastrointestinal, onde também podem ser despolimerizados liberando ácido elágico, o qual seria mais facilmente absorvido (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005). Cao *et al.* (1998) verificaram que a ingestão de suco de morangos frescos (240 g/copo) por mulheres aumentava a capacidade antioxidante do plasma em 14-30% após quatro horas, indicando que os compostos antioxidantes presentes eram absorvidos.

As fontes mais ricas de ácido elágico e derivados, romã, nozes, framboesa e amora, não estão habitualmente presentes na dieta da população brasileira. No entanto, excelentes fontes de ácido elágico foram identificadas entre algumas frutas nativas do Brasil, tais como o camu-camu (48 mg/100 g b.u.), araçá (64 mg/100 g b.u.) e cambuci (31 mg/100 g b.u.), todas da família Myrtaceae (GENOVESE *et al.*, 2008).

1.2.3. Taninos, proantocianidinas e procianidinas

Taninos são compostos fenólicos com massa molecular intermediária ou alta (variando de 500 a 30.000 Dalton). São moléculas altamente hidroxiladas e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. O nome tanino, aliás, advém

desta capacidade de ligação a proteínas: utilizam-se taninos no processo de curtume da pele de animais, em inglês “tanning”. O couro é, então, o resultado de complexos estáveis entre taninos e o colágeno da pele (BRAVO *et al.*, 1998; HERRMANN *et al.*, 1994). Do mesmo modo, os taninos se complexam com as proteínas salivares, atribuindo sensação de adstringência. Quanto mais polimerizado o tanino, maior é a sua precipitação. Os taninos resultantes em solução são aqueles de baixa massa molecular (SARNI-MANCHADO *et al.*, 1999).

Os taninos podem ser subdivididos em três grupos: hidrolisáveis, complexos e condensados. O primeiro grupo consiste num núcleo de glicose ou outro poliol esterificado com o ácido gálico (também chamado tanino gálico) ou o com o ácido hexahidroxidifênico (também chamado tanino elágico). A condensação oxidativa de 2 unidades galoil converte taninos gálicos em elágicos (**Figura 6**). Estes taninos são facilmente hidrolisáveis com ácidos, bases, aquecimento ou enzimas, produzindo álcool polihídrico e ácido fenilcarboxílico (RICE-EVANS *et al.*, 1996; BRAVO, 1998).

Figura 6. A - Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxidifênico.

Os taninos complexos consistem em um flavan-3-ol ligado glicosidicamente a uma unidade de tanino gálico ou elágico. Eles são apenas parcialmente hidrolisáveis (COS *et al.*, 2003).

Os taninos condensados, ou proantocianidinas, são polímeros de alta massa molecular. As unidades monoméricas que os compõem são, em grande parte, os flavan-3-ol, sendo um flavan-3,4-diol seu precursor. A condensação oxidativa ocorre entre o carbono C-4 com o C-6 ou C-8 das unidades adjacentes (**Figura 7**). Eles não possuem em sua estrutura um grupo poliol ligado e não são imediatamente hidrolisáveis (BRAVO *et al.*, 1998; HERMANN *et al.*, 1994; FERREIRA, 2003).

Figura 7. Procianidina C, um tanino condensado.

Os taninos condensados sob aquecimento em soluções alcoólicas (n-butanol) acidificadas (ácido clorídrico) se auto-oxidam produzindo pigmentos vermelhos de antocianidinas e são, por isso, também denominadas proantocianidinas (PORTER *et al.*, 1986). Proantocianidinas são oligômeros de flavonóides, especialmente os flavan-3-ol:

(+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina e (-)-epigalocatequina galato (BRAVO *et al.*, 1998; HERMANN *et al.*, 1995; KEALEY *et al.*, 1998; COS *et al.*, 2003). As ligações dos taninos condensados, ou proantocianidinas, são ácido-lábeis, sua quebra oxidativa ácida em meios alcoólicos produz antocianidinas. Se as subunidades monoméricas forem somente (+)-catequina e (-)-epicatequina, cianidina é o único produto resultante da quebra oxidativa. Proantocianidinas são chamadas, então, de procianidinas (PORTER, L.J., 1989; WOLLGAST *et al.*, 2000; DIXON *et al.*, 2004; SCALBERT *et al.*, 2000).

Os taninos condensados, de mesmo modo que os flavonóides, possuem diversas evidências de benefícios à saúde humana, a saber: analgésicos, imunomoduladores, hipocolesterolêmicos, moduladores antiinflamatórios e plaquetários, anti-ateroscleróticos, redutores da suscetibilidade oxidativa da LDL, bactericidas e, por fim, anticancerígenos por ser antioxidantes, antimutagênicos e reguladores da apoptose. Como desvantagem, afirma-se que os taninos reduzem a digestibilidade de proteínas e depletam micronutrientes como o zinco e o ferro (SCALBERT *et al.*, 1991; REED *et al.*, 1995; AERTS *et al.*, 1999; SMULIKOWSKA *et al.*, 2001; MATHUR *et al.*, 2002; SCHEWE *et al.*, 2001; SCHEWE *et al.*, 2002; MOINI *et al.*, 2002; COS *et al.*, 2003; DIXON *et al.*, 2004; ENGLER *et al.*, 2004; VINSON *et al.*, 2006; JALIL *et al.*, 2008).

Não há informações sobre a presença e/ou teores de proantocianidinas do cambuci até o momento.

1.3. Remoção da adstringência

Apesar do excelente sabor e aroma do cambuci, a alta adstringência dos frutos, provavelmente devido ao elevado conteúdo de taninos, reduz a sua aceitabilidade e aplicabilidade na indústria alimentícia.

Na boca, os taninos precipitam as proteínas presentes na saliva, principalmente a amilase, e se ligam aos receptores de sabor, causando uma sensação de secura no palato, característica de alimentos adstringentes (JOSLYN & GOLDSTEIN, 1964). Taninos altamente condensados são menos solúveis e apresentam menor capacidade de se ligar a outros componentes celulares (BUREM, 1970).

Os taninos possuem maior afinidade por proteínas ricas em prolina, tais como o colágeno (HAGERMAN *et al.*, 1981). As proteínas ricas em prolina correspondem aproximadamente 70% do total de proteínas da saliva (MEHANSHO *et al.*, 1987). As características gerais de proteínas com alta afinidade por taninos são: tamanho grande, estrutura livre e aberta, alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos e elevado conteúdo de prolina. Proteínas com baixa afinidade por taninos são geralmente pequenas, compactas e com ligações dissulfeto. A característica da proteína que melhor correlaciona-se com a afinidade a taninos condensados é o conteúdo de prolina (HAGERMAN, 1980).

O grau de adstringência de frutos como o caqui (*Diospyros kaki* L.) mostra-se altamente correlacionado com o teor de taninos. Frutos contendo aproximadamente 0,25% de tanino revelam-se ligeiramente adstringentes, tornando-se comestíveis quando a concentração de taninos solúveis encontra-se abaixo de 0,1% (KATO, 1984).

Uma maneira eficaz para remoção da adstringência é submeter o fruto a um processo de destanização. Durante esse processo, o acetaldeído é acumulado na polpa, e concomitantemente os taninos solúveis em água, responsáveis pela adstringência, são

gradualmente insolubilizados, reduzindo assim a adstringência. Matsuo e Itoo (1976) mostraram que os taninos do caqui são proantocianidinas com alto peso molecular ($\sim 1.38 \times 10^4$ daltons em média), e sugeriram que sua insolubilização é causada pela condensação com o acetaldeído, tendo em vista que as proantocianidinas solúveis em água formam gel quando tratadas com acetaldeído *in vitro*.

O acetaldeído é gerado *in situ* pela oxidação do etanol endógeno ou exógeno e pela descarboxilação do ácido pirúvico (PESIS *et al.*, 1986).

A polimerização das moléculas de tanino pode ser causada por ligações covalentes com moléculas de acetaldeído ou por interações não covalentes com outros componentes presentes no citosol (MATSUO *et al.*, 1982).

Alguns métodos de destanização incluem aplicação de vapor de álcool etílico, etileno (aceleração do amadurecimento), ou exposição dos frutos a ambiente anóxico, sendo que todos tem como foco principal acumular acetaldeído na polpa (MATSUO *et al.*, 1991). As vantagens e desvantagens dos diferentes métodos variam e a escolha, é orientada pela relação custo/benefício e facilidade de adaptação dos produtores segundo Edagi & Kluge (2009).

1.3.1. Aplicação de etanol

A destanização com álcool etílico é um processo simples e que tem a vantagem de poder ser realizada até mesmo por pequenos produtores, consistindo no armazenamento dos frutos em câmaras sob condições que propiciem a evaporação do álcool. Quanto maior a concentração de etanol na atmosfera circundante, maior será a sua penetração no fruto (KATO, 1987).

Insolubilização pode ser promovida através da destanização com vapor de álcool etílico. Esse processo consiste na transformação do etanol que penetra nos frutos, através da ação da enzima álcool desidrogenase, em acetaldeído, o qual terá a papel de polimerizar os taninos solúveis (OSHIDA *et al.*, 1996).

Entre as desvantagens da destanização com álcool está o fato de ser um processo recomendado apenas para pequenas quantidades de frutos e o de ser um tratamento que pode resultar no amolecimento da polpa (ANTONIOLLI *et al.*, 2000; SHIMIZU *et al.*, 2002)

Matsuo (1991) comprovou que desativando a enzima álcool desidrogenase em alta temperatura, o etanol não é capaz de remover a adstringência, sendo necessária a presença da enzima para catalisar a formação do acetaldeído. O acetaldeído também pode ser utilizado para a remoção da adstringência, porém a aplicação de etanol foi mais eficiente; fato provavelmente relacionado com a melhor absorção de etanol pelos frutos em relação ao acetaldeído (FUKUSHIMA *et al.*, 1991).

1.3.2. Aplicação de etileno

A destanização com etileno acelera o amadurecimento. Esse processo tem como grande inconveniente a diminuição da vida de prateleira do fruto, já que este perde firmeza, tornando-se muito frágil. O amolecimento ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas de degradação de parede celular (TAIRA *et al.*, 1997).

Assim como o etanol, o etileno induz a formação do acetaldeído, que irá polimerizar as moléculas de taninos, além de formar etanol que pode ser transformado em acetaldeído (EDAGI & KLUGE, 2009).

Esse processo pode ser feito utilizando carbureto de cálcio que, ao reagir com água, libera hidróxido de cálcio e etileno. Porém tal processo é perigoso, considerando os riscos de explosão. Outra maneira, mais segura, pode ser realizada com a aplicação de acetil, uma mistura de etileno e nitrogênio que não é explosiva já que o nitrogênio é um gás inerte (EDAGI & KLUGE, 2009).

1.3.3. Armazenamento em ambiente com baixo teor de oxigênio

É possível produzir acetaldeído armazenando os frutos sob baixa concentração de oxigênio. Sob esta condição, o piruvato proveniente da glicólise é descarboxilado, gerando grandes quantidades de acetaldeído e etanol (EDAGI & KLUGE, 2009).

Baixas concentrações de oxigênio na atmosfera de armazenamento são capazes de promover respiração anaeróbica; tal efeito pode ser conseguido com alta pressão parcial de nitrogênio ou dióxido de carbono (método mais utilizado pela maior eficiência) (PESIS *et al.*, 1986; ARNAL & DEL RIO, 2003).

Concentrações entre 70% e 100% de dióxido de carbono são eficientes para destanização de caqui, além de manter a firmeza adequada do fruto (PESIS *et al.*, 1986).

Esse processo tem como desvantagens o aparecimento de manchas escuras no caqui, quando aplicado por períodos maiores de 24 h, provavelmente pelo aumento da atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) (KATO, 1987). Outra desvantagem é a possibilidade de ocorrer ressolubilização das moléculas de tanino, caso a etapa de polimerização com acetaldeído não seja corretamente concluída (ITAMURA *et al.*, 1989).

Com o uso de embalagens de polietileno, com permeabilidade menor que a taxa de produção de dióxido de carbono, é possível formar um ambiente que possibilite a formação de acetaldeído a partir do piruvato (PESIS *et al.*, 1986).

Embora o processo de destanização do caqui esteja bem estabelecido e seja amplamente utilizado, nenhum estudo foi realizado com o cambuci, cuja elevada adstringência limita seu consumo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Comparação dos frutos de cambuci, provenientes de 4 município do estado de São Paulo, em relação ao tamanho, teor de sólidos solúveis totais, acidez titulável, teores de fenólicos totais, taninos e capacidade antioxidante *in vitro*;
- Caracterização dos frutos de cambuci (provenientes de Mogi das Cruzes), em seis estágios de maturação, em relação ao tamanho, firmeza, sólidos solúveis totais, acidez titulável e teores de taninos;
- Comparar a eficiência dos processos de destanização do cambuci utilizando meio anóxico, câmara de etileno e tratamento com etanol (imersão, vapor e aplicação no cálice);
- Avaliar o efeito da destanização sobre pH, acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST), teores de fenólicos totais, proantocianidinas totais, perfil e teores de flavonóides, vitamina C, ácido elágico livre e total, atividade da polifenoloxidase, inibição da α -amilase e α -glicosidase e capacidade antioxidante *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Este estudo foi dividido em três etapas, sendo a primeira a determinação da variabilidade dos frutos de cambuci colhidos em um mesmo plantio comercial, localizado em Paraibuna, e colhidos em quatro municípios do estado de São Paulo. A segunda etapa correspondeu à caracterização dos frutos de cambuci em seis estádios de maturação, e a última etapa, avaliação de diferentes métodos de destanização para reduzir a adstringência.

Para a primeira etapa, foram utilizados frutos maduros, colhidos entre os meses de março e abril de 2012, provenientes de Mogi das Cruzes (Sítio Sussumo Nagai), Rio Grande da Serra (produtor local), Paraibuna (Sítio do Bello) e Paranapiacaba (produtor local). Foram colhidos cerca de 50 frutos em cada localidade.

Para a segunda etapa foram utilizados frutos em diferentes estádios de maturação, coletados em 01 de março de 2012, em plantação comercial no sítio Sussumo Nagai, localizado em Mogi das Cruzes – SP, selecionados de acordo com seu tamanho, firmeza e arredondamento das quinas. Foram divididos em seis grupos, sendo o grupo 1 composto por frutos mais jovens, indo até o grupo 6, composto por frutos já maduros. Cada grupo continha cerca de 60 frutos.

Para a terceira etapa foram selecionados frutos em estágios de maturação previamente determinados, provenientes de Mogi das Cruzes, colhidos em março de 2011 e maio de 2012, Paranapiacaba, colhidos em abril de 2011, e Paraibuna colhidos em abril de 2011, os quais foram utilizados nos tratamentos de destanização por imersão em etanol, aplicação de etanol no cálice, câmara de etanol, câmara de etileno e câmara de CO₂.

Na **Tabela 1** estão descritas as regiões de onde os frutos utilizados neste estudo foram colhidos.

Tabela 1. Características dos locais de produção dos cambucis utilizados nos experimentos.

Região	Latitude	Longitude	Tipo de plantação
Mogi das Cruzes	23°31'29'' Sul	46°11'14'' Oeste	Comercial
Rio Grande da Serra	23°44'43'' Sul	46°24'8'' Oeste	Local
Paraibuna	23°22'53'' Sul	45°39'45'' Oeste	Comercial
Paranapiacaba	23°39'20'' Sul	47°13'31'' Oeste	Local

Os frutos colhidos no Sítio Sussumo Nagai (Mogi das Cruzes) e Sítio do Bello (Paraibuna) foram colhidos de árvores com aproximadamente 15 e 12 anos de idade, respectivamente.

Todos os produtores não possuem pomar clonal e as arvores foram obtidas por sementes.

Como o cambuci permanece com a coloração verde durante o amadurecimento, os produtores identificam o fruto maduro quando este se destaca facilmente da planta e quando suas quinas estão mais arredondadas (**Figura 8**).

Figura 8. Cambuci maduro, á direita, com as quinas mais arredondadas, cambuci mais jovem à esquerda.

Todos os frutos utilizados foram colhidos pela manhã e transportados em caixas de poliestireno expandido (“isopor”) refrigeradas até o Laboratório de Compostos Bioativos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os frutos forma analisados ao chegarem ao laboratório foram avaliados quanto à firmeza (Kg/cm^2), massa, altura e diâmetro. A partir de 15 frutos, foram preparadas amostras de suco do cambuci em triplicata para avaliação de pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST). Em seguida foram congelados a -90°C em nitrogênio líquido, liofilizados (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems®) e armazenados a -20°C para as análises químicas.

3.2 Métodos

3.2.1 Diâmetro, altura e firmeza

Para se obter o diâmetro e altura, o fruto foi medido com o auxílio de um paquímetro digital marca Mitutoyo, modelo MIP/E-104-1 nos dois sentidos e os resultados expressos em milímetros (mm). A firmeza foi determinada com um penetrômetro portátil marca Instrutherm, modelo PTR-100, com ponteira de 7,9 mm de diâmetro, que mede força de penetração de 0 a $13 \text{ kg}/\text{cm}^2$. A leitura foi feita entre a região equatorial e o cálice.

3.2.2 Acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST) e pH

Para a determinação de pH, AT e SST os sucos foram preparados com uma prévia trituração no liquidificador e em seguida centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, sendo utilizado somente o sobrenadante.

O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro digital marca Hanna instruments pH 20 – pH 21, calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, segundo técnica da AOAC (2005). A determinação da acidez titulável foi realizada por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, usando como indicador a fenolftaleína, segundo técnica da AOAC (2005). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

Os sólidos solúveis totais foram determinados por refratometria, e foi utilizado o refratômetro digital marca Reichert Analytical Instruments r² mini, com correção automática de temperatura. Os resultados foram expressos em °Brix, conforme AOAC (2005).

