



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS CAMPO MOURÃO
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

WAGNER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS VEGETAIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPUS MOURÃO
1º SEMESTRE DE 2013

WAGNER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS
FENÓLICOS DE EXTRATOS VEGETAIS**

Trabalho de Conclusão de curso
apresentado a UTFPR – Campus
Campo Mourão, como parte dos
requisitos para a conclusão do Curso
Superior de Tecnologia em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Plata
Oviedo

CAMPO MOURÃO
1º SEMESTRE DE 2013

Resumo

Um importante desafio para a pesquisa industrial nos últimos anos é a busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. Esses antioxidantes são obtidos sobretudo de produtos de origem vegetal, aos quais os compostos fenólicos estão incluídos. Esses compostos fazem parte do metabolismo secundário da planta e são encontrados no caule, fruto, raiz e principalmente nas folhas. Para este trabalho, foram adquiridas folhas de acerola, araçá, pitanga, guabiroba, goiaba e pitanga oriundas de sítios da região de Campo Mourão. A extração de CFT (compostos fenólicos totais) foi feita com etanol 80 % (v/v) acidulada com HCl 0,5% (v/v) em alta temperatura. Em seguida, eles foram quantificados e para a avaliação de sua atividade antioxidante utilizou-se o método do radical ABTS, que se baseia na descoloração da molécula frente a uma substância antioxidante. Sendo assim, a quantidade de CFT variou de 2449,7 a 20626,2 mg AG/100g de folha para os extratos de acerola e pitanga, respectivamente. Em contrapartida, a atividade antioxidante nestes extratos foi de no mínimo 3040, 85 μM Trolox/g para a folha de acerola, enquanto o valor máximo foi de 13439,45 μM Trolox/g no extrato de guabiroba. Diante desses resultados, não foi encontrada uma correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. No entanto, os teores de compostos fenólicos extraídos com etanol acidulado em água fervente apresentaram-se elevados em comparação a outras condições de extração e que as folhas podem ser consideradas como potenciais fontes de antioxidantes naturais.

Palavras-chave: folhas frutíferas, compostos fenólicos, antioxidantes, método ABTS

Abstract

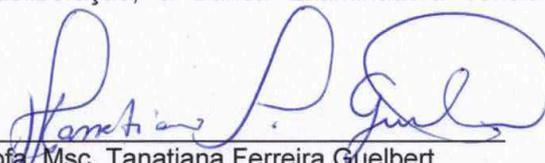
An important challenge for the research industry in recent years is the search for natural antioxidants for food products, cosmetics and pharmaceuticals. These antioxidants are obtained primarily from vegetable products, of which phenolic compounds are included. These compounds are part of plant secondary metabolism and are found on the stem, fruit, root, and especially the leaves. For this work were acquired sheets acerola, guava, cherry, guabiroba, guava and cherry coming from sites in the region of Campo Mourao. The extraction CFT (total phenolic compounds) was made with 80% ethanol (v / v) acidified with HCl 0.5% (v / v) at high temperature. Then they were quantified and the evaluation of their antioxidant activity used the ABTS method, which is based on the decolorization of the molecule across a substance antioxidant. Therefore, the CFT amount ranging from 2449,7 to 20626,2 mg to AG/100g sheet and acerola cherry extracts, respectively. In contrast, the antioxidant activity of these extracts was at least 3040, 85 mM Trolox / g for sheet acerola, while the maximum value was 13439.45 mM Trolox / g extract of guabiroba. Given these results, no correlation was found between phenolic compounds and antioxidant activity. However, the concentration of phenolic compounds with acidic ethanol in boiling water were high in comparison with other extraction conditions, and that leaves can be considered as potential sources of natural antioxidants.

Keywords: leaves fruit, phenolic compounds, antioxidants, ABTS method

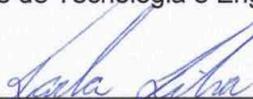
Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais

Wagner de Souza

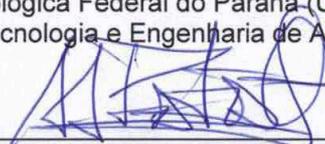
Este trabalho foi apresentado às 14:00 horas do dia 02 de outubro de 2013 como requisito para obtenção do título de graduação do curso superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi avaliado pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.



Membro 1 – Profa. Msc. Tanatiana Ferreira Guelbert
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos



Membro 2 – Profa. Dra. Karla Silva
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos



Orientador – Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente Plata Oviedo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos

Sumário

1 Introdução	1
2 Objetivo Geral	2
2.1 Objetivos Específicos	2
3 Revisão bibliográfica	3
3.1 Folhas frutíferas	3
3.1.1 Acerola	3
3.1.2 Araçá.....	4
3.1.3 Goiaba.....	4
3.1.4 Guabiroba.....	5
3.1.5 Pitanga	6
3.1.6 Jaboticaba	6
3.2 Compostos fenólicos.....	7
3.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	9
3.3.1 Método ORAC	10
3.3.2 Sequestro do radical DPPH (2,2 -difênil -1- picril –hidrazil).....	11
3.3.3 Método ABTS	11
4 Materiais e Métodos	13
4.1 Material.....	13
4.2 Preparo dos extratos	13
4.3 Determinação de compostos fenólicos totais	14
4.4 Determinação da atividade antioxidante total (AAT) pelo método ABTS ⁺	14
4.4.1 Curva de calibração.....	14
4.4.2 Determinação da atividade antioxidante total nos extratos	15
4.5 Análise Estatística	16
5 Resultados e Discussões	17
5.1 Compostos fenólicos	17
5.2 Avaliação da Atividade antioxidante pelo método ABTS	20
6 Conclusão	24
7 Referências	25

1 Introdução

De acordo com Pietta (2000), antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), já entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β - caroteno (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (TOVANI BENZAQUEM, 2009).

Diversas pesquisas de porte nacional e internacional sobre propriedade antioxidante de vegetais foram realizadas nos últimos 20 anos em decorrência da busca de um estilo de vida mais saudável e da constatação de que certos alimentos apresentam substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (PARK *et al.*, 1997). Neste contexto, os vegetais que apresentam propriedade antioxidante integram o grupo destas substâncias, denominadas funcionais, por estarem potencialmente envolvidas na redução do risco de doenças (KROON; WILLIAMSON, 1999).

