

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ELAINE CHAMORRO REIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DOS FRUTOS DE *Eugenia moraviana* E *Eugenia blastantha***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA

2016

ELAINE CHAMORRO REIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DOS
FRUTOS DE *Eugenia moraviana* E *Eugenia blastantha***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC 2 do curso de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para avaliação parcial.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Laverde Júnior

LONDRINA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DOS FRUTOS DE *Eugenia moraviana* E *Eugenia blastantha*

por

ELAINE CHAMORRO REIS

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 02 de dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Antonio Laverde Junior
Professor Orientador

Profª. Dra. Isabel Craveiro Moreira Andrei
Membro titular

Prof. Dr. Fábio Vandresen
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso –

RESUMO

REIS, Elaine C. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos frutos de *Eugenia moraviana* E *Eugenia blastantha*. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

A família Myrtaceae considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em virtude da vasta ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional. Entre elas *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha*., conhecidas no Brasil como guamirim ou cereja preta e grumixama-mirim ou pitanga roxa da mata, são de grande interesse, especialmente devido a crescente busca por substâncias antioxidantes provenientes de fontes naturais. Os extratos etanólicos dos frutos dessas espécies nativas foram avaliados no presente trabalho quanto às propriedades antioxidantes. A concentração em equivalente trolox por grama dos extratos das referidas espécies foi determinada usando ensaios de capacidade de eliminação de radicais DPPH e ABTS, ensaio de capacidade de absorvância de radical de oxigênio (ORAC) e ensaio de potencial antioxidante reduzido férrico (FRAP). O teor fenólico total também foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Ambas as espécies apresentaram expressiva atividade antioxidantes em todos os ensaios realizados, o que as caracteriza como possíveis fontes de antioxidantes. O extrato dos frutos de *E. blastantha* mostraram maior teor de compostos fenólicos ($213,28 \pm 4,55$), maior atividade antioxidante nos ensaios DPPH ($1789,82 \pm 139,22$) e FRAP ($2023,46 \pm 34,12$), além de demonstrar atividade superior a de outras espécies do mesmo gênero e espécies comumente consumidas. O extrato dos frutos da espécie *E. moraviana* mostrou maior capacidade antioxidante apenas pelos métodos ORAC ($2120,05 \pm 50,80$) e ABTS ($68,18 \pm 2,68$). Os resultados sugerem que os frutos de *E. moraviana* e *E. blastantha* sejam considerados uma fonte de metabólitos bioativos, podendo ser sugerido em terapias de doenças relacionadas com a presença de radicais livres. Esta atividade está sendo relatada pela primeira vez para ambas espécies. Os resultados encontrados estimulam a realização de estudos adicionais para identificação dos compostos bioativos.

Palavras-chaves: Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Guamirim/ Cereja preta. Grumixama-mirim/ Pitanga roxa da mata. Myrtaceae.

ABSTRACT

REIS, Elaine C. Evaluation of the antioxidant activity of the ethanolic extracts of the fruits of *Eugenia moraviana* and *Eugenia blastantha*. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

The Myrtaceae family is considered one of the most important families of the Brazilian flora due to the vast occurrence of edible species and / or used in traditional medicine. Among them *Eugenia Moraviana* and *Eugenia Blastantha*, known in Brazil as guamirim or black cherry and grumixamirim or purple cherry woodland, are of great interest, especially due to the growing search for antioxidant substances from natural sources. The ethanolic extracts of the fruits of these native species were evaluated in the present work on the antioxidant properties. The concentration in trolox equivalent per gram of the extracts of said species was determined using DPPH and ABTS radical scavenging capacity assays, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reduced antioxidant potency (FRAP) assays. The total phenolic content was also determined by the Folin-Ciocalteu method. Both species presented expressive antioxidant activity in all the tests carried out, what characterizes them as possible sources of antioxidants. The extract of the fruits of *E. blastantha* showed a higher content of phenolic compounds (213.28 ± 4.55), higher antioxidant activity in the DPPH (1789.82 ± 139.22) and FRAP (2023.46 ± 34.12), besides showing superior activity than other species of the same genus and commonly consumed species. Fruit extracts of *E. moraviana* showed higher antioxidant capacity only by ORAC (2120.05 ± 50.80) and ABTS (68.18 ± 2.68). The results suggest that the fruits of *E. moraviana* and *E. blastantha* are considered a source of bioactive metabolites, and may be suggested in therapies of diseases related to the presence of free radicals. This activity is being reported for the first time for both species. The results found stimulate further studies to identify bioactive compounds.

Keywords: Antioxidant activity. Phenolic compounds. Guamirim / Black cherry. Grumixamirim / Purple cherry cherry. Myrtaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química das principais classes de flavonoides.....	16
Figura 2- Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos.....	17
Figura 3- Estrutura do radical livre estável DPPH.....	20
Figura 4- Reação entre o radical DPPH e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	20
Figura 5- Interação por ligação de hidrogênio do metanol com o radical DPPH e o aumento da localização do elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio (N•) do radical DPPH	22
Figura 6 - a) Estrutura do trolox; b) Estrutura do tocoferol (vitamina E).....	24
Figura 7- Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a ferroso $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, pela ação do antioxidante.....	25
Figura 8- Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante	27
Figura 9- Estrutura química da fluoresceína.....	28
Figura 10- Estrutura química do 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH)	29
Figura 11- Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH)	29
Figura 12- Representação da atuação dos antioxidantes no ataque dos radicais peroxila à fluoresceína.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	RADICAIS LIVRES.....	13
3.1.1	Classificação e Mecanismo de Ação.....	13
3.2	COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES	14
3.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
3.3.1.	MÉTODO DE DPPH.....	19
3.3.1.1.	Interpretação dos Resultados.....	23
3.3.2.	MÉTODO FRAP	24
3.3.2.1.	Interpretação dos Resultados.....	25
3.3.3.	MÉTODO DO RADICAL ABTS ⁺	26
3.3.3.1.	Interpretação dos Resultados.....	27
3.3.4.	MÉTODO ORAC	28
3.3.4.1.	Interpretação dos Resultados.....	30
3.4	ENSAIO COM REAGENTE FOLIN-CIOCALTEU	31
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GÊNERO <i>EUGENIA</i>	32
4.	METODOLOGIA	37
4.1.	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES DE <i>EUGENIA</i>	38
4.2.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE DPPH	38
4.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE FRAP.....	38
4.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE ABTS	38

4.5.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELO ENSAIO ORAC	
	37	
4.6.	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que presentes em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato, ou seja, que são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Nos seres vivos a produção de radicais livres é controlada por diversos compostos antioxidantes. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podendo ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007, p. 351). A formação de radicais livres decorrente do metabolismo celular se intensifica pela exposição a fatores exógenos (radiações gama e ultravioleta, medicamentos, má alimentação, cigarro, entre outros). A produção de grande quantidade desses radicais é responsável por danos oxidantes nos tecidos e células. Esses danos têm sido relacionados à causa de várias doenças, incluindo doenças degenerativas e do envelhecimento, como artrite, aterosclerose, cardiopatia, diabetes, enfisema, disfunção cerebral, esclerose múltipla, envelhecimento, câncer, catarata, inflamações crônicas, doenças do sistema imune. Além disso, os radicais livres também causam danos no DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas, danos que desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (BIANCHI; ANTUNES, 1999, p. 124). Como estratégia para combate aos radicais livres, e considerando a crescente popularidade no mercado mundial do uso de métodos oriundos de fontes naturais para o tratamento e prevenção de doenças (BOROSKI *et al.*, 2015), diversas fontes ricas em compostos antioxidantes vêm sendo estudadas, como frutas, legumes, cereais, sementes e castanhas (OROIAN; ESCRICHE, 2015 *apud* NICÁCIO, 2016). Dentre estas fontes, as frutas são destaque, não só por serem constituídas também por altas quantidades de água, fibras, vitaminas e minerais, mas também devido à variedade de opções para consumo (tanto *in natura*, quanto na fabricação de bebidas, licores, sorvetes, entre outras. (VAUZOUR *et al.*, 2010 *apud* NICÁCIO, 2016).

Diversos autores relatam o potencial de frutas nativas brasileiras como fontes de compostos antioxidantes (GONÇALVES, 2008; CASTRO, 2012; ROESLER *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2011; COUTINHO; PASCOLATTI, 2014, entre outros). Por vezes estas frutas são conhecidas e consumidas pela população local, em alguns casos empregadas até na medicina popular, sem que se tenham realizado estudos acerca das propriedades dessas frutas. Esse tipo de

estudo pode conferir desenvolvimento social, econômico e ambiental por meio da valorização das frutas nativas das diversas regiões do país.

Considerando a posição do Brasil como gestor da maior biodiversidade do planeta, é primordial o estudo de espécies nacionais e sua preservação indispensável para exploração consciente desses recursos (BRASIL, 2016). A família Myrtaceae, uma das maiores famílias em ocorrência na flora brasileira, apresenta um grande número de espécies importantes em muitos biomas brasileiros. Muitas mirtáceas são conhecidas por suas utilidades, tais como: extração de madeira (*Eucalyptus spp.*), alimentar (goiaba - *Psidium guajava*; jaboticaba - *Myrciaria cauliflora*; pitanga - *Eugenia uniflora*; jambo - *Syzygium jambos*; guabiroba - *Campomanesia xanthocarpa*; etc.) e ornamental (escova-de-garrafa - *Calistemon* e eugênia - *Eugenia sprengelii*) Do ponto de vista químico, os estudos em mirtáceas revelaram, especialmente, a presença de óleos essenciais, taninos, flavonóides e terpenóides. Embora muitos compostos tenham sido isolados e identificados em algumas espécies de mirtáceas, ainda são poucos os estudos que relacionam tais compostos aos efeitos biológicos indicados por algumas espécies (SILVEIRA, 2010).

Tendo em vista o potencial químico, farmacológico e econômico dessas espécies, seu estudo adquire grande importância, pois elas apresentam valor intrínseco à riqueza da flora brasileira e por meio dele pode-se propiciar a preservação e valorização das espécies nativas (QUEIROZ *et al.*, 2015). O estudo de propriedades biológicas, em particular a atividade antioxidante, pode contribuir para ampliação de fontes de antioxidantes naturais regionais, aumentando as opções de acesso para consumo da população.

Duas espécies regionais do gênero *Eugenia* foram selecionadas para o presente estudo: *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha*. Ambas não apresentam até o momento relatos na literatura relacionados ao estudo de propriedades antioxidantes.