3.2.3 Determinação da umidade

A determinação foi feita com cinco frutos, em liofilizador a vácuo (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems®) durante 96 horas (AOAC, 2005) em triplicata, e os resultados foram expressos como percentual, na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.2.4 Determinação de fibras totais

As fibras totais foram determinadas segundo o método descrito pela AOAC (AOAC, 2005). Em um recipiente foram misturados suavemente 0,5 g de amostra seca e 25 mL de água. O recipiente foi posteriormente envolvido em papel alumínio e incubado a 37°C por 90 min. Após a incubação, 100 mL de etanol foram adicionados e a mistura permaneceu em repouso por 1 hora a temperatura ambiente (25°C). A mistura foi filtrada a vácuo (filter aid - CELITE) e o sedimento recolhido em cadinho previamente pesado. O sedimento foi lavado 2 vezes com 20 mL de etanol (78%), 2 vezes com 10 mL etanol e 1 vez com 10 mL de acetona. Após a lavagem, o conjunto (cadinho e sedimento) foi colocado em estufa a 105 °C por 2 horas. Após o resfriamento em dessecador, efetuou-se a pesagem. Uma parte do sedimento foi colocada em mufla a 525°C por 5 horas para determinação de cinzas, resfriada e pesada. A outra parte do sedimento foi utilizada para determinação do teor de proteínas pelo método de micro Kjeldahl usando o fator % N x 6,25.

$$\% = 100 \times \left[\frac{\left\{ \frac{\text{Pr} - [(P + A) \times \text{Pr}]}{100} \right\}}{\text{Ps}} \right]$$

Onde:

Pr = mg resíduo

P = % proteína

A = % de cinzas no sedimento

Ps= mg amostra

3.2.5. Composição mineral

Os teores dos seguintes minerais foram determinados para definir a composição mineral do cambuci: sódio, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, zinco, ferro, manganês, cobre e selênio. Para a quantificação destes minerais, as amostras, inicialmente, foram submetidas a um processo de digestão ácida por 24 horas. A quantificação de sódio e potássio foi realizada por fotometria de emissão de chamas, e os demais minerais por espectrofotometria de absorção atômica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.2.6. Determinação da atividade inibitória da α -amilase *in vitro*

Este ensaio foi baseado no método descrito por Ali *et al.* (2006) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α -amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co.) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5% (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M, com breve aquecimento. Neste ensaio, 40 μ L do extrato, 160 μ L de água destilada e 400 μ L da solução de amido 0,5% foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25 °C por 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 200 μ L de solução enzimática em tempos diferentes (0, 1, 2, 3 minutos). Uma alíquota de 200 μ L da solução obtida foi retirada e adicionada em outro tubo de ensaio contendo 100 μ L de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 96 mM), o qual foi colocado imediatamente em banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 μ L de água destilada. A atividade da α -amilase foi

determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (BIOTEK, mod. Synergy H1). O controle positivo da reação representava 100% da atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, utilizando 40 µL e água no lugar do extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada e o procedimento foi realizado da mesma maneira descrita acima. No tempo zero, as amostras foram adicionadas a solução de DNS imediatamente após a adição de enzima. A produção de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540\text{nm}} (\text{amostra ou controle}) - A_{540\text{nm}} (\text{branco})$$

Onde A_{540} representa a absorbância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorbância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose gerada pela equação da reta obtida pela curva padrão.

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - [(\% \text{ maltose produzida no extrato no tempo 3 minutos}) - (\% \text{ maltose produzida no controle no tempo 3 minutos})]}{\% \text{ maltose produzida no controle no tempo 3 minutos}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram expressos em mg de amostra/mL do meio de reação e também em mg equivalente de catequina/mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de maltose.

3.2.7 Determinação da atividade inibitória da enzima α -glicosidase *in vitro*.

Este ensaio foi baseado no método descrito por Watanabe et al. (1997) com algumas modificações realizadas por Yamaki e Mori (2006) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose liberada na quebra do substrato pela enzima. O substrato utilizado na reação foi o *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo, dissolvido em tampão fosfato (pH 7,0). Foi realizada a extração do Intestinal acetone powders from rat (I1630- Sigma) 30 mg/mL em tampão fosfato (pH 7,0), sonificado por 3 min. centrifugado por 10 min. a 8000 g, o sobrenadante foi utilizado como α -glicosidase. Para o ensaio, 100 μ L da solução enzimática foram adicionados a 20 μ L de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), a qual foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 μ L de substrato. Procedeu-se outra incubação por 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorbância a 405 nm no tempo zero e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (BIOTEK, mod. Synergy H1). Os extratos foram adequadamente diluídos. Os cálculos foram efetuados a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{controle}) - \text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{controle})} \times 100$$

Onde $\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{controle})$ refere-se à absorbância do controle a 405 nm e $\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{amostra})$ à absorbância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em mg de amostra/mL do meio de reação e também em mg equivalente de catequina/mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de glicose.

3.2.8 Atividade respiratória e produção de etileno

A avaliação da atividade respiratória e produção de etileno foram realizadas no Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas, do departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, sob supervisão do Professor Doutor Angelo P. Jacomino.

Cinco frutos, de três estádios de maturação mais desenvolvidos (4, 5 e 6), foram acondicionados isoladamente em recipientes herméticos de vidro com volume de 700 mL, por 1 hora. Após este período, amostras de 1 mL de gás foram coletadas dos frascos, utilizando-se uma seringa (Hamilton, Gastight, Nevada, EUA) com capacidade de 2,5 mL e imediata injeção no cromatógrafo. As determinações das concentrações de etileno e atividade respiratória (CO_2) foram realizadas por cromatografia gasosa, em equipamento modelo Trace GC 2000, marca ThermoScience, com 2 injetores, 2 detectores de ionização de chama (FID) e 2 colunas “Porapak N”, uma delas com 1,8 metros para amostras de etileno e outra com 4 metros para amostras de CO_2 . O gás de arraste utilizado nestas análises foi o hidrogênio, a um fluxo constante de $27 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para determinação do CO_2 e nitrogênio a um fluxo também constante de $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, para determinação de etileno. As temperaturas mantidas no aparelho foram de 140°C na coluna, 120°C no injetor, 250°C no detector e 350°C no metanador. Foram utilizados gases padrões de CO_2 e etileno para elaboração das curvas padrões.

A atividade respiratória e a produção de etileno foram calculadas com base nos resultados obtidos das determinações cromatográficas, massa dos frutos, tempo de incubação e volume do frasco. Os resultados da atividade respiratória foram expressos em $\text{mL de CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e os resultados da produção de etileno expressos em $\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.2.9 Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

3.2.9.1 Extração

As amostras foram extraídas, em triplicata, com metanol aquoso 80% (armazenado em freezer) na proporção de 1:100 (m/v), com agitador magnético e barra magnética por 2 h a 4°C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar sob-refrigeração a 4°C, até o momento da análise, e diluídos se necessário em metanol aquoso 80%.

3.2.9.2 Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)

Este ensaio foi realizado de acordo com Singleton *et al.* (1999), modificado por Genovese *et al.* (2003). Utilizou-se 0,25 mL dos extratos obtidos, adicionou-se a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37°C durante 30 min para desenvolvimento de cor e posterior determinação da absorbância.

A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro Hewlett – Packard 8453 (Palo Alto, EUA) e o conteúdo de fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de catequina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em µg de catequina/100 g de amostra (b.s.).

3.2.9.3 Sequestro de radicais livres - DPPH[•]

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando-se o método do sequestro de radicais livres do DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações (Duarte – Almeida *et al.*, 2006). Uma solução metanólica de DPPH[•] (0,05 mM) foi preparada para apresentar em torno de 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 200 µL da solução de DPPH[•], 40 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. As leituras de absorbância foram efetuadas a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 25°C.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH}^{\bullet} = [(A_{517(C)} - A_{517(A)}) / A_{517(C)}] \times 100$$

onde, $A_{517(C)}$ refere-se à absorbância do controle a 517 nm e $A_{517(A)}$ refere-se à absorbância da amostra a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX - Flucka Chemicals Suisse) em metanol P.A. em diferentes concentrações e suas respectivas porcentagens de descoramento. Os resultados foram expressos como µmoles equivalentes de Trolox /100 g (b.s).

3.2.9.4 Determinação do poder redutor do ferro – método FRAP

A capacidade de redução do ferro foi determinada de acordo com Benzie e Strain (1996) com modificações. O reagente de FRAP foi preparado na concentração de 10:1: 1 com as seguintes soluções: (a) tampão acetato de sódio (Dinâmica) 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2, 4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ – Flucka Chemicals Suisse) 10 mM em ácido clorídrico (VETEC) 40 mM e (c) solução de cloreto férrico (Synth) 20 mM. O reagente foi preparado no momento da análise. Como padrão foi utilizado o reativo ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX – Flucka Chemicals Suisse) em concentração de 50 a 400 μ M. A leitura da absorbância foi feita em 593 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1(Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 37°C. Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox/100 g (b.s.).

3.2.10 Quantificação das proantocianidinas e taninos totais

3.2.10.1 Método do n-butanol acidificado

As amostras foram extraídas, em triplicata, com acetona aquosa 80% (armazenadas em freezer) na proporção de 1:100 (m/v) com agitador magnético e barra magnética por 1 hora a 4°C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n° 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos se necessários em acetona aquosa 80%.

O método do butanol acidificado utilizado para a quantificação das proantocianidinas foi o método cromogênico descrito por Porter *et al.* (1986). Foi

preparada uma solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado na proporção de 3 para 2, e a seguir 77 mg de sulfato de ferro hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em meio litro do butanol acidificado. Adicionou-se 2,5 mL desta solução a 250 μL do extrato devidamente diluído em um tubo de ensaio. Do mesmo modo, uma curva padrão foi preparada, variando de 0 a 2,4 mg/mL de tanino quebracho (QT, Unitan, Buenos Aires, Argentina). Os tubos foram tampados e deixados em banho a 95°C por 15 minutos; então, após leve agitação, tiveram sua absorbância medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm. A quantidade de proantocianidinas foi calculada com base na curva padrão e expressa em mg equivalentes de tanino quebracho/100 g de amostra (b.s.).

3.2.10.2 Método DMAC

As amostras foram extraídas, em triplicata, com acetona: água: ácido acético (70: 29,5: 0,5 v/v/v) na proporção de 1:1000 (m/v), em ultrassom por 30 min. Em seguida foram colocadas em barra magnética por 1 h a 4°C. Os extratos foram centrifugados a 10.000 g a 10°C por 10 min e coletou-se o sobrenadante. Os sobrenadantes foram armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos em etanol aquoso 80%.

O método DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi realizado de acordo com Prior *et al.* (2010). As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Foi preparada uma solução reagente de DMAC (0,1 %) em etanol: água: ácido clorídrico (75: 12,5: 12,5 v/v/v). Adicionou-se 210 μL desta solução a 70 μL do extrato devidamente diluído. Do mesmo

modo, uma curva padrão foi preparada, variando de 0 a 100 µg/ mL de prociadina B2 (HPLC, purity > 99%, Extrasynthese). A leitura da absorbância foi realizada a cada minuto durante 30 minutos a 640 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1(Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 25°C. Os resultados foram expressos como mg equivalente de prociadina B2/100 g de amostra (b.s).

3.2.10.3 Teor de taninos totais

As amostras foram extraídas, em triplicata, com metanol aquoso 80% (armazenado em freezer) na proporção de 1:100 (m/v), com agitador magnético e barra magnética por 2 hora a 4°C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar sob-refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos se necessários em metanol aquoso 80%.

O teor de taninos totais foi medido através do método de precipitação protéica descrito por Hagerman *et al.* (1978). Foram preparadas três soluções: (A) tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0) e 1,0 mg/ml BSA; (B) solução aquosa contendo 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% (v/v) trietanolamina e 20% (v/v) isopropanol, (C) FeCl₃ 0,01M em 0,01N HCL. Misturou-se 250 µL do extrato com 500 µL da solução A, foi deixado em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Após repouso centrifugou-se por 10 minutos a 500 g e descartado o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em 1 mL da solução B mais 250 µL da solução C. Após 20 minutos tiveram sua absorbância medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm. Do mesmo modo, uma curva padrão foi preparada, variando de 0 a 0,4 mg/mL de ácido tânico (Sigma chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos como mg equivalente de ac. tânico/100 g de amostra (b.s).

3.2.11 Determinação de flavonoides e ácido elágico livre e total

3.2.11.1 Extração dos flavonoides e ácido elágico livre

A extração foi realizada segundo Arabbi *et al.* (2004) com adaptações. As amostras foram extraídas com metanol aquoso 70% (armazenado em freezer) na proporção de 1:100 (m/v), através de agitador magnético, por duas horas a 4°C. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador em temperaturas de banho de 40°C (até aproximadamente 20 mL). As amostras concentradas, já sem metanol, foram passadas em coluna de 1 g de Poliamida. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonoides foi feita com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspendidas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.11.2 Extração de ácido elágico total

A determinação de ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Pinto *et al.* (2008). Amostras previamente pulverizadas (0,5 g) foram extraídas com 50 mL de acetona 80%, através de agitador magnético, por duas horas a 25°C. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6. O resíduo foi

re-extraído com mais duas porções de 25 mL de acetona 80%. Alíquotas de 2 mL do extrato obtido foram transferidas para vial, evaporadas até secagem completa em evaporador analítico (Organomation, Berlin, MA) e hidrolisadas com 2 mL de TFA (ácido trifluoro acético) 2N a 120°C por 90 min. Após hidrólise, foram adicionados 2 mL de álcool butílico terciário e os vials foram novamente evaporados. Após secagem, foram ressuspensos com 1 mL de metanol e filtrados em filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação de ácido elágico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD). O padrão de ácido elágico foi comprado da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

3.2.11.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD)

Na identificação de flavonoides, ácido elágico livre e ácido elágico total, estes foram separados por uma coluna Prodigy 5µ ODS (3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd., Reino Unido). Foi utilizado gradiente de solventes constituído por A. Água : Tetrahydrofurano : Ácido trifluoroacético (98 : 2: 0,1) e B. Acetonitrila, na proporção de 15% de B por 2 minutos aumentando para 25% B após 5 minutos, 35% B após mais 8 minutos e 50% B após mais 5 minutos. Para limpeza da coluna foi aumentada então para 100% B e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. O cromatógrafo utilizado foi o do sistema Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), controlados pelo software ChemStation. As amostras foram injetadas em duplicata e os compostos fenólicos foram identificados através da comparação do tempo de retenção e espectro com o dos padrões, e quantificados utilizando-se curva padrão apropriada. Os

padrões de epigallocatequina galato e rutina foram comprados da Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA. Os derivados glicosilados de quercetina e campferol foram quantificados usando-se curva padrão de suas respectivas agliconas (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).

3.2.12 Determinação de Vitamina C

As análises do ácido ascórbico foram realizadas segundo Abe *et al.* (2012). As amostras foram homogeneizadas com ácido metafosfórico 3% (m/v), em proporção 0,2: 2 (m/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm. Foi preparada uma solução reagente de DTT (ditiotreitól) em trizina: DTT: água (0,4: 0,38: 10 m/m/v). Adicionou-se 250 µL desta solução em 250 µL do sobrenadante filtrado e após 30 minutos adicionou-se 500 µL de tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico para a análise da vitamina C total. As amostras foram analisadas em CLAE utilizando coluna BondapakTM C18 (3,9 × 300 mm; 10 µm) (Waters, IRL), fase móvel composta por tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico, fluxo de 0,8 mL/minuto. A curva padrão foi feita com padrão de ácido ascórbico Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA) de concentrações 10 e 100 µg/mL. A detecção foi realizada por UV a 254 nm. Os resultados foram expressos em mg /100 g de amostra (b.s).

3.2.13 Determinação da polifenoloxidase

A determinação da enzima polifenoloxidase (PPO) foi realizada segundo Gomes *et al.* (2001), com modificações. Os frutos foram rapidamente macerados em gral, em

banho de gelo, e o suco obtido foi filtrado utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O suco filtrado foi utilizado para determinação da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO).

A atividade da PPO foi determinada pela adição 112 µL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0 com 70 µL do suco mais 7 µL substrato, catecol (0,01M), preparado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0. Ao branco, foi adicionado 7 µL do substrato mais 182 µL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0. As absorbâncias foram determinadas a 420 nm a cada 1 min por um período de 1 h em espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 30°C. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a 0,001 da absorbância por minuto.

3.2.14 Processos de destanização

Foram realizados quatro testes de destanização. No primeiro e quarto (testes 1, e 4, respectivamente) foram utilizados frutos de cambuci, adquiridos de produtor comercial da região de Mogi das Cruzes – SP, coletados em 23 de março de 2011 e 04 de maio de 2012, respectivamente.

O segundo experimento (Teste 2) foi realizado com frutos adquiridos de produtor comercial da região de Paranapiacaba – SP, coletados na data de 26 de abril de 2011.

O terceiro experimento (Teste 3) foi realizado com frutos adquiridos de produtor comercial da região de Paraibuna – SP, coletados na data de 28 de abril de 2011.

Em todos os experimentos os frutos foram tratados no mesmo dia em que foram coletados.

3.2.14.1 Tratamentos

Teste 1:

Os frutos foram divididos em cinco grupos, cada grupo contendo 24 frutos, e submetidos aos seguintes tratamentos de destanização: (1) controle, o qual não sofreu tratamento, (2) frutos imersos em etanol 96% por 5 minutos, (3) frutos submetidos ao vapor de etanol 96% (3,85 mL álcool/L de câmara) (ANTONILLI *et al.*, 2000) em recipiente hermeticamente fechado com dimensão de 21,15 dm³ no período de 20 h, (4) ao etileno através do acondicionamento com bananas prata em recipiente com dimensão de 21,15 dm³ fechado por 20 h e (5) frutos armazenados em ambiente anóxico constituído por dessecador hermeticamente fechado durante 20 h. As bananas utilizadas para criar uma atmosfera rica em etileno apresentavam coloração amarela, porém com as pontas ainda verdes, nessa fase as bananas encontram-se no período climatérico, onde a produção de etileno é elevada (CHITARRA & CHITARRA, 1990). O meio anóxico foi obtido colocando uma vela acesa e fechando a tampa do dessecador, a partir do momento que a vela apagou consideramos que os frutos estavam armazenados em meio livre de oxigênio. Todos os tratamentos foram aplicados em temperatura ambiente.

Após saírem do tratamento os frutos foram armazenados no laboratório em temperatura ambiente de 24±3°C e analisados em três momentos diferentes.

Terminado o período de armazenamento, os frutos do teste 1 e dos testes seguintes, foram cortados ao meio, sendo metade congelada em nitrogênio líquido e liofilizada para posterior análise e metade para determinação de acidez titulável, pH e sólidos solúveis totais.

É importante destacar que todos os grupos, inclusive o controle, foram analisados no mesmo momento, tomando como referência o primeiro, segundo e

terceiro dia após os frutos tratados por 20 h saírem do tratamento. Portanto, para os frutos tratados em câmaras de etanol, etileno e CO₂ as análises foram realizadas nos tempos 24, 48 e 72 h após saírem do tratamento, já para os frutos imersos em etanol as análises foram realizadas nos tempos correspondentes a 44, 68 e 92 h após tratamento.

Teste 2:

Os frutos foram divididos em cinco grupos, cada grupo contendo 24 frutos, e submetidos aos mesmos tratamentos de destanização do teste 1, no entanto nesse teste o meio anóxico foi obtido com o auxílio de uma bomba de vácuo conectada ao dessecador e o tratamento com etileno foi feito em uma sala fechada (4950 dm³) com o uso de um catalisador de etileno (Banasil®), usado por produtores comerciais para destanizar caqui, com duração de 10 h.

Após saírem do tratamento os frutos foram armazenados no laboratório em temperatura ambiente de 20±2°C e analisados.