De acordo com Laguerre *et al.* (2007), um importante desafio para a pesquisa industrial nos últimos anos é a busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. Esses antioxidantes são obtidos sobretudo de produtos de origem vegetal: compostos fenólicos, ácido

ascórbico e carotenóides. Nesses produtos, há um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, em virtude da deterioração que este tipo de dano oxidativo pode causar (rancificação, perda de aromas e formação de *off-flavors*, rejeição do consumidor).

O interesse no potencial antioxidante das folhas, para esta pesquisa, foi reforçado pela fácil disponibilidade do material na região, presença de substâncias antioxidantes e fenólicas em sua composição e porque os estudos até então realizados e relacionados com a atividade antioxidante, na maior parte compreende aos frutos, bagaços e polpas, sendo portanto, poucos os trabalhos relacionados com as folhas.

2 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos extraídos de folhas de araçá, goiaba, guabiroba, jabuticaba, pitanga e acerola.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar a extração de compostos fenólicos com etanol 80% (v/v) utilizando ácido clorídrico concentrado (HCl) 0,5 % (v/v).
- Quantificar compostos fenólicos totais utilizando curva de calibração de ácido gálico e medições espectrofotométricas de cada extrato;
- Determinar a atividade antioxidante utilizando método ABTS;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Folhas frutíferas

Este capítulo irá abordar algumas características sobre as espécies vegetais utilizadas para a obtenção dos extratos nos experimentos, que foram: acerola, araçá, jabuticaba, pitanga, guabiroba e goiaba.

3.1.1 Acerola

A acerola (*Malpighia emarginata* DC), fruto originário das Antilhas, tem grande importância nutricional por ser fonte natural de vitamina C. No entanto, além desta vitamina, outros compostos bioativos, como os polifenóis, fazem parte da composição deste fruto. Estes compostos, por possuírem propriedade antioxidante, atuam minimizando os danos oxidativos causados no organismo pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prevenindo doenças crônicas não transmissíveis, como câncer e aterosclerose, entre outras (JACOB; BURRI, 1996).

De acordo com Vendramini e Trugo (2000), a composição química, inclusive a distribuição de componentes do aroma, é dependente das espécies, condições ambientais e também, do estágio de maturação da fruta. O teor de vitamina C e outros atributos inerentes à qualidade da acerola, tais como coloração, peso e tamanho dos frutos, teor de sólidos solúveis e pH do suco, além de serem afetadas pela desuniformidade genética dos pomares, sofrem influência de outros fatores, como precipitações pluviais, temperatura, altitude, adubação, irrigação e a ocorrência de pragas e doenças (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

Simão (1971) esclarece que *Malpighia glabra* L. é um arbusto de tamanho médio, com 2 a 3 metros de altura. Possui ramos densos e espalhados, folhas opostas, com pecíolo curto, ovaladas e elíptico-lanceoladas, medindo entre 2,5 e 7,45 cm. A base e principalmente o ápice das folhas são

agudos, de coloração verde-escuro brilhante na superfície superior e verde-pálido na superfície inferior.

3.1.2 Araçá

O araçazeiro (*Psidium catteyanum*) pertence à família botânica das *Murtaceae*, e encontra-se naturalmente distribuído em uma extensa área do Brasil, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. O fruto é uma baga de coloração amarelada ou vermelhada, de acordo com o genótipo, cuja safra ocorre nos meses de fevereiro a abril (MANICA, 2000 apud MEDINA, 2009). A polpa é branca, amarelada ou avermelhada, mucigelatinosa, aromática, contendo muitas sementes. No Brasil não há relatos de plantações que têm por finalidade a prática industrial. Além do aproveitamento doméstico dos frutos e da madeira, utilizam-se também as raízes, cascas e folhas no preparo de infusões, que são difundidos na medicina popular (MEDINA, 2009).

De acordo com Rego (2008), as folhas dessa espécie são coriáceas, glabras, de 5 cm a 10 cm de comprimento por 3 cm a 6 cm de largura, com seis a oito pares de nervuras secundárias pouco visíveis.

3.1.3 Goiaba

Psidium guajavara L., conhecida como goiabeira, pertence à família *Myrtaceae*, que compreende cerca de 130 gêneros e 3,6 mil espécies de arbustos e árvores distribuídos principalmente nos trópicos e subtropicais. É uma das espécies mais estudadas desta família. Existem dois tipos mais comuns da fruta, a vermelha (*P. guajava* variedade *pomifera*) e a branca (*P. guajava* variedade *pyrifera*). Seus principais constituintes são taninos, flavonóides, óleos essenciais, alcoóis sesquiterpenoides e ácidos triterpenoides. Em extratos aquosos de folhas desta planta, foram isolados dois ácidos fenólicos, ácido gálico e ácido ferúlico, e no extrato acetônico foram identificados ácidos gálico, cafeico, clorogênico, ferúlico; quercetina e rutina (HAIDA *et al.*, 2011).

De acordo com os mesmos autores, o chá das folhas é comumente usado no tratamento de diarreias, inflamações na boca e da garganta ou em lavagens locais de úlceras e leucorreia. Investigações farmacológicas indicaram que suas raízes, a casca dos caules e suas folhas possuem atividade antipirética, analgésica do estômago, antitussígena, hipoglicêmica, anti-inflamatória, anestésica e atividade depressora do sistema nervoso central. Recentemente, a capacidade antioxidante de quercetina glicosídica, principal constituinte da folha do extrato metanólico, tem atraído a atenção dos pesquisadores para a aplicação destes produtos na área da farmacologia.

Alves *et al.* (2006) mencionaram a existência nas folhas de 9-10% de taninos, 90,3% de óleo essencial (cariofileno, nerolidiol, 1,8-cineol, pselinemo, a-pineno, b-bisaboleno, aromadendreno) e triterpenoides (ácido ursólico, oleanólico, catecólico, guiavólico, maslínico).

3.1.4 Guabiroba

Campomanesia xanthocarpa O. Berg, popularmente, também é chamada de guabirova, guariba. Pertencente à família *Myrtaceae* é uma frutífera muito cultivada em quintais, principalmente nas regiões sul e sudeste do país, além de ser facilmente encontrada em seu habitat natural, desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul em quase todas as formações florestais dessas regiões. É uma árvore semidecídua de 4 a 15 metros de altura. Algumas espécies são indicadas para paisagismo e reflorestamento para recuperação ambiental (LORENZI *et al.*, 2006).