A espécie *E. moraviana*, conhecida como guamirim ou cereja preta, pode ser encontrada na região de planície alagável do Alto Rio Paraná, nos Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná. Além disso, distribui-se no sul do Brasil, Bolívia, Paraguai até o norte da Argentina. Trata-se de uma espécie exclusiva de matas ripárias, sendo muito frequente na região chaqueana do Paraguai e da Argentina. Seus frutos são globosos, 5-8 mm de diâmetro, vermelho-escuros a pretos

quando maduros, são consumidos *in natura* e muito apreciados. Os frutos sem sementes são ótimos para se fazer bolo e também servem para fazer sucos, sorvetes e geleias. Frutifica nos meses de março a maio (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Apel *et al.* (2011) em seu estudo do óleo essencial das folhas desta espécie encontrou como principais constituintes o β -Caryophyllene (14,5%), além de β -elemene (11,8%) e biciclogermacrene (5,1%). Lunardi *et al.* (2001), por sua vez, isolou os triterpenos ácido 6α -hidroxibetulínico, ácido platânico, ácido betulínico e β -sitosterol a partir de extratos das folhas e caules da planta.

A espécie *Eugenia blastantha* é conhecida popularmente como grumixama-mirim (do tupi-guarani que significa fruta da árvore que se descasca e o termo mirim descreve o tamanho pequeno) e também chamada de pitanga roxa da mata. Tem origem nativa nos sub-bosques das florestas semidecíduas (que perdem as folhas) de altitude, de Minas Gerais até Santa Catarina. Frutifica nos meses de outubro a novembro e seus frutos são consumidos *in natura*, na forma de sucos, sorvetes e geleias (COLECIONANDO FRUTAS, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos frutos das espécies *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Obter os extratos etanólicos a partir dos frutos das espécies *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha*;
- Avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos etanólicos das espécies *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha* pelos métodos: DPPH, FRAP ABTS e ORAC;
- Determinar a capacidade antioxidante, utilizando o trolox como padrão de comparação (μmol equivalente de trolox. g^{-1} amostra).
- Quantificar compostos fenólicos dos extratos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu;
- Determinar com base nas análises gerais o melhor potencial de ação antioxidante entre essas duas espécies.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 RADICAIS LIVRES

Radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente. Essa configuração os torna, na maioria dos casos, altamente instáveis e com tempo de meia-vida muito curto (BIANCHI; ANTUNES, 1999, p. 123). Antioxidantes, por sua vez, são classificados como substâncias que presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação (incorporação de oxigênio a uma estrutura, no caso do substrato) (SOUSA *et al.*, 2007, p. 351).

O chamado estresse oxidativo é o desequilíbrio entre moléculas oxidantes (os radicais livres) e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999, p. 123).

3.1.1 Classificação e Mecanismo de Ação

Os antioxidantes podem ser classificados em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos.

Os antioxidantes primários são compostos que causam a remoção ou inativação dos radicais livres por meio da transferência de um átomo de hidrogênio. A reação ocorre conforme a seguinte equação:



Onde: $ROO\cdot$ e $R\cdot$ são radicais livres; AH é o antioxidante com um átomo de hidrogênio prótico e $A\cdot$ é o radical inerente.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante reage com maior facilidade com os radicais livres formando espécies inativas e um radical inerte ($A\cdot$), advindo do antioxidante e incapaz de propagar reações oxidativas. Os principais representantes desse grupo são os compostos fenólicos, como butil-hidróxi-anisol (BHA), butil-hidróxi-tolueno (BHT), *terc*-butil- hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) que são sintéticos, e os tocoferóis que são naturais (FINLAYS TEA SOLUTIONS, 2009, p. 17).

Já os antioxidantes sinérgicos, apesar da baixa capacidade antioxidante, podem aumentar o efeito dos antioxidantes primários, modificando inclusive seu mecanismo de atuação, quando combinados adequadamente.

Quanto aos removedores de oxigênio são compostos que atuam, conforme o próprio nome indica, tornando os oxigênios capturados indisponíveis para autooxidação. Exemplos desse grupo são: o ácido ascórbico, seus isômeros e derivados.

Os antioxidantes biológicos atuam removendo não só oxigênio, como também outros compostos muito reativos de um sistema alimentício. Os principais exemplos são enzimas como glucose oxidase e catalases. Os agentes quelantes ou sequestrantes, por sua vez, complexam íons metálicos principalmente de cobre e ferro, responsáveis pela catálise na oxidação lipídica. A complexação ocorre devido a um par de elétrons não compartilhado que esses compostos possuem em sua estrutura, exemplos: ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de EDTA.

Finalmente os antioxidantes mistos, que são provenientes de plantas e animais, amplamente estudados para uso em alimentos. Estão entre eles: proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (FINLAYS TEA SOLUTIONS, 2009, p. 18).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES

A atividade antioxidante das frutas e legumes pode ser atribuída a diversos compostos químicos, tais como os carotenóides, polifenóis, saponinas, vitaminas, entre outros (FLORA, 2009 *apud* NICÁCIO, 2016). Os estudos acerca de frutas comumente consumidas, em sua grande maioria, relatam a presença da classe dos polifenóis. Os polifenóis ou compostos fenólicos são compostos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais os quais, dependendo

da subclasse, apresentam um ou mais anéis aromáticos ligados a vários grupos hidroxila. Eles foram classificados em 4 classes principais: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (MANACH *et al.*, 2004).

De modo geral, os polifenóis, especificadamente os flavonoides (Figura 1) possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, o que os torna antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. Sua atividade antioxidante, além de estar condicionada a estrutura do composto e ao potencial de oxidação do flavonoide e das espécies a serem sequestradas, pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio ou de elétrons (interrompendo o mecanismo de oxidação), estabilidade do radical flavanoil formado (estabilizado devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias), (SOUSA *et al.*, 2007, p. 352), reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas. Em geral, quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Ainda, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, p. 122).

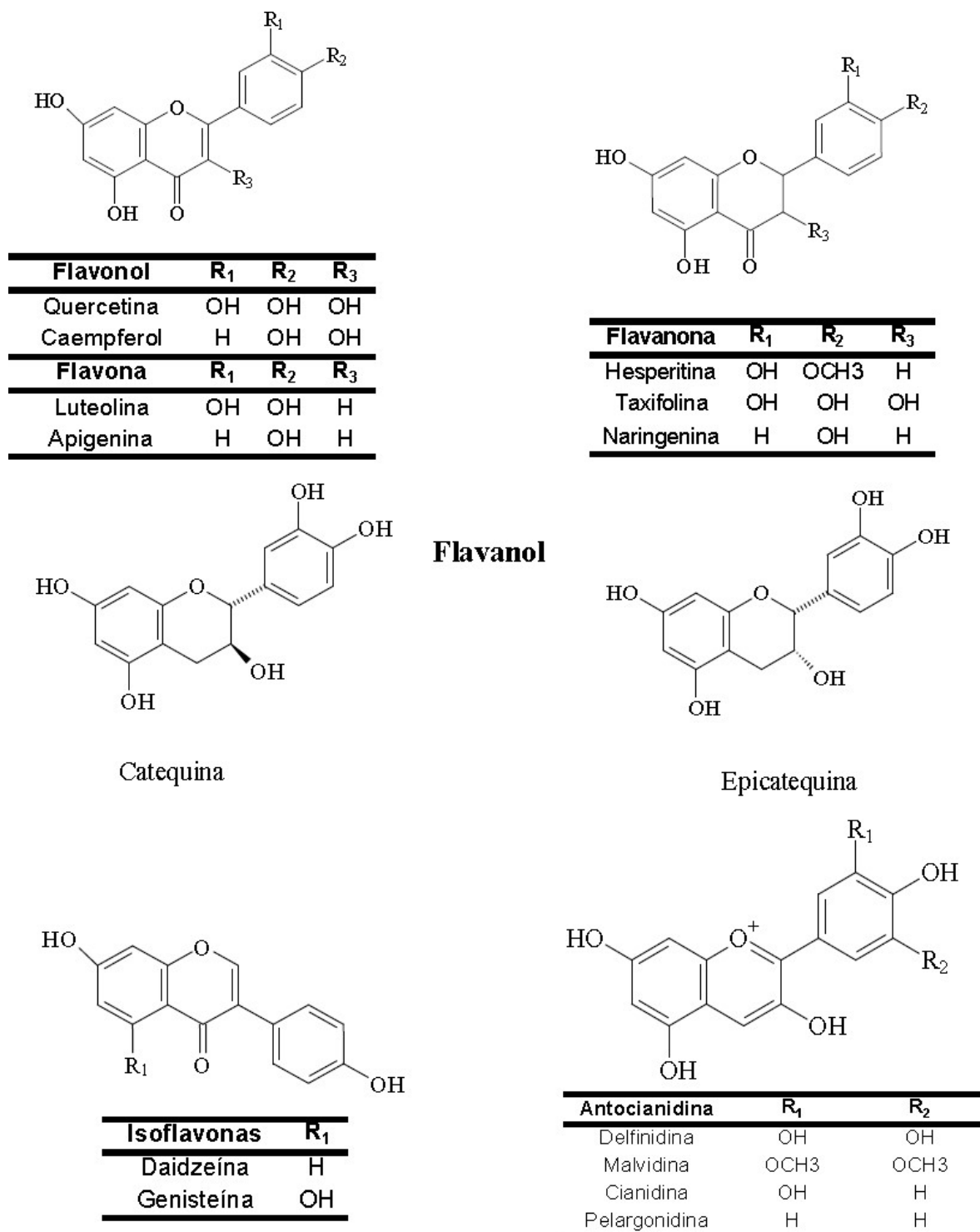


Figura 1- Estrutura química das principais classes de flavonoides
Fonte: Gonçalves (2008).

Estes compostos também são capazes de inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*, um dos motivos pelos quais têm sido muito estudados. Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados para esse fim são: o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butyl-fenona (THBP) e galato de propila (GP). (Figura 2) (SOUSA *et al.*, 2007, p. 352).

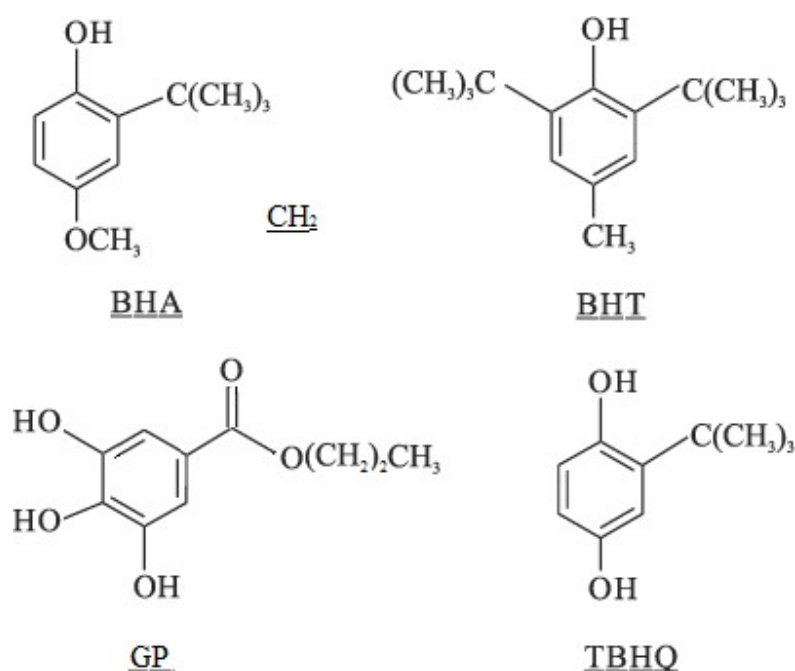


Figura 2- Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos
Fonte: Adaptado de Finlays Tea Solutions (2009, p. 18).