Todos os grupos, inclusive o controle, foram analisados no mesmo momento, tomando como referência o primeiro dia após os frutos tratados por 20 h saírem do tratamento. Portanto, para os frutos tratados em câmaras de etanol e CO₂ as análises foram realizadas 24 h após saírem do tratamento, a análise dos frutos tratados com etileno foi realizada 34 h após tratamento e os frutos imersos em etanol as análises foram realizadas 44 h após tratamento.

Teste 3:

Os frutos foram divididos em cinco grupos, cada grupo contendo 24 frutos, e submetidos aos mesmos tratamentos de destanização do Teste 2, porém o meio anóxico

foi obtido com o auxílio de uma bomba de vácuo conectada ao dessecador na presença de gelo seco para criar uma atmosfera rica em CO₂, com duração de 20 h.

Após saírem do tratamento os frutos foram armazenados em refrigerador com temperatura de 4°C e analisados em três tempos diferentes.

Para o momento de análise foi tomado por base o primeiro, segundo e terceiro dia que os frutos com processos de 20 h saíram do tratamento (câmara de etanol e CO₂). Portanto, para os frutos tratados em câmaras de etanol e CO₂ as análises foram realizadas nos tempos 24, 48 e 72 h após tratamento, para os frutos imersos em etanol as análises foram realizadas nos tempos correspondentes a 44, 68 e 92 h após tratamento e para os frutos tratados com etileno as análises foram realizadas nos tempos correspondentes 34, 58 e 82 h após tratamento.

Teste 4:

Os frutos foram divididos em quatro grupos, cada grupo contendo 24 frutos, e submetidos aos seguintes tratamentos de destanização: (1) controle, o qual não sofreu tratamento, (2) frutos imersos em etanol 96% por 5 minutos, (3) frutos submetidos ao vapor de etanol 96% (3,85 mL álcool/L de câmara) (ANTONILLI *et al.*, 2000) em recipiente hermeticamente fechado com dimensão de 21,15 dm³ no período de 20 h e (4) frutos contendo no cálice 100 µL de etanol 96%. Os frutos foram armazenados no laboratório em temperatura ambiente de 21±3°C e analisados.

Para o momento de análise foi tomado por base o terceiro dia em os frutos tratados em câmara de etanol saíram do tratamento. Portanto, para os frutos tratados em câmara de etanol as análises foram realizadas 72 h após tratamento e para os frutos imersos em etanol as análises foram realizadas 92 h após tratamento.

3.3 Análises dos resultados

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa Statistica versão 10.0 da StatSoft (Tulsa, EUA). A comparação das médias foi realizada por ANOVA ($P < 0,05$), teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variabilidade entre frutos de cambuci colhidos em um mesmo plantio comercial

O cambuci é um fruto nativo da Mata Atlântica, e além da sua grande diversidade encontrada em diferentes regiões, existem também diferenças entre frutos plantados em uma mesma região.

Frutos maduros de diferentes tamanhos foram coletados de três diferentes árvores no Sítio do Bello, em Paraibuna, no mês de abril de 2011 e classificados em pequeno, médio e grande, respectivamente. Na **Tabela 2** é possível identificar as diferenças em relação ao tamanho, massa, firmeza, teor de sólidos solúveis totais, acidez e pH.

Tabela 2. Características físicas e químicas de cambucis colhidos em tamanhos disitintos no Sítio do Bello, Paraibuna – SP, e analisados imediatamente após a colheita.

	Pequeno	Médio	Grande
Massa (g)	26,6 ±4,1 ^a	50,7±7,9 ^b	127,2±30,3 ^c
Altura* (mm)	39±2 ^a	42±4 ^a	62±19 ^a
Diâmetro* (mm)	38±2 ^a	60±6 ^b	81±21 ^b
Firmeza* (kg/cm²)	0,3±0,1 ^a	0,4±0,2 ^a	1,5±0,4 ^b
Sólidos solúveis totais** (°Brix)	10,17±0,25 ^a	10,1±0,2 ^a	10,8±0,15 ^a
pH**	2,80±0,02 ^a	2,40±0,04 ^b	2,48±0,02 ^c
Ácidoz titulável** (% ácido cítrico)	1,7±0,16 ^a	3,6±0,21 ^b	3,4±0,23 ^b

*Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=10).

**Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Comparando-se com três dos principais frutos da dieta brasileira, o cambuci coletado no Sítio do Bello apresenta teor de sólidos solúveis totais semelhantes à laranja pera, 8 - 12° Brix, e ao limão tahiti, 9 °Brix (LANDANIYA, 2008), não sendo, portanto, muito doce já que apresenta aproximadamente metade do teor de sólidos solúveis totais que da banana prata, na faixa de 22,23 - 23,01 °Brix (VIVIANI e LEAL, 2007).

Podemos considerar os três “tipos” de cambuci ácidos, já que apresentam acidez titulável entre a do limão tahiti, 5 – 6 % de ácido cítrico, e da laranja pera, 0,95 % de ácido cítrico. Os frutos de tamanho médio e grande são mais ácidos que os pequenos (LANDANIYA, 2008).

Provavelmente frutos com diferentes tamanhos correspondem a diferentes variedades genéticas. Assim como o tomate, onde o genótipo influencia a forma e o tamanho do fruto (TANKSLEY 2004).

4.2 Variabilidade do cambuci de diferentes municípios

A seguir avaliaram-se frutos maduros de quatro diferentes regiões, Mogi das Cruzes, Paraibuna, Paranapiacaba, e Rio Grande da Serra. Os frutos colhidos para esta etapa do estudo possuíam tamanho semelhantes aos frutos classificados como “médio” no estudo anterior.

4.2.1 Composição centesimal

Foi realizada análise centesimal das amostras liofilizadas de cada região. Os frutos de Mogi das Cruzes se destacaram pela maior quantidade de cinzas, lípidos, proteínas e calorias, já os frutos de Rio Grande da Serra apresentaram maior quantidade de carboidratos. O teor de fibras foi maior nos frutos de Rio Grande da Serra e Mogi das Cruzes, cerca de 19 g/100 g b.s., já os frutos de Paranapiacaba apresentaram a menor quantidade, 10,53 g/100 g b.s. (**Tabela 3**).

Tabela 3. Teores de umidade (%), cinzas (g/100 g b.s.), lipídeos (g/100 g b.s.), proteína (Nx5,75) (g/100 g b.s.), carboidratos (g/100 g b.s.) e calorias (Kcal/100 g b.s.) dos frutos provenientes de distintas regiões.

	Rio Grande da Serra	Mogi das Cruzes	Paraibuna	Paranapiacaba
Umidade*	85,6±2,7 ^a	88,8±0,6 ^a	86,3±1,2 ^a	87,4±1,5 ^a
Cinzas*	2,05±0,04 ^a	2,62±0,02 ^b	2,41±0,02 ^c	1,93±0,03 ^d
Lipídios totais*	1,61±0,02 ^a	4,60±0,10 ^b	2,48±0,07 ^c	1,69±0,03 ^a
Proteína*	2,09±0,01 ^a	2,95±0,10 ^b	2,36±0,01 ^c	2,14±0,07 ^a
Carboidratos**	90,86	84,39	85,90	87,31
Fibras*	19,30±0,54 ^a	19,21±0,45 ^a	13,35±0,36 ^b	10,53±0,14 ^c
Calorias***	386	391	375	373

*Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão. **Calculado por diferença.

***Soma de proteínas mais carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídeos totais multiplicado pelo fator 9 (Kcal/g). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

4.2.2 Composição de minerais

A composição de minerais encontrados nas amostras liofilizadas é apresentada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Teor de minerais de frutos de cambuci de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes , Paraibuna e Paranapiacaba (b.s.).

Parâmetros	Unidades	Rio Grande da Serra	Mogi das Cruzes	Paraibuna	Paranapiacaba
N	g/Kg b.s.	3,1	10	3,7	2,4
P	g/Kg b.s.	0,5	0,8	0,6	0,6
K	g/Kg b.s.	8,9	11,4	11,2	8,2
Ca	g/Kg b.s.	0,3	0,1	0,3	0,5
Mg	g/Kg b.s.	0,6	1	1	0,8
S	g/Kg b.s.	0,5	0,7	0,6	0,5
B	mg/Kg b.s.	8,5	8,7	5,8	5,7
Zn	mg/Kg b.s.	7	7	8	10
Fe	mg/Kg b.s.	32	21	29	19
Mn	mg/Kg b.s.	3	10	2	13
Cu	mg/Kg b.s.	4	4	2	5
Na	mg/Kg b.s.	59,9	25,2	43,8	60,9

Os frutos de Rio Grande da Serra apresentam maior quantidade de ferro e menor teor de potássio e magnésio, em relação aos frutos das outras regiões. Considerando que 85,6% dos frutos de Rio Grande da Serra é água e sua massa média é de 54,6 g, para um adulto, seria necessário a ingestão de aproximadamente 56 unidades de cambuci para suprir a necessidade diária para de ferro, correspondente a 14 mg (RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003).

Os frutos de Mogi das Cruzes se destacam pela maior quantidade de nitrogênio e menor quantidade de cálcio. Os frutos de Paranapiacaba possuem maior quantidade cobre, cálcio e manganês. Seria necessário a ingestão de aproximadamente 30 unidades de cambuci para suprir a necessidade diária de cobre, correspondente a 900 µg, 200 unidades para suprir a necessidade diária de cálcio, correspondente a 1000 mg, e

aproximadamente 3 frutas para suprir a necessidade diária de manganês, correspondente a 2,3 mg (RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003).

A diferença nos teores de minerais entre os frutos de diferentes regiões ocorre provavelmente pela composição de cada solo, já que esta influencia na qualidade bioquímica e mineral dos alimentos.

4.2.3 Tamanho, peso, sólidos solúveis totais e acidez titulável

Os frutos das quatro regiões não apresentaram diferenças em relação à massa, firmeza e altura, já as amostras de Rio Grande da Serra e Paraibuna apresentaram o maior diâmetro e as de Paranapiacaba o menor (**Tabela 5**).

Os frutos de Paranapiacaba apresentaram menor acidez, e com isso a maior relação entre sólidos solúveis totais e acidez, *ratio*. Os frutos de Paraibuna apresentaram o maior teor de sólidos solúveis totais (**Tabela 5**).

Tabela 5. Características físicas e químicas de cambucis colhidos em tamanhos disitintos nos município de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba, analisados imediatamente após a colheita.

	Rio Grande da Serra	Mogi das Cruzes	Paraibuna	Paranapiacaba
Massa (g)	54,6±5,7 ^a	53,9±10,1 ^a	50,7±7,9 ^a	47,3±6,9 ^a
Altura* (mm)	44,4±2,7 ^a	42±3 ^a	42±4 ^a	41±2 ^a
Diâmetro* (mm)	62±5 ^a	59±3 ^b	60±6 ^a	54±4 ^c
Firmeza* (Kg/cm ²)	0,31±0,05 ^a	0,42±0,23 ^a	0,4±0,2 ^a	0,36±0,19 ^a
SST** (°Brix)	9,37±0,20 ^a	9,47±0,21 ^a	10,1±0,2 ^b	9,57±0,15 ^a
pH**	2,74±0,05 ^a	2,94±0,06 ^b	2,40±0,04 ^c	3,00±0,05 ^a
AT** (% ác. cítrico)	4,16±0,15 ^a	2,37±0,22 ^b	3,6±0,21 ^c	2,16±0,14 ^b
Ratio	2,25	4,00	2,81	4,43

SST = Sólidos solúveis totais; AT = Acidez titulável. *Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=10). **Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

4.2.4 Teores de fenólicos totais, vitamina C, proantocianidinas e capacidade antioxidante *in vitro*

No presente estudo, foram avaliados os teores de fenólicos totais, vitamina C, proantocianidinas e capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de diferentes regiões. O maior conteúdo de fenólicos totais foi encontrado nos frutos colhidos em Mogi das Cruzes e o menor, nos frutos colhidos em Paranapiacaba, cerca de 30% menores que os frutos de Mogi das Cruzes (**Tabela 6**).

Foram detectados teores variáveis de proantocianidinas e taninos totais. Assim como no teor de fenólicos, os frutos de Mogi das Cruzes apresentaram maior concentração de proantocianidinas pelos métodos do n-butanol e DMAC e maior teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica. Os cambucis colhidos em Paraibuna apresentaram menor teor proantocianidinas e taninos totais, cerca de 59%,

52% e 59% menores que os cambucis colhidos em Mogi das Cruzes de acordo com os métodos do n-butanol, DMAC e precipitação proteica, respectivamente (**Tabela 6**).

Em relação à atividade antioxidante, os frutos de Mogi das Cruzes apresentam maior capacidade de sequestro do radical DPPH[•] e capacidade redutora do ferro (FRAP). Já os frutos que apresentaram menor atividade foram os de Paranapiacaba, cerca 34% e 14% menores que os frutos de Mogi das Cruzes pelos métodos de sequestro do radical DPPH[•] e capacidade redutora do ferro (FRAP), respectivamente (**Tabela 6**).

Essa diferença no teor de fenólicos e na capacidade antioxidante pode ser justificada por fatores extrínsecos tais como as condições climáticas, o local e a época de plantio, e diferença entre os cultivares, fatores que sabidamente afetam os teores de antioxidantes (TOMÁS-BARBERAN e ESPÍN, 2001).

Embora o cambuci tenha sido previamente considerado rico em vitamina C (VALLILO *et al.*, 2005), neste estudo a análise por CLAE-DAD não permitiu detectar vitamina C. Em todas as amostras observou-se pico com o mesmo tempo de retenção ao do padrão de ácido ascórbico, porém com espectro UV diferente, indicando provavelmente sobreposição com outros ácidos orgânicos (**Tabela 6**). Ainda Vallilo *et al.* avaliaram vitamina C pelo método de Contreras *et al.* (1984), método colorimétrico baseado na eficiência do ácido ascórbico como agente redutor, porém apesar de ser simples e fácil, apresenta pouca especificidade e está sujeito a interferências.

Tabela 6. Teor de fenólicos totais (mg eq. de catequina/100 g b.s.), teor de taninos totais (mg eq. ac. Tânico/ 100 g b.s.), teor de vitamina C (mg/100 g b.s.), teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg eq. de tanino quebracho/100 g b.s.) e DMAC (mg eq. de prociadina B1/100 g b.s.), capacidade de sequestro do DPPH[•] (μmol eq. de Trolox/100 g b.s.) e poder redutor do ferro FRAP (mmol eq. de Trolox/100 g amostra b.s.) dos frutos de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba.

	Fenólicos	Taninos	Vit.C	Proantocianidinas		Capacidade antioxidante	
	totais	totais		n-butanol	DMAC	DPPH [•]	FRAP
RGS*	4200±45 ^a	10303±496 ^a	n.d.	8352±542 ^a	2472±19 ^a	262±36 ^a	994±54 ^a
MOGI*	5132±71 ^b	14102±787 ^b	n.d.	11432±806 ^b	2656±71 ^b	368±24 ^b	1224±37 ^b
PIB*	4687±51 ^c	5826±125 ^c	n.d.	4645±235 ^c	1285±32 ^c	315±55 ^c	1050±31 ^a
PRN*	3574±86 ^d	8802±338 ^d	n.d.	9283±376 ^a	1960±86 ^d	239±9 ^a	821±11 ^c

*RGS (Rio Grande da Serra), MOGI (Mogi das Cruzes), PIB (Paraibuna) e PRN (Paranapiacaba). Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

4.2.5 Identificação e teores de flavonoides

Os flavonoides identificados nos frutos de cambuci foram, epigallocatequina galato (EGCG), rutina, derivados de quercetina e caempferol.

Em relação ao teor de flavonoides, os frutos colhidos em Mogi das Cruzes apresentaram maior quantidade de EGCG e derivados de quercetina. Os frutos de Rio Grande da Serra apresentaram maior teor de rutina e os de Paranapiacaba maior teor de campferol (**Tabela 7**).

Tabela 7. Composição e teor de flavonoides (mg/100 g b.s.) presentes nos frutos de Rio Grande da Serra, Mogi das Cruzes, Paraibuna e Paranapiacaba.

mg/100g	Rio Grande da Serra	Mogi das Cruzes	Paraibuna	Paranapiacaba
EGCG	9,99±0,1 ^a	13,77±0,26 ^b	8,05±0,12 ^c	6,96±0,58 ^d
Rutina	10,52±0,03 ^a	8,74±0,07 ^b	4,80±0,05 ^c	4,98±0,30 ^c
Derivado de Quercetina	2,42±0,01 ^a	2,72±0,02 ^b	2,15±0,05 ^c	1,31±0,09 ^d
Derivado de Campferol	nd*	0,624±0,06 ^a	0,306±0,001 ^b	0,77±0,2 ^a

*nd – não detectado. Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

O teor de flavonoides se mostrou diferente nos frutos das diferentes regiões, porém em relação à composição de flavonoides os frutos mostraram ser bem semelhantes, destacando apenas os frutos de Rio Grande da Serra que foram os únicos a não apresentarem caempferol em sua composição.

Gonçalves *et al.* (2010) identificaram apenas derivados de quercetina e caempferol, cerca de 21,6 e 0,4 mg/100 g (b.s.), respectivamente. Já Abe *et al.* (2012) detectaram apenas a presença de derivados de quercetina (0,0035 mg/g b.u.) no fruto do cambuci, entretanto não se sabe ao certo de qual região eram os frutos e nem em qual estágio de maturação estavam quando foram analisados. Essas variáveis podem alterar a composição e o teor de flavonoides presentes nos frutos.

4.2.6 Teores de ácido elágico livre e total

A **Tabela 8** mostra os teores de ácido elágico livre e total dos frutos das diferentes regiões. Os frutos de Paranapiacaba se destacaram por apresentarem maiores teores de ácido elágico livre, já os frutos de Mogi das Cruzes apresentaram menores teores (**Tabela 8**).

Em relação ao ácido elágico total, os frutos de Paraibuna apresentaram maiores teores e os de Mogi das Cruzes os menores (**Tabela 8**).

Tabela 8. Teores de ácido elágico livre e total do cambuci de três regiões de São Paulo (mg/100 g amostra b.s.).

	Paraibuna	Rio Grande da Serra	Mogi das cruces	Paranapiacaba
Ac. elágico livre	13,26±0,04 ^a	12,79±0,64 ^a	11,91±0,33 ^b	16,02±0,26 ^c
Ac. elágico total	1312±15 ^a	958±13 ^b	786±10 ^c	884±26 ^d

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Houve diferença nos teores de ácido elágico livre e total entre as quatro regiões, exceto Paraibuna e Rio Grande da Serra que não diferem entre si.

Gonçalves *et al.* (2010) identificaram cerca de 2,5 e 240 mg/100 g (b.s.), de ácido elágico livre e total, respectivamente. Abe *et al.* (2012) identificaram 0,0033 mg/100 g (b.u.) de ácido elágico livre e 2,67 mg/100 g (b.u.) de ácido elágico total.