Segundo este autor, os frutos possuem polpa suculenta, firme e de sabor doce, com maturação em novembro-dezembro, e são muito apreciados para consumo *in natura* e usados no preparo de geléias, sucos, doces, sorvetes, pudins, licores, batidas ou curtidos na cachaça. A textura do fruto pode ser atribuída ao alto teor de pectinas.

Infusões preparadas com folhas são comumente usadas como depurativos, antidiuréticos, purificadores do sangue, antirreumático e para baixar o teor de colesterol (Ballvé *et al.*, 1995 apud Hass, 2011). Além disso, foi

encontrada atividade anti-úlceras apresentada pelo extrato alcoólico das folhas (Markman *et al.*, 2004 apud Hass, 2011).

3.1.5 Pitanga

A pitanga, *Eugenia uniflora* L, é um fruto nativo das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Seu cultivo se encontra difundido por diversos países, podendo ser encontrada no sul dos Estados Unidos, nas ilhas do Caribe e em alguns países asiáticos (BEZERRA *et al.*, 2000; VIZZOTTO, 2008).

A pitanga é uma fruta tipo baga, globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro, que possui aroma característico intenso e sabor doce e ácido. Possui em média 77% de polpa e 23% semente, é rica em vitaminas A, C e do complexo B, apresentando também cálcio, ferro e fósforo (BEZERRA *et al.*, 2000).

Magina *et al.*, estudando a atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia*, verificou que o extrato bruto do caule de *Eugenia brasiliensis* e *E.beaurepaireana* apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos quando comparado ao extrato das folhas, porém, de uma maneira geral, as frações obtidas das folhas apresentam a maior quantidade de compostos fenólicos.

3.1.6 Jabuticaba

A jabuticabeira pertence à família das mirtáceas, sendo conhecida há cerca de cinco séculos. Seu fruto foi chamado pelos tupis de "IAPOTI' KABA", ou seja, "fruta em botão", em uma referência a sua forma arredondada. Encontra-se amplamente distribuída no Sul e Sudeste brasileiros, principalmente na mata pluvial atlântica e nas submatas de altitude, nascendo espontaneamente em muitas regiões brasileiras (MELETTI, 2000).

De acordo com este autor, o fruto da jabuticabeira é uma baga globosa, roxo-escura quando madura, de 1 a 3,5 cm de diâmetro, com casca grossa e polpa esbranquiçada, muito doce, envolvendo de uma a quatro sementes.

A jabuticaba é uma fruta que contém alto teor de antocianinas, a quantidade média é de 314 mg/100g de fruta, quando comparadas com a uva (227 mg/100g), jambolão (386 mg/100g) e amora (290 mg/100g), sendo que os pigmentos naturais estão presentes apenas na casca da jabuticaba. Em outras espécies, as substâncias também são encontradas na polpa (TERCI, 2004).

Para Donadio (2000), a jabuticabeira apresenta folhas com epiderme glabra, a folha é hipostomática, com estômatos paracíticos, com glândulas; colênquima com parênquima paliçádico e lacunoso; idioblastos incolores, desenvolvidos; tecido formado por esclerênquima e pouco colênquima; possuem transpiração cuticular baixa, sem restrição o dia todo, sendo do tipo heterobárica; possui células de contorno irregular com paredes espessas e pontuações simples na epiderme abaxial, e células maiores, com paredes pouco espessas e pontuações simples e estômatos numerosos na epiderme adaxial; os idioblastos são freqüentes, e estão em contato com a epiderme adaxial; as glândulas são esparsas e estão no nível do parênquima paliçádico, em contato com a epiderme adaxial, e são compostas de duas células; o sistema fibrovascular é bem desenvolvido, formado da nervura central, floema, xilema e nervuras laterais; o bordo da folha possui células epidérmicas com paredes espessas, e com células do parênquima lacunoso irregulares e de tamanhos variáveis, o que permite diferenciá-la de outras Mirtáceas.

3.2 Compostos fenólicos

Para Nass (2007), os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários são responsáveis pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e fixação de nutrientes, ao passo que os metabólitos secundários estão relacionados com as estratégias de defesa das plantas.

Os principais metabólitos secundários estão classificados em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAYZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos (CF), são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo que mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que conferem a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também devido a seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de ingredientes do alimento, principalmente de lipídeos (SILVA *et al.*, 2010).

Os CF também são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais. Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (ALMEIDA *et al.*, 2006). CF de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides (MELO; GUERRA, 2002).

Volp *et al.* (2008), avaliam que os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. São os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, podendo estar presentes em outras partes das plantas.

Segundo os mesmos autores, os flavonóides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais e têm a estrutura química C6- C3- C6, sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são seis anéis aromáticos. Com relação aos não flavonóides, são classificados como: os derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico; os derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos caféico e p-cumárico hidroxicinamatos e os derivados de estruturas químicas C6-C3-C6 específicas do trans-resveratrol, cis – resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo. Na figura 1, são representadas as estruturas químicas de alguns flavonóides frequentemente encontrados em alimentos de origem vegetal.

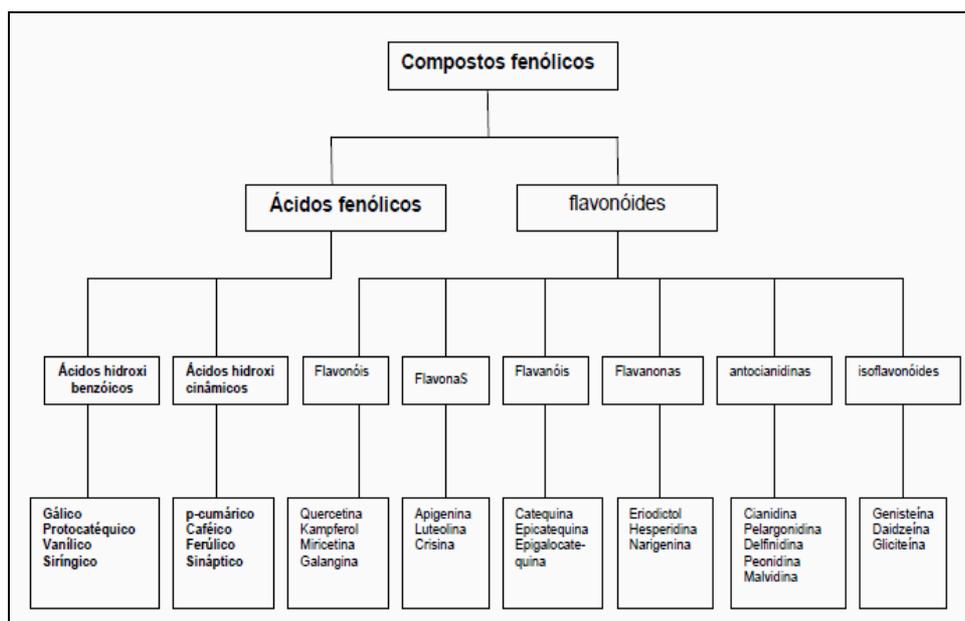


Figura 1: Compostos fitoquímicos presentes em matrizes vegetais

Fonte: Karakaya (2004)