Nos alimentos e bebidas, os compostos fenólicos, em especial os taninos, são responsáveis pelo amargor e adstringência da maioria. Enquanto os componentes fenólicos com baixo peso molecular tendem ao sabor amargo, os polímeros com alto peso molecular são mais adstringentes (ARABBI, 2001).

Como exemplos da ação de compostos fenólicos na alimentação podem ser citados a ingestão de chá verde (onde estão presentes ésteres de ácido gálico) (ANGELLA, 2014), o consumo de vinho (onde estão presentes ácidos fenólicos, catequinas, flavonóis e antocianinas) e derivados da soja (fonte de isoflavonas, incluindo a genisteína e a daidzeína). As isoflavonas atuam potencialmente na prevenção e tratamento do câncer e osteoporose. Já as antocianidinas (flavonoides hidrossolúveis) estão entre os principais pigmentos nas frutas e flores, e sua cor é

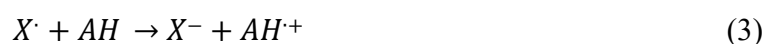
influenciada pelo pH, e complexos íon metálicos são antioxidantes *in vitro* e podem apresentar propriedade antioxidante e anti-mutagênica *in vivo* (ARABBI, 2001).

3.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em diferentes extratos e substâncias isoladas. Em diversos casos, os resultados obtidos não são comparáveis por fatores como: estrutura física do sistema; natureza do substrato para oxidação; presença de interferentes; modo de indução da oxidação; método analítico para medir a oxidação (MIGUEL, 2007, p. 113).

Os antioxidantes podem desativar radicais livres por dois mecanismos principais: transferência de um átomo de hidrogênio e/ou transferência de elétron. O mecanismo que irá prevalecer dependerá da estrutura do antioxidante, de suas propriedades, solubilidade, coeficiente de partição, sistemas de solventes, ainda da energia de dissociação da ligação e da energia de ionização. No primeiro mecanismo, o antioxidante captura o radical para o qual doa um átomo de hidrogênio, (conforme o mecanismo apresentado no item 3.1.1 para os antioxidantes primários). A reatividade relativa neste caso é determinada pela energia de dissociação da ligação do hidrogênio com o antioxidante (de aproximadamente -10 Kcal/mol e energia de ionização abaixo de -36 Kcal/mol). Trata-se de um mecanismo rápido, independente do pH e que deve ocorrer na ausência de agentes redutores, pois esses provocam aumento indiscriminado da reatividade (MIGUEL, 2007, p. 113). Alguns dos métodos que trabalham por este mecanismo são: ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) e TRAP (*total reactive antioxidant potential*) (VASCONCELOS *et al.*, 2007, p. 1329).

Em relação aos métodos baseados na transferência de um elétron, há capacidade de redução dos demais compostos e conseqüente formação de um cátion. A reatividade relativa do método se baseia na desprotonação e na energia de ionização do grupo reativo (mecanismo predominante para valores maiores que -45 Kcal/mol). Essas reações costumam ser lentas e dependentes do pH do sistema (normalmente quanto maior o pH, menor a energia de ionização).





Quando AH^+ tem uma vida elevada, ocorrem reações secundárias que podem gerar toxicidade ou mutagênese *in vivo*. Nas amostras em que ocorrem os dois mecanismos apresentados o balanço entre ambos é determinado pela estrutura do antioxidante e pH do meio (MIGUEL, 2007, p. 114). Exemplos de métodos cuja determinação analítica envolve transferência de elétrons são: FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*) e TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ABTS (VASCONCELOS *et al.*, 2007, p. 1329).

Atualmente, as técnicas mais utilizadas são os ensaios de DPPH e ABTS. Estes reagentes, que dão nome aos ensaios, correspondem aos radicais cuja absorção será atenuada pelo antioxidante e são determinantes para o custo do método espectrofotométrico. Esses métodos são relativamente simples baseando-se invariavelmente, na capacidade de “descolorante” da amostra. (BUTERA *et al.*, 2002).

A principal desvantagem dos métodos para determinação de capacidade antioxidante *in vitro* está relacionada ao fato dos radicais empregados, em sua maioria, com exceção do método ORAC que emprega o radical peroxila, não serem encontrados no organismo, ou seja, os testes não representam a condição real dos sistemas biológicos. Porém, caracterizam-se por serem rápidos, reprodutíveis e acessíveis a laboratórios de pesquisa e a indústria (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.3.1. MÉTODO DE DPPH

O ensaio intitulado DPPH é um método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (Figura 3).

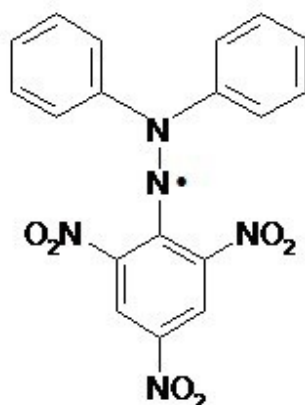
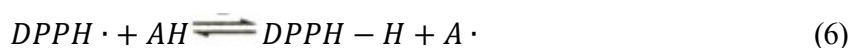


Figura 3- Estrutura do radical livre estável DPPH
Fonte: Oliveira (2015, p. 37).

O mecanismo por transferência de um átomo de H para neutralização ou redução de um radical livre na determinação da capacidade antioxidante de um composto, pode ser observado para o DPPH na Equação 6.



Estudos como de Karadag *et al.* (2009 *apud* OLIVEIRA, 2015, p. 37) defendem que dificilmente se consegue determinar qual dos mecanismos é determinante para esse método.

Enquanto outros autores como Huang e Prior (2005 *apud* OLIVEIRA, 2015, p. 37) acreditam que a transferência de um átomo de hidrogênio (Figura 4) é apenas uma reação secundária, além de ser reversível (Equação 6) (OLIVEIRA, 2015, p. 37).

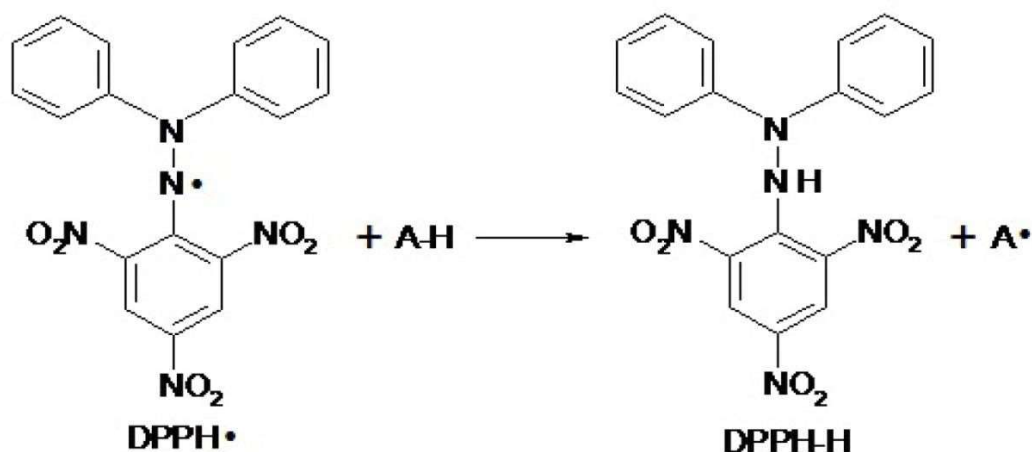


Figura 4- Reação entre o radical DPPH e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.

Fonte: Oliveira (2015, p. 37).

Os radicais livres contêm um elétron desemparelhado. A estabilidade do radical DPPH é devida à sua estrutura química, não só em virtude dos três anéis aromáticos, que apresentam efeito de ressonância, importante para estabilizar a carga eletrônica do radical, mas também pelo deslocamento do elétron desemparelhado sobre o radical nos três grupos nitro e nos dois átomos de nitrogênio, grupos que permitem o deslocamento de elétrons (OLIVEIRA, 2015, p. 38).

Por causa da localização do elétron livre ao longo da molécula de DPPH (Figura 3), o radical possui a cor púrpura ou violeta com uma banda de absorção em solução de etanol ou metanol com absorção máxima na região de 517 nm (515 a 528 nm). O método é baseado na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina (molécula estável diamagnética DPPH-H), com mudança concomitante na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010, p. 2204).

Inicialmente, os ensaios para avaliação da capacidade sequestrante de DPPH eram realizados por ressonância de elétron spin (RES), uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente proporcional à concentração do antioxidante testado e o tempo de reação. Atualmente, o método mais popular consiste na análise do decaimento da absorbância na faixa de comprimento de onda citada, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH (ALVES *et al.*, 2010, p. 2204). Esse monitoramento deve ser realizado no escuro, pois a luz é um fator que interfere na reação do radical DPPH, gerando uma substância que acelera a diminuição da absorbância e, conseqüentemente, altera os resultados finais (OLIVEIRA, 2015, p. 39). No geral o método é simples, preciso e reprodutível, ainda é aplicável à avaliação da atividade antioxidante de diversas amostras como sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras (ALVES *et al.*, 2010, p. 2204).

Estudos anteriores utilizando ácidos ascórbico e isoascórbico levaram à conclusão de que a interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, da conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, para a maior parte das substâncias, o mecanismo apresenta-se mais complexo e exige que outros estudos sejam feitos (ALVES *et al.*, 2010, p. 2204).

O método DPPH sofreu diversas mudanças ao longo dos anos, entre os vários protocolos desenvolvidos não foi estabelecido um procedimento padrão, o que dificulta a

comparação dos resultados. Esta falta de padronização leva às principais desvantagens do método: as diferentes formas de interpretação e determinação da capacidade antioxidante. Isso ocorre, pois avaliações realizadas por meio de distintas formas de medição e que empreguem diferentes solventes não podem ter seus resultados comparados. Aliás, o tipo de solvente utilizado também pode ser um inconveniente, (em meio aquoso o radical pode tornar-se um tanto inacessível ao antioxidante, e isso afeta a transferência de um elétron ou do átomo de H). O DPPH se dissolve melhor em solventes orgânicos e em meio alcoólico a transferência de um átomo de hidrogênio para o N ligado aos dois anéis aromáticos é facilitada. Assim, a carga antes deslocalizada passa a restringir-se ao N central da molécula, aumentando sua reatividade com o antioxidante (Figura 5) (OLIVEIRA, 2015, p. 39-40).