Sabe-se que o ácido elágico livre pode estar naturalmente presente nas plantas, juntamente com os taninos elágicos, ou pode ser formado durante o processamento dos alimentos. A proporção entre os teores de ácido elágico livre varia muito podendo exceder 50% dos teores de ácido elágico total em algumas amostras, dependendo das condições de armazenamento e processamento (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Portanto, a presença de ácido elágico livre pode também ser resultante de degradação dos taninos elágicos durante o processo de preparo e extração da amostra. Este fato é de extrema importância dada à insolubilidade em água do composto livre, o que deve ser levado em conta na sua extração e quantificação. Além disso, por conta das diferentes propriedades físico-químicas, diferenças em sua atividade biológica também são esperadas.

A determinação do teor total de ácido elágico se baseia no fato de que quando os taninos elágicos e outros derivados glicosilados são submetidos à hidrólise ácida ou básica eles originam o ácido elágico livre, o qual é geralmente quantificado por CLAE. O ácido elágico total determinado dessa forma corresponde, portanto, ao ácido elágico livre naturalmente presente na amostra e aquele derivado da hidrólise dos taninos elágicos e dos outros conjugados. Nesse estudo, a quantificação do ácido elágico total foi realizada através da extração com acetona aquosa a 80%, seguida de hidrólise durante 90 minutos a 120°C utilizando-se TFA (ácido trifluoracético) 2 N.

Sabe-se que os teores de ácido elágico livre em frutas são significativamente baixos, entretanto quantidades mais elevadas destes compostos são detectadas após hidrólise ácida dos extratos, resultante da liberação a partir dos taninos elágicos (BEATTIE *et al.*; 2005). Os resultados obtidos confirmam que a maior parte do ácido elágico é proveniente dos taninos elágicos, visto que o conteúdo de ácido elágico livre é bem menor se comparado ao valor total após hidrólise.

4.3 Caracterização do cambuci em seis estágios de maturação

Como o cambuci é uma fruta pouco estudada, algumas informações relacionadas a sua fisiologia ainda não são conhecidas. Portanto, para esta etapa do estudo foram utilizados frutos colhidos em Mogi das Cruzes (Sítio Sussumo Nagai) em diferentes estádios de maturação, selecionados de acordo com seu tamanho, firmeza e arredondamento das quinas. Os frutos foram divididos em seis grupos, sendo o grupo 1 composto por frutos mais jovens, indo até o grupo 6, composto por frutos já maduros. Cada grupo continha cerca de 60 frutos.

Como o cambuci permanece com a coloração verde do início ao fim de seu amadurecimento, os produtores identificam o fruto maduro quando este se destaca facilmente do pé e quando suas quinas estão mais arredondadas.

Segundo informações do produtor coletadas no Sítio do Bello o tempo entre a abertura da flor e a colheita do fruto, considerando a abscisão natural, é de 90 a 120 dias.

De acordo com a variedade no tamanho dos frutos maduros de cambuci, as amostras utilizadas nessa etapa foram consideradas do “tipo médio”. Foram escolhidos frutos do “tipo médio” por serem os mais encontrados nas produções, além do fato de que os tratamentos de destanização, apresentados adiante, foram realizados com cambuci deste tamanho.

Metade dos frutos estudados nesta etapa, ao chegarem ao laboratório, foram avaliados quanto à firmeza (Kg/cm^2), pesados, medidos seu diâmetro longitudinal e transversal e preparado sucos em triplicata para avaliação de pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST). A outra metade foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises químicas (**Tabela 9**).

Tabela 9. Características físicas e químicas de cambucis oriundos de Mogi das Cruzes colhidos em seis estádios de maturação.

Estádios	1*	2*	3*	4*	5*	6*
Massa** (g)	11,8±2,0 ^a	27,5±2,7 ^b	34,9±4,7 ^b	49,2±8,2 ^c	50,1±10,7 ^c	47,5±9,5 ^c
Altura** (mm)	18±3 ^a	29±2 ^b	36±2 ^{b,c}	40±4 ^c	40±3 ^c	42±3 ^c
Diâmetro** (mm)	28±1 ^a	33±1 ^a	46±2 ^b	54±1 ^c	56±6 ^c	59±3 ^c
Firmeza** (Kg/cm²)	n.d	n.d	n.d	9,88±2,15	3,08±2,42	0,42±0,23
Sólidos solúveis totais*** (°Brix)	13,11±0,71 ^a	11,67±0,67 ^b	9,67±0,45 ^c	9,20±0,35 ^c	8,67±0,15 ^c	9,47±0,21 ^c
pH***	3,2±0,01 ^a	2,92±0,04 ^b	2,79±0,03 ^b	2,82±0,04 ^b	2,90±0,02 ^b	2,94±0,06 ^b
Ácido titulável*** (g eq. ác. cítrico/100 ml)	2,60±0,15 ^a	3,60±0,27 ^b	3,66±0,34 ^b	3,51±0,47 ^{a,b}	2,82±0,56 ^{a,b}	2,37±0,22 ^a
Ratio SST/AT	5,03	3,24	2,64	2,62	3,07	4,00

n.d = não detectado.* Estádio de maturação 1 corresponde a frutos mais jovens, estágio de maturação 6 corresponde a frutos maduro. **Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=10). ***Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

A massa dos frutos e seu diâmetro transversal aumentaram até o estágio 4 e estabilizam nos estádios 5 e 6. Já em relação à altura o fruto no estágio 3 começa a se assemelhar à do fruto maduro (**Tabela 9**).

Portanto a partir do estágio 4 os frutos apresentaram diminuição na dureza com a maturação. A firmeza é um ótimo parâmetro para avaliar o grau de desenvolvimento do cambuci, sendo portanto a principal referência dos produtores para a colheita de frutos maduros.

O teor de sólidos solúveis totais indica quantidade de açúcares, ácidos, vitaminas, aminoácidos e pectina existentes nos frutos e que normalmente aumentam no processo de maturação, seja por biossíntese ou pela degradação de polissacarídeos (KLUGE *et al.*, 2002). Ainda, durante a maturação, por exemplo, dos citros, há uma diminuição da acidez, proveniente principalmente do ácido cítrico (ALBERTINI *et al.*, 2006). Para o cambuci, a acidez aumenta durante o desenvolvimento, porém volta a

diminuir nos estádios mais avançados os quais, provavelmente correspondem ao amadurecimento. O teor de SST diminui do estágio 1 ao 3, onde se estabiliza até os estádios mais desenvolvidos.

A relação entre o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) e o teor de ácidos totais, chamado de *ratio*, é o índice utilizado para determinar o estágio de maturação, determinando o balanço entre o sabor doce e ácido. Os citros são considerados maduros quando o seu *ratio* tiver atingido limites mínimos para a palatabilidade (LADANIYA, 2008), que segundo a EMBRAPA (2011), o *ratio* considerado adequado para os citros no Brasil pode variar de 8,5-10. Em se tratando do cambuci, o *ratio* (SST/AT) não é um bom parâmetro para diferenciar frutos imaturos de maduros, pois o *ratio* dos frutos no estágio 6 não foi maior que do estágio 1. Isso pode ser explicado porque algumas variedades de frutos apresentam teor de acidez alto e constante, o que ocorre com limões (ALBERTINI *et al.*, 2006). Assim, a proporção de sólidos solúveis: ácidos totais não é considerado um índice adequado para a determinação da maturidade do cambuci.

O teor de umidade aumenta com o desenvolvimento do fruto e estabiliza quanto atinge o estágio 5, já a porcentagem de suco continua aumentando até o estágio 6 (**Tabela 10**). Para frutas cítricas, o rendimento de suco pode ser utilizado para verificar o estágio de maturação (LADANIYA, 2008).

Tabela 10. Umidade (%) e quantidade de suco (%) (v/m) de seis estádios de maturação do cambuci.

Estádios	1	2	3	4	5	6
Umidade*	81,7±0,4 ^a	83,5±0,1 ^b	85,3±0,5 ^c	87,1±0,3 ^d	88,5±0,3 ^e	88,8±0,6 ^e
% suco**	7,0	33,2	42,6	50,1	58,6	61,7

*Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Suco extraído de 20 frutos. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

4.3.1 Taxa respiratória e produção de etileno

É de fundamental importância avaliar a taxa respiratória e a produção de etileno do cambuci para classificá-lo em climatérico ou não climatérico. Frutas não climatéricas, depois de colhidas, diminuem a sua respiração de maneira contínua até à sua senescência. Já frutas climatéricas têm aumento da respiração após a colheita, entretanto, chega um momento, que esta respiração aumenta bruscamente até atingir um pico. Em seguida ocorre uma queda drástica da atividade respiratória, o envelhecimento e a senescência. Este aumento da respiração é o pico climatérico (WATKINS, 2002).

Frutas não climatéricas, ao contrário das climatéricas, não possuem a capacidade de amadurecer depois da colheita, não ficam mais doces ou melhoram o sabor, pois não possuem a capacidade de reservar amido, o qual, durante o climatérico é hidrolisado a açúcares (WATKINS, 2002; BEATTIE e WADE, 1996). No pico climatérico ocorre uma série de reações bioquímicas que iniciam pela produção autocatalítica de etileno e que, associadas à respiração aumentada, conduzem ao amadurecimento (SUDHEER e INDIRA, 2007).

Um ponto importante para o processo de destanização é que frutos climatéricos podem ser separados de não climatéricos pelas respostas de respiração e/ou produção de etileno a etileno exógeno. Em frutos climatéricos, etileno exógeno acelera o climatérico

e a produção autocatalítica continua após a remoção do etileno (WATKINS, 2002).

A avaliação da taxa respiratória e da produção de etileno foi realizada pelo Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas, do departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, sob supervisão do Professor Doutor Angelo P. Jacomino.

O teste foi realizado com os frutos integros nos estádios 4, 5 e 6, pois nessas etapas da maturação o cambuci já está 100 % desenvolvido em relação ao seu tamanho.

As taxas respiratória e de produção de etileno foram avaliadas por quatro dias após colheita nos frutos nos estádios 5 e 6 e até nono dia para os frutos no estágio 4.

Na **Figura 9** é possível verificar um pico climatérico somente de dióxido de carbono (CO_2) pela respiração, não havendo nenhum pico climatérico para a produção de etileno.

Figura 9. Valores médios para a taxa respiratória ($\text{mL de CO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (A) e produção de etileno ($\mu\text{L de C}_2\text{H}_4.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (B) do cambuci nos estágios 4, 5 e 6 da maturação.

Frutos de cambuci proveniente de Mogi das Cruzes no estágio 4 de maturação foram coletados e armazenados no laboratório em temperatura ambiente por sete dias. Quando a firmeza ficou próxima à de um fruto maduro foi analisado teor de sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável. A **Tabela 11** mostra que após sete dias a firmeza

diminui, porém o teor de sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável se mantém.

Tabela 11. Firmeza (kg/cm^2), teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$), pH e acidez titulável (% ácido cítrico) do cambuci coletado no estágio 4 após sete dias.

	Firmeza	Brix	pH	Acidez
Dia da coleta	$10,1 \pm 1,2^a$	$8,97 \pm 0,35^a$	$2,56 \pm 0,01^a$	$2,95 \pm 0,25^a$
7 dias da coleta	$0,32 \pm 0,12^b$	$9,23 \pm 0,63^a$	$2,72 \pm 0,03^a$	$2,86 \pm 0,49^a$

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados encontrados, não foi possível definir se o cambuci é ou não um fruto climatérico, já que este apresenta características de frutos climatéricos, como o pico de CO_2 após colhido, e características de frutos não climatéricos, como manter a acidez e o teor de sólidos solúveis totais com a maturação e não apresentar um pico climatérico para o etileno.

4.3.2 Proantocianidinas e taninos totais

O teor de proantocianidinas foi avaliado através dos ensaios colorimétricos do butanol acidificado (PORTER *et al.*, 1986) e DMAC (Prior *et al.*; 2010).

A reação do butanol acidificado age sobre proantocianidinas por autocatálise, auto-oxidação (requer O_2) e oxidação direta (requer a ligação de íons metálicos nas hidroxilas vicinais do anel B), formando antocianidinas. A coloração vermelha se deve em grande parte à estrutura de ressonância obtida pelo ganho da olefina no anel C e, em menor grau, ao deslocamento batocrômico causado pela ligação do íon metálico na hidroxila em meta do anel B (PORTER *et al.*, 1986). O mecanismo da reação do reagente DMAC com uma molécula de proantocianidina não está claramente definido, embora acredita-se que ele reaja com compostos apresentando grupos hidroxila meta orientados na molécula de flavonóide e com uma ligação simples na posição 2 e 3 na

anel C (MCMURROUGH e MCDOWELL, 1978).

A concentração de proantocinidinas apresentou redução até o estágio 5 e se manteve com o mesmo valor até atingir a maturação, pelos dois métodos (**Figura 10**).

O teor de taninos totais foi avaliado pelo método de precipitação protéica (HAGERMAN *et al.*, 1978) e seguiu o mesmo comportamento que as proantocianidinas (**Figura 10**).

Assim como o caqui, o cambuci também apresentou uma redução significativa nos teores de taninos totais com o amadurecimento. Salvador *et al.* (2007) avaliaram o caqui “Rojo Brillhante” em seis estádios de maturação sendo que o teor de taninos no estágio 1 foi de 0,78% (b.u.) e no estágio mais maduro 0,36% (b.u.).

Figura 10. Teor de proantocianidinas pelos métodos do n-butanol (A) (mg eq. tanino quebracho/100 g b.s.) e DMAC (B) (mg eq. Procianidina B1/100 g b.s.) e teor de taninos totais (C) pelo método de precipitação protéica (mg eq. ac. tânico/100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Normalmente os taninos presentes no fruto, na forma não polimerizada, possuem propriedades tânicas mais acentuadas. Com a maturação, ocorre polimerização dos taninos e consequente diminuição da adstringência (CLIFFORD, 1997), o que é esperado para tornar o alimento ideal para consumo, porém os teores de taninos não diminuem o suficiente após a maturação, e mesmo maduro o fruto continua adstringente.

4.3.3 Ácido elágico livre e total

Os teores de ácido elágico livre e total do cambuci, foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e mostram que em todos os estádios de maturação a maior parte do ácido elágico é proveniente dos taninos elágicos, visto que o conteúdo de ácido elágico livre é bem menor se comparado ao valor total após hidrólise.

Em geral, o conteúdo de ácido elágico total decresce com o amadurecimento. O fruto no estágio 1 apresentou 3363 mg/100 g (b.s.) de ácido elágico total e o fruto maduro apenas 780 mg/100 g (b.s.). Essa redução, de cerca de 77% do teor de ácido elágico total, ocorreu gradativamente ao longo do processo de maturação, como foi confirmado pelos valores encontrados para os outros estádios.

Tabela 12. Teor de ácido elágico livre e total do cambuci em diferentes estádios de maturação (mg/100 g b.s.).

Estádios	1	2	3	4	5	6
Ác. Elágico livre	37,5±0,2 ^a	28,5±1,3 ^b	16,9±0,8 ^c	10,4±0,2 ^d	9,8±0,8 ^d	10,3±0,5 ^d
Ác. Elágico total	3363±120 ^a	2257±25 ^b	1562±19 ^c	815±21 ^d	709±3 ^d	780±32 ^d

Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Abe *et al.* (2011) avaliaram a polpa de jabuticaba em cinco estádios de maturação quanto aos teores de ácido elágico livre e total. Foram encontrados 36,8 g/ kg (b.s.) de ácido elágico total no estágio mais jovem e 4,6 g/ kg (b.s.) no estágio maduro. Em relação ao ácido elágico livre, os teores encontrados na jabuticaba foram de 0,358 g/kg (b.s.) para o fruto mais jovem e 0,022 g/kg (b.s.) para o fruto maduro. Nesse estudo também houve redução de ácido elágico livre e total na casca e nas sementes

durante a maturação. Chirinos *et al.* (2010) avaliaram os teores de ácido elágico total do camu camu em três estádios de maturação e os valores encontrados, dos frutos mais jovens para os mais maduros, foram, 7,0, 6,0 e 5,1 mg/100 g (b.u.).

As uvas muscadines (*Vitis rotundifolia*) se distinguem de outras variedades devido à presença de ácido elágico. Lee e Talcott (2004) observaram que a concentração de ácido elágico de oito cultivares de uvas muscadines variou significativamente do estágio verde para o estágio maduro, na polpa e na casca. Ao contrário do que se observou com cambuci, jabuticaba e camu camu, nas uvas a concentração de ácido elágico aumentou com a maturação. Em cascas, o teor de ácido elágico livre aumentou entre 0,3 e 13 vezes com a maturação. Em relação ao ácido elágico total, o aumento foi mais sutil, chegando a ser de até 1,7 vezes maior com a maturação.

4.3.4 Flavonoides

A composição e o conteúdo de flavonoides presentes nos seis estádios de maturação do cambuci foram analisados por CLAE/DAD (**Tabela 13**). Os flavonoides normalmente são encontrados como derivados glicosilados. Neste estudo, os teores foram expressos em concentrações equivalentes das respectivas agliconas, por serem os compostos que realmente teriam significado biológico.

Com a maturação observou-se que os teores de todos os flavonoides reduziram drasticamente. Houve uma queda gradativa de cerca de 243 mg/100 g (b.s.) no estágio 1 para 9,9 mg/100 g (b.s.) no estágio 6 de epigallocatequina galato (EGCG) e cerca de 10,11 mg/100 (b.s.) no estágio 1 para 1,88 mg/100 g no estágio 6 de derivados de quercetina (**Tabela 13**) .

Os teores de rutina também caíram com a maturação, começando com cerca de

33,5 mg/100 g (b.s.) no estágio 1 para 7,43 mg/100 g (b.s.) no estágio 6, porém ao contrário da EGCG e derivados de quercetina os teores de rutina no estágio 5 foram menores que no estágio 6 (**Tabela 13**).

Em relação aos derivados de campferol, seus teores no estágio 1 foram de 2,88 mg/100 g (b.s.) e caíram gradativamente até o estágio 4, onde não foram detectados, mas no estágio 5 esses derivados aparecem e os teores se mantêm até o estágio 6 com cerca de 0,26 mg/100 g (b.s.) (**Tabela 13**).

Tabela 13. Composição e conteúdo de flavonoides do cambuci em diferentes estádios de maturação (mg/100 g b.s.).

