

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ROOSLANY QUEIROZ BARREIRA

**COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.) DE COR ALARANJADA E ROXA**

PATO BRANCO

2024

ROOSLANY QUEIROZ BARREIRA

**COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.) DE COR ALARANJADA E ROXA**

**PHYSICAL-CHEMICAL COMPOSITION, PHENOLIC PROFILE AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ORANGE AND PURPLE PITANGA(*Eugenia uniflora* L.)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do
título de Mestre em Agronomia- Área de concentração:
Produção vegetal da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Orientador: Dr. Moeses Andrigo Danner

Coorientadora: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

PATO BRANCO

2024



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco**



ROOSLANY QUEIROZ BARREIRA

**COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PITANGA
(EUGENIA UNIFLORA L.) DE COR ALARANJADA E ROXA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 25 de Março de 2024

Dr. Moeses Andrigo Danner, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Edimir Andrade Pereira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Marcia Vizzotto, Doutorado - Embrapa

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/03/2024.

Dedico este trabalho aos meus pais, Roosevelt Barreira e Maria do Socorro Queiroz (*in memoriam*). A morte física não separa os laços de afeto, que seguem unidos além do tempo e do espaço! Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida e sabedoria, e por ter me proporcionado a oportunidade de vivenciar essa etapa em minha vida.

À minha família, em especial aos meus irmãos Roosevelt Junior, Roosman Barreira que sempre me apoiaram, principalmente durante os momentos mais difíceis. Meu muito obrigado pela paciência, pelo incentivo, pela força e especialmente pelo carinho. Amo vocês!

Aos meus tios Walfredo Barreira, Maria da Conceição, Joana Nascimento, Maria Tereza Moura, Maria Lucia Barreira, sou grata pelo o amor e carinho que todos têm por mim.

Ao meu tio Henrique Santos (*in memoriam*), uma das pessoas que mais me incentivou a seguir na caminhada acadêmica. Hoje não está presente no plano terrestre, porém seus ensinamentos levarei para a vida.

A minha prima Zaira Carvalho, por todas palavras de apoio e por sempre me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.

Aos meus irmãos do coração Mayra Fernandes e João Victor Santos, por se tornarem família ao longo dos anos de amizade. Amo vocês!

As minhas grandes amigas Marines Brito e Bruna Brasil, que mesmo de longe sempre arrumam um tempinho para mandar uma mensagem com palavras amigas que confortam o coração.

Ao meu orientador, professor Moeses Danner, por ser um mestre extremamente dedicando, e por toda sua paciência nas horas de orientações. Muito Obrigada!

A minha coorientadora, professora Tatiane Oldoni, por todo apoio e paciência nas horas de orientação.

Aos meus amigos do Pará Esmailson Moreira, Laise Oliveira, Larisse Medeiros, que foram minha rede de apoio em muitos momentos, sou grata pelo o carinho e amizade de cada um, vocês estão eternizados da minha história.

Aos amigos que fiz no PPGAG, Matheus Santos, Rafael Pertille, Emanuelli Perreira, pelo acolhimento e carinho em vários momentos durante o mestrado.

À todas as colegas da Central de Análises, em especial a Fernanda Knob por todo o auxílio e paciência durante a realização das análises laboratoriais.

Ao Laboratório Multiusuário Central de Análises da UTFPR –Campus Pato Branco.

À Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa (Chamada Pública N° 09/2021) – Programa Pesquisa Básica e Aplicada) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior – Brasil (CAPES) – pela concessão da bolsa durante todo o período do mestrado (código de financiamento 001).

À Secretaria do PPGAG pela cooperação, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos professores do PPGAG, e a todos os funcionários da UTFPR.

“Pedi e dar-se-vos-á; buscai e achareis; batei e abrir-se-vos-á; porque todo o que pede, recebe; e o que busca, acha; e a quem bate abrir-se-lhe-á” (Mateus, 7:7-8).

RESUMO

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma frutadeira nativa do Brasil, que contém elevadas concentrações de compostos bioativos e alta capacidade antioxidante. Essa espécie apresenta frutos de coloração que varia do amarelo-alaranjado, vários tons de vermelho até preto-arroxado. O presente trabalho teve como objetivo investigar as características físico-químicas, o perfil de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de dois genótipos de pitangueira, comparando frutos de cores alaranjada e roxa. As pitangas foram avaliadas em relação às suas características físico-químicas, em seguida os extratos etanólicos foram preparados para análise de concentração de compostos antocianinas totais, compostos fenólicos totais, determinação da atividade antioxidante por três métodos (DPPH, FRAP, ABTS), e do perfil fenólico por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados foram submetidos ao teste *t* para comparação das médias entre os frutos dos dois genótipos. As pitangas alaranjadas apresentaram maior acidez titulável e parâmetros de coloração (*L**, *b**, *C** e *h*). As pitangas roxas apresentaram maiores valores de pH, relação sólidos solúveis/acidez titulável, antocianinas totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método ABTS. Os compostos ácido gálico, ácido clorogênico, quercetina e rutina foram encontrados nas pitangas das duas cores, com concentração de 2,2 a 3,4 vezes maiores nas pitangas roxas. Além disso, três compostos (catequina, epicatequina e isoquercetina) foram presentes apenas nas pitangas roxas. Estes resultados indicam que pitanga roxa possui maior potencial bioativo e terapêutico, pois apresentou maior conteúdo de antocianinas e compostos fenólicos da classe dos flavonoides, polifenóis e taninos, refletindo em maior atividade antioxidante.

Palavras-chave: Myrtaceae; compostos bioativos; cromatografia; bioatividade.

ABSTRACT

The pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) is a fruit tree native to Brazil, which contains high concentrations of bioactive compounds and high antioxidant capacity. This species has fruits that vary in color from orange-yellow, various shades of red to purplish-black. The present work aimed to investigate the physicochemical characteristics, the profile of phenolic compounds and the antioxidant capacity of two pitangueira genotypes, comparing fruits with orange and purple cores. The pitangas were evaluated in relation to their physicochemical characteristics, then the ethanolic extracts were prepared for analysis of concentration of total anthocyanin compounds, total phenolic compounds, determination of antioxidant activity by three methods (DPPH, FRAP, ABTS), and the phenolic profile using high-performance liquid chromatography, with a diode array detector (HPLC-DAD). The results were tested to compare the means between the fruits of the two genotypes. Orange pitangas showed higher titratable acidity and color parameters (L^* , b^* , C^* and h). Purple pitangas showed higher pH values, soluble solids/titratable acidity ratio, total anthocyanins, total phenolic compounds and antioxidant activity by the ABTS method. The compounds gallic acid, chlorogenic acid, quercetin and rutin were found in pitangas of both colors, with concentrations 2,2 to 3,4 times higher in purple pitangas. Furthermore, three compositions (catechin, epicatechin and isoquercetin) were presented only in purple pitangas. These results indicate that purple pitanga has greater bioactive and therapeutic potential, as it presented a higher content of anthocyanins and phenolic compounds from the class of flavonoids, polyphenols and tannins, resulting in greater antioxidant activity.

Keywords: myrtaceae; bioactive compounds; chromatography; bioactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Amostragem de <i>Eugenia uniflora</i> L. nas cores alaranjada (A) e roxa (B). UTFPR, Pato Branco – PR, 2022.	23
Figura 2 – Extratos da polpa de <i>Eugenia uniflora</i> L. das cores alaranjada (A) e roxa (B) após processo de liofilização. UTFPR, Pato Branco – PR, 2023.	25
Figura 3 - Cromatograma do mix de padrões (20 mg L¹) utilizado na identificação e quantificação por CLAE-DAD: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) ácido vinílico, (5) ácido cafeico, (6) epicatequina, (7) ácido cumárico, (8) ácido ferrulico, (9) rutina, (10) isoquercetina, (11) miricetina, (12) quercetina, (13) ácido cinamico, (14) kaempferol.....	30
Figura 4 -Cromatograma dos extratos de pitanga alaranjada, apresentando os sinais: (1) ácido gálico (2) ácido clorogênico (3) Rutina (4) Quercetina.....	36
Figura 5 - Cromatograma dos extratos de pitanga roxa, apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) epicatequina, (5) rutina, (6) isoquercetina, (7) quercetina.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análises físico-químicas, análise de cor e antocianinas de <i>E. uniflora</i> L. nas cores alaranjada e roxa.	31
Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos etanólicos das pitangas de cor alaranjada e roxa, obtida pelos ensaios DPPH, FRAP e ABTS.....	34
Tabela 3 - Compostos fenólicos identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiências.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EFP	Extratos de frutos de pitanga
ET	Equivalente de Trolox
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
pH	Potencial Hidrogeniônico
Tr	Tempo de Retenção
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

λ_{max}	Máximo de absorção
R^2	Coefficiente de determinação
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	17
3.2	Compostos bioativos da pitanga	18
3.3	Atividade antioxidante da pitanga	19
3.4	Métodos de avaliação da atividade antioxidante	20
3.4.1	Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	20
3.4.2	Método sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).....	21
3.4.3	Método da redução do ferro FRAP (<i>Ferric Reducing Ability Power</i>).....	21
3.5	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Coleta dos frutos	23
4.2	Análise de cor dos frutos	24
4.3	Análises físico-químicas das pitangas	24
4.4	Liofilização dos frutos e preparo dos extratos	25
4.5	Determinação de antocianinas totais	26
4.6	Teor dos compostos fenólicos totais	27
4.7	Determinação das atividades antioxidantes dos extratos de pitanga	27
4.7.1	Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	28
4.7.2	Método sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).....	28
4.7.3	Método de redução do ferro FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	28
4.8	Identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).....	29
4.9	Análise estatística.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Características físico-químicas, análise de cor e antocianinas das pitangas	31
5.2	Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	33

5.3	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).....	36
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNDICES	46

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira possui uma grande diversidade de espécies, dentre as quais se destacam as da família Myrtaceae, que tem representantes de expressiva importância nos biomas brasileiros. Trata-se também de uma das famílias botânicas mais conhecidas, com frutos apropriados para a industrialização, potencial biotecnológico e presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, alguns deles com utilidade na medicina popular no tratamento de doenças infecciosas, distúrbios gastrointestinais e cardiovasculares (CAMLOFSKI, 2008; RUFINO et al., 2010).