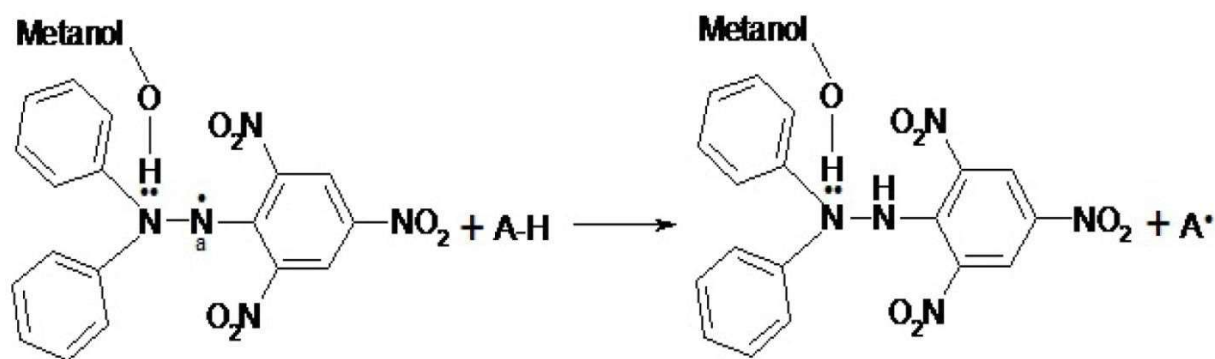


Figura 5- Interação por ligação de hidrogênio do metanol com o radical DPPH e o aumento da localização do elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio (N•) do radical DPPH
Fonte: Oliveira (2015, p. 40).

Com relação à influência da luz, foi observado que sua presença durante a reação ocasiona uma perda da absorbância entre a solução de DPPH e o antioxidante (em torno de 20 a 35%), perda que pode ser maior com o tempo. Ainda, a presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas (OLIVEIRA, 2015, p. 40) e a própria substância analisada podem interferir nos resultados. Essa última ocorre caso o espectro da substância em questão se sobreponha ao do DPPH ao redor de 517 nm. Além disso, o tamanho da molécula avaliada também é um fator determinante da reação, em virtude da acessibilidade estérica, pois moléculas pequenas têm melhor acesso ao sítio do radical podendo apresentar uma maior atividade aparente quando comparada a moléculas maiores (ALVES *et al.*, 2010, p. 2204).

Ainda, o método não é adequado para sistemas biológicos, pois as proteínas podem precipitar-se em meio alcoólico, ou seja, não é fisiologicamente relevante (OLIVEIRA, 2015, p. 40).

3.3.1.1. Interpretação dos Resultados

Os resultados costumavam ser apresentados como valor de EC₅₀ ou IC₅₀, que são a quantidade de antioxidante necessário para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%. Este valor é calculado através da regressão linear da curva de inibição percentual do radical DPPH em função da concentração do antioxidante (OLIVEIRA, 2015, p. 40). Para tanto, se faz necessária à utilização de diferentes concentrações do extrato (que correspondem aos valores do eixo x) e os valores das porcentagens de inibição (eixo y) calculados através da Equação 7. Os resultados podem ainda ser expressos simplesmente em função da porcentagem de inibição (% I), uma correlação da absorbância das amostras com a absorbância da solução metanólica do radical, conforma a seguinte equação:

$$\% I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

(Ac)= a absorbância do controle, solução metanólica do radical DPPH;

(Aam)= a absorbância das amostras, solução da amostra após 30 minutos de reação com o radical DPPH (INFANTE, 2013).

São muitos os trabalhos publicados que fazem uso desta técnica, no entanto não há padronização para apresentação dos resultados. Os trabalhos mais recentes são usualmente reportados como equivalentes de trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico)(Figura 6- a), análogo hidrossolúvel do tocoferol (Figura 6- b). Nesses casos, uma curva de calibração é construída a partir de soluções de diferentes concentrações do padrão trolox, e os resultados são expressos em µmol de equivalente do padrão trolox em 1 grama da amostra (BOROSKI *et al.*, 2015).

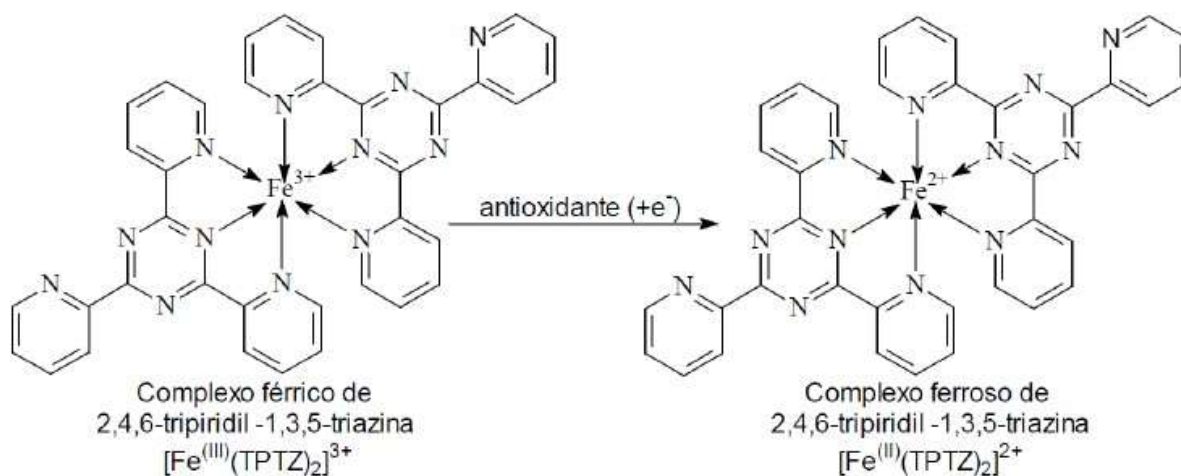


Figura 7- Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a ferroso $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, pela ação do antioxidante.

Fonte: Carbonera (2014, p. 27).

Para quantificação da atividade antioxidante, a absorbância máxima do complexo formado é monitorada. Várias metodologias empregadas para determinação de capacidade antioxidante incluem a redução do íon Fe^{3+} , onde a determinação é baseada na capacidade de reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} . Justamente em virtude do princípio da técnica (medida da capacidade de redução) esses métodos não podem ser empregados para antioxidantes que atuam por transferência de hidrogênio, como carotenoides e tióis. Outra desvantagem do método é atribuída à ação no organismo, onde os íons reduzidos (Fe^{2+}) podem atuar como pró-oxidantes, devido à formação de radicais hidroxila, por exemplo (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.3.2.1. Interpretação dos Resultados

Os resultados podem ser apresentados em equivalente do padrão utilizado para construção da curva de calibração. Dentre os padrões comumente empregados estão BHT, trolox, ácido gálico, entre outros antioxidantes. A curva é estabelecida no comprimento de onda máximo do complexo (563 nm) em determinada faixa de concentração em função das leituras de

absorbância. Desta forma, para uma amostra sólida, por exemplo, os resultados podem ser expressos em miligramas de equivalente do padrão de antioxidante por grama de extrato. Ainda não há uma padronização para expressão dos resultados (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.3.3. MÉTODO DO RADICAL ABTS^{•+}

Outro ensaio para avaliar a capacidade antioxidante é realizado através da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), denominado também por TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), quando padrão trolox é utilizado. Este método é aplicável tanto a matrizes lipofílicas quanto hidrofílicas e é considerado prático, rápido e de alta sensibilidade, sendo por isso amplamente empregado (BOROSKI *et al.*, 2015).

O princípio do método tem por base a capacidade dos compostos antioxidantes presentes na reação de capturar os radicais livres ABTS com descoloração da solução e consequente redução da absorbância, correspondendo quantitativamente à concentração de antioxidantes presentes na amostra (Figura 8) (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009 *apud* CARBONERA, 2014).

O radical ABTS^{•+} estável é gerado pela reação química entre o ABTS e um oxidante, como persulfato de potássio, dióxido de manganês, enzimas (peroxidase ou metamioglobina, entre outras) e apresenta coloração verde escuro com máximo de absorbância em 734 nm (RE *et al.*, 1999).

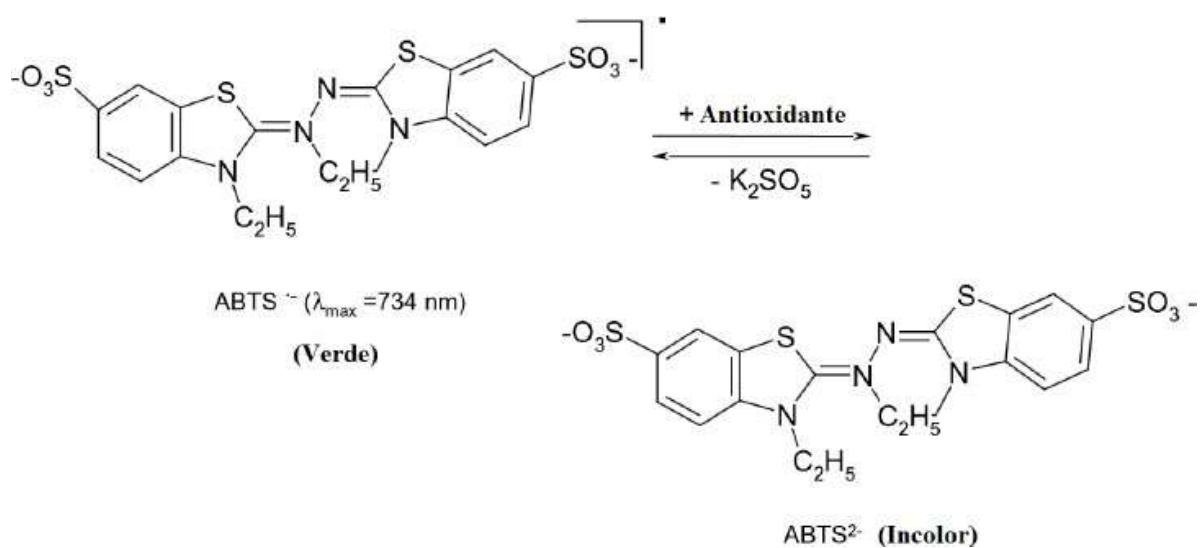


Figura 8- Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante
Fonte: Carbonera (2014, p. 28 adaptado de Zulueta *et al*, 2009).