Estádios	1	2	3	4	5	6
EGCG	243,05±0,82 ^a	78,06±1,38 ^b	30,64±5,27 ^c	19,30±0,07 ^d	8,17±0,01 ^e	9,90±0,28 ^e
Rutina	33,48±0,17 ^a	14,29±0,09 ^b	14,97±0,68 ^c	9,34±0,09 ^d	5,42±0,13 ^e	7,43±0,22 ^f
Derivado Quercetina	10,11±0,41 ^a	4,34±0,01 ^b	3,95±0,08 ^b	3,27±1,29 ^b	1,41±0,03 ^c	1,88±0,07 ^c
Derivado Campferol	2,88±0,20 ^a	1,66±0,12 ^b	0,25±0,01 ^c	n.d.*	0,33±0,08 ^c	0,26±0,08 ^c

*n.d – não detectado. Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Wang *et al.* (2009) avaliaram os teores dos flavonoides da framboesa vermelha em 5 estádios de maturação e observaram que derivados de quercetina e campferol caíram de 63,5 µg/g (b.u.) e 71,6 µg/g (b.u), no estágio mais jovem, para 4,3 µg/g (b.u) e 5,6 µg/g (b.u) no estágio maduro, respectivamente. Em uma avaliação de flavonóides da uva, observou-se que durante a maturação somente as antocianinas aumentavam enquanto outras classes de fenólicos exibiam um padrão de acumulação e subsequente declínio durante o amadurecimento, sugerindo sua degradação ou sua utilização na biossíntese de outros compostos (ADAMS, 2006). Chirinos *et al.* (2010) avaliaram o camu camu em três estádios de maturação, e detectaram que durante seu

desenvolvimento os teores de catequina aumentaram e os teores de rutina diminuíram.

4.3.5 Ácido siríntrico

Os teores de derivados de ácido siríntrico do cambuci, foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na **Tabela 14** estão apresentados os teores de ácido siríntrico nos diferentes estádios de maturação.

Tabela 14. Teor de derivados de ácido siríntrico do cambuci em diferentes estádios de maturação (mg/100 g b.s.).

Estádios	1	2	3	4	5	6
Ácido Siríntrico	141,5±3,9 ^a	75,3±1,0 ^b	47,4±1,7 ^c	26,5±0,2 ^d	18,1±0,8 ^e	20,37±0,06 ^e

Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

O conteúdo de ácido siríntrico decresce com o amadurecimento. O fruto no estágio 1 apresentou cerca 141 mg/100 g (b.s.) e o fruto maduro apenas cerca de 20 mg/100 g (b.s.). Essa redução de cerca de 86% do teor de ácido siríntrico ocorreu gradativamente ao longo do processo de maturação, como foi confirmado pelos valores encontrados para os outros estádios.

A diminuição nos teores de compostos fenólicos observada no cambuci com o seu desenvolvimento pode ser decorrente da degradação dos compostos que foram inicialmente biossintetizados e acumulados. Diversos estudos comprovam a diminuição dos compostos fenólicos com a maturação (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 2001, TAMILMANI, 2005). Essa redução pode ser devido ao aumento de enzimas como peroxidases, polifenoloxidase e catalases (MASIA, 1998), além do estresse ambiental

como exposição dos frutos a radiações UV, altas temperaturas, fermentos entre outras injúrias, antes e depois da colheita, que podem afetar o caminho de biossíntese dos metabólitos secundários (CISNEROS, 2003).

4.4 Efeito dos tratamentos de destanização

O cambuci é uma fruta adstringente devido a sua alta concentração de taninos. Para avaliar comparativamente a adstringência dos frutos de cambuci, realizou-se uma análise dos teores de proantocianidinas dos frutos não destanizados de caqui Giombo e de caju, ambos comprados no CEAGESP em março de 2011.

O cambuci possui aproximadamente 35% e 48% a mais de taninos condensados que o caju e o caqui, respectivamente (**Tabela 15**). Isto comprova a necessidade de destanizar o cambuci para reduzir sua adstringência e permitir seu consumo *in natura*,

Tabela 15. Teor de proantocianidinas (mg eq. tanino quebracho/100 g base úmida) do cambuci, caju e caqui.

	Cambuci	Caju	Caqui
PAC	870±20 ^a	562±52 ^b	449±27 ^c

Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Foram realizados quatro testes de destanização, estes testes se diferenciaram em relação ao estágio de maturação dos frutos, ou em relação ao tempo de espera, temperatura após tratamento, e também aos processos de destanização. Nas **Tabelas 16** e **17** podem ser observadas as diferenças entre cada teste.

Tabela 16. Processos de destanização realizados em cambuci em cada um dos quatro testes.

Testes		Processos de destanização			Temperatura estocagem
1	Imersão em etanol 96% - 5'	Câmara de etanol 96% 20 h	Ambiente anóxico 20 h (vela)	Câmara de etileno - 20 h (bananas verdes)	24±3°C
2	Imersão em etanol 96% - 5'	Câmara de etanol 96% 20 h	Ambiente anóxico 20 h (vácuo)	Câmara de etileno - 10 h (catalisador de etileno)	20±2°C
3	Imersão em etanol 96% - 5'	Câmara de etanol 96% 20 h	Ambiente anóxico 20 h (vácuo + gelo seco)	Câmara de etileno 10 h (catalisador de etileno)	4°C
4	Imersão em etanol 96% - 5'	Câmara de etanol 96% 20 h	100 µL etanol 96% no cálice	--	21±2°C

Tabela 17. Procedência, qualidade e estágio de maturação dos cambucis antes dos tratamentos de destanização.

Teste	Procedência	Firmeza (kg/cm)	SST (°Brix)	AT (% ac. cítrico)	pH	Estádio de maturação
1	Mogi das Cruzes	10,17±1,05	10,02±0,12	3,5±0,05	2,56±0,01	4
2	Paraibuna	1,7±1,3	10,20	1,7±0,03	3,08±0,02	5
3	Paranapiacaba	0,36±0,19	9,57±0,15	2,16±0,14	3,01±0,02	6
4	Mogi das Cruzes	9,57±1,03	8,23±0,31	3,34±0,14	2,75±0,01	4

SST = Sólidos solúveis totais; AT = acidez titulável. Resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

4.4.1 Proantocianidinas e taninos totais

No teste 1 os tratamentos de destanização por imersão e câmara de etanol foram efetivos na redução do teor de taninos.

No terceiro dia após saírem do tratamento a redução no teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos imersos em etanol, em relação ao controle, foi de aproximadamente 75%, 84% e 70%, pelos métodos de precipitação proteica, butanol acidificado e DMAC, respectivamente, e para os frutos tratados em câmara de etanol foi de aproximadamente 72%, 84% e 77%, pelos métodos de precipitação proteica, butanol acidificado e DMAC, respectivamente (**Figura 11**).

Figura 11 – Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011, (A) teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq. ácido tânico/ 100g b.s.), (B) teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg eq. tanino quebracho/ 100 g b.s.) e (C) teor de proantocianidinas pelo método DMAC (mg eq. procianidina B1/ 100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Três processos de destanização realizados no teste 2 diminuíram o teor proantocianidinas. Após 24 horas da saída do tratamento a redução de proantocianidina pelo método do butanol acidificado foi de aproximadamente 35%, 26% e 7%, para os tratamentos em câmara de etanol, imersão em etanol e câmara de etileno, respectivamente. Pelo método DMAC a redução foi de aproximadamente 36%, 26% e 5%, para os tratamentos em câmara de etanol, imersão em etanol e câmara de etileno,

respectivamente. Os frutos submetidos ao meio anóxico não apresentaram redução no teor de proantocianidinas (**Figura 12**).

Já a redução do teor de taninos totais foi efetiva somente para os frutos tratados em câmara e imersão de etanol, cerca de 27% e 29% respectivamente (**Figura 12**).

Figura 12 – Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011, (A) teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg eq. tanino quebracho/ 100 g b.s.), (B) teor de proantocianidinas pelo método DMAC (mg eq. procianidina B1/ 100 g b.s.) e (C) teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq. ácido tânico/ 100g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

A redução no teor de taninos solúveis foi maior nos tratamentos com etanol no teste 1 após 72 horas, isso pode ser uma das causas dos mesmos tratamentos no teste 2 não terem sido tão efetivos, já que os frutos ficaram apenas 24 horas armazenados após o processo de destanização. Antonioli *et al.* (2000) e Fukushima *et al.* (1991) verificaram que a partir do quarto dia do tratamento a redução da adstringência do caqui ‘Giombo’ se acentua.

O cambuci submetido ao processo de destanização quando maduro não pode ficar muito tempo armazenado, pois começa a apodrecer. Este apodrecimento foi observado no teste 2, onde os frutos maduros permaneceram íntegros só até 24 horas após o tratamento.

A **Figura 13**, mostra que os tratamentos de destanização do teste 3 não foram efetivos na redução do teor taninos solúveis. Como os tratamentos deste teste não foram efetivos na redução de proantocianidinas, pelo método do butanol acidificado, outros métodos como DMAC e precipitação proteica não foram realizados.

Figura 13 – Teor de proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 5 de maturação, em Paraibuna em 28/04/2011 e armazenados a 4°C. Teor de proantocianidinas avaliado pelo método do butanol acidificado (mg eq. Tanino Quebracho/ 100 g b.s). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

O teste 3 foi realizado com frutos provenientes de Paraibuna, com teor de proantocianidinas bem menor que dos frutos usados no teste 1. Os tratamentos de destanização do teste 3 não foram efetivos na redução de taninos solúveis como os tratamentos com etanol do teste 1. Um dos motivos pode ser devido ao armazenamento após tratamento em temperatura de 4°C. A temperatura utilizada no processo de destanização é um fator muito importante. Em temperaturas elevadas, a taxa de respiração dos frutos é maior, seu metabolismo é acelerado, aumentando a velocidade de amadurecimento (EDAGI *et al.*, 2009).

Antoniolli *et al.* (2002) expôs caquis “Giombo” às temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, revelando maior rapidez de destanização nos frutos tratados a 30°C. Isso deve-se à maior velocidade de evaporação de álcool etílico, e, conseqüentemente maior

velocidade de acúmulo de etanol e acetaldeído na polpa dos frutos, responsáveis pela polimerização dos taninos solúveis.

Além de a temperatura influenciar na evaporação do etanol, ela influencia na atividade da álcool desidrogenase, enzima que converte etanol em acetaldeído. Segundo Chao-Peng *et al.* (2008) a temperatura ótima da álcool desidrogenase em caqui é 25°C.

Outro estudo mostra que para a redução da adstringência do caqui, é necessário manter os frutos a uma temperatura superior a 22° C, durante 48 h após o tratamento de destanização, para promover o acúmulo de acetaldeído e o início da polimerização das moléculas de taninos (MATSUO & ITOO, 1982). Kato (1987) também verificou maior velocidade de redução da adstringência com o aumento da temperatura. No entanto outro estudo mostra que submetendo caquis “Giombo” ao armazenamento refrigerado (1°C), logo após a aplicação de vapor de etanol, o processo de destanização não foi comprometido. Após 20 dias em armazenamento refrigerado, os frutos apresentavam-se não adstringentes e sua qualidade se manteve durante 16 dias a 22° C (BENETTI-PINTO *et al.*, 2007).

No Teste 4 os tratamentos por câmara de etileno e meio anóxico não foram realizados, porém foi acrescentado o processo de adicionar 100 µL de etanol 96% no cálice dos frutos (**Figura 15**).

Os três tratamentos surtiram efeito na redução dos taninos solúveis, sendo que os frutos imersos em etanol, armazenados em câmara de etanol e com etanol no cálice apresentaram redução no teor de proantocianidinas, pelo método do butanol acidificado, de aproximadamente 77%, 90% e 56%, respectivamente, pelo método de DMAC de aproximadamente 69%, 89% e 48%, respectivamente, e no teor de taninos totais de 90%, 92% e 65% (**Figura 14**).

Figura 14 – Teor de taninos totais e proantocianidinas dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 04/05/2012, (A) teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado (mg eq. tanino quebracho/100 g b.s.), (B) teor de proantocianidinas pelo método DMAC (mg eq. procianidina B1/ 100 g b.s.) e (C) teor de taninos totais pelo método de precipitação proteica (mg eq. ácido tânico/ 100 g b.s.). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

4.4.2 Sólidos solúveis totais, pH, acidez e firmeza

Sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável foram avaliados nos Testes 1 e 4 e não foram encontradas diferenças dos frutos tratados em relação ao grupo controle, conclui-se que os tratamentos de destanização utilizados não influenciaram na maturação do fruto (**Tabela 18**).

Blum *et al.* (2008) obtiveram uma diminuição linear no pH de caquis ‘Giombo’ tratados com etanol em 50% após doze dias, em relação ao grupo controle. O teor de sólidos solúveis totais foi inferior ao grupo controle, sugerindo que o etanol auxiliou na degradação dos açúcares pelo estímulo da atividade respiratória. Antoniolli *et al.* (2000) também verificaram redução no pH após o sexto dia do tratamento por vapor de etanol, a acidez titulável manteve-se a mesma com o tratamento, já o teor de sólidos solúveis totais foi superior à média verificada durante a caracterização inicial dos frutos. O aumento no teor de sólidos solúveis totais pode ser resultado da perda de matéria fresca pelos frutos durante o período de exposição ao vapor de álcool e da hidrólise de

compostos, como substâncias pécicas e hemicelulose da parede celular, em consequência do amadurecimento (WILLS *et al.*, 1981).

Tabela 18. Teores de sólidos solúveis totais (°Brix), pH e acidez titulável (% ácido cítrico) após destanização dos frutos colhidos, no estágio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011 (testes 1) e em 04/05/2012 (teste 4).

TESTE 1						
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Câmara etileno	Meio anóxico
SST	24	9,17±0,35 ^a	9,57±0,55 ^a	9,03±0,49 ^a	9,23±0,36 ^a	9,00±0,44 ^a
	48	9,20±0,10 ^a	9,00±0,20 ^a	9,47±0,31 ^a	9,20±0,10 ^a	9,47±0,31 ^a
	72	9,60±0,46 ^a	9,47±0,47 ^a	9,63±0,15 ^a	9,63±0,32 ^a	9,70±0,36 ^a
AT	24	2,98±0,10 ^a	3,02±0,16 ^a	2,97±0,13 ^a	2,86±0,08 ^a	2,94±0,14 ^a
	48	2,92±0,06 ^a	2,95±0,08 ^a	2,92±0,07 ^a	2,99±0,18 ^a	2,99±0,12 ^a
	72	2,71±0,20 ^a	2,84±0,08 ^a	2,95±0,13 ^a	2,89±0,30 ^a	2,86±0,07 ^a
pH	24	2,55±0,06 ^a	2,54±0,07 ^a	2,56±0,07 ^a	2,57±0,09 ^a	2,52±0,08 ^a
	48	2,58±0,03 ^a	2,58±0,11 ^a	2,56±0,06 ^a	2,51±0,10 ^a	2,51±0,09 ^a
	72	2,71±0,17 ^a	2,57±0,06 ^a	2,56±0,06 ^a	2,55±0,09 ^a	2,59±0,04 ^a
TESTE 4						
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Etanol no cálice	
SST	72	8,53±0,87 ^a	9,00±1,19 ^a	8,53±0,15 ^a	8,3±0,46 ^a	
AT	72	3,90±0,25 ^a	3,68±0,34 ^a	3,68±0,02 ^a	4,42±0,42 ^a	
pH	72	2,70±0,01 ^a	2,86±0,10 ^a	2,78±0,09 ^a	2,64±0,11 ^a	

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

A firmeza, após o tratamento, foi avaliada nos testes 1, 2 e 4. Primeiramente foi comparada a firmeza de todos os grupos com a firmeza dos frutos no dia da coleta (**Tabela 17**) e depois foi comparada a firmeza dos frutos tratados com a firmeza dos frutos do grupo controle.

Os frutos de todos os testes apresentaram redução na firmeza em relação ao dia da coleta, em destaque para os frutos do teste 1 que com maior o tempo de armazenamento menor foi a firmeza, no entanto de acordo com esse parâmetro conclui-se que os frutos não estavam maduros após 72 h do tratamento. Em todos os testes a firmeza dos frutos tratados ficou estatisticamente igual ao grupo controle (**Tabela 19**).

Tabela 19 – Firmeza, expressa em kg/cm^{-2} após destanização dos frutos colhidos, no estádio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 23/03/2011 (testes 1), dos frutos colhidos, no estádio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011 (teste 2) e dos frutos colhidos, no estádio 4 de maturação, em Mogi das Cruzes em 04/02/2012 (teste 4).

TESTE 1						
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Câmara etileno	Meio anóxico
Firmeza	24	8,3±0,98 ^a	8,6±1,31 ^a	7,20±0,82 ^a	7,27±0,70 ^a	7,87±0,65 ^a
	48	5,53±0,49 ^a	5,33±0,59 ^a	5,87±0,67 ^a	5,17±0,32 ^a	5,33±0,61 ^a
	72	3,00±1,00 ^a	3,03±1,11 ^a	3,5±1,00 ^a	3,30±1,20 ^a	3,40±1,25 ^a
TESTE 2						
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Câmara etileno	Meio anóxico
Firmeza	24	0,21±0,09 ^a	0,23±0,12 ^a	0,17±0,08 ^a	0,15±0,05 ^a	0,23±0,10 ^a
TESTE 4						
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Etanol no cálice	
SST	72	0,42±0,22 ^a	0,40±0,23 ^a	0,37±0,05 ^a	0,34±0,15 ^a	

Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Já para os caquis, a destanização tem como consequência a redução da firmeza. Em frutos tratados com imersão em etanol Blum *et al.* (2008) detectaram uma queda de 5,7 N no caqui “Giombo” após 12 dias de armazenamento. Kato (1987) identificou que após oito dias de armazenamento em frutos tratados em câmara de etanol 50% a 10° C a firmeza caiu de 3 kg/cm^2 para 1,9 kg/cm^2 após 14 dias do tratamento.

4.4.3 Perda de matéria fresca

A perda de matéria fresca foi avaliada nos frutos tratados nos testes 2 e 4. A massa de cada fruto foi comparada com sua respectiva massa antes deste entrar no tratamento. De acordo com **Figura 15** é possível verificar que estatisticamente os frutos do teste 2 após 24 horas do tratamento tiveram a mesma perda de matéria fresca que o grupo controle. Já no teste 4 somente os frutos imersos em etanol após 72 horas do tratamento apresentaram uma perda maior que o grupo controle, em torno de 32% a mais.

Com esses resultados é possível concluir que todos os grupos apresentaram perda de matéria fresca, porém os frutos imerso em etanol no teste 4 apresentaram uma perda maior que o grupo controle. Além disso, se conclui que quanto maior o tempo de armazenamento, maior a perda de massa fresca e consequentemente um fruto de menor qualidade. Chitarra e Chitarra (1990) consideram que perdas de matéria fresca entre 3% e 6% são suficientes para causar redução na qualidade de muitos produtos vegetais (**Figura 15**).

Figura 15 – Perda de matéria fresca após destanização dos frutos colhidos, (A) no estágio 6 de maturação, em Paranapiacaba em 26/04/2011 (teste 2) e (B) dos frutos de Mogi das Cruzes, colhidos no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Estudos com o caqui detectaram perda de massa fresca de 5,34% em frutos tratados em câmara de etanol em temperatura de 20°C após 10 dias do tratamento (ANTONIOLLI *et al.*, 2000) e 8,85% em frutos tratados em câmara de etanol em 30°C após 9 dias do tratamento (ANTONIOLLI *et al.*, 2002). Blum *et al.* (2008) identificaram uma perda de massa fresca em frutos imersos em etanol 50% de aproximadamente 2,5%, 5% e 7,5% após 3, 6 e 12 dias do tratamento, respectivamente.