Nesse táxon, destaca-se o uso da *Eugenia uniflora* L., conhecida popularmente como pitanga, nome derivado do vocabulário indígena tupi, onde pi'tãg se traduz como “vermelho” ou “profundo vermelho”, coloração que o fruto é mais encontrado. É uma planta nativa do Brasil, Uruguai, Guiana Francesa e Suriname, sendo altamente adaptada a diversos biomas (LIRA JUNIOR et al., 2007; WILSON et al., 2009).

A *E. uniflora* L. tem uma vasta utilidade, desde ornamental, frutífera a medicinal, onde o chá das suas folhas e frutos são amplamente utilizados como fitoterápicos. Plantas medicinais têm atraído a atenção da comunidade científica, pois muitas substâncias encontradas nestes vegetais têm demonstrado potencial antioxidante capaz de combater os radicais livres. Dessa forma, nota-se que a pitangueira apresenta diversas atividades terapêuticas, destacando-se as ações anti-inflamatória, hipotensora, hipoglicemiante, antipirética e antibacteriana (QUEIROZ et al., 2015).

Nos frutos, as pitangas, foram identificados teores elevados de fitoquímicos, os quais possuem propriedades antioxidantes e nutracêuticas. Além disso, a espécie apresenta ampla variação na coloração da epiderme do fruto, podendo variar nos tons de amarelo-alaranjado até vermelho e preto-arroxeadado, revelando uma diversidade de compostos que apresentam potencial para serem utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica (SILVA et al., 2014).

Considerando a atividade de bioativos das frutas nativas, a pitanga se sobressai por apresentar alto potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos, incluindo-se ácido gálico, clorogênico, cafeico, miricetina e quercetina. Além disso, os frutos também apresentam carotenoides e antocianinas entre outros compostos os quais proporcionam benefícios a saúde humana (KARWOWSKI, 2012).

Diante desse contexto, a hipótese testada neste trabalho é de que pitangas com coloração distintas da epiderme (alaranjada e roxa) apresentam também diferenças na composição química e, em consequência, no potencial antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar as características físico-químicas, o perfil de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de dois genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) com frutos de cores alaranjada e roxa.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar as características físicas e físico-químicas de pitangas de duas cores - alaranjada e roxa;
- Avaliar o teor de antocianinas monoméricas totais nos extratos das pitangas pelo método do pH diferencial;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos das pitangas pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de pitangas pelos métodos do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e redução do ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*);
- Identificar e quantificar via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) os compostos fenólicos presentes nos extratos de pitangas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

A pitanga é originária da região que se estende desde o Brasil Central até o Norte da Argentina (FIUZA et al., 2008). Em outros países, recebe denominações como: arrayán e nangapiri, na Argentina; Brazil cherry, Surinam cherry, Cayenne cherry, Florida cherry e pitanga, nos países de língua inglesa; cereza de Surinam, grosella de México e pitanga, em países de língua espanhola; e cerisier de Cayenne e cerisier de Surinam, em países de língua francesa (LIRA JUNIOR et al., 2007). Sua taxonomia segue: Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae); Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae); Ordem: Mytales; Família: Myrtaceae; Gênero: *Eugenia*; e Espécie: *Eugenia uniflora* L. (CARVALHO, 2006).

A cultura da pitangueira pode apresentar características extrativistas voltadas para o consumo do fruto in natura ou para o preparo de sucos. Já o seu cultivo comercial está concentrado principalmente nos estados de Pernambuco e Bahia, que possuem as maiores áreas de plantio - cerca de 300 hectares -, além de comportarem indústrias de processamento de polpas (LIRA JUNIOR et al., 2007). De acordo com o último censo Agropecuário (2017), esses estados permanecem sendo os maiores produtores, com o Pernambuco produzindo 138 toneladas e Bahia, 13 toneladas, mantendo a região Nordeste como um importante polo de produção do fruto (IBGE, 2017).

No Brasil, a única cultivar comercial disponível é a “Tropicana”, desenvolvida e lançada pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Esse material tem recomendações específicas para o plantio na Zona da Mata do Pernambuco, tendo origem de uma população de plantas coletadas em Bonito - PE e selecionada na coleção de germoplasma da IPA (LIRA JUNIOR et al., 2007).

Tratando sobre o hábito de crescimento, a pitangueira é naturalmente encontrada como um arbusto denso e ramificado, com 2 a 4 m de altura, mas também são conhecidas pequenas árvores de 6 a 9 m de altura, com copa arredondada medindo 3 a 6 m de diâmetro (BEZERRA, LIRA JUNIOR e SILVA JUNIOR, 2018). Seu desenvolvimento é ideal em regiões de clima tropical quente e úmido, apesar de também se adaptarem em climas temperados e subtropicais e em diferentes altitudes; ademais, desde que haja condições mínimas de umidade no solo, a planta pode se desenvolver bem (LORENZI, 2002).

A espécie detém pequenas flores brancas, hermafroditas, pubérulas, axilares e isoladas - ou em grupos de 3 a 4 unidades, ou em panículas fasciculadas. A floração acontece durante os meses de agosto a novembro, enquanto a maturação dos frutos é de outubro a janeiro. Suas

sementes são consideradas recalcitrantes, medindo de 0,5 a 0,6 cm de diâmetro. A dispersão de frutos e sementes ocorre pela gravidade e por animais específicos, como algumas aves e mamíferos. Já a polinização é realizada por abelhas (CARVALHO, 2006).

O fruto é do tipo baga, globoso, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro. Quando maduros, sua coloração pode variar entre os tons alaranjados a vermelho, chegando até em um roxo escuro; além de um aroma intenso característico e sabor equilibrado entre o doce e ácido. Os frutos são compostos de 77% de polpa e 23% de semente, sendo ricos em vitaminas A, C e do complexo B, apresentando também cálcio, ferro e fósforo (BICAS et al., 2011; CARVALHO, 2006; VIZZOTTO, 2008), o que indica sua alta bioatividade. Além dessas características, também se pode citar a presença de antocianinas, flavonóis e carotenoides, determinando as capacidades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (FIDELIS et al., 2020).

3.2 Compostos bioativos da pitanga

Os fitoquímicos da família Myrtaceae são amplamente reconhecidos e caracterizados pela presença de taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e derivados do floroglucinol. Tanto as folhas como os frutos da pitanga possuem vários constituintes importantes, logo, se o consumo do fruto e a utilização das folhas forem estimulados, podem proporcionar efeitos benéficos à saúde (CRUZ e KAPLAN, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

A pitangueira é conhecida pela grande variedade de usos na medicina popular, apresentando inúmeras propriedades terapêuticas. Suas folhas vêm sendo largamente utilizadas em infusões para o tratamento de diarreias, hipertensão, reumatismo, doenças hepáticas e do sistema digestivo, febre, dor de garganta, entre outras enfermidades (FIDELIS et al., 2022; MOURA et al., 2018).

No extrato das folhas de *E. uniflora* L., foram constatadas oito substâncias, sendo: um esterol: β -sitosterol; dois triterpenos: ácido betulínico e centelosídeo; três flavonóides: miricetrina, miricetina (3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnopiranosídeo) e miricetina (3-O- β -D-glucopiranosídeo); dois megastigmanes: actinidioionosídeo e (6S,9R)-roseosídeo. Também se verificou atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus* dos flavonóides isolados miricetrina e miricetina (SAMY et al., 2018).

Com relação aos fitoquímicos detectados na pitanga, é observado que estes podem ser influenciados por fatores bióticos e abióticos, como: localização geográfica, manejo filotécnico, estádios de maturação e diversidade genética. Em termos gerais, frutos imaturos tendem a ter maiores concentrações de compostos fenólicos e consequentemente, maiores atividades

antioxidantes. O mesmo é identificado em plantios com maiores densidades de plantas (MOURA et al., 2011).

Quanto à diversidade genética dentro da espécie, observa-se que a cor da epiderme do fruto também pode influenciar sua composição bioquímica. Em pitangas alaranjadas, os carotenoides são os principais compostos encontrados. Na fruta vermelha, há uma combinação de carotenoides, com predominância do licopeno; além das antocianinas, que são responsáveis pela cor do fruto. Nas pitangas roxas, predominam as antocianinas, como a cianidina-3-glicosídeo, que é o composto majoritário, a cianidina-3-O- β -glicopiranosídeo e a delphinidina-3-O- β -glicopiranosídeo. Em adição, podem ser localizados outros constituintes bioativos, como: miricetina, kampferol, a quercetina e seus derivados (BAGETTI et al., 2011; EINBOND et al., 2004; FIDELIS et al., 2022; HOFFMANN-RIBANI, HUBER e RODRIGUEZ, 2009; SIVAKUMAR, SULTANBAWA e NETZEL, 2022; SOUTO, 2017).