Uma das críticas ao método está relacionada ao fato do radical empregado não ser encontrado no organismo e de que não é possível avaliar compostos com potencial redox menores do que do próprio radical. Por outro lado, o radical em questão proporciona a vantagem de diminuir interferências de compostos que absorvam radiação eletromagnética em comprimentos de onda menores, pois absorve na região próxima ao infravermelho (734 nm), o que também viabiliza a análise de compostos que absorvem radiação na região do visível, como as antocianinas. Além disso, trata-se de um radical altamente estável (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.3.3.1. Interpretação dos Resultados

Os resultados podem ser obtidos empregando-se várias concentrações de extrato ou apenas uma concentração. A partir de soluções do padrão trolox em diferentes concentrações (eixo x) e suas respectivas absorbâncias (eixo y), obtém-se a equação da reta por regressão linear. Substituindo o valor da absorbância de uma única concentração do extrato na equação da curva de calibração é possível expressar quanto equivale em μmol de trolox determinada massa

do extrato, ou seja, a capacidade do extrato de inibir o radical ABTS equivalente ao padrão. Logo, sabe-se qual quantidade de padrão trolox equivale a 1 g suco de fruta ou de extrato ($\mu\text{mol ET. g}^{-1}$) (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.3.4. MÉTODO ORAC

O método de capacidade de absorção dos radicais de oxigênio - ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) consiste em um ensaio espectrofluorimétrico, baseado na capacidade de absorvância do radical de oxigênio, utilizando fluoresceína (Figura 9) como marcador da capacidade antioxidante, um método amplamente utilizado para avaliação de diversas matrizes alimentícias (PRIOR; CAO, 1999 *apud* BOROSKI *et al.*, 2015).

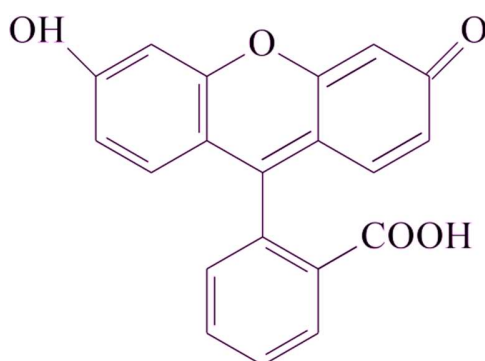


Figura 9- Estrutura química da fluoresceína
Fonte: Boroski *et al.* (2015, p. 128).

No teste ORAC se verifica a capacidade de inibição da oxidação dos radicais peroxila, induzidos pelo iniciador AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis [2-amidinopropano]) (Figura 10), por meio da decomposição térmica desse azo-composto a 37°C (Figura 11) (OU *et al.*, 2001 *apud* CARBONERA, 2014).

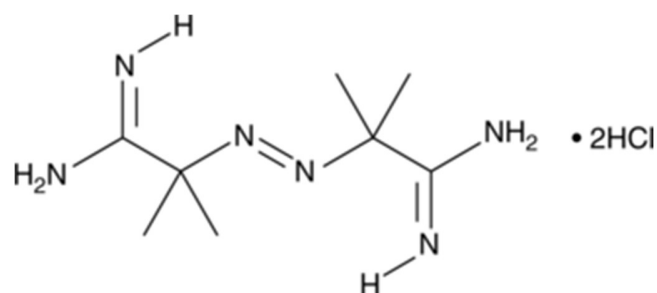


Figura 10- Estrutura química do 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH)

Fonte: Boroski *et al.* (2015, p. 128).

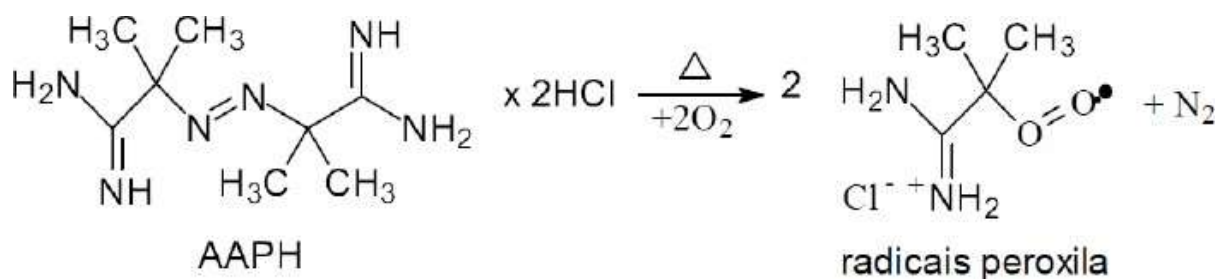


Figura 11- Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH).

Fonte: Carbonera (2014, p. 29 *apud* Zulueta, *et al.*, 2009).

Neste ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente (fluoresceína, substrato oxidável) formando um produto não fluorescente. O efeito protetor do antioxidante (AO) se dá através da doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres, evitando o decréscimo de fluorescência (Figura 12). Esse efeito é determinado pelo cálculo da área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra *versus* tempo, quando comparada ao branco, em que não há antioxidantes presentes (OU *et al.*, 2001 *apud* CARBONERA, 2014).

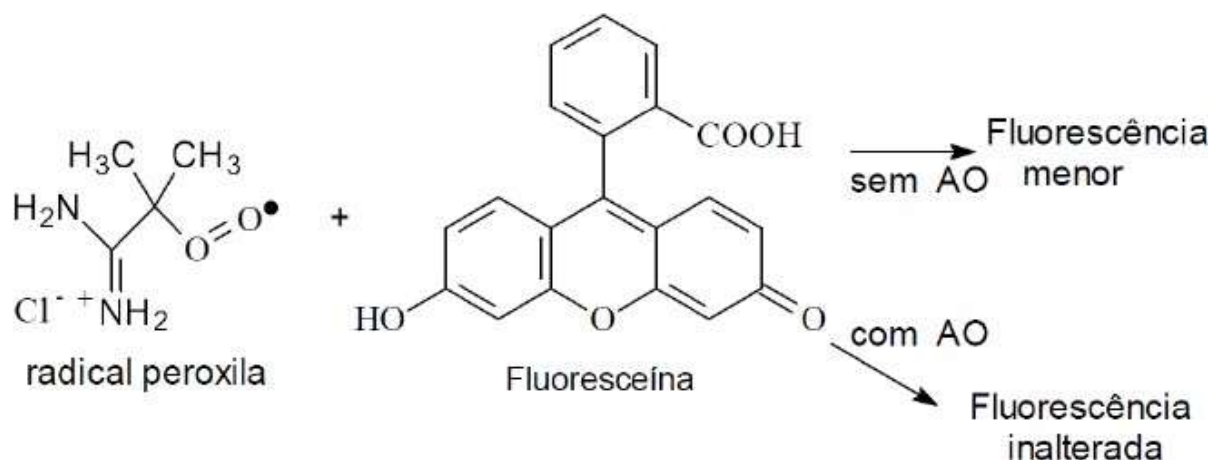


Figura 12- Representação da atuação dos antioxidantes no ataque dos radicais peroxila à fluoresceína

Fonte: Boroski *et al.* (2015, p. 129).

A mudança estrutural da fluoresceína após a perda da fluorescência pela ação dos radicais ainda não foi confirmada.

Quanto às vantagens envolvidas no uso do ensaio ORAC, estão não só a utilização de uma fonte de radical biológica relevante e da temperatura do corpo humano (37°C), como também por tratar-se do único método que combina tempo e grau de inibição por um antioxidante num único valor, reproduzindo o mecanismo de atuação e prevenção dos radicais livres no organismo (PRIOR *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2008; HUANG *et al.* 2002 *apud* CARBONERA, 2014).

3.3.4.1. Interpretação dos Resultados

Após as análises é obtido um gráfico de tempo por intensidade de fluorescência. A área abaixo da curva (AUC- area under curve) é calculada, tanto para o padrão quanto para a amostra. A AUC também é calculada para o branco. O controle é obtido somente pela fluoresceína para verificação da manutenção de sua fluorescência ao longo do tempo. O cálculo da AUC é realizado pela razão entre a intensidade da fluorescência de cada um dos pontos pela

fluorescência obtida no primeiro ponto. Os resultados dessas divisões são somados (BOROSKI, *et al.*, 2015).

A área líquida abaixo da curva (Net AUC) é calculada pela subtração do valor do branco, ela representa apenas o valor da AUC para o padrão ou para amostra. A partir da área líquida calcula-se o valor da capacidade antioxidante por meio da equação da reta da curva de calibração feita com o padrão trolox em determinada faixa de concentração, sendo assim o resultado é expresso em equivalente trolox (TE), e finalmente em μmol de equivalente trolox por grama de amostra com base na concentração do extrato empregado (BOROSKI *et al.*, 2015).

3.4 ENSAIO COM REAGENTE FOLIN-CIOCALTEU

O ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu (FCR) é o mais utilizado para quantificação de fenóis em uma amostra, o qual também é conhecido como ensaio para determinação de compostos fenólicos totais. Foi desenvolvido inicialmente por Singleton e colaboradores em 1965 e, em 1999, o ensaio foi delineado e padronizado para quantificação de fenóis totais (SINGLETON *et al.* 1956 *apud* TOMEI; SALVADOR, 2007).

O princípio desta técnica consiste na redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelo composto analisado, uma solução de complexos que também apresenta átomos de molibdênio no estado de oxidação VI, que na presença de elétrons passa para o estado de oxidação V, conferindo-lhe coloração azul em decorrência da mudança de estado. Os produtos de reação podem ser detectados na faixa de 740 a 750 nm (absorbância máxima). Para redução do molibdênio, os compostos fenólicos devem estar desprotonados, condição favorecida em meio básico (HUAN; OU; PRIOR, 2005 *apud* INFANTE, 2013, p. 41).

Os compostos fenólicos totais determinados por FCR são frequentemente expressos em equivalente de ácido gálico. Quanto às desvantagens do método, elas estão relacionadas à formação do complexo de cor azul não ser atribuída exclusivamente a compostos fenólicos. Outros compostos tais como ácidos orgânicos, ácido ascórbico, aminas aromáticas e Fe (III), também conferem esse efeito (MAGALHÃES *et al.*, 2008 *apud* INFANTE, 2013, p. 41).

O ensaio de fenóis totais por FCR é conveniente, simples e reprodutivo. Por isso, tem sido vastamente aplicado e tornou-se um ensaio rotineiro no estudo de antioxidantes fenólicos, uma vez que se estabeleceu uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2007; ATOUI *et al.*, 2005; PICINNELI *et al.*, 2004; ANAGNOSTOPOULOU *et al.*, 2006; SURVESWARAN *et al.*, 2007; STRATIL *et al.*, 2006; SALVADOR *et al.*, 2006; TERMENTZI *et al.*, 2006 *apud* TOMEI; SALVADOR, 2007).