4.4.4 Capacidade antioxidante *in vitro*

Análises relacionadas à determinação da capacidade antioxidante foram desenvolvidas com os frutos do teste 1, 2 e 4 por meio de três diferentes ensaios, capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999), capacidade de seqüestro do DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) e capacidade redutora do ferro (FRAP) (BENZIE; STRAIN, 1996). As análises por DPPH e FRAP foram realizadas somente com as amostras que apresentaram melhor redução, em comparação ao grupo controle, no teor de taninos totais e proantocianidinas.

No teste 1 os tratamentos de destanização por imersão em etanol e câmara de etanol foram os mais efetivos na redução do teor de taninos solúveis. Porém após 72 horas do tratamento a atividade antioxidante *in vitro* do cambuci pelo método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, sequestro do radical DPPH e capacidade redutora do ferro (FRAP) diminuiu aproximadamente 67%, 57% e 71%, respectivamente para os frutos tratados e câmara de etanol e de aproximadamente 72%, 67% e 72%, respectivamente para os frutos imersos em etanol (**Figura 16**).

Figura 16 – Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol eq. catequina/100 g b.s.}$), (B) capacidade de seqüestro do DPPH ($\mu\text{moles eq. Trolox/100 g b.s.}$) e (C) capacidade redutora do ferro ($\text{mmoles eq. Trolox/100 g b.s.}$). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

A redução na capacidade antioxidante dos frutos tratados no teste 2 pelo método de Folin-Ciocalteu foi aproximadamente 32%, para amostras tratadas em câmara de etanol e 24% para frutos imerso em etanol. Pelo método DPPH a redução foi aproximadamente 18%, para amostras tratadas em câmara de etanol, para os frutos imersos em etanol, essa redução foi de aproximadamente 16%, porém não houve diferença estatística em relação ao grupo controle. Pelo método FRAP não houve diferença estatística entre os frutos tratados e o grupo controle (**Figura 17**).

Figura 17 – Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol eq. catequina/100g b.s.}$), (B) capacidade de seqüestro do DPPH ($\mu\text{ moles eq. trolox/100 g b.s.}$) e (C) capacidade redutora do ferro ($\text{mmoles eq. trolox/100 g b.s.}$). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

A redução na capacidade antioxidante dos frutos tratados em câmara de etanol no Teste 4 pelos métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP foi de aproximadamente 78%, 69% e 69%, respectivamente; para os frutos imersos em etanol foi de 63%, 60% e 60%, respectivamente, e para os frutos com etanol no cálice foi de 28%, 42% e 62% respectivamente (**Figura 18**).

Figura 18 – Capacidade antioxidante após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4). (A) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol eq. catequina/100g b.s.}$), (B) capacidade de seqüestro do DPPH ($\mu\text{ moles eq. trolox/100 g b.s.}$) e (C) capacidade redutora do ferro ($\text{mmoles eq. trolox/100 g b.s.}$). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Os frutos tratados com etanol no teste 2 não apresentaram uma redução na capacidade antioxidante tão significativa como os frutos tratados nos teste 1 e 4, isso provavelmente está relacionado a menor redução de taninos solúveis que os frutos tratados com etanol apresentaram nos teste 1 e 4.

As **Tabelas 20, 21 e 22** apresentam os coeficientes de correlação entre os teores de proantocianidinas e taninos totais dos frutos utilizados nos testes 1, 2 e 4, em relação à capacidade antioxidante *in vitro*, mostrando alta correlação entre taninos com a atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de capacidade de sequestro do DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu.

Tabela 20. Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante *in vitro* (capacidade de sequestro do DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1).

METODOLOGIA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Proantocianidinas (n-butanol) X DPPH	0,990
Proantocianidinas (n-butanol) X FRAP	0,999
Proantocianidinas (n-butanol) X Folin-Ciocalteu	0,998
Proantocianidinas (DMAC) X DPPH	0,999
Proantocianidinas (DMAC) X FRAP	0,998
Proantocianidinas (DMAC) X Folin-Ciocalteu	0,999
Taninos totais X DPPH	0,996
Taninos totais X FRAP	0,999
Taninos totais X Folin-Ciocalteu	0,999

Tabela 21. Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante *in vitro* (capacidade de sequestro do DPPH[·], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos destanizados colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2).

METODOLOGIA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Proantocianidinas (n-butanol) X DPPH	0,989
Proantocianidinas (n-butanol) X FRAP	0,978
Proantocianidinas (n-butanol) X Folin-Ciocalteu	0,999
Proantocianidinas (DMAC) X DPPH	0,985
Proantocianidinas (DMAC) X FRAP	0,984
Proantocianidinas (DMAC) X Folin-Ciocalteu	0,999
Taninos totais X DPPH	0,990
Taninos totais X FRAP	0,880
Taninos totais X Folin-Ciocalteu	0,957

Tabela 22. Correlação de Pearson entre os teores de proantocianidinas (pelo método do butanol acidificado e DMAC), taninos totais (pelo método de precipitação protéica) e capacidade antioxidante *in vitro* (capacidade de sequestro do DPPH[·], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).

METODOLOGIA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Proantocianidinas (n-butanol) X DPPH	0,999
Proantocianidinas (n-butanol) X FRAP	0,957
Proantocianidinas (n-butanol) X Folin-Ciocalteu	0,958
Proantocianidinas (DMAC) X DPPH	0,995
Proantocianidinas (DMAC) X FRAP	0,928
Proantocianidinas (DMAC) X Folin-Ciocalteu	0,976
Taninos totais X DPPH	0,992
Taninos totais X FRAP	0,962
Taninos totais X Folin-Ciocalteu	0,999

4.4.5 Flavonoides

Análises relacionadas à identificação e teor de flavonoides foram desenvolvidas com os frutos do teste 1, 2 e 4 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O efeito da destanização no teor de flavonoides foi semelhante nos frutos tratados com etanol nos testes 1 e 4. Em ambos os testes, os tratamentos de destanização com etanol reduziram os teores de epigallocatequina galato, derivados de quercetina e rutina dos frutos. No entanto no teste 1, os dois tratamentos com etanol reduziram os teores de derivados de caempferol, já no teste 4 somente o tratamento em câmara de etanol reduziu a concentração de derivados de caempferol (**Tabela 23**).

No teste 1, os frutos tratados com etanol, apresentaram teores semelhantes de epigallocatequina galato, derivados de quercetina e derivados de caempferol, porém os teores de rutina foram menores nos frutos destanizados em câmara de etanol, em comparação aos frutos imersos em etanol. Já no teste 4, os menores teores de flavonoides foram nos frutos tratados em câmara de etanol (**Tabela 23**).

No teste 2, somente os teores de rutina e derivados de caempferol foram menores nos frutos tratados com etanol, a concentração de epigallocatequina galato e derivados de quercetina foi a mesma para os frutos tratados e para o grupo controle (**Tabela 23**). Esse comportamento diferente dos outros testes ocorre provavelmente pelas principais diferenças dos frutos utilizados no teste 2 em relação aos frutos utilizados nos testes 1 e 4, que são: menor tempo de armazenamento e estágio de desenvolvimento já maduro.

Tabela 23 - Teor de flavonoides (mg/100 g b.s) após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).

TESTE 1					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	
EGCG	72	20,01±0,28 ^a	9,73±0,03 ^b	8,97±0,82 ^b	
Der. Quercetina	72	9,56±0,12 ^a	2,67±0,30 ^b	2,16±0,15 ^b	
Rutina	72	15,30±0,01 ^a	9,41±0,51 ^b	7,74±0,04 ^c	
Der. Campferol	72	1,56±0,31 ^a	0,38±0,09 ^b	0,32±0,21 ^b	
TESTE 2					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	
EGCG	24	6,96±0,58 ^a	6,51±0,11 ^a	6,49±0,06 ^a	
Der. Quercetina	24	1,31±0,09 ^a	1,02±0,10 ^a	1,89±0,91 ^a	
Rutina	24	4,98±0,30 ^a	3,12±0,07 ^b	2,56±0,01 ^c	
Der. Campferol	24	0,78±0,20 ^a	0,36±0,05 ^b	0,44±0,27 ^{a,b}	
TESTE 4					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Etanol no cálice
EGCG	72	17,00±0,24 ^a	8,12±0,11 ^b	7,86±0,57 ^b	12,44±0,03 ^c
Der. Quercetina	72	7,64±1,12 ^a	5,05±0,04 ^b	2,91±0,02 ^c	3,94±0,06 ^c
Rutina	72	14,63±0,23 ^a	11,59±0,03 ^b	8,86±0,25 ^c	10,13±0,07 ^d
Der.campferol	72	0,40±0,04 ^a	0,35±0,02 ^{a,b}	0,29±0,05 ^b	0,40±0,04 ^a

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

4.4.6 Ácido elágico livre, total e derivados de ácido sirínico

Os teores de ácido elágico livre, total e derivados de ácido sirínico foram analisados nos frutos dos testes 1, 2 e 4. Os frutos tratados em todos os testes analisados apresentaram redução nos teores de ácido elágico livre, total e derivados de ácido sirínico. Ressaltando que, não houve diferença significativa, em relação ao grupo controle nos teores de ácido elágico total dos frutos tratados em câmara de etanol no teste 1 e derivados de ácido sirínico nos frutos tratados em câmara de etanol no teste 4 (**Tabela 24**).

O efeito dos tratamentos com etanol nos frutos do teste 1 e 2 foi semelhante, já que os frutos imersos em etanol apresentaram menores teores de ácido elágico livre, total e derivados de ácido sirínico. Ao contrário do teste 4, onde os frutos tratados com etanol no cálice foram os que apresentaram menores teores de ácido elágico livre e total e os frutos destanizados por imersão em etanol apresentaram os menores teores de derivados de ácido sirínico (**Tabela 24**).

Tabela 24 – Teor de ácido elágico livre (mg/100 g b.s.), total (mg/100 g b.s.) e ácido siríngico (mg/ 100 g b.s.) após destanização dos frutos colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação, em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação, em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação, em 04/05/2012 (teste 4).

TESTE 1					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	
Ac. Elágico livre	72	25,55±0,08 ^a	20,48±0,31 ^b	20,87±0,30 ^b	
Ac. Elágico total	72	1611±66 ^a	1056±59 ^b	1528±46 ^a	
Ac. Siríngico	72	49,24±0,49 ^a	34,56±1,07 ^b	42,15±0,21 ^c	
TESTE 2					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	
Ac. Elágico livre	24	21,81±0,18 ^a	13,3±0,35 ^b	16,80±0,16 ^c	
Ac. Elágico total	24	884±26 ^a	678±39 ^b	821±18 ^c	
Ac. Siríngico	24	24,15±0,07 ^a	19,46±0,20 ^b	22,36±0,26 ^c	
TESTE 4					
	Horas	Controle	Imersão etanol	Câmara etanol	Etanol no cálice
Ac. Elágico livre	72	15,40±0,45 ^a	10,49±0,03 ^b	11,09±0,22 ^c	8,92±0,11 ^d
Ac. Elágico total	72	948±10 ^a	806±77 ^{a,b}	734±41 ^b	638±8 ^b
Ac. Siríngico	72	26,65±0,05 ^a	21,73±0,06 ^b	26,30±0,44 ^a	25,21±0,33 ^c

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

No terceiro dia após saírem do tratamento, os frutos imersos em etanol do teste 1 apresentaram uma redução no teor de ácido elágico total em relação aos frutos do grupo controle, de aproximadamente 34%, e para os frutos tratados em câmara de etanol a redução foi de aproximadamente 5%.

Após 24 horas da saída do tratamento, a redução de ácido elágico total dos frutos tratados no teste 2 foi de aproximadamente 23% e 7% para frutos imersos em etanol e para frutos tratados em câmara de etanol, respectivamente.

Já no teste 4, 72 h após tratamento a redução nos teores de ácido elágico total foi de aproximadamente 15%, 22% e 32%, para frutos imersos em etanol, tratados em câmara de etanol e destanizados com etanol no cálice, respectivamente.

Em todos os testes a redução dos taninos hidrolisáveis pelos tratamentos de destanização foi menor que a observada para os taninos condensados. Além disso, o tratamento mais efetivo na redução das proantocianidinas de cada teste não necessariamente foi o mais efetivo na redução dos taninos hidrolisáveis. Por exemplo, no teste 2, frutos tratados em câmara de etanol apresentaram maior efetividade na diminuição de proantocianidinas, porém menor efetividade na diminuição dos teores de ácido elágico total. No teste 1, os dois tratamentos com etanol, imersão e câmara, apresentaram praticamente a mesma efetividade em reduzir teores de taninos condensados, porém em relação à diminuição de taninos elágicos, o tratamento por imersão foi significativamente mais efetivo.

4.4.7 Efeito dos compostos fenólicos purificados na atividade enzimática da α -amilase e da α -glicosidase

A exposição prolongada a níveis elevados de glicose após refeições tem um impacto adverso sobre as células e tecidos. A hiperglicemia pós-prandial pode causar danos às células β , responsáveis pela produção e liberação de insulina, contribuindo para uma diminuição progressiva da secreção de hormônio (YAMOTO *et al.*, 2008).

Hoje em dia existem no mercado medicamentos capazes de auxiliar na redução da hiperglicemia pós-prandial, como a acarbose e o miglitol, ambos auxiliam na redução da hiperglicemia pós-prandial por retardar a degradação enzimática de carboidratos no intestino delgado, através da inibição da α -glicosidase, com consequente redução da absorção intestinal de glicose (WANNMACHER, 2007; KIM, *et al.*, 2000).

Muitas espécies de plantas e compostos purificados de plantas têm sido estudados e usados na redução dos níveis de glicose pós-prandial (GROVER *et al.*, 2002; MARLES e FARNSWORTH, 1994).

Tadera *et al.* (2006) mostraram que os flavonoides quercetina, miricetina, epigallocatequina galato e cianidina são bons inibidores de α -amilase. Os taninos também são potentes inibidores da α -amilase, a remoção dos componentes inibitórios dos extratos por Sephadex LH-20 sugere que os inibidores de α -amilase são os taninos hidrolisáveis (MULLEN *et al.*, 2003; GAL *et al.*, 2001).

A atividade da α -amilase é avaliada através da formação de maltose resultante da ação dessa enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação α -1,4), reduz o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) formando um produto de cor característica cuja absorbância máxima é determinada a 540 nm. Já, a avaliação da atividade da α -glicosidase, se baseia na ação desta enzima sobre um substrato sintético, *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo, que ao ser hidrolisado libera o cromóforo *p*-nitrofenil.

Para realizar esses experimentos, os açúcares, vitaminas e minerais presentes nos extratos foram eliminados e um extrato metanólico rico em compostos fenólicos foi obtido através de extração em fase sólida. Nesta purificação foi utilizada a resina de C18, para a avaliação dos taninos presentes na amostra, além dos flavonoides e ácidos fenólicos. Os resultados foram expressos tanto em massa de amostra como de equivalentes de catequina necessários para inibir 50% da α -amilase e α -glicosidase presente.

Em todos os testes de destanização os frutos do grupo controle foram os mais efetivos na inibição da enzima α -amilase e os frutos tratados em câmara de etanol e imersão em etanol foram os menos efetivos. No teste 4 frutos imersos em etanol e

tratados em câmara de etanol apresentaram quantidades estatisticamente iguais para inibir 50% da α -amilase, tanto em resultados expressos em massa de amostra quanto em equivalentes de catequina. O comportamento dos frutos no teste 2 foi semelhante ao dos frutos do teste 4, porém cambucis imersos em etanol foram menos efetivos na inibição da enzima quando o resultado foi expresso em mg amostra b.s./ mL de reação. Já no teste 1 os frutos imersos em etanol foram menos efetivos na inibição de 50% da α -amilase, tanto em resultados expressos em massa de amostra quanto em equivalentes de catequina (**Tabela 25**).

Tabela 25. Atividade inibitória de α -amilase de extratos purificados em C18 obtidos a partir dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).

Amostras	IC₅₀ (mg amostra b.s/mL reação)	IC₅₀ (mg EC*/mL reação)
TESTE 1		
Controle	0,66±0,01 ^a	0,46±0,03 ^a
Câmara de etanol 72 h após trat.	1,03±0,03 ^b	0,72±0,02 ^b
Imersão em etanol 72 h após trat.	1,25±0,02 ^c	0,88±0,02 ^c
TESTE 2		
Controle	0,85±0,01 ^a	0,67±0,01 ^a
Câmara de etanol 24 h após trat.	1,12±0,03 ^b	0,74±0,05 ^b
Imersão em etanol 24 h após trat.	1,37±0,04 ^c	0,78±0,09 ^b
TESTE 4		
Controle	0,77±0,02 ^a	0,52±0,02 ^a
Etanol no cálice 72 h após trat.	1,35±0,03 ^b	0,68±0,01 ^b
Câmara de etanol 72 h após trat.	1,50±0,06 ^c	0,74±0,02 ^c
Imersão em etanol 72 h após trat.	1,45±0,02 ^{b,c}	0,73±0,01 ^c

*mg equivalentes de catequina. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

Em todos os testes de destanização os extratos dos grupos controle foram os mais efetivos na inibição da enzima α -glicosidase. Nestes teste os frutos imersos em etanol e tratados em câmara de etanol foram os menos efetivos, apresentando quantidades semelhantes para a inibição enzimática, porém no teste 1, os frutos imersos

em etanol apresentaram uma efetividade menor para inibir a α -glicosidase quando o resultado foi expresso em mg de amostra capaz de inibir 50 % da enzima (**Tabela 26**).

Tabela 26. Atividade inibitória de α -glicosidase de extratos purificados em C18 obtidos a partir dos frutos destanizados colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 26/04/2011 (teste 2) e em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4).

Amostras	IC ₅₀ (mg amostra b.s/mL reação)	IC ₅₀ (mg EC*/mL reação)
TESTE 1		
Controle	0,52±0,02 ^a	0,46±0,04 ^a
Câmara de etanol 72 h após trat.	0,74±0,03 ^b	0,90±0,08 ^b
Imersão em etanol 72 h após trat.	0,89±0,02 ^c	1,01±0,06 ^b
TESTE 2		
Controle	0,69±0,03 ^a	0,768±0,04 ^a
Câmara de etanol 24 h após trat.	0,77±0,01 ^b	0,93±0,06 ^b
Imersão em etanol 24 h após trat.	0,77±0,03 ^b	0,96±0,03 ^b
TESTE 4		
Controle	0,60±0,01 ^a	0,66±0,02 ^a
Etanol no cálice 72 h após trat.	0,78±0,02 ^b	0,88±0,03 ^b
Câmara de etanol 72 h após trat.	0,91±0,02 ^c	1,18±0,03 ^c
Imersão em etanol 72 h após trat.	0,90±0,02 ^c	1,24±0,02 ^c

*mg equivalentes de catequina. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

A menor capacidade dos frutos tratados em inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase pode ser justificada principalmente pela redução dos taninos hidrolisáveis e condesandos nesses frutos destanizados.