Ademais, há outros compostos de interesse na pitanga, como os voláteis, predominantemente formados por monoterpenos (75,3%), abrangendo o trans- β -ocimene (36,2%), cis-ocimene (13,4%), β -ocimene (15,4%) e o β -pinene (10,3%) (OLIVEIRA et al., 2006). É importante observar que frutos com a coloração roxa ainda podem se destacar em outras características importantes, como: elevados valores de pH, sólidos solúveis totais e carboidratos. Da mesma forma, foram detectados maiores teores de ácidos graxos, especialmente os ácidos oleicos (FIDELIS et al., 2022; BAGETTI et al., 2011). Em relação à atividade antioxidante da pitanga de diversas cores, observa-se que, normalmente, a pitanga roxa também se sobressai em relação aos frutos de outras cores (BAGETTI et al., 2011; FIDELIS et al., 2022).

3.3 Atividade antioxidante da pitanga

Alguns estudos, como o de Bagetti et al. (2011), demonstraram a atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos de pitangas das cores vermelha, roxa e alaranjada pelo método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), encontrando valores de 14, 31 e 14 μmol de trolox. g^{-1} , respectivamente. O trabalho concluiu que as pitangas são uma fonte rica em polifenóis e que a pitanga roxa, em geral, tem maior capacidade antioxidante, sendo sugerido que isto se deve provavelmente a maior presença de antocianinas.

Utilizando o método de redução do ferro – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) para analisar a atividade antioxidante das polpas de pitangas das cores vermelha, roxa e alaranjada, Bagetti et al. (2011) obtiveram valores equivalentes a 1,1, 3,1 e 1,4 mmol de trolox/100. g^{-1} , respectivamente. Em um estudo realizado por Denardin et al. (2015) com pitangas

das cores roxa, alaranjada e vermelha usando um ensaio de FRAP, foram encontrados valores de 81,62, 33,17 e 27,43 $\mu\text{mol FeSO}_4\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Os resultados dos estudos revelam que as pitangas roxas demonstraram maiores concentrações de fenólicos, tendo assim maior atividade antioxidante.

Analizando os extratos brutos e extratos fenólicos de polpas de pitangas pelo método do sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), Zola (2018) obteve valores de 0,17 e 8,83 $\mu\text{mol trolox}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Já Rodrigues et al. (2016), abordando os extratos etanólicos do fruto, encontraram o valor de 8,83 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$. Os resultados dessas pesquisas demonstraram que os frutos da *E. uniflora* L. são ricos em substâncias que contribuem para a atividade antioxidante, antimicrobianas e sensoriais, indicando que o seu consumo regular pode contribuir para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

3.4 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

No cenário atual, há uma ampla variedade de abordagens para a avaliação da atividade antioxidante de alimentos e produtos naturais. Com o objetivo de identificar um método de fácil reprodução, rápido e que demande quantidades mínimas de reagentes, além de serem insensíveis às propriedades físicas dos compostos (OLDONI, 2010), os métodos espectrofotométricos apresentam fundamentos, mecanismos de ação e formas distintas de expressar os resultados. Nesse contexto, é recomendável optar por métodos amplamente aceitos, validados e padronizados já presentes na literatura.

Os métodos DPPH, ABTS e FRAP têm sido amplamente utilizados em várias pesquisas sobre *Eugenia uniflora* L. Denardin et al. (2015) conduziram um estudo avaliando a capacidade antioxidante e compostos bioativos de quatro frutas nativas, incluindo a pitanga. Eles realizaram ensaios de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) e ensaio de hidrato de 2,2-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). Rodrigues et al. (2016) investigaram a capacidade antioxidante por meio de extratos etanólicos de frutos de *E. uniflora* L. pelo ensaio ABTS, alcançando resultados que demonstraram sua alta bioatividade.

3.4.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A técnica de eliminação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é amplamente utilizada em função de sua simplicidade, estabilidade na ausência de luz e aplicabilidade. Foi desenvolvida por Blois (1958) e usava uma molécula similar, denominada

α -difenil- β -picrilhidrazila. Posteriormente, essa técnica foi modificada por Brand-Williams, Cuvelie e Berset (1995) para simplificar os resultados. Desde então, tem sido frequentemente adaptada, especialmente em relação ao uso de solventes, tempos necessários e leituras de absorbância (OLIVEIRA, 2015).

O DPPH atua como um sequestrador de radicais livres, oferecendo vantagens significativas em termos de rapidez (SUCUPIRA et al., 2012). Para Moon e Shibamoto (2009), esse método é conduzido em laboratórios para determinar teores de antioxidantes em amostras puras ou misturas, sendo aplicado em até 90% dos estudos. A substância 2,2-difenil-1-picrilhidrazil é um radical orgânico nitrogenado que apresenta uma coloração violeta. Quando há a presença de antioxidantes na amostra, ocorre uma alteração na coloração, a qual pode ser mensurada por meios espectrofotométricos UV/visível, geralmente entre 515 e 520 nm (OLIVEIRA, 2015).

3.4.2 Método sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

A técnica de ABTS, também conhecida como *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC), faz uso do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), um radical livre, sintético, estável, catiônico e cromóforo. Este radical apresenta um pico máximo de absorção em 414 nm. De maneira similar ao método de DPPH, a técnica utiliza a espectrofotometria para leituras (OPITZ, 2017). Uma vantagem significativa dessa técnica reside na sua aplicabilidade tanto em fases aquosas quanto lipídicas (SCHAICH, TIAN e XIE, 2015).

A metodologia se baseia na captura do cátion do radical, o que leva a uma diminuição na absorbância que pode ser monitorada ao longo do tempo. Esse método apresenta boa estabilidade e reprodutibilidade e pode testar a atividade antioxidante de extratos vegetais e compostos puros, permitindo a criação de um gráfico que representa a capacidade antioxidante presente na amostra e o seu potencial de neutralização do composto (SUCUPIRA et al., 2012).

3.4.3 Método da redução do ferro FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*)

O método de redução do íon de ferro, conhecido como FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) com o objetivo inicial de quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma. Esse ensaio proporciona resultados rápidos e reprodutíveis, fundamentado na redução do complexo ferritripiridiltiazina (Fe^{3+} - TPTZ) para

ferroso tripiridiltiazina (Fe^{2+} - TPTZ) em meio ácido, por meio das substâncias antioxidantes presentes.

Durante essa reação, há uma variação na intensidade da cor, passando de um tom azul claro para um azul intenso, que é medido através de uma absorção máxima em 593 nm. Além disso, é importante ressaltar que este método não é capaz de detectar todos os antioxidantes presentes em matrizes complexas. No entanto, é amplamente utilizado em estudos relacionados a plantas e alimentos, muitas vezes combinado com outros ensaios (APAK et al., 2004).

3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Várias técnicas analíticas vêm sendo utilizadas para a identificação, quantificação e composição de diversos compostos presentes na natureza, sendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no inglês HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), a mais comumente utilizada, quando se requer pureza, rendimento e produtividade. A separação dos componentes na cromatografia se baseia nas diferentes interações físicas e químicas desses com as fases móvel e estacionária (COLLINS, 2007).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência pode ser definida como uma técnica de separação na qual os componentes a serem analisados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, denominada fase estacionária - e outra denominada fase móvel, onde um fluido que percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2016).

A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas com alta resolução, eficiência e sensibilidade de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficácia (AMORIM, 2019). Tal técnica vem sendo utilizada na identificação e quantificação de compostos fenólicos de frutos e folhas da pitangueira (MIGUES et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos

Foram selecionadas duas plantas que produziam frutos de colorações alaranjadas e roxas localizadas na Universidade Tecnológica do Paraná (UTFPR) - *campus* Pato Branco, sob as coordenadas 26° 10' 34" S e 52° 41' 22" W. Nessa região, o clima característico é do tipo Cfa subtropical (Classificação de Köppen) (ALVARES et al., 2013), com temperaturas médias anuais entre 14,1 a 15 °C e precipitações médias em torno de 2000,1 a 2200 mm ao ano (NITSCHKE et al., 2019). O solo é classificado como latossolo vermelho distroférico, de relevo ondulado e textura argilosa (DOS SANTOS et al., 2018).

Os frutos foram coletados quando atingiram o ponto de maturação fisiológica, onde a coloração da epiderme era intensa (Figura 1). A coleta das pitangas de tonalidade alaranjadas ocorreu durante o mês de outubro de 2022, enquanto as pitangas de coloração roxa foram colhidas entre os dias 10 de novembro a cinco de dezembro de 2022. As pitangueiras estavam distantes à 6,0 metros uma da outra.

Figura 1 - Amostragem de *Eugenia uniflora* L. nas cores alaranjada (A) e roxa (B). UTFPR, Pato Branco – PR, 2022.



Fonte: Autoria própria (2022).

A colheita foi realizada manualmente em todas as porções da planta - central, inferior e superior -, a fim de obter uma amostra representativa e para possibilitar a posterior seleção.

Os frutos que estavam morfologicamente saudáveis e totalmente maduros foram levados para o Laboratório de Horticultura da instituição referida anteriormente, onde foram submetidos à higienização por imersão em água adicionada de uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 5% por 15 minutos, e lavados novamente em água destilada e secos com papel absorvente para retirada do excesso de umidade.

Posteriormente, as amostras foram congeladas a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ultra freezer (modelo Indrel Scientific CPH 45 D). Optou-se pelo congelamento do material devido ao pequeno número de frutos obtidos em cada coleta, sendo necessário acumular a quantidade necessária para conduzir as análises que se sucederam, onde as amostras utilizadas partiram desses frutos congelados.