3.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Devido à complexidade da composição desses alimentos, a separação e o estudo individual de cada substância antioxidante são praticamente inviáveis além de custosos. Por isso, espera-se dos pesquisadores que venham a ter métodos rápidos para a determinação da eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças. Entretanto, muitos métodos ainda precisam ser aperfeiçoados. Um teste de atividade antioxidante com base em reações químicas parece não ser condizente com situações reais, ainda que existam muitas publicações com medida de atividade antioxidante *in vitro* (HUANG *et al.*, 2005).

Sendo assim, o trabalho irá discorrer sobre os métodos ORAC, DPPH e ABTS, que são comumente utilizados na avaliação do potencial antioxidante e redutor, principalmente de fontes naturais.

3.3.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo. Utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β - ficoeritrinas ou R – Ficoeritrina (PE), altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor (34 grupos prostéticos tetrapirrólicos unidos covalentemente). Essas proteínas derivam de espécies de algas roxas e cianobactérias e possuem um peso molecular de 250.000 dáltons (PRIOR; CAO, 1999).

De acordo com Gonçalves (2008), o ORAC, verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2' – azobis (2 – amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37°C. Neste ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra *versus* tempo, quando comparada ao branco, que não apresenta antioxidantes. Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a β - ficoeritrina. Mas foi observado que a β - ficoeritrina interagia com os compostos fenólicos levando a erros neste método. No entanto, OU *et al.* (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando a fluoresceína como composto fluorescente, que perde a fluorescência indicando reação com o radical peroxila. Além disso, a fluoresceína mostrou excelente fotoestabilidade, redução dos custos deste experimento e não interage com antioxidantes.

Para Lima (2008), a vantagem deste método em relação aos demais que determinam a capacidade antioxidante usando a absorbância, que é o uso da fluorescência como medida de dano oxidativo, pois assim, ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. Isso é fator importante a se considerar quando se analisam alimentos que possuem cor (especialmente frutas e hortaliças), suplementos de produtos naturais e vinho tinto. Outra vantagem é o uso de radicais peroxila ou hidroxila como pró -

oxidantes, conferindo maior significado biológico frente aos métodos que usam oxidantes não, necessariamente, pró - oxidantes fisiológicos.

3.3.2 Sequestro do radical DPPH (2,2 -difeníl -1- picril –hidrazil)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em seqüestrar o radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES *et al*, 2010).

Segundo Brand- Willians *et al.*, (1995), a interação do antioxidante com o DPPH depende de suas conformações estruturais. Para o melhor entendimento dos mecanismos de reação dos substratos é interessante caracterizar os intermediários e os produtos da reação, sendo também necessária a separação dos compostos por cromatografia e posterior identificação.

3.3.3 Método ABTS (2, 2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina – 6- ácido sulfônico)

Além do método DPPH, a determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2- azino – bis – 3- etil – benzotiazolina – 6- ácido sulfônico) é bastante utilizado. Ambos apresentam boa estabilidade em certas condições de análise, mas também mostram diferenças importantes frente aos antioxidantes e quanto á manipulação. O DPPH é um radical livre que é adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo; já o radical ABTS deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Outra diferença é que o ABTS pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes,

enquanto que o DPPH somente pode ser solubilizado em meios orgânicos, especificamente alcoólicos (ARNAO, 2000).

O método, segundo baseia-se na geração do $ABTS^{\cdot+}$, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $ABTS^{\cdot+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional, como é observado na figura 2. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\cdot+}$ é determinada em função do Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE *et al.*, 1999).

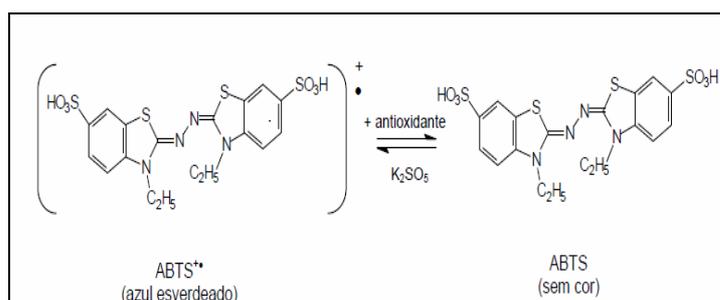


Figura 1: Redução do radical ABTS por um antioxidante
Fonte: Rufino *et al.* (2007)

O método $ABTS^{\cdot+}$ é simples e pode ser avaliado em diferentes faixas de pH, o que torna essa metodologia importante para o conhecimento do efeito do pH em mecanismos oxidantes. Porém, esse método tem a limitação de não ser um representante das biomoléculas e nem mesmo sem encontrado em nenhum sistema biológico. Destaca-se, ainda, que termodinamicamente, qualquer componente que apresente um potencial redutor menor que este radical pode reagir com o mesmo (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

4 Materiais e Métodos

4.1 Material

Foram utilizadas folhas de acerola, araçá-roxo, guabiroba, goiaba, jaboticaba, pitanga adquiridas em sítios de Campo Mourão. O material vegetal foi lavado com água potável e seco em estufa com circulação de ar a temperatura de 90°C por um período de 18 horas. Sendo assim, as folhas foram moídas em um liquidificador para obtenção de pó uniforme, acondicionadas em potes de plástico e armazenadas em geladeira a temperatura de 5 a 8°C.

As análises foram realizadas na UTFPR *Campus* Campo Mourão.

4.2 Preparo dos extratos

A metodologia para extração de CFT foi feita conforme Asolini *et al.* (2006), com modificações. Foram pesadas 4 g de cada folha em tubos fálcon. Adicionou-se 35 mL de etanol 80% (v/v) acidificado com 0,5% (v/v) de ácido clorídrico (HCl) P.A. em cada extrato e os tubos foram colocados em banho com água fervente por 30 minutos.