Gonçalves *et al.* (2010) avaliaram o efeito do extrato de cambuci purificado em poliamida na atividade da enzima α -amilase, e encontram valores de IC_{50} igual a 1,0 mg amostra b.s/mL reação e 0,4 mg eq. de catequina/mL de reação. Já, na avaliação do efeito do cambuci na enzima α -glicosidase, Gonçalves *et al.* (2010) realizaram testes com extrato metanólico de cambuci bruto e purificado em poliamida e os valores de IC_{50} foram 0,3 mg amostra b.s/mL reação e 1,3 mg eq. de catequina/mL de reação para o extrato bruto e 0,6 mg amostra b.s/mL reação e 0,4 mg eq. de catequina/mL de reação para o extrato purificado em poliamida.

4.4.8 Atividade da polifenoloxidase

A destanização por câmara de etanol e imersão em etanol provocou o escurecimento da casca dos frutos. Os mesmo acontece com caquis, porém com escurecimento na casca e na polpa, quando tratados com elevadas concentrações de dióxido de carbono, por um período muito longo (EDAGI & KLUGE *et al.*, 2009). No caso do caqui, o mecanismo da formação dessas manchas ainda não está claro, porém, sabe-se que, durante a exposição dos frutos à atmosfera rica em dióxido de carbono, a atividade de enzimas como polifenoloxidase aumenta gradativamente, atingindo o máximo com o aparecimento das manchas (KATO, 1987).

Para avaliar se a causa deste escurecimento esta relacionada à atividade da polifenoloxidase, foi realizada análise para quantificar a atividade desta enzima.

A polifenoloxidase esta presente em diversas frutas e vegetais. Ela faz parte de um grupo de enzimas conhecidas como oxiredutases podendo promover uma variedade de reações (CLEMENTE, 1998). A atividade enzimática pode ocasionar mudança na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e até modificações na textura (LAURENTE & CLEMENTE, 2005).

A atividade da enzima foi analisada em frutos de diferentes estádios de maturação, estádios 4 e 6, no dia da coleta e 24 h após o tratamento, onde os frutos tratados em câmara de etanol e imersão em etanol já apresentavam escurecimento da (Tabela 27).

Tabela 27. Atividade da enzima polifenoloxidase (U/mL/min) em frutos destanizados, em dois estádios de maturação, estágio 4 e 6, analisados no dia da coleta e 24 h após o tratamento.

	Dia da coleta Estádio 4	Dia da coleta Estádio 6	24 h após trat. Estádio 4	24 h após trat. Estádio 6
Controle	0,015±0,001	0,011±0,001	Sem atividade	Sem atividade
Etanol no cálice	n.a.*	n.a.*	0,001±0,0003	Sem atividade
Câmara de etanol	n.a.*	n.a.*	0,001±0,0002	Sem atividade
Imersão em etanol	n.a.*	n.a.*	0,002±0,0005	Sem atividade

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). *n.a. – não analisados.

Observou-se que a atividade da polifenoloxidase do cambuci é muito baixa e 24 h após a coleta sua atividade é nula, portanto não podemos considerar que o escurecimento dos frutos é devido a sua presença. Em termos de comparação, foi analisada a atividade desta enzima em maçãs maduras pelo mesmo método e o valor

encontrado foi $0,11 \pm 0,001$, ou seja, 10 vezes maior que a atividade da enzima no cambuci maduro no dia da coleta.

Estudos relatam que o acúmulo de acetaldeído e etanol pode causar deterioração fisiológica nos frutos, como descoloração da pele (HEWAGE *et al.*, 1995). Porém como a mudança na cor da pele não aconteceu com frutos tratados com etanol no cálice, somente em frutos tratados em imersão e câmara de etanol, provavelmente o escurecimento da casca se deve pelo contato direto desta com o etanol, onde pode ter ocorrido uma dissolução da cera da cutícula presente na pele pelo etanol.

5. CONCLUSÃO

Os frutos de cambuci de um mesmo plantio comercial, apresentam alta variabilidade em relação a tamanho, acidez e pH. Frutos do “tipo médio”, provenientes de quatro municípios do estado de São Paulo, apresentaram a mesma firmeza, porém existem diferenças na composição centesimal, mineral, teores de fenólicos totais, proantocianidinas, taninos elágicos e capacidade antioxidante. Provavelmente os frutos colhidos em uma mesma produção podem ser diferentes por pertencerem a variedades genéticas diferentes. Já cambucis colhidos em diferentes municípios, provavelmente as diferenças na composição do solo, temperatura e exposição solar de cada localidade sejam as responsáveis pela variabilidade da composição química desses frutos, não descartando também a possibilidade de possuírem diferenças genéticas.

Os melhores parâmetros para avaliar o estágio de maturação do cambuci são a sua aparência, observando o arrendodamento da quinas, e a firmeza, pois quanto mais maduro mais mole é a polpa. Outros parâmetros como sólidos solúveis totais, acidez titulavel e pH não são boas ferramentas na diferenciação de frutos em diferentes estádios, pois não se diferem com a maturação.

Provavelmente o cambuci não é um fruto climatérico, pois mesmo apresentando um pico de CO₂ após colhido, ele possui algumas características de frutos não climatérico, pois mantém a acidez e o teor de sólidos solúveis totais com a maturação, não apresenta pico climatérico para o etileno e não responde ao etileno nos tratamentos de destanização.

Em relação aos tratamentos de destanização, fica comprovado que o uso do etanol, em suas diferentes formas de aplicação, é efetivo para reduzir os teores de taninos solúveis. No entanto, a destanização provoca redução na capacidade

antioxidante *in vitro* do cambuci e na atividade inibitória de enzimas do metabolismo de carboidratos. Os tratamentos de destanização mais efetivos foram câmara de etanol e imersão em etanol, porém esses tratamentos causam escurecimento na casca do cambuci.

6. REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potencial dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n.8, p. 1679-1687, 2012.
- ADAMS, D. O. Phenolics and ripening in grape berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 249-256, 2006.
- ADATI, R.T. **Estudos biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae**. 2001. 128f. Dissertação (Mestrado em Farmacognosia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- AERTS, R.J.; BARRY, T.N., MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages, **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.75, 1-12, 1999.
- ALBERTINI, M. V., CARCOUET, E., *et al.* Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.21, p.8335-8339, 2006.
- AOAC (2005) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 18ed., Gaithersburg, MD., 2005.
- ANDERSON, K.J.; TEUBER, S.S.; GOBEILLE, A.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; STEINBERG, F.M.. Walnut Polyphenolics Inhibit *in vitro* Human Plasma and LDL Oxidation. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, p. 2837-2842, 2001.
- ANTONIOLLI, L.R. *et al.* Remoção da adstringencia de frutos de caqui 'Giombo' sob diferentes períodos de exposição ao vapor de álcool etílico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2000.
- ANTONIOLLI, L.R. *et al.* Remoção da adstringencia de frutos de caqui 'Giombo' sob diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p.687-691, 2002.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52,p.1124-113,1 2004.

ARNAL, L.; DEL RIO, M.A. Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen-enriched atmospheres in persimmon fruit cv, 'Rojo brillante'. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p. 1516-1518, 2003.

BATE-SMITH, E.C. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochem.**, Oxford, v. 11, p. 1153-1156, 1972

BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potential health benefits of berries. **Cur. Nutr. Food Sci.**, v. 1, p. 71-86, 2005.

BEATTIE, B.; WADE, N. Storage, ripening, and handling of fruit. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. Fruit processing. London: Chapman & Hall, p. 40-69, 1996.

BENETTI-PINTO, J. *et al.* Armazenamento refrigerado de caqui 'Giombo' após remoção de adstringência com diferentes concentrações de etanol. In: **Simpósio Latino Americano de ciências dos alimentos**, 7., Campinas, SP, 2007.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical biochemistry** 239,70-76, 1996.

BLUM, J.; HOFFMANN, F.B.; AYUB, A.R.A.; PRADO, P.V.B.; MALGARIM, M.B. Destanização do caqui "Giombo" com etanol e ethephon. **Revista Ceres**, v.55, n. 1, p. 054-059, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, v 56(11), 317-333, 1998.

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informação nutricional. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. Brasília: Ministério da saúde; 2003.Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/rotuali.htm>. Acessado em 12 dezembro de 2012.

BUREN, J. VAN. Fruits phenolics. In HULME, A.C. (Ed). **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic, 1970. V. 1, p.269-304, 1970.

CAO, G.; RUSSELL, R.M.; LISCHNER, N.; PRIOR, R.L. Serum antioxidant capacity is increase by consumption of Strawberries, Spinach, Red wine or Vitamin C in elderly women. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 128, p. 2383-2390, 1998.

CENTRO DE PESQUISAS ECO-NATURAIS – CEPEN. Cambuci, *Campomanesia phaea*. Disponível em: http://www.cepen.com.br/arv_nat_Myrtaceae.htm. Acesso em 22 dez. 2011.

CHAO-PENG, L.; ZHENG, Z.; LIANG, Y.; LI, B. Relationship between activity of alcohol dehydrogenase and soluble tannin in persimmon. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 35, p. 741-746, 2008.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLEULUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruviam camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) MacVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v.120, p. 1019-1024, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/ FAEPE, p. 293, 1990.

CISNEROS, Z. L. The use of controlled post-harvest abiotic stressed as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding – value of fresh fruits and vegetables. **J. Fd. Sci.** v. 68, p. 1560-1565, 2003.

CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **J.Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1118-1125, 2000.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S.; STROG, F.C.; GUERNELLI, O. Determinação de ácido ascórbico (vit. C) por redução de íons cúpricos. **Química Nova**, v. 7, n. 2, p. 60-64, 1984.

COS, P.; DE BRUYNE, N.; HERMANS, N.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.J. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current medicinal chemistry**, v.10, p.1345-1359, 2003.

DIXON, R.A.; XIE, D.Y.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist**, v.165, 9-28, 2004.

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

EDAGI, F.K.; CHIOU, D.G.; TERRA, F.A.M.; SESTARI, I.; KLUGE, R.A. Adstringency removal of “Giombo” persimmon with ethanol sub-doses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2022-2028, 2009.

EDAGI, F.K.; KLUGE, R.A. Removal of astringency in persimmon fruits: a biochemical, physiological and technological view. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 585-597, 2009.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Coleção 500 Perguntas – 500 respostas: Citros. Ed. Embrapa, 2008. 219 p. Disponível em: <<http://www.sct.embrapa.br/500p500r/default.asp>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**, v.24, 695-706, 2004.

ERENEL, G.; ERBAS, D.; ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, v.1, n.85, p.37-43, 1993.

FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J.; SLADE, D. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*, **Phytochemistry**, v.64, 31-51, 2003.

FUKUSHIMA, T. et al. Mechanisms of astringency removal by ethanol treatment in ‘Hiratanenashi’ kaki fruits. **Japanese Society for Horticultural Science Journal**, v.60, n.3, p.685-694, 1991.

GAL, J.Y.; FOVET, Y.; ADIB-YADZI, M. About a synthetic saliva for *in vitro* studies. **Talanta**, v. 53, p. 1103-1115, 2001.

GENOVESE, M. I. ; HASSIMOTTO, N. M. A. ; LAJOLO, F. M. . Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition Research** (New York), v. 28, p. 198-207, 2008.

GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 67-69, 2003.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v 48, p. 4581-4589, 2000.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals and targets of chronic disease. In: **Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W.R.; OMAJE, S.T.; MESKIN,

M.S.; JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998.
Chemistry, v. 53, p. 1370-1373, 2005

GONÇALVES, A.E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666-4674, 2010.

GROVER, J.K.; YAVAD, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potencial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 81-100, 2002.

HADDOCK, E.A.; GUPTA, R.K.; AL-SHAFI, S.M.K.; LAYDEN, K.; HASLAM, E.; MAGNOLATO, D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. **Phytochem.** Oxford, v. 21, p. 1049-1062, 1982.

HAGERMAM, A.E., BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

HAGERMAM, A.E., BUTLER, L.G. Determination of protein in tannin-protein precipitates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 28, p. 944-947, 1980.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. **J. Agric. Food Chem.**, v.26, n. 4, p. 809- 812, 1978.

HANNUM, S.M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, p. 1-17, 2004.

HASLAM, E. **Plant polyphenols, vegetable tannins revisited**, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.

HERRMANN, K. Bemerkungen zum "Gerbstoff" – Gehalt in Lebensmitteln. **Gordian**, v.94(1-2), 12-14, 1994.

HERRMANN, K. Neuere Erkenntnisse ueber Kakaoiinhaltsstoffe. II Catechine und Procyanidine und deren oxidative Kondensation sowie Ballaststoffe der Kakaoschalen, **Gordian**, v.95(9), 141-142, 144, 1995.

HEWAGE, K.S., WAINWRIGHT, H., LUO, Y. Effect of ethanol and acetaldehyde on banana ripening. **J. Hort. Sci.** v. 70, p. 51–55, 1995.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 37, p. 937-942, 1999.

ITAMURA, H., T. FUKUSHIMA, T.; KITAMURA, T. Changes in cell-wall polysaccharide composition during fruit softening of Japanese persimmon (*Dispyros-kaki thumb* Var Hiratanenashi). **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.36, n.8, p.647-650,1989.

JALIL, A.M.M., ISMAIL, A.; CHONG, P.P.; HAMID, M.; KAMARUDDIN, S.H.S. Effects of cocoa extract containing polyphenols and methylxanthines on biochemical parameters of obese-diabetic rats, **Journal of the science of Food and Agriculture**, v.89, 130-137, 2008.

JOSLYN, M.A.; GOLDSTEIN, J.L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. **Adv. Food Res.**, v. 13, p. 179-217, 1964.

KATO, K. Astringency removal and ripening as related to etanol concentration in persimmon fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 53, n.3, p. 278-289, 1984.

KATO, K. Astringency removal and ripening as related to temperature during the de-astringency by ethanol in persimmon fruits. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, v. 55, n. 4, p. 498-509, 1987.

KAWASAKI, M.L. & LANDRUM, L.R. A rare and potentially economic fruit of Brazil . cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). **Economic Botany**, v. 51, p. 403-407, 1997.

KRESTY, L.A.; MORSE. M.A.; ADAMS, C.A.; LU, J.; STONER, G.D. Inhibitory effect of lyophilized black raspberries on esophageal tumorigenesis and O⁶-methylguanine levels in the F344 rat. **Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.**, São Francisco, A120, 1998.

KEALEY, K.S., SNYDER, R.M., ROMANCZYK, L.J., GEYER, H.M., MYERS, M. E., WITHCARE, E.J., HAMMERSTONE, J.F., e SCHMITZ, H.H. **Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses**. *Patent Cooperation Tready (PCT) WO 98/09533*, Mars Incorporated, USA, 1998.

KIM, J.S.; KWON, C.S.; SON, K.H. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n.11, p. 2458-2461, 2000.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v.99, n.2, p. 213-218, 1999.

KLUGE, R.A.; JACOMINO, A.P. ; MARTINEZ O.. Inibição do amadurecimento de abacate com 1-metilciclopropeno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 895-901, 2002.

LADANIYA, M. S. Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation. Elsevier Science & Technology, São Diego, CA, p. 576, 2008.

LAURENTE, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (Oxalidacia averrhoa) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 159-163, 2005.

LEE, J.; TALCOTT, S. T. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 361-366, 2004.

MAAS, J.L.; WANG, S.Y.; GALLETTA, G.J. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. **Hortscience**, v. 26, n. 1, p. 66-68, 1991.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, p.319, 1997.

MALES, R.; FARNSWORTH, N. Plants as sources of antidiabetic agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. **Economic and Medical Plant Research**, v. 6, p. 149-187, 1994.

MANDAL, S.; STONER, G.D. Inhibition of methylbenzyl nitrosamine-induced esophageal tumors in rats by ellagic acid. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 55-61, 1990.

MASIA, A. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. **Physiol. Pl.** v.104, p. 668-672, 1998.

MATHUR, S.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans, **Human Nutrition and Metabolism**, v.132, p. 3663-3667, 2002.

MATSUO, T.; ITOO, S. A model experiment for deastringency of persimmon fruit with high carbon dioxide treatment: *in vitro* gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. **Agricultural Biology Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 683-689, 1982.

MATSUO, T.; SHINOHARA, J.; ITOO, S. An improvement on removing astringency in persimmon fruits by carbon dioxide gas. **Agric. Biol. Chem.**, v. 40, p. 215, 1976.

MATSUO, T.; ITOO, S.; BEN-AIRE, R. A model experiment for elucidating the mechanism of astringency removal in persimmon fruit using respiration inhibitors. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, v. 60, n. 2, p. 437-442, 1991.

MEHANSHO, H.; BUTLER, L.G.; CARLSON, D.M. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 7, p. 423-440, 1987.

MCMURROUGH, I.; MCDOWELL, J. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. **Anal Biochem**, v.91, p.92-100, 1978.

MOINI, H.; GUO, Q.O.; PACKER, L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.132, 1825, 2002.

MULLEN, W.; YOKOTA, T.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. **Phytochem.**, Oxford, v. 64, p. 617-624, 2003.

MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M.E.J.; MACLEAN, M.R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; YOKOTA, T.; CROZIER, A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 5191-5196, 2002.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v.51, p. 3309-3312, 2003.

OSHIDA, M. et al. On the nature of coagulated tannins in astringent-type persimmon fruit after an artificial treatment of astringency removal. **Postharvest Biology and Technology**, v.8, p.317-327, 1996.

PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107 (4), p. 1629-1635, 2008.

PESIS, E.; MATTHEWS, H.R. Deastringency of persimmon fruits by creating a modified atmosphere in polyethylene bags. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 1014-1017, 1986.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PORTER, L.J. Tannins. **Methods in plant biochemistry**, v.1, 389-419, 1989

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, **Phytochemistry**, v.25. 223-230, 1986.

PRIOR, R. L.; FAN, E.; JI, H.; HOWELL, A.; NIO, C.; PAYNE, M. J.; REED, J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1473–1478, 2010.

PRIYADARSINI, K.I.; KHOPDE, S.M.; KUMAR, S.S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **J. Agric. Food. Chem.**, Columbus, v. 50, p. 2200-2206, 2002.

REED, J.D. Nutrition toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes, **Journal of Animal Science**, v.73, 1516-1528, 1995.

RENARD, C. M. G. C.; DUPONT, N.; GUILLERMIN, P. Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. **Phytochemistry**, v.68, p.1128-1138, 2007

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, n.1, p.71-110, 1993.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, Oxford, v. 66, p. 401-436, 1999.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PÉREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. 'Rojo Brillhante'. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p. 181-188, 2007.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SARNI-MACHADO, P.; DELERIS, A.; AVALLONE, S.; CHEYNIER, V., MOUTOUNET, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agente in enology. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 81-86, 1999.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCALBERT, J.P.E. Antimicrobial properties of tannins, **Phytochemistry**, v.30, 3875-3883, 1991.