4.2 Análise de cor dos frutos

Para a análise de cor, foram utilizadas cinco repetições de 15 frutos de cada genótipo. Para cada repetição, foi feita uma triplicata de cinco frutos. Em seguida, as amostras congeladas foram adicionadas a uma cubeta de vidro, onde foi inserido o colorímetro (modelo CR-400) para a realização das leituras diretas dos valores pelo sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*). Nesse sistema, o L^* (luminosidade) varia de 0 (preto) a 100 (branco); a^* indica a variação do verde (-) ao vermelho (+); b^* mostra a variação do azul (-) ao amarelo (+); C^* é o croma; e o h é ângulo da tonalidade. A calibração do aparelho foi realizada por meio de placas de cerâmica, utilizando-se o iluminante D_{65} .

4.3 Análises físico-químicas das pitangas

Utilizou-se 75 frutos de cada genótipo, os quais foram divididos em cinco repetições de 15 frutos cada para a avaliação de oito características físico-químicas, sendo elas: diâmetro equatorial, peso total do fruto, peso das sementes, rendimento de polpa, pH, teor de sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT) e relação (SS/AT).

As características físicas dos frutos foram obtidas por meio da medição com paquímetro e balança digital analítica. Para as determinações químicas, seguiu-se a metodologia descrita pelo instituto Adolfo Lutz (2008). O pH foi mensurado diretamente sob a polpa concentrada e congelada, utilizando pHmetro (modelo MA522[®]). O teor de SS foi avaliado com o auxílio de um refratômetro digital portátil (modelo PALM-1 Pocket[®]) com os valores expressos em $^{\circ}\text{Brix}$. A AT foi determinada com a polpa diluída em água destilada (10 mL de polpa e 90 mL de água destilada) pelo método de volumetria, titulada com NaOH ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$) até o ponto de viragem de cor, usando indicador fenolftaleína. Os resultados foram expressos

em % de ácido cítrico. A relação (SS/AT) foi obtida através da relação dos valores destas duas variáveis de cada amostra.

4.4 Liofilização dos frutos e preparo dos extratos

Os frutos foram liofilizados utilizando um liofilizador (modelo L101) composto por câmara e tampa em acrílico, sistema a vácuo e bandejas de aço inox. Os frutos congelados foram distribuídos em quatro bandejas para serem liofilizados. O processo de liofilização durou aproximadamente 72 horas. Após os frutos serem liofilizados, armazenou-os em um dessecador de vidro com sílica até o momento do preparo dos extratos.

O procedimento para obter os extratos das pitangas (Figura 2) envolveu o uso dos frutos liofilizados e triturados. As sementes foram descartas após o processo de liofilização, mantendo apenas a polpa das pitangas. Foram utilizados 30 g dos frutos liofilizados e triturados e 600 mL do solvente etanol:água 80:20 (v/v), usando o método de extração exaustiva sólido-líquido, adaptada de Barnes et al. (2009).

Figura 2 – Extratos da polpa de *Eugenia uniflora* L. das cores alaranjada (A) e roxa (B) após processo de liofilização. UTFPR, Pato Branco – PR, 2023.



Fonte: Autoria própria (2023).

A extração ocorreu durante quatro dias em mesa agitadora, onde a cada 24 horas o solvente foi repostado totalmente. Passado esse período, os extratos foram filtrados utilizando

filtro de papel sobre um funil e armazenados em frascos de âmbar para refrigeração em geladeira. Posteriormente, os extratos combinados passaram pelo processo de concentração pelo evaporador rotativo (modelo IK RV 10), a fim de remover todo o solvente orgânico. Em seguida, foram congelados e liofilizados para eliminação da água.

4.5 Determinação de antocianinas totais

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas pelo método do pH-diferencial, segundo descreve Giusti e Wrolstad (2001), a partir da utilização de duas soluções tampões, das quais a primeira trata-se de uma solução de cloreto de potássio concentração $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ com $\text{pH} = 1,0$, e a segunda, uma solução de acetato de sódio na concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ com $\text{pH} = 4,5$, de acordo com o valor de fator de diluição ($\text{FD} = 10$). Assim, foram adicionados 1,8 mL de cada tampão e 0,2 mL de extrato de pitangas na concentração de 2000 ppm, homogeneizados em agitador vórtex e deixados em equilíbrio a temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 minutos. Ao término desse período, a absorbância foi medida no comprimento de onda do visível no qual a absorbância é máxima, sendo de 510 nm, e a 700 nm para corrigir o espalhamento de luz produzido por uma possível turbidez da amostra. Foi utilizada água destilada como branco analítico e as medidas foram feitas em triplicatas para cada amostra.

Determinou-se a absorbância resultante (A) pela Equação (1) a partir das leituras das soluções obtidas.

Equação (1):

$$A = (A_{520} - A_{700})\text{pH}_{1,0} - (A_{520} - A_{700})\text{pH}_{4,5}$$

O cálculo da concentração das antocianinas nos extratos foi feito de acordo com a Equação (2):

Equação (2):

$$C = \frac{(A \times \text{FD} \times \text{MM} \times 1000)}{(\Sigma \times b)}$$

Sendo:

C = concentração de antocianinas em mg.L^{-1} ;

A = absorbância calculada pela Equação (1);

FD = fator de diluição utilizado;

MM = massa molar do padrão;

Σ = coeficiente de absortividade molar do padrão;

b = caminho óptico.

O cálculo foi realizado como descreve Lee, Durst e Wrolstad (2005), levando em consideração a cianidina-3-glicosídeo com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol e coeficiente de absortividade molar (ϵ) de 26.900.

4.6 Teor dos compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos de pitanga, foi realizada por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, seguindo o protocolo descrito por Singleton *et al.* (1999), com algumas modificações feitas para atender às necessidades específicas do estudo. O método consiste na mistura em tubos de ensaio 0,5 mL extrato das pitangas na concentração de 2000 ppm (para ambos os extratos foi utilizado a mesma concentração), com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração de 4%. Os tubos contendo a mistura foram deixados incubados no escuro durante um período de duas horas a temperatura ambiente. Na sequência, foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro a 740 nm (modelo UV-Vis lambda 25, Perkin Elmer). O branco foi realizado utilizando 0,5 mL de etanol: água 80:20 (v/v) no lugar do extrato etanólico para zerar o espectrofotômetro.

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais, foi elaborada uma curva analítica utilizando o ácido gálico como substância de referência, com os resultados apresentados em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra (mg EAG.g^{-1}). As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:50 (v/v) em um solvente com a mesma concentração utilizada durante o processo de extração, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra (mg EAG g^{-1}).

4.7 Determinação das atividades antioxidantes dos extratos de pitanga

Foram utilizados três métodos (DPPH, ABTS e FRAP) para quantificação da atividade antioxidante dos extratos de pitangas alaranjadas e roxas.

4.7.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A determinação da capacidade antioxidante pelo método sequestro de radical DPPH foi adaptado de Brand-Williams, Cuvelie e Berset (1995). Esse método consiste na adição de 0,5 mL dos extratos de pitanga na concentração 500 ppm cor (roxa) e 750 ppm para cor (laranjada), juntamente com 3mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mmol.L⁻¹. Na sequência a mistura, foi incubada na ausência de luz à temperatura ambiente, por um período de 1 hora. Posteriormente, foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro (modelo UV-Vis lambda 25, Perkin Elmer) a 517 nm, utilizando etanol para o branco analítico. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica usando trolox como padrão, e os resultados foram expressos em µmol de trolox por grama da amostra (µmol trolox g⁻¹).

4.7.2 Método sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

A metodologia para determinar a atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS, foi realizada conforme Re et al. (1999), com algumas modificações. Inicialmente, o cátion radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL na concentração ABTS 7 mmol. L⁻¹ com 8,8 µL de persulfato de potássio na concentração de 140 mmol. L⁻¹, incubados sem a presença de luz por um período de 16 horas, em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução foi diluída em etanol até absorbância de aproximadamente 0,700 ± 0,200 a 734 nm.

O procedimento consistir na adição de 0,03 mL dos extratos de pitanga na concentração de 2000 ppm (ambos os extratos foram utilizados as mesmas concentrações), juntamente com 3 mL do radical formado, tendo como branco etanol leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (modelo UV-Vis lambda 25, Perkin Elmer) a 734 nm após seis minutos de reação. Para a quantificação foi construída uma curva analítica utilizando o antioxidante trolox como padrão, os resultados foram expressos em µmol de trolox por grama de amostra (µmol g⁻¹).

4.7.3 Método de redução do ferro FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para determinar a atividade antioxidante pelo método redutor de ferro (FRAP) foi adaptada de Benzie e Strain (1996). Inicialmente, o reagente FRAP foi preparado a partir da mistura de 25 mL de tampão de acetato 0,3 mol.L⁻¹, 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) na concentração de 10 mmol L⁻¹, 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa na concentração de 20 mmol.L⁻¹, preparado apenas na hora da utilização da análise para evitar a oxidação.

O procedimento consiste na mistura de 0,1 mL dos extratos de pitangas na concentração de 2000 ppm (ambos os extratos foram utilizados as mesmas concentrações), e 3 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e deixada sob abrigo de luz, e mantida em banho maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida foi realizado a leitura da absorbância em espectrofotômetro (modelo UV-Vis lambda 25, Perkin Elmer) a 595 nm. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando sulfato ferroso como padrão, e os resultados foram expressos em μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4\cdot\text{g}^{-1}$). As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em solvente na mesma concentração utilizado na extração.