O sobrenadante foi retirado e armazenado em outro tubo. À “torta” resultante dessa extração, foram adicionados 20 mL do mesmo solvente utilizado na primeira etapa e realizou-se uma nova extração com 35 mL de etanol 80% (v/v) acidificado com 0,5% de Ácido Clorídrico (HCl) 37% (m/m) em banho de água em ebulição por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e guardado juntamente com outro extrato obtido na primeira extração. Feito isso, centrifugou-se em 6000 rpm por 30 minutos e armazenou-se em geladeira a 2°C na ausência de luz para não haver degradação dos compostos a serem analisados, durante uma semana para a realização das análises físico-químicas.

4.3 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin- Ciocalteau segundo metodologia proposta por Singleton *et al.* (1999) com modificações. Foi utilizado ácido gálico como padrão de referência. Este método envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com formação de um complexo azul.

Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos foi transferida para um tubo de ensaio de 10 mL e adicionado 3 mL de água destilada seguidos de 0,25 mL do reagente de Folin Ciocalteau. A reação ficou em repouso por 3 minutos para então ser acrescentado 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5% (m/v). Um teste em branco foi conduzido nas mesmas condições, de modo que foi usado 0,1 mL de água destilada em substituição da amostra. As amostras foram protegidas com papel alumínio e conduzidas a um banho de 37°C por meia hora. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 765 nm. A quantificação de fenóis totais nos extratos em triplicata foram expressos em mg AG/100g de folha.

4.4 Determinação da atividade antioxidante total (AAT) pelo método ABTS⁺

A atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ [2,2' – azinobis – (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid)] foi feita conforme a metodologia descrita por Rufino *et al.*(2007). O radical ABTS⁺ foi formado pela reação de 5 mL da solução ABTS⁺ 7mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140mM, incubados à temperatura de 25°C e na ausência de luz, durante 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734nm.

4.4.1 Curva de calibração

Preparou-se uma solução padrão de Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, na concentração 2 mM. Primeiro, diluiu-se 25 mg deste

composto em álcool etílico até completar o volume para 50 mL em balão volumétrico. A partir desta solução, foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 100 a 2000 μM .

Em ambiente escuro, transferiu-se 100 μL de cada solução de trolox para tubos de ensaio, contendo 10 mL da solução do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da mistura. O álcool etílico foi utilizado como branco na calibração do equipamento.

Sendo assim, plotou-se as concentrações de trolox (μM) no eixo x e as respectivas absorbâncias no eixo y e calculou-se a equação da reta.

4.4.2 Determinação da atividade antioxidante total nos extratos

A partir do extrato de cada folha, foram preparadas três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se um alíquota de 100 μL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 10 mL do radical ABTS. A leitura foi feita após 6 minutos de reação a 734 nm, e o etanol foi utilizado como branco. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo y e a diluição (mg/L) no eixo x. Em seguida, determinou-se a equação da reta. O cálculo da ATT foi feito substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 μM do padrão Trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 μM de trolox, conforme equação 1.

$$y = -ax + b \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

y = Absorbância correspondente a 1000 μM de trolox

x = diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 μM de trolox

A partir do resultado encontrado (x) na equação 1, dividiu-se por 1000 pra ter o valor em g. O resultado final foi calculado conforme equação 2, pela

divisão de 1000 (μM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1 (g) para encontrar o valor final (Z) que foi expresso em μM trolox / g de folha.

$$X(g) = x / 1000$$

$$Z = 1000 / X(g) \cdot 1$$

(Eq. 2)

4.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) usando o programa Assistat versão 7.6 beta.

5 Resultados e Discussões

5.1 Compostos fenólicos

Na figura 4, é apresentada a curva padrão de ácido gálico, cuja equação da reta foi utilizada para o cálculo de compostos fenólicos nos extratos.

O Reagente de Folin Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA *et al.*, 2009), conforme é observado na figura 3.

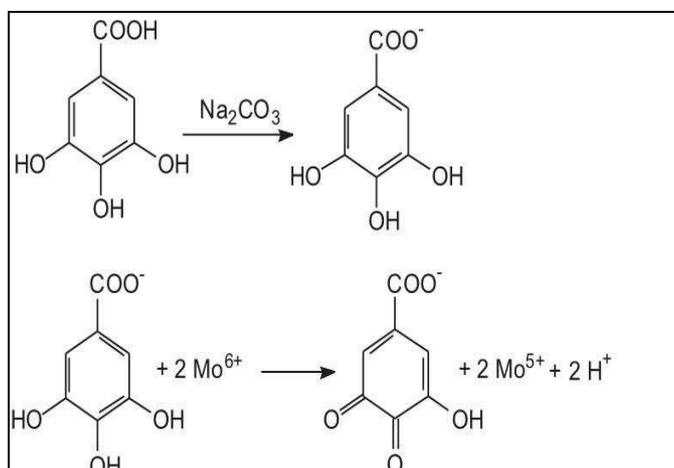


Figura 3: Reação do ácido gálico com molibdênio.
Fonte: Oliveira *et al.*, 2009

Em seguida, a tabela 1, apresenta os resultados obtidos com os extratos etanólicos de folhas de araçá, guabiroba, goiaba, jabuticaba, acerola e pitanga.

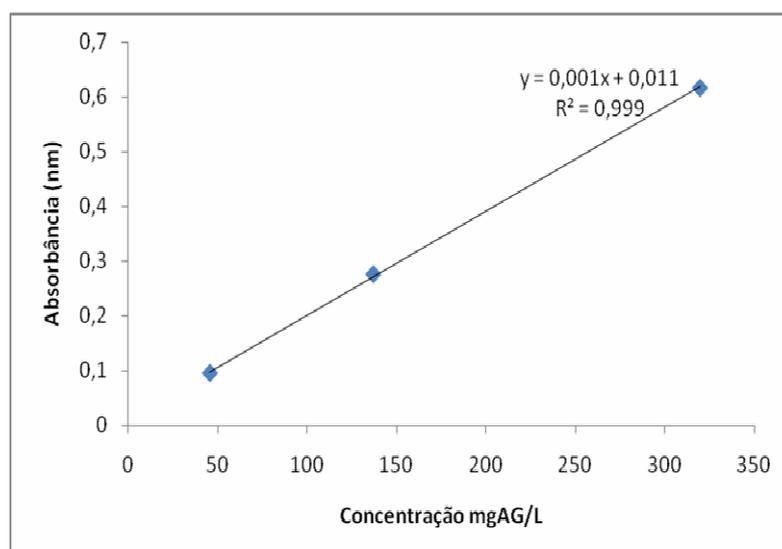


Figura 4: Curva Padrão do ácido gálico
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 1: Quantidade de compostos fenólicos realizados em extração com 80% de etanol acidulado com 0,5 % (v/v) de HCl concentrado em b.s. (base seca).