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GÊNERO *EUGENIA*

Entre as espécies frutíferas brasileiras, a família Myrtaceae é uma das mais representativas, contando com cerca de 20 gêneros e 1000 espécies, sendo um terço dessas pertencentes ao gênero *Eugenia* (SENNA *et al.*, 2011). Este gênero é constituído por aproximadamente 550 espécies de árvores e arbustos, das quais cerca de 400 podem ser encontradas no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os frutos das espécies de *Eugenia* costumam apresentar cores vibrantes que variam do amarelo ao púrpura. Conforme Bagetti *et al.*, (2011), Harborne e Williams, (2000) e Moon e Schibamoto (2009, *apud* INFANTE, 2013), a atividade antioxidante de frutos com tais colorações normalmente está relacionada à presença de compostos fenólicos. Além disso, a composição de muitas espécies ricas em compostos fenólicos justificaria as propriedades antioxidantes e adstringentes de várias mirtáceas conhecidas.

O Quadro 1 a seguir apresenta os dados levantados a partir de pesquisas publicadas sobre a capacidade antioxidante de várias espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie (nome popular)	Extrato	Partes da Planta	Métodos	Capacidade Antioxidante	Referência
<i>E. beaurepaireana</i> / cereja do mato	Extrato bruto em EtOH	Folhas	DPPH- IC ₅₀ (g.mL ⁻¹)	18,00	MAGINA, 2010.
<i>E. beaurepaireana</i> / cereja do mato	Extrato bruto em EtOH	Caule	DPPH- IC ₅₀ (g.mL ⁻¹)	12,61	MAGINA, 2010.

Espécie (nome popular)	Extrato	Partes da Planta	Métodos	Capacidade Antioxidante	Referência
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH	Folhas	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,14± 0,004	INFANTE, 2013.
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH		ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	757,32± 34,74	INFANTE, 2013.
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH	Semente	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,20± 0,004	INFANTE, 2013.
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH		ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	211,84± 9,33	INFANTE, 2013.
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH	Polpa	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,47± 0,003	INFANTE, 2013.
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Extrato bruto em EtOH		ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	477,45± 23,25	INFANTE, 2013.
<i>E. caryophyllus/ cravo da índia</i>	extrato aquoso (50°C)	Botão da flor	DPPH % de inibição	31.58 ± 4.73	DUDONNÉ, <i>et al.</i> , 2009.
			ABTS % de inibição	46.68 ± 0.73	DUDONNÉ, <i>et al.</i> , 2009.
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	3084 ± 65	DUDONNÉ, <i>et al.</i> , 2009.
<i>E. caryophyllata Thunb /cravo-da-índia</i>	EtOH	Botão da flor	DPPH- IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	1.118,77	SILVESTRI, <i>et al.</i> , 2010.
<i>E. elliptica</i>	Extrato metanólico	Folhas	FRAP (µmol Fe(II).g ⁻¹ planta)	290±4.06	NEERGHEEN <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
			TEAC/ABTS (µmol ET.g ⁻¹ de extrato)	373±3.14	NEERGHEEN <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
<i>E. involucrata/ cereja do rio grande</i>	Extrato bruto em EtOH	Folhas	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,08± 0,003	INFANTE, 2013.
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	644,31± 25,44	
		Semente	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,74± 0,021	INFANTE, 2013.
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	96,24± 4,70	
Polpa	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,60± 0,009	INFANTE, 2013.		
	ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	127,62± 5,78			
<i>E. jambolana Lam/ jambolão</i>	EtOH	Polpa	DPPH (µmol ET. g ⁻¹ de amostra)	13,3 ± 1,9	KUSKOSKI, <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. leitonil/ araçá-piranga</i>	EtOH	Folhas	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,11± 0,002	INFANTE, 2013
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	417,71± 16,71	
		Semente	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,07± 0,001	INFANTE, 2013
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	514,75± 21,54	
		Polpa	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,79± 0,008	INFANTE, 2013
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	102,82± 7,81	
<i>E. luschnathiana/ Pitomba-da-baía ou curuiri</i>	MeOH	Fruta	DPPH (IC ₅₀ µg/ml)	38.0 ± 4.86	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008.

Espécie (nome popular)	Extrato	Partes da Planta	Métodos	Capacidade Antioxidante	Referência
<i>E. myrcianthes/ubajai</i>	Extrato bruto em EtOH	Folha	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,08± 0,003	INFANTE, 2013.
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	644,31± 25,44	
		Semente	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,74± 0,021	
			ORAC (µmol ET.g ⁻¹ extrato)	96,24± 4,70	
		Polpa	DPPH- IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	0,60± 0,009	
			ORAC (µmol ET.g extrato)	127,62± 5,78	
<i>E. orbiculata</i>	Extrato metanólico	Folhas	FRAP (µmol Fe(II).g ⁻¹ planta)	290±4.06	NEERGHEEN <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
			TEAC/ABTS (µmol ET.g ⁻¹ de extrato)	373±3.14	
<i>E. reinwardtiana/ cereja da Austrália</i>	MeOH	Fruta	DPPH (IC ₅₀ µg/ml)	110 ± 8.31	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008.
<i>E. tinifolia</i>	Extrato metanólico	Folhas	FRAP (µmol Fe(II).g ⁻¹ planta)	1463±35.32	NEERGHEEN <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
			TEAC/ABTS (µmol ET.g ⁻¹ de extrato)	200±11.81	
<i>E. umbelliflora/ baguaçu</i>	Extrato bruto em EtOH	Folhas	DPPH (IC ₅₀ (g.mL ⁻¹))	39,70	MAGINA, 2010.
		Caule	DPPH (IC ₅₀ (g.mL ⁻¹))	52,20	
<i>E. umbelliflora Berg/ baguaçu</i>	EtOH	Polpa	DPPH (µmol ET. g ⁻¹ de amostra)	111,2 ± 0,1	KUSKOSKI, <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. uniflora L./pitanga</i>	EtOH	Semente	DPPH % máx de AO	92,15	LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010.
			DPPH (IC ₅₀ (mg.g ⁻¹))	30,72	
<i>Eugenia uniflora L./pitanga</i>	EtOH	Folha	ABTS (µM trolox. g ⁻¹ de folha)	5897,8± 476,5	SOUZA, 2013.

Quadro 1- Capacidade Antioxidante para Várias Espécies do Gênero *Eugenia*

Fonte: Autoria própria (2016).

Além desse, o mesmo levantamento foi realizado para os estudos sobre fenólicos totais em diferentes espécies de *Eugenia*, estudos acerca da mesma espécie com resultados que divergiram também são apresentados.

Espécie/Nome Popular	Método	Parte da Planta	Polifenóis Totais	Referência
<i>E. beaurepaireana/ cereja do mato</i>	Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou <i>et al.</i> 2006) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de extrato)	Folha	174, ± 1,6	MAGINA, 2010.
		Caule	138,0± 2,7	
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou <i>et al.</i> 2006) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de extrato)	Folha	1626 ± 3,3	MAGINA, 2010.
		Caule	174, ± 1,6	
<i>E. brasiliensis/ grumixama</i>	Folin&Ciocalteu(mg GAE/grama de extrato)	Folha	73,25±3,41	INFANTE, 2013.
		Semente	42,60±1,90	
		Polpa	26,69±1,22	

Espécie/Nome Popular	Método	Parte da Planta	Polifenóis Totais	Referência
<i>E. caryophyllus/</i> cravo da índia	Folin&Ciocalteu(mg GAE/grama de extrato)	Botão da flor	212,85± 2,96	DUDONNÉ, <i>et al.</i> , 2009.
<i>E. elliptica</i>	Folin–Ciocalteu(Singleton and Rossi 1965) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de planta)	Folhas	16± 0,37	NEERGHEEN, <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
<i>E. involucrata/</i> cereja do rio grande	Folin&Ciocalteu(mg GAE/grama de extrato)	Folha	70,19±1,88	INFANTE, 2013.
		Semente	22,75±0,50	
		Polpa	18,36±0,66	
<i>E. jambolana Lam/</i> jambolão	Folin&Ciocalteu(1927) (mg de ácido gálico/ 100g de frutos)	Polpa	229,6± 13,6	KUSKOSKI, <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. leitonil/</i> aracá-piranga	Folin&Ciocalteu(mg GAE/grama de extrato)	Folha	88,62±2,43	INFANTE, 2013.
		Semente	36,08±1,24	
		Polpa	120,67±4,38	
<i>E. luschnathiana/</i> Pitomba-da-baía ou curuiri	Folin–Ciocalteu (Kähkönen <i>et al.</i> , 1999; Singleton & Rossi, 1965).(mg GAE/g de extrato seco)	Fruta	22.0 ± 0.21	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008.
<i>E. myrcianthes/</i> ubajáí	Folin&Ciocalteu(mg GAE/grama de extrato)	Folha	100,29±3,29	INFANTE, 2013.
		Semente	11,34±0,49	
		Polpa	17,80±0,89	
<i>E. orbiculata</i>	Folin–Ciocalteu(Singleton and Rossi 1965) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de planta)	Folhas	28± 1.0	NEERGHEEN, <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
<i>E. reinwardtiana/</i> cereja da austrália	Folin–Ciocalteu (Kähkönen <i>et al.</i> , 1999; Singleton & Rossi, 1965).(mg GAE/g de extrato seco)	Fruta	9.25 ± 0.78	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008.
<i>E. tinifolia</i>	Folin–Ciocalteu(Singleton and Rossi 1965) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de planta)	Folhas	23± 1.36	NEERGHEEN, <i>et al.</i> , 2006, p. 787-799.
<i>E. umbelliflora Berg/</i> baguaçu	Folin&Ciocalteu(1927) (mg de ácido gálico/ 100g de frutos)	Polpa	897,6± 5,1	KUSKOSKI, <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. umbelliflora Berg/</i> baguaçu	Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou <i>et al.</i> 2006) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de extrato)	Folha	128,1± 2,9	MAGINA, 2010.
		Caule	105,8± 2,6	
<i>E.uniflora L./pitanga</i>	Folin–Ciocalteu(Singleton and Rossi 1965) (mg de ácido gálico (AG)/ grama de extrato)	Semente	75,64	LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010.
<i>E.uniflora L./pitanga</i>	Folin- Ciocalteu (Singleton <i>et al.</i> 1999) (mg AG/100g de amostra)	Folha	206,2±130,2	SOUZA, 2013.

Quadro 2- Compostos Fenólicos Totais para Várias Espécies do Gênero *Eugenia*
Fonte: Autoria própria (2016).

Notas:

GAE= Equivalente em ácido gálico.

Por meio dos dados apresentados para todas as análises relacionadas à determinação de capacidade antioxidante pode ser observada a falta de padronização para expressão dos resultados, o que se caracteriza em um obstáculo para comparação de resultados até mesmo entre estudos realizados com mesmo tipo de ensaio.

4. METODOLOGIA

4.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

Os frutos frescos e maduros da espécie *E. moraviana* foram coletados em área remanescente de uma floresta estacional semidecidual do Noroeste do Paraná (coordenadas 52° 53'W e 22° 35'S, Diamante do Norte, PR). Uma exsicata foi depositada no Herbário Educacional da Universidade Estadual de Maringá, sob o número HUEM 21428.