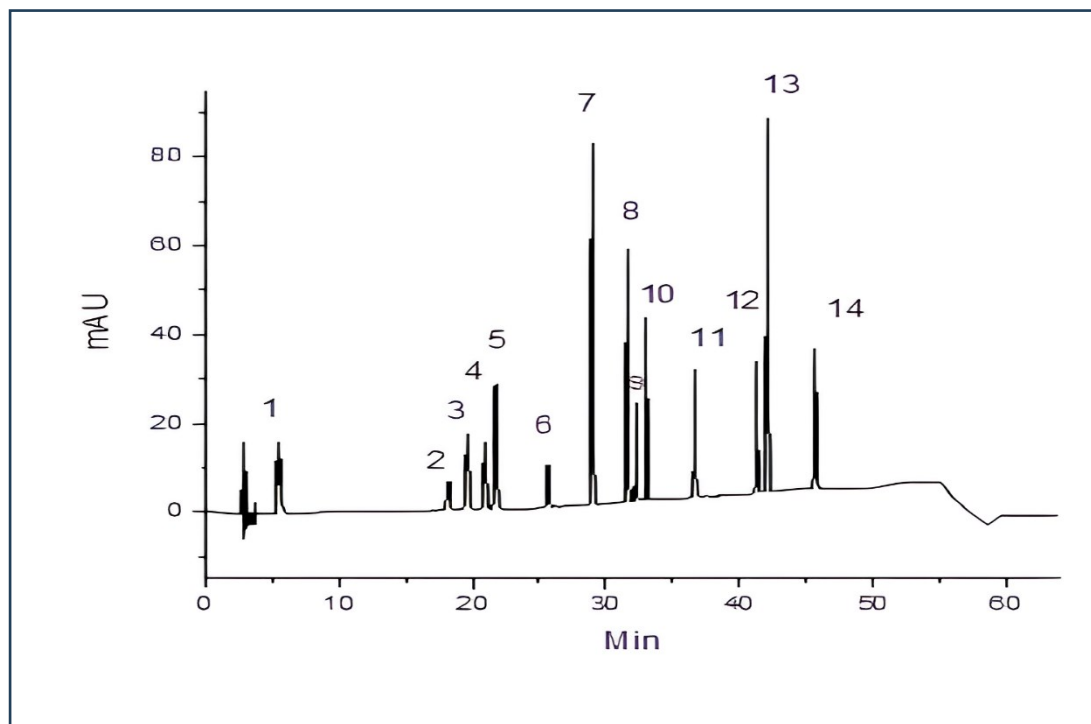
4.8 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de pitanga, foi utilizado o método que consiste em um sistema CLAE-DAD, Varian modelo 920-LC, com coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 e fase reversa, com detector com arranjo de fotodiodos, mantida a uma temperatura constante de 30 °C. A fase móvel utilizada constitui em uma mistura de ácido acético:água (2:98 v/v) (solvente A) e ácido acético:acetonitrila:água (2:40:58 v/v) (solvente B). A taxa de fluxo foi de 1 mL min⁻¹ no modo gradiente, com início em 5% de B a 0 minutos, 25% de B em 20 minutos, 85% de B em 40 minutos, 85% de B em 45 minutos, 95% B em 48 minutos, 95% de B em 51 minutos, 5% de B em 54 minutos, 5% de B em 64 minutos, com tempo de corrida de 64 minutos. Os extratos foram injetados e os compostos foram reconhecidos pela comparação do tempo de retenção e absorção dos aspectos dos padrões na faixa ultravioleta.

As amostras foram preparadas dissolvendo 10 mg do extrato dos frutos de pitanga alaranjada e roxa, em 1 mL de metanol grau cromatográfico. Depois de solubilizadas, as amostras foram filtradas utilizando filtro de seringa celulose regenerada de 25 mm de diâmetro e 0,45 μm de tamanho de poro e na sequência foram injetadas

Para identificar e quantificar a concentração total de compostos fenólicos nas amostras, foi usado um mix de padrões para identificar e medir a presença desses compostos através da técnica CLAE-DAD. Para esse fim, foi realizada a injeção de 14 padrões (Figura 3), sendo eles: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cumárico, epicatequina, isoquercetina, rutina, miricetina, ácido cinâmico, quercetina, kaempferol. Foram estabelecidas curvas de calibração com seis pontos (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 3 - Cromatograma do mix de padrões (20 mg L⁻¹) utilizado na identificação e quantificação por CLAE-DAD: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) ácido vinílico, (5) ácido cafeico, (6) epicatequina, (7) ácido cumárico, (8) ácido ferrulico, (9) rutina, (10) isoquercetina, (11) miricetina, (12) quercetina, (13) ácido cinâmico, (14) kaempferol.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.9 Análise estatística

Para a comparação entre pitangas alaranjadas e roxas, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* independente ($p < 0,05$), ou o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade da variância foram violados nos testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors, respectivamente. Além disso, foi calculado o tamanho do efeito pela estatística D de Cohen, para representar a magnitude da diferença entre as médias das pitangas de duas cores. Estas análises foram realizadas em linguagem R® (R CORE TEAM, 2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas, análise de cor e antocianinas das pitangas

Foram observadas diferenças significativas entre as pitangas alaranjadas e roxas para alguns dos parâmetros químicos. As pitangas alaranjadas apresentaram maior acidez titulável e maiores índices de coloração L* (maior luminosidade ou brilho), b* (maior teor de amarelo) C* (croma) e h (ângulo da tonalidade). Enquanto que as pitangas roxas tiveram maior pH, relação SS/AT e teor de antocianinas (Tabela 1). Não houve diferenças significativas entre as pitangas das duas cores para nenhum dos parâmetros físicos (diâmetro equatorial, peso do fruto, peso da semente, rendimento de polpa). É relevante observar que para todas as variáveis citadas com diferenças significativas pelo teste t, o tamanho do efeito calculado pelo D de COHEN foi considerado grande, indicando uma ampla diferença entre as médias das pitangas de duas cores.

Tabela 1- Análises físico-químicas, análise de cor e antocianinas de *E. uniflora* L. nas cores alaranjada e roxa.

Variáveis	Pitanga Alaranjada	Pitanga Roxa	D de COHEN
Diâmetro (mm)	17,05 ^{ns}	17,64	0,77
Peso Fruto (g)	2,81 ^{ns}	2,90	0,51
Peso Semente (g)	0,73 ^{ns}	0,78	0,83
Rendimento de polpa (%)	73,91 ^{ns}	72,93	0,58
pH	2,96b	3,34a	1,72
Sólidos Solúveis (°Brix)	8,96 ^{ns}	12,60	1,77
AT (g áci. cítrico 100 mL ⁻¹)	1,22 a	0,90 b	1,75
SS/AT	7,36b	14,06 a	1,79
L*	17,93 a	12,49 b	1,55
a*	15,04 ^{ns}	14,18	0,26
b*	16,67 a	7,99 b	1,53
C*	24,75 a	16,90 b	1,45
h	51,95 a	26,66 b	1,22
Antocianinas (mg 100 g ⁻¹)	8,96 b	20,98 a	1,82

NS: não significativo; AT: acidez titulável. Médias seguidas de letras diferente na mesma linha se diferiram significativamente ao teste t a nível significância ($p < 0,05$). D de Cohen: 0.0 a 0.19 efeito muito pequeno; 0.20 a 0.49 efeito pequeno; 0.50 a 0.79 efeito médio; >0.80 efeito grande (COHEN, 1988).

De acordo com os resultados, no que diz respeito às avaliações físicas, se observou que nenhum dos parâmetros físicos se diferiram estatisticamente, isso se deve a semelhança

física entre as pitangas alaranjadas e roxas. Esses resultados foram próximos ao encontrados por Pio et al. (2005) onde avaliaram as características físico-química de frutos de pitangueira em função de sua disposição na planta.

A determinação do pH é uma medida importante para caracterizar a atividade de enzimas, a deterioração do alimento quanto ao crescimento de microorganismos, a retenção de sabor e odor, a estabilidade de compostos em alimentos e, também, a verificação do estado de maturação de frutos (ZAMBLAZI, 2010). Os valores de pH encontrados nesse trabalho estão próximos dos valores encontrados por Bagetti et al. (2011) onde o pH variou de 2,88 a 3,01, ou seja, os frutos tem características ácidas.

Observou-se que as pitangas alaranjadas obtiveram valores elevados de AT em comparação com as pitangas roxas. Em relação à literatura, os valores de AT observados nesse estudo foram inferiores aos encontrados por Bagetti et al. (2011) e Andrade et al. (2022). É importante destacar que as diferenças que ocorrem na composição das pitangas de cores alaranjada e roxa possivelmente são atribuídas às diferenças de espécies botânicas, à região de coleta, ao clima, ao solo, à estação do ano a qual as pitangas foram coletadas (SANTOS, 2011).

A AT constitui uma variável de grande interesse para o estado de conservação de produtos alimentícios. Pode-se considerar que frutas que indicam um resultado acima de 1% são preferidas pela agroindústria, pois nesses casos não há a necessidade de adição de ácido para preservar a polpa e evitar o desenvolvimento de microorganismos (DIAS et al., 2011; PINTO et al., 2003).

Além disso, os frutos que apresentam elevados índices de sólidos solúveis são, em geral, mais indicados para o consumo in natura. Essa preferência deve-se à vantagem proporcionada a maior qualidade e quantidade de néctar gerado pela polpa que resulta em um maior rendimento. Desta forma, a relação SS/AT é uma das melhores formas de avaliação do sabor e o ponto de maturação dos frutos, sendo mais representativa que a medição isolada de açúcares e de acidez, além de ser um importante parâmetro de qualidade dos frutos. Assim, frutos que apresentam altos teores de sólidos solúveis e baixa acidez são preferenciais para uma alta relação SS/AT (SANTOS et al., 2010).