<i>Extrato</i>	<i>Compostos fenólicos (mg AG/100g)</i>
Acerola	2449,7 ^a ±45,55
Araçá	16670,1 ^d ±167,51
Goiaba	12508,9 ^c ±576,86
Guabiroba	13015,5 ^c ±148,84
Jaboticaba	17828,0 ^d ±632,72
Pitanga	20626,2 ^b ±130,25

Fonte: Elaborado pelo autor

O extrato que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais, foi o de pitanga, seguido das folhas de jaboticaba e araçá que apresentaram valores intermediários. Não houve diferença significativa entre a quantidade de CFT dos extratos de goiaba e guabiroba. No entanto, a acerola apresentou um menor conteúdo de fenóis totais.

Neste trabalho obteve-se 13015,5 mg AG/100 g de amostra nas folhas de guabiroba. Valores similares foram encontrados por Rocha (2011), que

obteve 11500 mg AG/100 g em extratos etanólicos da mesma folha. Magina *et al.* (2010), pesquisou CFT em três espécies de *Eugenia* (*E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*), cujos valores foram de 16260, 13800 e 12810 mg AG /100 g, respectivamente. Esses resultados concordaram com os valores obtidos neste trabalho para as folhas de guabiroba, araçá e goiaba.

Santos e Vieira (2010), utilizando etanol acidulado, submeteu as mesmas folhas à extração em temperatura ambiente e seus resultados são visualizados na tabela 2.

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos (mg equivalentes de ácido gálico/100 g) nas folhas secas de acerola, araçá, guabiroba, goiaba, ora-pro-nobis, jabuticaba e pitanga extraídas com metanol 80%-acidulado com ácido clorídrico e etanol 80%.

Amostra	Solvente metanol 80% acidulado com 1% (v/v) de HCl 37%	Solvente etanol 80%
	mg EAG/ 100g (b.s)	mg EAG/ 100g (b.s)
Acerola	1656,66 ± 55,07 ^a	1410,00 ± 00 ^e
Orapronobis	1693,33 ± 32,15 ^a	940 ± 27,07 ^f
Goiaba	4893,33 ± 68,07 ^b	2116,66 ± 20,82 ^d
Jabuticaba	5000 ± 72,11 ^{cb}	2960 ± 17,32 ^b
Pitanga	5130 ± 81,85 ^{db}	2752 ± 47,03 ^c
Guabiroba	5196,66 ± 49,33 ^d	3316,67 ± 60,27 ^a
Araçá	5494 ± 52,42 ^e	3296,67 ± 15,27 ^a

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

EAG = equivalente de ácido gálico

b.s = base seca

Fonte: Santos e Vieira (2010).

Os resultados deste trabalho indicaram que temperaturas elevadas, utilizando etanol acidulado, favoreceram a extração de maior quantidade de compostos fenólicos do que em temperaturas mais brandas utilizadas pelas

autoras. Em ambos os trabalhos, a acerola apresentou um conteúdo menor de compostos fenólicos.

Asolini *et al.* (2006), pesquisaram CFT em folhas de arruda, camomila, macela, alcachofra, erva-mate, tanchagem, malva, sálvia, capim-limão e alecrim. Os resultados variaram de 1800 a 14500 mg AG /100g de folha seca de malva e erva-mate, respectivamente. Os valores encontrados neste trabalho para as folhas de acerola, goiaba e guabiroba estão situados na faixa de variação encontrados pelos autores.

HAIDA *et al.* (2011), pesquisando compostos fenólicos em folhas, obteve quantidades que variaram de 15829 a 16507 mg AG/100g de extrato seco para a goiaba branca e 16061 a 17510 mg AG/100g para goiaba vermelha que superam o valor encontrado neste trabalho para o extrato alcóolico dessa mesma folha. Na literatura há valores similares ao deste trabalho obtidos por Chen, Lin e Hsieh (2007) no extrato aquoso de folhas de goiaba (15436 mg AG/100g).

Melo *et al.* (2003) ressaltam que os compostos bioativos em uma matriz vegetal apresentam polaridade diferenciada. Desta forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento de extração universal.

Para Gobbo-Neto e Lopes (2007), há vários fatores que podem interferir no teor de metabólitos secundários nas plantas, dos quais os compostos fenólicos fazem parte. Dentre eles estão a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataque de patógenos.

5.2 Avaliação da Atividade antioxidante pelo método ABTS

Na figura 5 é apresentada a curva padrão do ABTS e na tabela 3, estão descritos os valores de cada extrato que correspondem em μM de trolox/g de folha.

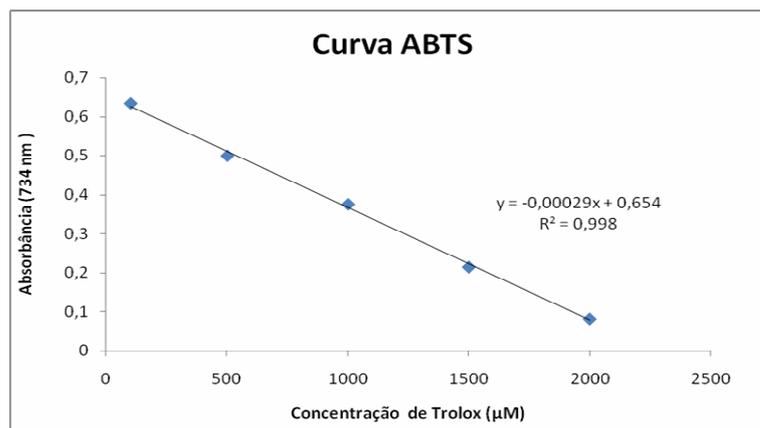


Figura 5: Curva padrão de Trolox
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3: Atividade antioxidante total (AAT) de extratos etanólicos em µM trolox/g de folha.