SCHEWE, T.; SADIK, C.; KLOTZ, L.O.; YOSHIMOTO, T.; KÜHN, H.; SIES, H. **Biology Chemistry**, v.382, 1687, 2001

SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. **Journal of Nutrition**, v.132, 1825, 2002.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SHIMIZU, M.K.; CONEGLIAN, R.C.C.; BUSQUET, R.N.; CASTRICINI, A. Evaluation of different alcohol concentrations in destanization and in some postharvest parameters of persimmon fruits. **Agronomia**, v. 36, n. ½, p. 11-16, 2002.

SHINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and onther oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, 299, p.152-178, 1999.

SMULIKOWSKA, S.; PASTUSZEWSKA, B.; SWIECH, E.; OCHTABINSKA, A.; MIECZKOWSKA, A.; NGUYEN, V.C.; BURACZEWSKA, L. Tannin content affects negatively nutrition value of pea for monogastrics, **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.10, 511-523, 2001

SRINIVASAN, P.; VADHANAM, M.V.; ARIF, J.M.; GUPTA, R.C. A rapid screening assay for antioxidante potential of natural and synthetic agents *in vitro*. **Int. J. Onc.**, v. 20, p. 983-986, 2002.

SUDHEER, K. P.; INDIRA, V. Maturity and harvesting of fruits and vegetables. In: PETER, K. V. **Post harvest technology of horticultural crops**. New Delhi: New India Publishing Agency, p. 31-46, 2007.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amilase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 149-153, 2006.

TAIRA, S.; ONO, M.; MATSUMOTO, N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 265-271, 1997.

TAMILMANI, C. Phenolic Degradation during the Ripening of Bitter gourd Fruit (*Momordica charantia* L). **Biosci. Biotech. Res. Asia**. V. 3, n. 2, p. 411-413, 2005.

TANKSLEY S.S. The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. **The Plant Cell**. V. 16, p. 181-189, 2004.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sc. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1024-1032, 2000.

TOMAS-BARBERAN, F.A., GIL, M.I., CREMIN, P., WATERHOUSE, A.L., HESS – PIERCE, B., AND KADER, A.A. HPLC – DAD – ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. **J. Agri. Fd. Chem**, v. 49, n. 10, p. 4748 – 4760, 2001.

VALLILO, M.I.; GARBELOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L.C.A. Physical and chemical characteristics of cambucizeiro's fruit (*Campomanesia phae*). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal – SP, v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.

VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G.A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, 8071-8076, 2006.

VIVIANI, L.; LEAL, P. M. Qualidade pós-colheita de banana prata após armazenada sob diferentes condições. Ver. **Bras. Frutic**, v.29, n.3, p.465-470, 2007.

WANG, S. Y.; CHEN, C.; WANG, C.Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. **Food Chemistry**, v.112, p. 676-684, 2009.

WANNMACHER, L. Uso racional de medicamentos – **Antidiabéticos orais: comparação entre diferentes intervenções**. Disponível em: [HTTP://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_URM_ADO_1005.pdf/](http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_URM_ADO_1005.pdf/) Acesso em 10 de dezembro de 2012.

WATKINS, C. B. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: KNEE, M. Fruit quality and its biological basis. Boca Raton: CRC Press, p. 180-224, 2002.

WILLS, R.H.H.; LEE, T.H.; GRAHAM, D.; MCGLASSON, W.B.; HALL, E.G. Postharvest – an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. Kensington: New South Wales University Press, p. 161, 1981.

WOLLGAST, J., ANKLAM, E.. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, 33, 423-447, 2000.

YAMAMOTO, M.; YAMATO, E.; SHU-ICHI, T.; TASHIRO, F.; IKEGAMI, H.; YODOL, J.; MIYAZAKI, J. Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic β cells prevents progression of type 2 Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n. 1, p. 43-50,2008.

7. ANEXOS OBRIGATÓRIOS

Maria Cecília Rocha Sanches

- **Endereço para acessar este CV:**<http://lattes.cnpq.br/2637086777998360>
- **Última atualização do currículo em 10/04/2013**

Resumo informado pelo autor

Formada em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná. Experiência na área de Farmácia, com ênfase em Química de Produtos Naturais, Controle de Qualidade e Garantia da Qualidade. Mestranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Maria Cecília Rocha Sanches
Filiação	Edison Sanches Filho e Maria do Rocio Rocha Sanches
Nascimento	29/12/1984 - Guarapuava/PR - Brasil
Carteira de Identidade	68130778 SESP - PR - 02/04/2002
CPF	048.891.539-26
Endereço residencial	Rua Emílio Trevisan, 550 apto 163 - A Bom Jardim - Sao Jose do Rio Preto 15084-067, SP - Brasil Telefone: 11 999190618
Endereço eletrônico	E-mail para contato : cissasanches@gmail.com e-mail alternativo : ceciliasanches@usp.br

Formação acadêmica/titulação

- 2010** Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeito da destanização do fruto cambuci (*Campomanesia phaea*) sobre o potencial funcional in vitro
- Orientador: Maria Inés Genovese Rodriguez
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2012** Especialização em Alimentos Funcionais, Fitoterapia e Suplementação.
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São Jose Do Rio Preto, Brasil
- 2008 - 2010** Especialização em Marketing Farmacêutico.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, São Paulo, Brasil

Título: Avanços tecnológicos: o papel da televisão e internet no comportamento do paciente e no consumo de medicamentos.
Orientador: Samantha Mazzero

2003 - 2007 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Paraná - UFPR

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitora , Carga horária: 12, Regime: Parcial

2005 - 2006 Vínculo: estagiário , Enquadramento funcional: estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2003 - 2005 Vínculo: estagio voluntário , Enquadramento funcional: estagiário , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

03/2006 - 12/2006 Estágio, Setor de Ciência da Saúde/ Departamento de Farmácia

Estágio:
Desenvolvimento de novas aulas práticas para a disciplina de farmacognosia I e II

08/2003 - 08/2005 Estágio, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

Estágio:
Trabalho com Rhizobium sp.

2. Farmácia de Manipulação Cravo Canela - CRAVO&CANELA

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 23, Regime: Parcial

3. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

4. Laclede do Brasil - LACLEDE

Vínculo institucional

2009 - 2011 Vínculo: Funcionário , Enquadramento funcional: Responsável Técnica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

5. Instituto Butantan - IBU

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Pesquisador Voluntário , Enquadramento funcional: Voluntário , Carga horária: 20,

Regime: Parcial

6. Laboratório Homeopático Almeida Prado - ND

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Funcionário , Enquadramento funcional: Supervisora de Validação , Carga horária: 42, Regime: Dedicção exclusiva

7. Laboratório Elofar - ELOFAR

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Funcionária , Enquadramento funcional: Farmacêutica da Garantia da Qualidade , Carga horária: 42, Regime: Dedicção exclusiva

2007 - 2007 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Analista do Controle de Qualidade , Carga horária: 42, Regime: Integral

8. Lidifarma Farmácia Homeopática - LIDIFARMA

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Manipulação de medicamentos homeopáticos , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Química de Produtos Naturais
2. Farmacognosia
3. Genética de Microorganismos
4. Fisiologia

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2010 - 2010** Estudo dos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante in vitro da *Campomanesia phaea*
- Descrição: Projeto não remunerado devido ao vínculo empregatício da aluna com outra empresa
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Maria Cecília Rocha Sanches Maria Inés Genovese (Responsável)
- 2010 - 2012** Efeito da destanização do fruto cambuci (*Campomanesai phaea*) sobre o potencial funcional
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Maria Cecília Rocha Sanches (Responsável);
- 2009 - 2010** ESTUDO DAS VIAS DE INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CULTURA DE CÉLULAS HIPOCAMPAS DE RATOS TRATADAS COM NEUROTOXINAS PLA2 ISOLADAS DO VENENO DA SERPENTE MICRURUS LEMNISCATUS
- Descrição: Estágio não remunerado devido ao vínculo empregatício da aluna com outra empresa.
Situação: Desativado Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Maria Cecília Rocha Sanches Maria Regina Lopes Sandoval (Responsável)

2005 - 2006 Estudo dos constituintes ativos de *Passiflora actinia*, Passifloraceae

Descrição: Estudo químico e farmacológico biomonitorado dos constituintes ativos de *Passiflora actinia*, Passifloraceae

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Maria Cecília Rocha Sanches Cid Aimbiré de Moraes Santos; Larissa de Biaggi Villas Bôas (Responsável); Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. SANCHES, M. C. R., SILVA, R. R., GENOVESE, M. I.
Effect of astringency removal of cambuci (*Campomanesia phaea*) in proanthocyanidins and elagic acid content., 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
2. ★ SANCHES, M. C. R., SILVA, R. R., GENOVESE, M. I.
Effect of astringency removal in phenolic contents and in vitro antioxidante capacity of cambuci fruits (*Campomanesia phaea*), 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
3. ★ SANCHES, M. C. R., SILVA, R. R., GENOVESE, M. I.
Effect of astringency removal in tannin content of cambuci fruits (*Campomanesia phae*), 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
4. ★ BALISTEIRO, D. M., SANCHES, M. C. R., GENOVESE, M. I.
Potencial of cambuci (*Campomanesia phaea*) juice in diabetes control, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
5. BÔAS, Larissa de Biaggi Villas, SANCHES, M. C. R., SANTOS, Cid Aimbiré de Moraes, OLIVEIRA, Rúbia Maria Monteiro Weffort de
Estudo cromatográfico da fração n-butanol das folhas do extrato hidroalcoólico de *Passiflora actinia* Hooker, 2006. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2012. (Congresso)
Antioxidantes e fenólicos do cambuci (*Campomanesia phae*) provenientes de diferentes regiões..
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos & III Conferência do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012. (Simpósio)
Effect of astringency removal of cambuci (*Campomanesia phaea*) in proanthocyanidins and elagic acid content..
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2011. (Simpósio)
Effect of astringency removal in phenolic contents and in vitro antioxidante capacity of cambuci fruits (*Campomanesia phae*).
4. Apresentação Oral no(a) XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2011.

(Simpósio)

Effect of astringency removal in tannin content of cambuci fruits (Campomanesia phaea).

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Simpósio)
Pontential of cambuci (Campomanesia phaea) in diabetes control.
6. **Atuação do Farmacêutico em Assuntos Regulatórios**, 2009. (Outra)
.
7. **Metrologia e Confiabilidade Metrológica**, 2008. (Outra)
.
8. **II Seminário Estadual da Indústria Farmacêutica**, 2007. (Seminário)
.
9. **Técnicas de Análise**, 2007. (Outra)
.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Semana Acadêmica de Farmácia**, 2006. (Seminário)
VILLAS-BÔAS, L. B. ; SANCHES, M. C. R. ; OLIVEIRA, R. M. M. W. ; SANTOS, Cid Aimbiré de Moraes . Estudo cromatográfico da fração n-butanol das folhas do extrato hidroalcoólico de Passiflora actinia Hooker..
11. **Semana Acadêmica de Farmácia**, 2005. (Seminário)
.
12. **Semana Acadêmica de Farmácia**, 2004. (Seminário)
.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Apresentações de trabalhos (Seminário)	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	4

Eventos

Participações em eventos (congresso)	1
Participações em eventos (seminário)	4
Participações em eventos (simpósio)	4
Participações em eventos (outra)	3

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7346645/1 - Maria Cecilia Rocha Sanches

Email: ceciliasanches@usp.br
Data de Nascimento: 29/02/1984
Cédula de Identidade: RG - 6.813.077-8 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2007

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 29/11/2010
Início da Contagem de Prazo: 29/11/2010
Data Limite: 29/05/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Ines Genovese Rodriguez - 29/11/2010 até o presente. E.Mail: genovese@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 29/11/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/02/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 29/11/2010
Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 12/04/13 11:42:20

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 29/11/2010
Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013
Impresso em: 12/04/13 11:17:25

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7346645/1 - Maria Cecilia Rocha Sanches

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5899-2/1	Biodisponibilidade de nutrientes e de substâncias bioativas em alimentos e dietas	14/03/2011	24/04/2011	90	6	92	A	N	Concluída
FBA5702-4/1	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde	15/03/2011	18/04/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5870-6/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	05/04/2011	13/06/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5900-1/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	08/08/2011	14/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5764-3/2	Biossíntese de Metabólitos Secundários Vegetais	17/08/2011	28/09/2011	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BIB5706-5/1	Prospecção de Fármacos de Origem Vegetal (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	22/11/2011	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5706-2/1	Planejamento experimental para otimização de produtos e processos em alimentos	29/02/2012	12/06/2012	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5102-2/7	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2012	23/04/2012	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013
Impresso em: 12/04/13 11:17:25

8. APÊNDICES

Figura A-1. Perfil cromatográfico da análise de ácido ascórbico total (após redução com DTT) por CLAE-DAD a 245 nm de cambuci de diferentes regiões. A – padrão de ácido ascórbico, B – cambuci de Rio Grande da Serra, C – cambuci de Mogi das Cruzes, D – cambuci de Paraibuna e E- cambuci de Paranapiacaba.

Figura A-2. Perfil cromatográfico dos flavonoides de frutos colhidos em Rio Grande da Serra detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,623), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,990), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,161), **4** – rutina (TR – 11,445) e **5** – ácido elágico (TR – 11,999). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-3. Perfil cromatográfico dos flavonoides de frutos colhidos em Mogi de Cruzes detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,640), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,008), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,200), **4** – rutina (TR – 11,479), **5** – ácido elágico (TR – 12,040) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,897). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-4. Perfil cromatográfico dos flavonoides de frutos colhidos em Paraibuna detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,620), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,973), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,167), **4** – rutina (TR – 11,470), **5** – ácido elágico (TR – 12,033) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,841). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-5. Perfil cromatográfico dos flavonoides de frutos colhidos em Paranapiacaba detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,713), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,115), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,261), **4** – rutina (TR – 11,535), **5** – ácido elágico (TR – 12,065) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,981). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-6. Perfil cromatográfico de ácido elágico total de frutos colhidos em Rio Grande da Serra, (TR – 10,467), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-7. Perfil cromatográfico de ácido elágico total de frutos colhidos em Mogi das Cruzes, (TR – 10,486), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-8. Perfil cromatográfico de ácido elágico total de frutos colhidos em Paraibuna, (TR – 10,501), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-9. Perfil cromatográfico de ácido elágico total de frutos colhidos em Paranapiacaba, (TR – 10,396), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-10. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 1, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,542), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,969), **3** – rutina (TR – 11,336), **4** – ácido elágico (TR – 11,643), **5** – derivado de quercetina (TR – 12,070) e **6** - derivado de caempferol (TR – 19,267). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-11. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 2, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,558), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,964), **3** – rutina (TR – 11,319), **4** – ácido elágico (TR – 11,841), **5** – derivado de quercetina (TR – 12,057) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,774). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-12. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 3, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,575), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,014), **3** – rutina (TR – 11,350), **4** – ácido elágico (TR – 11,856), **5** – derivado de quercetina (TR – 12,070) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,744). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-13. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 4, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,627), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,933), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,033), **4** – rutina (TR – 11,314) e **5** – ácido elágico (TR – 11,826). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-14. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 5, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,644), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,954), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,054), **4** – rutina (TR – 11,333), **5** – ácido elágico (TR – 11,838) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,849). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-15. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos frutos no estágio de maturação 6, colhidos em Mogi das Cruzes, detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,637), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,978), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,071), **4** – rutina (TR – 11,348), **5** – ácido elágico (TR – 11,855) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,760). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-16. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,244) de frutos no estágio de maturação 1, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-17. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,263) de frutos no estágio de maturação 2, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-18. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,325) de frutos no estágio de maturação 3, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-19. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,236) de frutos no estágio de maturação 4, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-20. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,309) de frutos no estágio de maturação 5, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-21. Perfil cromatográfico de ácido elágico total (TR – 10,391) de frutos no estágio de maturação 6, colhidos em Mogi das Cruzes, detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-22. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos do grupo controle, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,682), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,106), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,129), **4** – rutina (TR – 11,411), **5** – ácido elágico (TR – 11,871) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,849). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-23. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanzados em câmara de etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,681), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,067), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,129), **4** – rutina (TR – 11,395), **5** – ácido elágico (TR – 11,876) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,842). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-24. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanzados por imersão em etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,656), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,029), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,083), **4** – rutina (TR – 11,358), **5** – ácido elágico (TR – 11,834) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,815). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-25. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos do grupo controle, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,658), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,987), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,092), **4** – rutina (TR – 11,370), **5** – ácido elágico (TR – 11,863) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,792). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-26. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanizados em câmara de etanol, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,579), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,038), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,114), **4** – rutina (TR – 11,392), **5** – ácido elágico (TR – 11,880) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,829). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-27. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanzados por imersão em etanol, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,579), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,038), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,114), **4** – rutina (TR – 11,392), **5** – ácido elágico (TR – 11,880) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,829). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-28. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos do grupo controle, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,638), **2** - epigallocatequina galato (TR – 7,995), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,086), **4** – rutina (TR – 11,359), **5** – ácido elágico (TR – 11,858) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,801). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-29. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanizados com 100 μ L de etanol no cálice, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,617), **2** – epigallocatequina galato (TR – 8,030), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,243), **4** – rutina (TR – 11,403), **5** – ácido elágico (TR – 11,899) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,822). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-30. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanizados em câmara de etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,685), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,083), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,162), **4** – rutina (TR – 11,437), **5** – ácido elágico (TR – 11,926) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,866). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-31. Perfil cromatográfico de flavonoides dos frutos destanizados por imersão em etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), detectados a 245 nm. **1** – ácido Siringico (TR – 4,685), **2** - epigallocatequina galato (TR – 8,083), **3** – derivado de quercetina (TR – 11,162), **4** – rutina (TR – 11,437), **5** – ácido elágico (TR – 11,926) e **6** - derivado de caempferol (TR – 21,866). Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-32. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos do grupo controle, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), (TR – 10,340), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-33. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados em câmara de etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), (TR– 10,281), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-34. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados por imersão em etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 23/03/2011 (teste 1), (TR – 10,329), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-35. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos do grupo controle, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), (TR – 10,396), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-36. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados em câmara de etanol, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), (TR -10,367), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-37. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados por imersão em etanol, colhidos em Paranapiacaba, no estágio 6 de maturação em 24/04/2011 (teste 2), (TR – 10,379), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-38. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos do grupo controle, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), (TR – 10,369), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-39. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados com 100 μ L de etanol no cálice, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), (TR – 10,29), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-40. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados em câmara de etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), (TR – 10,349), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura A-41. Perfil cromatográfico de ácido elágico total dos frutos destanizados por imersão em etanol, colhidos em Mogi das Cruzes, no estágio 4 de maturação em 04/05/2012 (teste 4), (TR – 10,385), detectado a 245 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.