A cor é um atributo fundamental no julgamento da qualidade de um alimento, já que a apreciação visual é o primeiro sentido a ser utilizado como critério de aceitação e escolha de um produto (BORGES, 2015). Observou-se que, para o parâmetro de coloração, as variáveis que se diferenciaram foram L* (luminosidade), b* (cor amarela), C* (cromaticidade) e h (tonalidade).

Em relação às pitangas analisadas nesse experimento, a variação encontrada está dentro do esperado já que, quanto mais clara a amostra, como as das pitangas alaranjada, maior o valor do L^* ; e quanto mais escura a amostra, como as das pitangas roxas, menores os valores de L^* . Analisando os resultados do parâmetro b^* , que considera valores positivos de amarelo e o decréscimo desses valores indicam o desaparecimento da cor amarelada da casca, se observa que os resultados foram condizentes com a realidade observada visualmente nas amostras. Para a cromaticidade, a intensidade das cores dos frutos alaranjados foi mais intensa, confirmado pelo maior valor de C^* . Da mesma forma, a variação da coloração das pitangas alaranjadas foi maior, quando comparado com o valor de h com as pitangas roxas. Entretanto, os parâmetros avaliados foram superiores aos encontrados por Borges (2015) onde os valores de h (tonalidade) ficaram próximo a zero, indicando que as pitangas roxas tendem para o vermelho.

Em relação as análises de antocianinas, se destaca as pitangas de cor roxa que obtiveram o maior conteúdo de antocianinas do que as pitangas de cor alaranjadas. Esse resultado está dentro do esperado uma vez que as antocianinas são os pigmentos responsáveis pelas cores azul, vermelho, roxo e preto nos vegetais.

Ao mesmo tempo, o maior teor de antocianinas das pitangas roxas deve gerar maiores propriedades benéficas à saúde humana, uma vez que as antocianinas geram melhorias na circulação sanguínea e previnem doenças vasculares, devido à alta atividade antioxidante (BAGETTI, 2009; SHAHIDI, 2003; VOLP et al., 2008). Em outros trabalhos a pitanga roxa também apresentou maiores quantidade destes compostos, destacando-se a identificação de cianidina-3-O β -glicopiranosídeo e delphinidina-3-Os como principais tipos de antocianinas (BAGETTI, 2011; EINBOND et al., 2004; SPADA et al., 2008). É relevante destacar que o consumo de frutas que são ricas em compostos bioativos e de alta atividade antioxidante tem potencial para prevenir doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, diabetes mellitus, dislipidemias, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias (PEREIRA et al., 2021).

5.2 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

O resultado da análise para determinar a concentração de compostos fenólicos totais pelo reagente redutor Folin-Ciocalteu (TCFT) apresentou diferença estatisticamente significativa pelo teste t , onde o extrato de pitanga roxa obteve os maiores valores (Tabela 2). Já a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos dos frutos foi determinada utilizando métodos baseados em diferentes mecanismos antioxidantes, pois é consenso que nenhum

método isolado possui eficácia suficiente para determinar com precisão a capacidade antioxidante de uma substância (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Nesse estudo, foram realizados ensaios baseados na capacidade de sequestro do radical DPPH, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e capacidade de sequestro do radical ABTS. Entre os testes realizados, apenas o ensaio com ABTS demonstrou diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). É importante observar que em todas as variáveis que se diferiram pelo teste t, o tamanho do efeito, avaliado pelo D de COHEN, foi considerado grande. Isso sugere que há uma ampla diferença entre as médias das pitangas de tonalidades diferentes.

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos etanólicos das pitangas de cor alaranjada e roxa, obtida pelos ensaios DPPH, FRAP e ABTS.

Variáveis	Pitanga Alaranjada	Pitanga Roxa	D de COHEN
TCFT (mg EAG.g ⁻¹)	15,39 b	24,41 a	1,79
DPPH (μmol ET.g ⁻¹)	68,41 ^{ns}	100,20	1,15
FRAP (μmol FeSO ₄ .g ⁻¹)	373,29 ^{ns}	621,63	1,48
ABTS (μmol ET.g ⁻¹)	90,63 b	170,44 a	1,79

NS: não significativa; ET: equivalente de trolox; EAG: equivalente de ácido gálico. Médias seguidas de letras diferente na mesma linha se diferiram significativamente ao teste t a nível significância ($p < 0,05$). D de Cohen: 0.0 a 0.19 efeito muito pequeno; 0.20 a 0.49 efeito pequeno; 0.50 a 0.79 efeito médio; >0.80 efeito grande (COHEN, 1988).

As concentrações de compostos fenólicos totais no extrato de pitanga roxa foram significativamente mais elevadas quando comparadas com o extrato de pitanga alaranjada. Esse resultado segue a tendência observada na literatura, onde pitangas de cores mais escuras apresentam maiores concentrações dessas substâncias (FIDELIS et al., 2022; LIMA et al., 2002). Em estudo realizado por Bagetti et al., (2011), foram comparados genótipos de pitangas de cores vermelha, alaranjada e roxa, coletadas no estado do Rio Grande do Sul, onde observou-se valores de compostos fenólicos de 179 mg/EAG.g⁻¹ para pitanga alaranjada e 463 mg/EAG.g⁻¹ para pitanga roxa, valores superiores aos reportados nesse estudo.

Rodrigues et al. (2016) avaliaram concentrações de compostos fenólicos totais nos extratos brutos de pitanga alaranjada colhidas em Minas Gerais, encontrando valor de 104,6 mg/EAG.g⁻¹ na polpa fresca. Já Celli, Pereira-Netto e Beta (2011), ao avaliarem extratos de pitanga roxa, verificaram teores entre 2,49 e 5,81 mg/EAG.g⁻¹. Dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto, é possível perceber que as concentrações de compostos fenólicos totais em pitanga roxa podem variar. É importante frisar que as variações na composição de

compostos fenólicos também podem estar associadas a o método de extração ou solvente usado para extração desses compostos (BAGETTI et al., 2011; MOURA et al., 2011).

Rufino et al. (2010) analisaram o conteúdo fenólico de 18 frutas brasileiras não tradicionais, e as classificaram em três categorias com base em seu conteúdo fenólico: baixo teor fenólico (< 100 mg.GAE/100 g), teor médio (< 100 a 500 mg.GAE/100 g) e alto teor (> 500 mg.GAE/100 g). De acordo com este estudo, a pitanga pode ser considerada com um fruto com baixo teor de compostos fenólicos.

Entretanto, o conteúdo de compostos fenólicos presente nas pitangas, ainda pode reforçar seu potencial de utilização, tornando-a uma fruta relevante para estudos. Além disso, outras propriedades podem desempenhar funções biológicas importantes, como atividade antioxidante (BAGETTI et al., 2011; BORGES, 2015) *Anti-quorum sensing* (RODRIGUES et al., 2016) e antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2008; ZOLA et al., 2014).

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e/ou de seus compostos pode refletir a capacidade de eliminar radicais livres em alimentos e sistemas biológicos (PILEROOD e PRAKASH, 2014). A teoria que fundamenta a técnica de determinação de potencial antioxidante estabelece que quanto maior a concentração em equivalente de Trolox, maior será a capacidade da amostra analisada de estabilizar o radical ABTS (BOROSKI et al., 2015).

Nesse experimento, foi observado que o extrato de pitanga roxa demonstrou uma capacidade superior de inibir o cátion do radical ABTS em comparação ao extrato de pitanga alaranjada. A elevada atividade antioxidante pelo ensaio ABTS encontrados para pitangas roxas, em comparação com pitangas de cores alaranjada e vermelha, provavelmente está associado à sua maior concentração de antocianinas (BAGETTI et al., 2011; DERNARDIN et al., 2015). No trabalho realizado por Pacheco et al. (2021) utilizando o mesmo ensaio, obteve-se valores de $21,78 \mu\text{mol de ET.g}^{-1}$ para pitanga roxa, valor inferior ao encontrado nesse experimento.

A variação na atividade antioxidante pode ocorrer devido a uma série de elementos, como condições climáticas e de solo, estágio de maturação, variações genéticas e condições de armazenamento pós-colheita. Além disso, a parte da fruta utilizada e o método de extração também podem ser responsáveis pelas variações nos resultados (BIEGELMEYER et al., 2011; PINTO et al., 2010).

A abundância e diversidade de compostos antioxidantes encontrados nas pitangas, especialmente naquelas de cor roxa, representam uma fonte promissora de benefícios para a

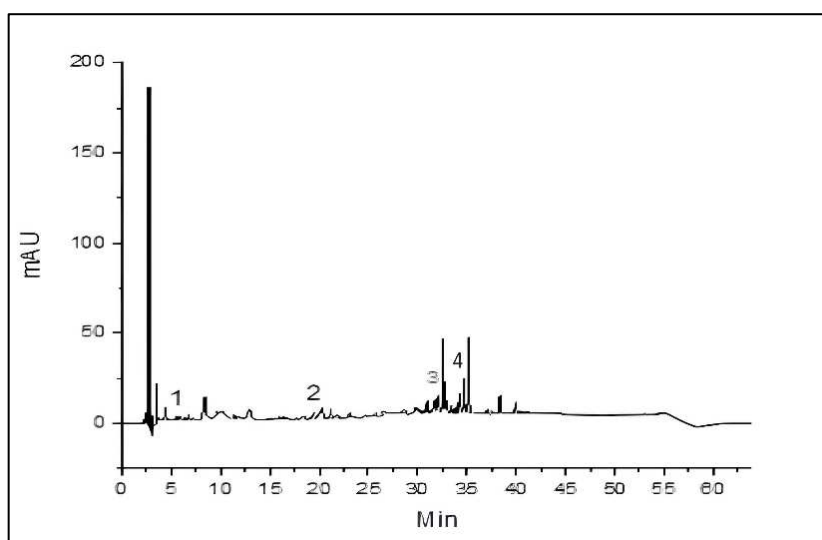
saúde. Assim, os resultados dessas pesquisas evidenciam o considerável potencial bioativo das pitangas de tonalidades diversas.