Para a obtenção do extrato bruto, primeiramente 400 g da polpa dos frutos de *E. moraviana* foram submetidas a um processo de extração exaustiva por maceração estática com etanol. Em seguida para total remoção do solvente, o extrato etanólico foi seco por evaporação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, seguido pelo processo de liofilização por 48 horas, obtendo-se o extrato alcoólico bruto dos frutos de *E. moraviana* (27,8 g).

Os frutos frescos e maduros de *E. blastantha* foram coletados no Bosque Municipal de Paranaíba - PR, pela professora Mariza Barion Romagnolo. Para a obtenção do extrato bruto, primeiramente 400 g da polpa dos frutos de *E. blastantha* foram submetidas a um processo de extração exaustiva por maceração estática com etanol. Em seguida para total remoção do solvente, o extrato etanólico foi seco por evaporação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, seguido pelo processo de liofilização por 48 horas, obtendo-se o extrato etanólico bruto dos frutos de *E. blastantha* (26,6 g).

A partir dos extratos brutos foram preparadas soluções em metanol de 2 g.L⁻¹(solução estoque) para cada uma das espécies. Essas soluções foram empregadas em todas as análises. Sendo que cada ensaio demandou diluições específicas, de acordo com a reatividade de cada espécie, obtidas a partir das soluções estoque.

Para os ensaios DPPH e ABTS foi utilizada uma diluição 1:5 do extrato da espécie *E. blastantha*. Já para o ensaio FRAP foram necessárias uma diluição 1:3 do extrato de *E. moraviana* e 1:10 do extrato de *E. blastantha*. No ORAC as diluições foram as mesmas para as duas espécies (1:800) e, por fim, para o ensaio de Fenólicos Totais, para o qual bastou uma diluição de 1:3 do extrato de *E. blastantha*.

4.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE DPPH

A solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi preparada na concentração de 50 mmol. L⁻¹ em metanol. O valor de absorvância foi de aproximadamente 0,689 em 517 nm. Para leitura das absorvâncias das amostras foram diluídos em metanol 25 µL do extrato e 2mL do radical, em quadruplicata. Soluções metanólicas de trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ($y = -2,54333E^{-4}x + 0,69784$; $r^2 = 0,9944$), sendo a capacidade antioxidante expressa em µmol de equivalente trolox por grama de amostra (µmol ET g⁻¹).

4.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FRAP

A solução de FRAP foi preparada pela diluição de uma solução aquosa de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) (10 mmol. L⁻¹) e de cloreto férrico (20 mmol. L⁻¹) em uma solução tampão (pH 3,6) de acetato de sódio (300 mmol. L⁻¹) na proporção de 1:1:10 (v/v/v), como descrito por Benzie e Strain (1996). As leituras de absorvância foram realizadas em 593 nm. Soluções metanólicas de trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ($Y = 0,0013x + 0,01161$; $r^2 = 0,9996$), sendo a capacidade antioxidante expressa em µmol de equivalente trolox por grama de amostra (µmol. ET g⁻¹).

4.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ABTS

No ensaio ABTS, a solução de trabalho foi preparada de acordo com Rufino *et al.* (2007), reagindo-se a solução estoque de ABTS (7 mmol. L⁻¹) com solução de persulfato de potássio (140 mmol. L⁻¹). A solução final ficou em repouso, ao abrigo da luz e temperatura ambiente, durante 16 h antes da utilização. O valor de absorvância entre 0,65 e 0,75 em 734 nm

foi determinado diluindo-se 5mL da solução estoque com aproximadamente 88 μL da solução de persulfato de potássio. Soluções metanólicas de trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ($y = -0,003x + 0,676$; $r^2 = 0,9957$), sendo a capacidade antioxidante expressa em μmol de equivalente trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$).

4.5. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELO ENSAIO ORAC

O teste foi realizado pela adição de 25 μL do extrato. Para o branco foram adicionados 25 μL de tampão fosfato ($\text{pH} = 7$), e para construção da curva de calibração, 25 μL de solução de padrão trolox (curva de calibração: $y = (\text{NET} + 17,401) / 4,3508$, onde NET é a diferença entre a soma das intensidades de fluorescência normalizadas e a fluorescência do branco). Em seguida, foram acrescentados 150 μL da solução de fluoresceína ($1,03 \text{ mmol. L}^{-1}$) e a cubeta foi então mantida sob proteção da luz e ambientada durante 5 min a 37°C . Na sequência, foram adicionados 25 μL da solução de AAPH (161 mmol. L^{-1}) e finalmente realizada leitura das intensidades de fluorescência em espectrofluorímetro (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

4.6. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado com base no método colorimétrico de empregando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1956). Este reagente forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos (COUTINHO; PASCOLATTI, 2014, p. 22). Foram diluídos 250 μL do extrato em metanol, a mesma quantia foi adicionada do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em água). Também foram adicionados 500 μL de solução saturada de Na_2CO_3 e 4 mL de água destilada. A solução do branco consistiu apenas em 250 μL de metanol. Os tubos foram mantidos sob

proteção da luz por 25 min e centrifugados por 10 min a 3000 rpm. Por fim, o valor de absorbância foi lido em 725 nm. Soluções de ácido gálico com concentrações entre 0 e 200 mg. L⁻¹ foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ($y = 0,0057x - 0,0115$; $r^2 = 0,9996$), sendo a capacidade antioxidante expressa em miligramas de ácido gálico por grama de amostra (mg AG. g⁻¹).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo das plantas que constituem um grupo grande e complexo. Essas moléculas são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e sua síntese é induzida em condições de estresse biótico e abiótico, como infecções, lesões, radiação UV, ozônio, salinidade, estresse hídrico e calor. Eles são parcialmente responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa nos alimentos (MANACH *et al.*, 2004)

Estes compostos têm uma poderosa atividade antioxidante *in vitro* e são capazes de destruir uma vasta gama de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, tais como ânion superóxido, radical hidroxil, radicais peroxil, ácido hipocloroso e ácido peroxinitroso. Eles também quelam íons metálicos e, assim, diminuem a sua atividade pró-oxidante. Como evidências consideráveis indicam que o aumento do dano oxidativo está associado ao desenvolvimento da maioria das doenças degenerativas relacionadas à idade, especula-se que os polifenóis podem ter efeitos protetores contra tais condições (TABART *et al.* 2009).

Vários autores afirmam que nenhum método isolado é suficiente para determinação da capacidade antioxidante (HUANG, OU, PRIOR, 2005; PRIOR & CAO, 1999 (*apud* DUDONNÉ *et al.*, 2009); TABART *et al.* 2009). Portanto, mais do que um tipo de ensaio da capacidade antioxidante deve ser realizado para considerar todos os possíveis modos de ação de um antioxidante. Buenger *et al.* (2006, *apud* DUDONNÉ *et al.*, 2009) em estudos sobre a comparação de métodos *in vitro* para avaliação de potencial antioxidante atestou que as análises de DPPH e ABTS são as mais práticas, de baixo custo, além de apresentarem resultados mais reprodutíveis. Com destaque para o ensaio de ABTS, devido à eliminação de interferência de cor (seção 3.3.3), particularmente interessante em extratos de plantas.

Já Thaipong *et al.* (2006) em sua comparação dos ensaios ORAC, FRAP, ABTS e DPPH para extrato alcoólico de goiaba considerou as técnicas de DPPH e FRAP as de maior reprodutibilidade e menor tempo de análise. De fato, o ensaio ABTS despense maior tempo já que o preparo da solução radicalar é feito 16h antes do uso. Entretanto, com relação à comparação entre os resultados obtidos nos ensaios e valores de capacidades antioxidantes

descritos na literatura, os mesmos autores relatam melhor compatibilidade para os resultados do ensaio ORAC.

Considerando que o uso de diferentes ensaios antioxidantes ajudariam a identificar variações na resposta dos compostos presentes em extratos das espécies *E. moraviana* e *E. blastantha*, neste trabalho foram determinadas as capacidades de sequestro de radical livre dos extratos selecionados usando os ensaios DPPH, ABTS e ORAC e sua capacidade de redução de íon férrico utilizando o ensaio FRAP.

Dos métodos empregados, em FRAP e ABTS costumam prevalecer mecanismos de transferência de elétron, (com redução do radical, em que não se podem avaliar compostos com potencial redox menores do que o do próprio radical), assim como para o método de Compostos Fenólicos Totais, enquanto que em ORAC e DPPH ocorre transferência de um átomo de hidrogênio. Além disso, o ensaio ORAC é o único que leva em conta a ação cinética de antioxidantes, o que pode explicar a discrepância entre os resultados (DUDONNÉ *et al.*, 2009). As diferenças apresentadas pelos métodos podem ser justificadas ainda com base nas distintas afinidades dos antioxidantes pelas substâncias oxidantes utilizadas nos ensaios bem como pelo mecanismo de ação envolvido e a composição do meio reacional (INFANTE, 2013).

Os resultados dos ensaios ORAC, FRAP, ABTS, DPPH e Fenólicos Totais em termos de equivalentes dos padrões utilizados são apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Esses valores correspondem à quantia de padrão que equivale a 1 g de extrato em capacidade de inibição do radical.

Tabela 1 - Capacidade Antioxidante dos extratos de *E. moraviana* e *E. blastantha* obtida pelos ensaios ORAC, FRAP, ABTS, DPPH e Compostos Fenólicos Totais

(continua)

	Espécies	
	<i>E. moraviana</i>	<i>E. blastantha</i>
ORAC (μmol de ET. g de extrato ⁻¹)	2120,05 \pm 50,80	1848,29 \pm 70,97
FRAP (μmol de ET. g de extrato ⁻¹)	732,82 \pm 24,55	2023,46 \pm 34,12

Tabela 2 - Capacidade Antioxidante dos extratos de *E. moraviana* e *E. blastantha* obtida pelos ensaios ORAC, FRAP, ABTS, DPPH e Compostos Fenólicos Totais

	Espécies	
	<i>E. moraviana</i>	<i>E. blastantha</i>
ABTS ($\mu\text{mol de ET. g de extrato}^{-1}$)	68,18 \pm 2,68	42,51 \pm 5,57
DPPH ($\mu\text{mol de ET. g de extrato}^{-1}$)	737,20 \pm 53,01	1789,82 \pm 139,22
Fenólicos Totais (mg AG. g de extrato ⁻¹)	64,54 \pm 2,36	213,28 \pm 4,55

Fonte: Autoria Própria (2016).

Apesar dos ensaios ORAC e ABTS resultaram em maior capacidade antioxidante para o extrato da espécie de *E. moraviana*, os resultados de FRAP, DPPH e Fenólicos Totais apontaram para uma maior capacidade antioxidante para o extrato de *E. blastantha*, mostrando uma diferença considerável e bem mais favorável para a segunda espécie avaliada (**Erro! Fonte de eferência não encontrada.**), o que pode estar associado a diferenças no perfil de compostos fenólicos entre estes frutos.

