

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS  
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CÂMPUS CAMPO MOURÃO – PARANÁ

MONISE CESTARI APPOLONI

**ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA *Lycium barbarum***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO  
2015

MONISE CESTARI APPOLONI

## **ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA *Lycium barbarum***

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado a disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso de Engenharia de Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Câmpus* Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Coorientador: Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior

CAMPO MOURÃO

2015



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA *Lycium barbarum*

por

MONISE CESTARI APPOLONI

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 13 de Fevereiro de 2015 às 14:00h como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk  
Orientador

---

Profa. Dra. Ângela Maria Gozzo

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Março

Aos meus pais, Angelina e Luis, que lutaram dia após dia para verem meu sucesso. Espelhos de confiança e sabedoria, tão poucas palavras, mas sábias o suficiente, que me confortaram em todos os momentos da minha vida. Meu amor por vocês é incondicional.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter conduzido o meu caminho até onde estou hoje. Não foram em vão as inúmeras vezes que pedi para que o Senhor me guiasse e traçasse o meu caminho da melhor maneira possível, e hoje sei que fui atendida. Sem a minha fé em Deus, nada teria conseguido.

Agradeço aos meus pais, Angelina e Luis, aos meus irmãos Vinícius e Laíse por sempre estarem ao meu lado, na conquista e na dificuldade. Sei que se em algum momento fraquejei, foi por vocês que eu lutei e estou aqui hoje. Minha família, minha vida. Minha vitória é por vocês. Amo-os incondicionalmente.

Agradeço ainda a minha avó Maria Aparecida, meu avô Oswaldo, minha tia Fátima e meu tio Wilson. Tenho o prazer de dizer que tive a sorte de ter mais dois “pais” e mais duas “mães”. Sempre me instruíram ao melhor caminho a se percorrer, nem sempre o mais fácil, mas com certeza o que tive maior aprendizado. Amo vocês.

Agradeço aos meus admiráveis professores orientadores, Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk e Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior, primeiramente pela oportunidade a mim cedida de ser orientada por dois grandes doutores da área de Engenharia de Alimentos, pelas diversas orientações e principalmente pelos conselhos e conversas amigas.

Agradeço ao Marcos Vieira e a Vanessa Rodrigues pelas diversas orientações no laboratório, e nós sabemos que não foram poucas, durante a realização da minha pesquisa. Agradeço-os ainda pela grande paciência que tiveram comigo, pelos momentos de descontração e até mesmo pelo apoio que me deram quando eu achava que tudo estava dando errado, e na verdade, consegui entender que não era eu e sim a “vida” de quem trabalha com pesquisa, cheia de desafios.

A quem posso chamar de amigos e segunda família, Gustavo, Renan, Lucas, Priscila, Bárbara e Murilo que mesmo com alguns momentos distantes, estiveram do meu lado ao longo desses anos, aguentando as minhas loucuras tanto em relação à faculdade, empresa, vida pessoal como quando a gente saía para se distrair, afinal todos sabem da minha velha frase: “companheiro é companheiro!”. Obrigada pelos cinco anos de companheirismo, amizade, respeito e lealdade. De vocês eu não esqueço jamais, vou sentir muita falta! Amo vocês.

Agradeço a Carol e a Ana Gabriela por serem duas amigas que conheci ao longo da faculdade que sempre estiveram dispostas a me ajudar e principalmente a ter uma conversa amiga. Agradeço aos meus amigos de Fernandópolis que mesmo distante, sempre se importaram comigo e me apoiaram nesse meu sonho, especialmente ao Vitor, por todo momento em que você esteve ao meu lado durante a minha graduação, me apoiando e tendo paciência comigo na realização desse meu sonho.

Aos amigos e melhores vizinhos que alguém poderia ter: Letícia, Luana, Gustavo, Vinícius, Patrícia, Rego, João e Calouro por terem sido tão acolhedores comigo nessa fase da vida. Uns já se formaram e se foram, outros chegaram há pouco tempo, mas sou muito grata a todos vocês com a mesma intensidade.

Há essa pessoa que é mais do que especial em minha vida, Sara. Agradeço a Deus por ter me dado você por todo esse longo tempo de universidade. Todos nós temos nossos defeitos e com você sei que aprendi a respeitar e admirar a pessoa inigualável que é. Você é mais do que uma amiga, é minha irmã e também mãe de coração, não tenho palavras para te agradecer por esses cinco anos morando juntas, sendo da mesma sala e ainda fazendo todos os trabalhos da faculdade juntas, eu amo muito você “gordinha”.

A Cyclus Consultoria – Empresa Júnior de Engenharia de Alimentos, a qual tenho orgulho em dizer que fundei. Foi um grande sonho e realização pessoal/profissional ter iniciado essa empresa, tenho só a agradecer pelo aprendizado que o Movimento Empresa Júnior me ofereceu por esse tempo. Obrigada a todas as pessoas maravilhosas que eu conheci e estive do meu lado nessa conquista!

Por fim, agradeço a UTFPR – *Campus* Campo Mourão e aos professores do Departamento Acadêmico de Alimentos por terem colaborado com a minha formação.

“Ajude as pessoas a realizarem seus sonhos e elas o ajudarão a realizar os seus”.