5.3 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Após a injeção do mix de padrões, foi possível a identificação e quantificação de quatro compostos fenólicos no extrato de pitanga alaranjada: ácido clorogênico, ácido gálico, quercetina e rutina; e sete compostos fenólicos no extrato de cor roxa: ácido clorogênico, ácido gálico, catequina, epicatequina, isoquercetina, quercetina e rutina. É importante destacar que não a relatos de estudos na literatura que realizaram a identificação e quantificação de rutina em pitangas. Cada sinal obtido foi comparado por similaridade com os padrões disponíveis na biblioteca previamente atualizada do equipamento e comparada aos comprimentos de ondas de máxima absorção.

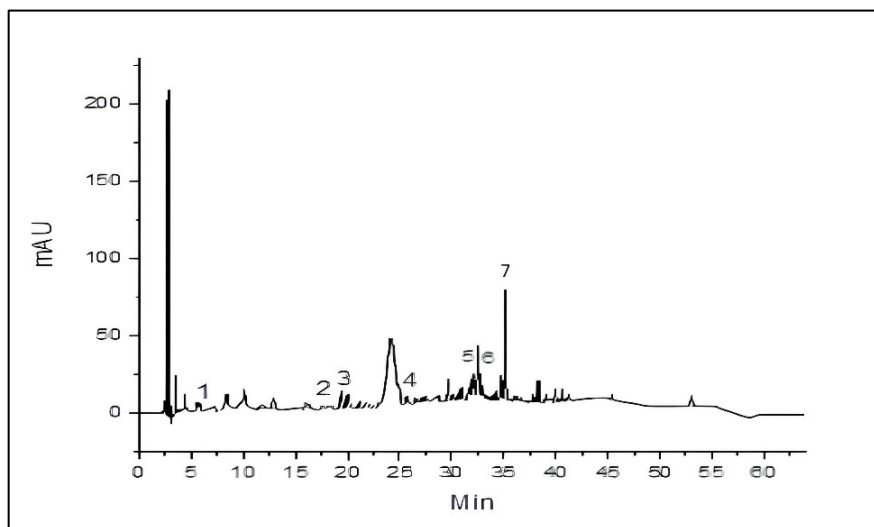
Ao analisar os cromatogramas (Figuras 3 e 4), os compostos que apresentam menor afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel se extraem com menor tempo de retenção. Por se tratar de uma coluna C18, os compostos mais polares, como ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, eluem primeiro, ou seja, apresentam maior interação com a fase móvel. Já os compostos como rutina, isoquercetina e quercetina eluem no final da corrida cromatográfica, ou seja, apresentam maior interação com a fase estacionária e maior tempo de retenção (JACOBSEN, 2023).

Figura 4 -Cromatograma dos extratos de pitanga alaranjada, apresentando os sinais: (1) ácido gálico (2) ácido clorogênico (3) Rutina (4) Quercetina.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 5 - Cromatograma dos extratos de pitanga roxa, apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) epicatequina, (5) rutina, (6) isoquercetina, (7) quercetina.



Fonte: Autoria própria (2023).

Foi possível quantificar quatro compostos no extrato de pitanga alaranjada, com a rutina sendo o composto majoritário, seguida do ácido clorogênico. No extrato de pitanga roxa, foi possível quantificar sete compostos, com a rutina também como composto majoritário, seguido da epicatequina e do ácido clorogênico. Para as variáveis: ácido clorogênico, ácido gálico e rutina, o tamanho do efeito, avaliado pelo D de Cohen, foi acima de 0,80, considerado grande, e se diferiram estatisticamente pelo teste t. De forma geral, o extrato de pitanga roxa apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos, exceto a quercetina, que não diferiu entre os dois extratos (Tabela 3).

Tabela 3 - Compostos fenólicos identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiências.

Variáveis	Pitanga Alaranjada (mg. L ⁻¹)	Pitanga Roxa (mg. L ⁻¹)	D de COHEN
Ác. Clorogênico	2,95 b	10,05 a	1,80
Ácido gálico	1,50 b	4,43 a	1,75
Catequina	-	1,42	-
Epicatequina	-	18,05	0,74
Isoquercetina	-	3,47	-
Quercetina	0,42 ^{ns}	1,14	0,74
Rutina	14,95 b	32,95 a	1,73

NS: não significativa. Médias seguidas de letras diferente na mesma linha se diferiram significativamente ao teste t a nível significância ($p < 0,05$). D de Cohen: 0.0 a 0.19 efeito muito pequeno; 0.20 a 0.49 efeito pequeno; 0.50 a 0.79 efeito médio; >0.80 efeito grande (COHEN, 1988).

Os compostos geralmente associados ao gênero *Eugenia* são flavonóides e triterpenóides, embora chalconas e taninos também estejam presentes. Entre os flavonóides, como os glicosídeos ou agliconas, predominam os flavonóides poli-hidroxilados. A maior parte dos compostos isolados dessa classe são triterpenos. Esses compostos exibem inúmeras atividades farmacológicas, incluindo analgésica, antipirética, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, atividade antidiabética e anti-inflamatória (GUPTA et al., 2014).

Nesse trabalho, foi possível identificar compostos fenólicos de diferentes classes nos extratos das pitangas, sendo: dois ácidos fenólicos - ácido clorogênico e ácido gálico; dois flavonoides glicosilados - isoquercetina e rutina; um flavonoies - quercetina; e dois flavanóis - catequina e epicatequina. Dentre esses compostos, catequina, epicatequina e isoquercetina estavam presentes apenas nos extratos de pitangas roxas. Essas diferentes classes de compostos podem estar associadas entre cores distintas. Entre as pitangas roxas, a maior concentração de compostos fenólicos é consequência das maiores quantidades de fitoquímicos antioxidantes, especialmente antocianinas (GUPTA et al., 2014).

Um aspecto importante a considerar nas pitangas roxas é a presença de flavonóis na forma aglicona, enquanto geralmente os flavonóides são encontrados nos vegetais na forma glicosilada. Nehring (2016) identificou 19 compostos fenólicos no extrato de polpa da *Eugenia brasiliensis* Lamarck, fruta nativa brasileira pertencente à família da Myrtaceae, sendo isoquercetina, catequina e quercetina detectados na forma livre e conjugada. Já Karwowski (2012), analisando os teores de compostos fenólicos de frutas nativas da Mata Atlântica, indicou que ácido gálico e ácido clorogênico foram os ácidos fenólicos majoritariamente encontrados em polpas de pitangas, o mesmo foi observado no presente trabalho.

Nesse estudo, a rutina foi o composto fenólico predominante em ambas as cores de pitangas analisadas, com as roxas indicando maiores quantidades. Este é um composto pertencente à classe dos flavonóides e, comumente, estão presentes nos frutos na forma de agliconas ou glicosiladas, e vem sendo utilizada na prevenção e tratamento de vários problemas de saúde, exibindo propriedades antivirais, antialérgicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antibacterianas e antioxidantes (NASIRIZADEH et al., 2012; NEHRING et al., 2022).

6 CONCLUSÃO

- O genótipo de pitanga roxa apresentou maiores teores de antocianinas, compostos fenólicos e de atividade antioxidante, quando comparada a pitanga alaranjada;
- O genótipo de pitanga roxa apresentou sete compostos fenólicos, incluindo três a mais - catequina, epicatequina e isoquercetina -, em relação à pitanga alaranjada, além de apresentar maior teor de ácido clorogênico, ácido gálico e rutina.
- O maior potencial nutracêutico e bioativo da pitanga roxa a torna mais promissora que a pitanga alaranjada para ser utilizada como fonte de corante e antioxidante natural pela indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e para consumo in natura da fruta.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, Clayton Alcarde et al. Modeling monthly mean air temperature for Brazil. **Theoretical and applied climatology**, v. 113, p. 407-427, 2013.
- AMORIM, Antônia Fádía Valentim. **Química: Métodos Cromatográficos**. 1a Edição Fortaleza. 2019.
- APAK, Reşat et al. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.
- BAGETTI, Milena et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Food Science and Technology**, v. 31, p. 147-154, 2011.
- BAGETTI, Milena. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). 2009.
- BARNES, Jeremy S. et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4728-4735, 2009.
- BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BEZERRA, João Emmanoel Fernandes; DE LIRA JUNIOR, José Severino; DA SILVA JUNIOR, Josué Francisco. *Eugenia uniflora*: pitanga. 2018.
- BICAS, Juliano Lemos et al. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 1843-1855, 2011.
- BIEGELMEYER, Renata et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. C991-C996, 2011.
- BORGES, Kátia Cristina. Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização: Características físico-químicas, compostos bioativos e efeito sobre longevidade, estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida em modelos in vivo *Caenorhabditis elegans*. 2015.
- BOROSKI, Marcela et al. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. **Curitiba: Appris**, v. 141, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAMLOFSKI, Ana Mery de Oliveira. **Caracterização do fruto de Cerejeira (*Eugenia involucrata* DC) visando seu aproveitamento tecnológico**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Ponta Grossa: UEPG. 102p.2008.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. *Eugenia uniflora* L. **EMBRAPA: Comunicado técnico**, 224. Colombo, 2006.