Com relação aos erros, o ensaio ABTS para a espécie *E. blastantha*, representou o maior valor (13,11%), ao passo que os demais ensaios apresentaram erros entre 1,68 a 3,93%, exceto método de DPPH, em que os erros foram de 7,78 a 8,08%.

A atividade antioxidante obtida pelo ensaio ORAC tanto para espécie *E. moraviana* (2120,05 \pm 50,80) quanto para *E. blastantha* (1848,29 \pm 70,97) não se apresentaram maiores do que a atividade do óleo essencial da espécie *E. caryophyllus* (cravo da índia) (DUDONNÉ *et al.*, 2009), porém, ambos resultados foram superiores aos encontrados para as espécies *E. brasiliensis* (grumixama), *E. myrcianthes* (ubajai), *E. leitonil* (araçá-piranga) e *E. involucrata* (cereja do rio grande) (INFANTE, 2013).

As atividades antioxidantes determinadas em $\mu\text{mol de ET. g de extrato}^{-1}$ de DPPH para os extratos de *E. moraviana* (737,20 \pm 53,01) e de *E. blastantha* (1789,82 \pm 139,22) também se caracterizaram superiores à atividade descrita por Kuskoski *et al.* (2006) para as espécies *E.*

jambolana (jambolão) e *E. umbelliflora* (bagaçu), conforme Quadro 1- Capacidade Antioxidante para Várias Espécies do Gênero *Eugenia* Quadro 1. Não obstante, as capacidades determinadas por ABTS para os extratos de *E. moraviana* ($68,18 \pm 2,68$) e de *E. blastantha* ($42,51 \pm 5,57$) foram inferiores às obtidas para extratos metanólicos das espécies *E. elliptica*, *E. orbiculata* e *E. tinifolia* (NEERGHEEN *et al.*, 2006) (Tabela 1). O mesmo resultado para o extrato de *E. moraviana* comparado aos resultados de Kuskoski *et al* (2006) em estudo sobre a capacidade antioxidante de várias frutas foi próximo aos valores obtidos para acerola e superior aos valores determinados para manga, abacaxi, graviola, cupuaçu, maracujá, uva, açai, goiaba, amora e morango.

A comparação dos resultados do ensaio FRAP entre espécies do gênero não foi possível em virtude da falta de padronização do ensaio (estudos que empregavam esse ensaio dentro do gênero utilizaram outros padrões como Ferro (II)).

Quanto aos resultados obtidos na determinação de Compostos Fenólicos Totais, os valores obtidos na avaliação do extrato de *E. blastantha* ($213,28 \pm 4,55$) foram superiores aos obtidos para o extrato de *E. moraviana* ($64,54 \pm 2,36$). A espécie *E. blastantha* mostrou resultados melhores quando comparados aos relatados para extratos das folhas e caules das espécies *E. umbelliflora* (bagaçu), *E. brasiliensis* (grumixama) e *E. beaurepaireana* (cereja do mato), com exceção para o extrato do caule de cereja do mato (MAGINA, 2010). Ainda para espécie *E. blastantha*, o resultado foi muito similar ao obtido por Dudonné *et al.* (2009) para *E. caryophyllus* (cravo da índia) e também, maiores do que os valores de compostos fenólicos encontrados em folhas, sementes, cascas e polpas de *E. brasiliensis* (grumixama), *E. myrciantes* (ubajai), *E. leitonil* (araçá-piranga) e *E. involucrata* (cereja do rio grande) por Infante (2013).

A atividade antioxidante dos polifenóis ocorre por diferentes mecanismos. O mais importante é o sequestro de radicais livres, que depende da estrutura do composto envolvido. A intensidade da atividade antioxidante exibida por estes fitoquímicos difere, principalmente devido ao número e posição de grupos hidroxila na molécula (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996). Portanto, a maneira como estes compostos neutralizam os radicais livres dependerá das suas concentrações relativas na matriz da amostra. Além disso, os compostos fenólicos podem atuar de forma sinérgica, aditiva ou antagonista para inibir espécies reativas.

De um modo geral, ambas as espécies apresentaram expressiva atividade em todos os ensaios realizados, o que as caracteriza como possíveis fontes de antioxidantes. Considerando

que consumo de alimentos ricos nesses compostos está associado à potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças. Esses resultados estimulam a realização de estudos adicionais para identificação dos compostos.

6. CONCLUSÃO

A aplicação de diferentes métodos foi relevante para observação de atividades distintas.

Os resultados do presente estudo revelaram que os frutos com maior teor de fenólicos (extrato da espécie *E. blastantha*) também tiveram a maior atividade antioxidante nos ensaios DPPH e FRAP, além de demonstrar atividade superior a outras espécies do mesmo gênero, já estudadas e a diversas frutas comuns no consumo dos brasileiros.

O extrato dos frutos da espécie *E. moraviana* mostrou maior capacidade antioxidante apenas pelos métodos ORAC e ABTS.

Esses resultados reforçam a importância de uma ingestão regular de frutas para fornecer polifenóis antioxidantes na dieta humana e indicam que o guamirim (ou cereja preta) e a grumixama-mirim têm um grande potencial antioxidante. Contudo, são necessários mais estudos para identificar e quantificar todos os compostos fenólicos presentes nestes frutos e determinar a contribuição dos principais compostos para a atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANAGNOSTOPOULOU, M.A. *et al.* Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry** v.94, 2006, p.19–25.

ANGELLA, F. C. O. **Avaliação da atividade antioxidante em frutas do cerrado brasileiro**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência). Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

APEL, M. A. *et al.* Chemical composition of the essential oils from southern brazilian *Eugenia* species. part IV: section racemulosae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 290- 292, 2011.

ARABBI, P. R. Alimentos funcionais- aspectos gerais. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP. v.21, p. 87-102, jun., 2001.

ATOUI, A.K., *et al.* Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry** v.89, p.27–36, 2005.

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

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12(2), p. 123-130, 1999.

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.

BOROSKI, M. *et al.* **Antioxidantes- princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: **Biodiversidade- Flora**. 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>>. Acesso em 20 ago. 2016.

BUENGER, J. *et al.* An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. **Int. J. Cosmet. Sci.**, 28, 135–146, 2006.

BUTERA, D. *et al.* Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (50), 6895-901, 2002.

CARBONERA, F. **Avaliação da composição lipídica e da capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014, p.27-28.

CARVALHO J., A. R. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Quím. Nova**. v.37 n.3 São Paulo, mai.-jun. 2014.

CASTRO, J. F. A. **Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

COUTINHO, A. M.; PASCOLATTI, Y. S. **Caracterização físico-química e análise antioxidante da polpa de uvaia (*Eugenia pyriformiscambess*)**. 2014. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

DUDONNÉ, S. *et al.* Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 5, 2009.

FINLAYS TEA SOLUTIONS. Dossiê antioxidantes. **Rev. FiB.**, n. 6, p. 16-30, 2009. Disponível em: < <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acessoem: 27 out. 2015.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2, p.191- 206, 2009.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação de capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação de teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação

(Mestrado em Ciência de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 1841–1856, 2005.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, D. *et al.* High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4437-4444, 2002.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas do Brasil**. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

JAYAPRAKASHA, G.K., NEGI, P.S., JENA, B.S., RAO, J.M. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **J. Food Comp. and Analysis** v.20, 2007, p.330–336.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009. ISSN 1936-9751.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, julho, 2006.

LUZIA, D. M. M.; BERTANHA, B. J.; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.175-180. 2010.

MAGALHÃES, R. M. *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidants properties. **Analytica Chmica Acta**, Amsterdam, v. 613, 2008, p. 1-19.

MAGINA, M. A. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy** - 29 (3) – 2010.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727- 747, 2004.

MIGUEL, M. G. **Plantas aromáticas e medicinais como antioxidantes naturais**: métodos de análise. In: Figueiredo A. C., Barroso J. G. P. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais- Curso Teórico-prático*, Lisboa. Ed. 3, 2007. p. 106-136. Disponível em: <<http://cbv.fc.ul.pt/PAM/pdfsLivro/GracaMiguel.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2015.

NEERGHEEN, V.S. *et al.* Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, 163, p. 787-799, 2006.

NICÁCIO, A. E. **Determinação de compostos antioxidantes e da capacidade antioxidante das frutas cereja-do-mato, saraguaji e mamey por cromatografia líquida e ensaios espectrofotométricos**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Chemistry**, v.74, p.10-36, 2015.

OU B.; HAMPSCH-WOODILL M.; PRIOR R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.** 49(10): 4619-26, 2001.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1173- 1181, 1999.

PRIOR, R. L. *et al.* Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 3273-3279, 2003.

QUEIROZ, J. M. G. *et al.* Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9(2): 73-159, abr.-jun., 2015.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A. *et al.* Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, 109, 883– 890, 2008.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**;20:933-56, 1996.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 53- 60, 2007.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia L.* (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.20 n.3 São Paulo jul.-set. 2006.

RUFINO, M. do S. M. *et al.*. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.⁺**. Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza, 2007.

SALVADOR, M.J *et al.* Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella Colla*. **Z. Naturforschung**. v.61, p.19-25, 2006.

SENNA, L. M. *et al.* Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa O. Berg.* (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farm.** 92(2): 51-54, 2011.

SILVEIRA, J. **Estudo das propriedades biológicas de *Calycorectes psidiiflorus (O. BERG) Sobral (Myrtaceae)***. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura), Universidade Paranaense – UNIPAR, Umuarama, 2010.

SILVESTRI, J. D. F. *et al.* Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata Thunb.*) **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, set/out, 2010.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J. A. **American Journal of Enology and Viticultura**. v. 16. p. 144-158. 1956.

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.607-616, 2006.

SURVESWARAN, S., CAI, Y.Z., CORKE, H., SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry** v.102, p.938–953, 2007.

TABART J, *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chem**; 113:1226-33, 2009.

TERMENTZI, A., KEFALAS, P., KOKKALOU, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbusdomestica* fruits at different maturity stages. **Food Chemistry** v.98, 2006, p.599–608.

THAIPONG, K. *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19: 669- 675, sep. 2006.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: XI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO – Universidade do Vale do Paraíba, **Anais...**, 2007. p. 1963-1967. Disponível em: < http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00322_01C.pdf>. Acesso em: 27 out. 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n.. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAUZOUR, D. *et al.* Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. **Nutrients**, v.2, p.1106-1131, 2010.

VIEIRA *et al.* Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal- SP, v. 33, n. 3, p. 888-897, set., 2011.

WU, C., *et al.* Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. **Meat Science**, 80, 662-667, 2008.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to ensure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, 114, 310-316, 2009.