Extrato	AAT
Araçá	5018,1 ^b ±425,82
Goiaba	7039,23 ^b ±235,02
Guabiroba	13439,45 ^a ±2750,86
Jabuticaba	6451,28 ^b ±629,71
Pitanga	5897,76 ^b ±476,46
Acerola	3040,85 ^c ±301,47

Fonte: Elaborado pelo autor

A maior atividade antioxidante dentre as folhas analisadas neste trabalho foi a encontrada na folha de guabiroba (13439,45), cujo valor foi quase 5 vezes maior frente ao menor valor, exibido pela acerola (3040,85).

Nora (2012) obteve para atividade antioxidante por método ABTS 150,2 µM trolox /g de fruto de araçá vermelho, que é inferior ao resultado encontrado neste trabalho que foi de 5628,4 µM trolox/g de folha. Isso, provavelmente, se deve ao fato da autora ter feito a extração com outros solventes, acetona e metanol, do fruto e não da folha, indicando que esta possui uma maior capacidade antioxidante.

Silva (2011), trabalhando com polpas de guabiroba armazenadas em diferentes dias, obteve em 30 dias para extrato hidroalcoólico 109,9 μM trolox/g de polpa para 131,90 mg de AG/100g.

Fetter *et al.* (2009), em sua pesquisa, selecionou frutos de pitanga em diferentes estádios de maturação e obteve de 445,29 \pm 26,37 a 960,83 \pm 5,56 mg equivalente ácido clorogênico/100g de peso fresco de compostos fenólicos totais, que apresentaram atividade antioxidante variando de 4502,57 \pm 353,14 a 13668,41 \pm 200,87 μg trolox/g de peso fresco. A atividade antioxidante encontrada nesse trabalho, que foi de 7370,8 μM trolox/g de folha, corrobora com os valores da referida pesquisa, por situar na faixa de variação encontrada pelos seus autores. Embora os autores citados tenham usado outras partes da planta, os resultados mostraram que as folhas além de possuírem maior quantidade de CF, também apresentaram melhor atividade antioxidante.

Santos e Vieira (2010) avaliando a atividade antioxidante das mesmas folhas utilizadas nesse trabalho, concluíram que os extratos capazes de reduzir em 50% a atividade do radical DPPH em menores concentrações, foram pitanga (0,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$), jabuticaba (0,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$), goiaba (1,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$); os que apresentaram valores intermediários foram araçá (2,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e guabiroba (3,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$); e o maior de todos foi o extrato de folhas de acerola (9,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Neste estudo, foi utilizado outro método de avaliação da atividade antioxidante, o do radical ABTS, que corroborou com o resultado apresentado pelas autoras, no fato da folha da acerola ter uma atividade antioxidante menor que as outras espécies estudadas. No entanto, esse trabalho divergiu no fato da guabiroba apresentar uma maior atividade antioxidante, ao passo que no trabalho de Santos e Vieira (2010), a pitanga apresentou maior atividade antioxidante.

Os extratos de araçá, goiaba, jabuticaba e pitanga não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si. Observa-se então que estes extratos apresentam uma alta capacidade de doar seus elétrons e atuarem como excelentes antioxidantes.

Asolini *et al.* (2006), avaliando extratos aquoso e etanólico de alcachofra, obtiveram baixos teores de compostos fenólicos totais (3227 e 4003 mg

AG/100 g respectivamente), com atividade antioxidante acima de 85%, sugerindo que a concentração de CFT não determina a atividade antioxidante, mas sim a natureza destes compostos presente nos extratos.

Os resultados apresentados também indicaram que não foi encontrada uma correlação linear entre a quantidade CFT (compostos fenólicos totais) e a ATT (atividade antioxidante total) utilizando o método do radical cátion ABTS^{·+}, como é observado na figura 6.

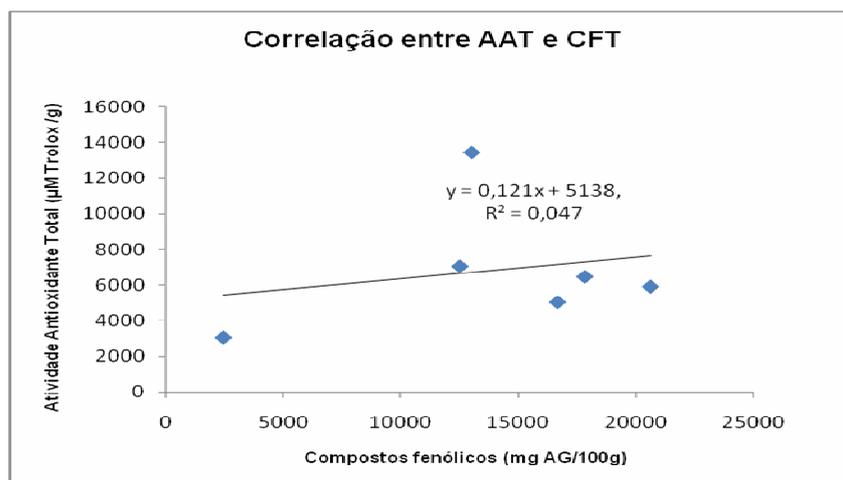


Figura 2: Correlação entre teor de CFT e a ATT de folhas de acerola, goiaba, guabiroba, araçá, jaboticaba e pitanga
Fonte: Elaborado pelo autor

6 Conclusão

Todos os extratos etanólicos acidificados extraídos em alta temperatura apresentaram elevados teores de compostos fenólicos, que em ordem crescente, estão as folhas: acerola, goiaba, guabiroba, araçá, jabuticaba e pitanga. Porém, dentre as seis, a que possuiu maior atividade antioxidante foi a folha de guabiroba, onde não foi encontrada uma correlação entre a quantidade de CFT e atividade antioxidante. Por isso, é necessário que se explorem mais sobre as folhas dessas frutíferas, pois os trabalhos até então publicados demonstram que além de um elevado teor de compostos fenólicos elas possuem excelente atividade antioxidante, que se aplicadas em alimentos, podem no futuro substituir antioxidantes sintéticos, a fim de reforçar a segurança alimentar.

Para trabalhos futuros, é importante a avaliação do teor de açúcares destes extratos, já que pesquisas pré-liminares indicaram que eles possuem uma quantidade significativa; verificação da inibição de enzimas por compostos fenólicos, bem como sua atividade antimicrobiana; identificar isoladamente os compostos bioativos presentes em cada folha e estudar seu efeito no organismo humano a níveis toxicológicos.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Revista Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210. 2010.