CELLI, Giovana Bonat; Pereira-Netto, Adauto Bellarmino; Beta, Trust. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442-2451, 2011.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (orgs.) **Fundamentos de Cromatografia**, 456 p., Campinas: Editora Unicamp, 2007.

CRUZ, Ana Valéria de. Melo; KAPLAN, Maria Auxiliadora Coelho. A importância das famílias Myrtaceae e Melastomataceae na etnomedicina Brasileira. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. 5, p. 47-52, 2005.

DENARDIN, Cristiane Casagrande et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DIAS, Alex Batista et al. Variabilidade e caracterização de frutos de pitangueiras em municípios baianos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1169-1177, 2011.

DOS SANTOS, Humberto Gonçalves et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018., 2018.

EINBOND, Linda S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

FIDELIS, Eduarda Monteiro. et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, 2022.

FIDELIS, Eduarda Monteiro. et al. Pitanga *Eugenia uniflora* L., fonte de compostos bioativos e seus benefícios para doenças neurodegenerativas: uma revisão. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 12, n. 1, 2020.

FIUZA, Tatiana S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, 2008.

GIUSTI, M. Mónica; WROLSTAD, Ronald E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, n. 1, p. F1. 2.1-F1. 2.13, 2001.

GUPTA, Neetu Koolwal. et al. Biological importance of phytochemical constituents isolated from genus *Eugenia*. **Journal of the Indian Chemical Society**, vol. 91, p. 1539-1553, 2014.

HOFFMANN-RIBANI, Rosemary; HUBER, Lísia S.; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2009.

HUANG, Dejian; Ou, Boxin; Prior, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea (coordenadores). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Brasileiro de 2010. Censo Agropecuário de 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/24/27745>>. Acesso em 02 de abril de 2024.

JACOBSEN, Simone da Silva et al. **Fracionamento bioguiado e identificação de compostos fenólicos antioxidantes em folhas de Pereskia aculeatta**. 2023. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

KARWOWSKI, Marília Silva Malvezzi. Estudo da estabilidade, comportamento reológico e dos compostos fenólicos de frutas da Mata Atlântica. 2012.

LANÇAS, Fernando Mauro. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. 2016.

LEE, Jungmin; DURST, Robert; WROLSTAD, Ronald. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LIMA, Vera Lúcia Arroxelas Galvão de; MÉLO, Enayde de Almeida; LIMA, Daisyvângela E. Fenólicos e carotenoides totais em pitanga. **Scientia agrícola**, v. 59, p. 447-450, 2002.

LIMA, Vera Lúcia Arroxelas Galvão. de; MÉLO, Enayde de Almeida; LIMA, Daisyvângela E. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 92-94, 2005.

LIRA JÚNIOR, José Severino et al. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA. 2007.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MIGUES, Ignacio et al. Phenolic profiling and antioxidant capacity of *Eugenia uniflora* L.(Pitanga) samples collected in different uruguayan locations. **Foods**, v. 7, n. 5, p. 67, 2018.

MOON, Joon-Kwan; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOURA, Gabriele Silva. et al. *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-9, 2018.

- MOURA, Gisely Corrêa et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pitangas em função de diferentes estádios de maturação e espaçamentos de plantio. **Comunicado Técnico Embrapa Clima Temperado**. 2011.
- NASIRIZADEH, Navid et al. Optimization of wool dyeing with rutin as natural dye by central composite design method. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 361-366, 2012.
- NEHRING, Priscila et al. Grumixama (*Eugenia brasiliensis Lamarck*) functional phytochemicals: Effect of environmental conditions and ripening process. **Food Research International**, v. 157, p. 111460, 2022.
- NITSCHKE, Pablo Ricardo et al. Atlas climático do estado do Paraná. **Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná**, 2019.
- OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, Alessandra. et al. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora L.*). **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 1-5, 2006.
- OLIVEIRA, Anderson Marques de et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis L.*(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, 2006.
- OLIVEIRA, Cibele Braga de et al. Atividade antimicrobiana in vitro da *Eugenia uniflora L.*(Pitanga) sobre bactérias cariogênicas. **Rev. brasileiro Ciências da Saúde**, p. 239-250, 2008.
- OLIVEIRA, George Layson da Silva. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.
- OPITZ, Sebastian Ed Wieland et al. Understanding the effects of roasting on antioxidant components of coffee brews by coupling on-line ABTS assay to high performance size exclusion chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 2, p. 106-114, 2017.
- PACHECO, Simone Muniz et al. Antioxidant activities and antidiabetic potential of extract of fruits from the Myrtaceae family: inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. **Biomedical Sciences**. 18(1):25-37. 2021.
- PEREIRA, Elisa dos Santos et al. Biological activity and chemical composition of native fruits: a review. **Agrociencia Uruguay**, v. 25, n. NSPE2, 2021.
- PILEROOD, Shirin Adel; PRAKASH, Jamuna. Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). **Journal of food science and technology**, v. 51, p. 845-854, 2014.
- PINTO, Marcia et al. Evaluation of red currants (*Ribes rubrum L.*), black currants (*Ribes nigrum L.*), red and green gooseberries (*Ribes uva-crispa*) for potential management of type 2 diabetes and hypertension using in vitro models. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 639-660, 2010.

PINTO, Wilza da Silveira et al. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1059-1066, 2003.

PIO, Rafael. et al. Physical-chemical characterization of surinam cherry fruits according to the disposition and height in the plant. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 1, 2005.

QUEIROZ, Julia M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos**. v. 9, n. 2, p. 73-100, jun, 2015.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: < <https://www.R-project.org/>>. Acesso em 04 de março. 2023.

RE, Roberta. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RODRIGUES, Adeline Conceição et al. Quorum quenching and microbial control through phenolic extract of *Eugenia uniflora* fruits. **Journal of food science**, v. 81, n. 10, p. M2538-M2544, 2016.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAMY, Mamdouh Nabil. et al. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 37-47, 2014.

SANTOS, Márcio Barros dos et al. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* x *S. mombin*) provenientes do recôncavo sul da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1089-1097, 2010.

SANTOS, Marli da Silva. Impacto do processamento sobre as características físico-químicas, reológicas e funcionais de frutos da gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). 2011.

SCHAICH, Karen M.; TIAN, Xin; XIE, Jianhua. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 111-125, 2015.

SHAHIDI, Fereidoon; NACZK, Marian. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC press, 2003.

SILVA, Mariana Casagrande et al. Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 203-209, 2014.

SINGLETON, Vernon L. et al. Of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1999. p. 152-178.

SIVAKUMAR, Dharini; SULTANBAWA, Yasmina; NETZEL, Michael (Ed.). **Handbook of Phytonutrients in Indigenous Fruits and Vegetables**. CABI, 2022.

SOUTO, Mariana Magalhães. **Caracterização de compostos bioativos de três variedades de Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.)**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SPADA, Patrícia DS et al. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

VIZZOTTO, Marcia. Pitanga: Uma fruta especial. *Criar e plantar*, v. 12, n.2, 2008.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WILSON, P. G. et al. Conspectus of the genus *Eugenia* (Myrtaceae) in the Philippines. **Garadens' Bull. Singapore**, v. 60, p. 399-410, 2009.

ZAMBIAZI, Rui Carlos. Análise Físico Química de Alimentos. **Pelotas: Editora Universitária/UFPEL**, v. 1, p. 202, 2010.

ZOLA, Flávia Guimarães. Atividades antioxidante e antimicrobiana de polifenóis de grumixama (*Eugenia Brasiliensis*) e pitanga (*Eugenia Uniflora*). 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela com parâmetros de qualidade de CLAE

Tabela. Compostos fenólicos identificados e quantificados nos extratos dos frutos de *E. uniflora* L. nas cores alaranjada e roxa.

Composto fenólico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Equação de regressão	R ²	Concentração (mg. L ⁻¹)
Pitanga Alaranjada					
Ácido gálico	5,63	267	$y = 0,2187x + 0,206$	0,9944	1,50b
Ác. clorogênico	19,57	315	$y = 0,2398x + 0,1292$	0,9959	2,95b
Rutina	32,19	354	$y = 0,1004x + 0,1116$	0,9981	14,95b
Quercetina	41,31	372	$y = 0,2125x - 0,0943$	0,9888	0,42 ^{ns}
Pitanga Roxa					
Ácido gálico	5,68	269	$y = 0,2187x + 0,206$	0,9944	4,43a
Catequina	18,32	278	$y = 0,0972x - 0,0553$	0,9978	1,42
Ác. clorogênico	19,68	325	$y = 0,2398x + 0,1292$	0,9959	10,05a
Epicatequina	25,93	277	$y = 0,10115x + 0,0133$	0,9944	18,05
Rutina	32,16	353	$y = 0,1004x + 0,1116$	0,9981	32,95a
Isoquercetina	33,03	353	$y = 0,1502x + 0,3919$	0,9534	3,47
Quercetina	41,01	370	$y = 0,2125x - 0,0943$	0,9888	1,14 ^{ns}
D de COHEN					
Ácido gálico			1,75		
Ác. clorogênico			1,80		
Rutina			1,73		
Quercetina			0,74		

P NS: não significativo; Tr: tempo de retenção; λ_{max} : máximos de absorção; R²:coeficiente de determinação. Médias seguidas de letras diferente na mesma linha se diferiram significativamente ao teste t de Student ao nível significância ($p < 0,05$). D de Cohen: 0.0 a 0.19 efeito muito pequeno; 0.20 a 0.49 efeito pequeno; 0.50 a 0.79 efeito médio; >0.80 efeito grande (COHEN, 1988).