ALVES, Polliana M.; LEITE, Pedro H. A. S.; PEREIRA, Jozinete V.; PEREIRA, Luciana F.; PEREIRA, Maria S. V.; HIGINO, Jane S.; LIMA, Edeltrudes O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn, (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2 , 2006.

ALMEIDA, Joaquim M. D.; SANTOS, Ricardo J. dos; GENOVESE, Maria I.; LAJOLO, Franco M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/Ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452. Abr. jun. 2006.

ARAÚJO, Júlio M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2^aed. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.

ARNAO, Marino B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.11, p. 419- 421, 2000.

ASOLINI, Fabia C.; TEDESCO, Adriana M.; CARPES, Solange T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of food technology**. v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.

BEZERRA, João E. F.; SILVA JÚNIOR, Josué F.; LEDERMAN, Ildo E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Série Frutas Nativas. Funep, p. 16-28, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CHEN, Hui Y.; LIN, Yuh. C.; HSIEH, Chiu L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chem.** v. 104, p. 1418-24. 2007.

DONADIO, Luis C. **Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg).** Jaboticabal: Funep, 2000. 55p. (Série Frutas Nativas, 3).

FETTER, Mariana da R.; CORBELINI, Diandra D.; VIZZOTTO, Márcia; GONZALEZ, Tatiane N. **Compostos bioativos e atividade antioxidante de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) em diferentes estágios de maturação.** 18. Empos Amostra científica. 2009. Pelotas, Rio Grande do Sul.

GOBBO - NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundário. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 – 381, 2007.

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

HAAS, Lírio I. R. **Caracterização físico-química, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg).** 2011. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

HAIDA, Kimiyo S.; BARON, Ângela; HAIDA, Karissa S.; FACI, Danusa de; HAAS, Jucelaine; SILVA, Fábio J. da. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de Goiaba e Arruda. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 9, n. 28. Abr/jun. 2011.

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

JACOB, Robert A.; BURRI, Betti J. Oxidative damage and defese. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 63, n. 6, 1996.

KARAKAYA, Sibel. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 66, 2004.

KROON, Paul A; WILLIAMSON, Gary. Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives. **J. Sci. Food Agric**, v. 79, n. 3, p.355-361, 1999.

LAGUERRE, Mickaël; LECOMTE, Jérôme, VILLENEUVE, Pierre. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Review. Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LIMA, Alessandro de. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação de compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LORENZI, Harri; SARTORI, Sérgio F.; BACHER, Luís B.; LACERDA, Marco T. C. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006.

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

MAGINA, Michele A.; GILIOLI, Andressa; MORESCO, Henrique H.; COLLA, Guilherme; PIZZOLATTI, Moacir G.; BRIGHENTE, Inês M. C. Atividade antioxidante de três espécies de Eugenia (*Myrtaceae*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MEDINA, Aline L. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*)**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Industrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. RS.

MELETTI, Laura M. M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, p. 145-1453. 2000.

MELO, Enayde de A.; GUERRA, Nonete B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA (Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Campinas, v.36, n.1, p.1-11. 2002.

MELO, Enayde de A.; MANCINI FILHO, Jorge; GUERRA, Nonete B.; MACIEL, Giselle R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 195-199, dez. 2003.

NASS, Luciano L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia**, 2007.

NOGUEIRA, Rejane J. M. C.; MORAES, José A. P. V. de; BURITY, Hélio A.; SILVA JUNIOR, Josué F. da. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

NORA, Cleice D. **Caracterização, atividade antioxidante “in vivo” e efeito do processamento na estabilidade de compostos bioativos de araçá vermelho e guabiju**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

OLIVEIRA, Alane C.; VALENTIM, Iara B.; GOULART, Maria O. F.; SILVA, Cícero A.; BECHARA, Etelvino J. H.; TREVISAN, Maria T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Revista Química nova**, v. 32, n. 3, 2009. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=42>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

OU, Boxin; HAMPSCH, Maureen W.; PRIOR, Ronald L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, n. 10, p.4619 – 26, 2001.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA (Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. v. 31, p. 200-206, 1997.

PIETTA, Pier G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** v. 63, n. 7, p. 1035-1042. 2000.

PRIOR, Ronald L.; CAO, Guohua. In vitro total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic Biol Med.** v. 27, p. 1173 – 81. 1999.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4. jul/ago. 2006.

RE, Roberta; PELEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGO, Gizelda M. Monitoramento da Fenologia de espécies arbóreas das florestas brasileiras. **Embrapa Florestas**. Disponível em: <<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/580595/1/FolderFenolAracF.pdf>>>. Acesso em 7 de out. 2013.

RICE-EVANS, Catherine; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, Edmilson de O. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RUFINO, Maria do S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de.; MORAIS, Selene M. de.; SAMPAIO, Caroline de G.; JIMÉNEZ, Jara P.; CALIXTO, Fulgencio D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. Comunicado Técnico 128. **Embrapa**, Fortaleza, 2007.

SANTOS, Pauline S.; VIEIRA, Denise A. **Avaliação da atividade antioxidante de folhas de acerola, araçá-roxo, goiaba, guabiroba, jabuticaba, ora-pro-nobis e pitanga**. 2010. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em

Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2010.

SANTOS, Marli da S. Impacto do processamento sobre as características físico-químicas, reológicas e funcionais de frutos da gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). 2011. 148 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

SILVA, Everton M. **Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado sobre α -amilases com ênfase em *Kielmeyera coriacea***. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2008.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 477- 485.1971.

SILVA, Marília L. C.; COSTA, Renata S.; SANTANA, Andréa dos S.; KOBLITZ, Maria G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n. 3, p.669-682, jul/set. 2010.

SILVA, Pollyanna I. **Otimização da extração e microencapsulamento de fenólicos e antocianinas de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)**. 2011. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; RAVENTÓS, Rosa M. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

TAYZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERCI, Daniela B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 2004. 213 f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

TOVANI BENSQUER. Comércio, Importação, Exportação e Representações Ltda. Dossiê Antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, n.6. 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 6 set. 2011.

VENDRAMINI, Ana L.; TRUGO, Luiz C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

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

VOLP, Ana C. P.; RENHE, Isis R. T.; BARRA, Kiriaque; STRINGUETA, Paulo C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutr. Cin.** v. 23, n. 3, p.141-149. 2008.