## RESUMO

APPOLONI, M. C. **Estudo dos compostos bioativos da *Lycium barbarum***. 2015. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

O estudo de compostos bioativos de frutas tem atraído cada vez mais atenção devido a suas propriedades nutraceuticas. A Goji berry, *Lycium barbarum* é uma baga originária da região da Ásia e vem sendo estudada em virtude de suas altas atividades biológicas devido aos seus compostos funcionais. Esta pesquisa teve por objetivo estudar os compostos fenólicos totais, flavonoides e antocianinas, assim como seu potencial antioxidante e identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes na fruta. Diferentes concentrações (v/v) de etanol (20%, 40%, 60%, 80%) foram utilizadas como solvente extrator dos compostos fenólicos, os quais foram quantificados por meio do método de Folin-Ciocalteu. Flavonoides totais foram estimados usando o método colorimétrico com cloreto de alumínio e o diferencial de pH foi utilizado para determinar as antocianinas monoméricas. O potencial antioxidante foi avaliado por meio dos métodos de Sequestro do Radical do DPPH e do ABTS. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para identificar e quantificar os compostos fenólicos individuais presentes na baga. Quanto maior o teor de etanol, maior foi a presença dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas monoméricas. No entanto, as amostras apresentaram elevado poder antioxidante para a extração com menor concentração alcoólica. Por meio da CLAE foram identificados: catequina, rutina, ácido clorogênico e por fim, ácido p-cumárico. Por fim, notou-se a importância desse estudo em virtude da escassez de estudos sobre os frutos da *Lycium barbarum*, já que esta é rica em compostos bioativos, e pelos fatores extrínsecos e intrínsecos que influenciam na composição destes compostos na baga.

**Palavras-chaves:** Goji berry, *Lycium barbarum*, compostos bioativos, antioxidantes, CLAE.

## ABSTRACT

APPOLONI, M. C. **Study of bioactive compounds of *Lycium barbarum***. 2015. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

The study of bioactive compounds in fruits has increased attracting attention due to its nutraceutical properties. The Goji berry, *Lycium barbarum* is an original berry cultivated mainly in the Asia region and has been studied due to its high biological activities due to its functional compounds. This research aimed to study the total phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, as well as its antioxidant potential and identification and quantification of phenolic compounds present in the fruit. Different concentrations (v / v) ethanol (20%, 40%, 60%, 80%) was used as extractor solvent of phenolic compounds, which were measured by the Folin-Ciocalteu method. Total Flavonoids were estimated using the colorimetric method with aluminum chloride and the pH differential was used to determine the monomeric anthocyanins. The antioxidant potential was assessed by means of scavenging methods of Radical DPPH and ABTS. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to identify and quantify the individual phenolic compounds present in the berry. The higher ethanol content was increased with the presence of phenolic compounds, total monomeric anthocyanins and flavonoids. However, the samples showed high antioxidant power to extraction with a lower alcohol concentration. By means of HPLC were identified as catechin, rutin, chlorogenic acid and, finally, p-coumaric acid. Finally, its noted the importance of this study due to the lack of studies on the fruits of *Lycium barbarum*, since it is rich in bioactive compounds, and the extrinsic and intrinsic factors that influence the composition of these compounds in the berry

**Keywords:** Goji berry, *Lycium barbarum*, bioactive compounds, antioxidants, HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem ilustrativa da fruta Goji Berry .....	14
Figura 2 - Formas de estabilização do anel fenólico de uma molécula antioxidante por ressonância interna. ....	16
Figura 3 - Estrutura básica dos flavonoides. ....	17
Figura 4 - Estrutura geral de uma molécula de antocianina. ....	19
Figura 5 - Formas estruturais das antocianinas em diferentes pH. ....	20
Figura 6 - Características espectrais de antocianinas de rabanete purificadas em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. ....	21
Figura 7 - Curva padrão de ácido gálico utilizada para a quantificação dos compostos fenólicos totais.....	31
Figura 8 - Curva padrão de catequina utilizada para a quantificação dos flavonoides totais.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos utilizados como padrão para CLAE e sua respectiva curva de calibração .....	30
Tabela 2 - Conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas quantificados em extratos de diferentes concentrações etanólicas da fruta goji berry. ....	32
Tabela 3 - Atividade antioxidante em extratos de diferentes concentrações etanólicas da fruta goji berry pelos ensaios de DPPH e ABTS <sup>•+</sup> . ....	37
Tabela 4 - Compostos fenólicos extraídos de goji berry em função do teor de etanol na solução extratora. ....	39

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 GOJI BERRY .....	14
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	15
2.2.1 Quantificação dos compostos fenólicos .....	16
2.3 FLAVONOIDES .....	17
2.3.1 Quantificação dos flavonoides .....	18
2.4 ANTOCIANINAS .....	18
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	21
2.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CLAE .....	23
3 OBJETIVOS .....	24
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1 AMOSTRAS DE GOJI BERRY .....	25
4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	25
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	25
4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS .....	26
4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS .....	27
4.6.1 Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) .....	28
4.6.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	28
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE .....	29
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1 CONTROLE ANALÍTICO .....	31
5.1.1 Curva padrão de ácido gálico .....	31
5.1.2 Curva padrão de catequina .....	31
5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS .....	32
5.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE .....	37

5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	38
6 CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O comércio internacional de alimentos está crescendo continuamente liderado pelos gostos dos consumidores e hábitos alimentares que vêm mudando, tornando-se amplamente variados e estimulando a demanda por alimentos provenientes de outras regiões, atraente não só pelas suas características culinárias, mas também pelas suas propriedades funcionais (REEVE, 2010).

Goji berry (*Lycium barbarum*), também conhecido como wolfberry, pertence à família botânica *Solanaceae* (CARNÉS, et al., 2013), vem sendo cultivada por mais de 2500 anos como alimento funcional em países como China, Tibete e outras partes da Ásia (AMAGASE, NANCE, 2008). Podem ser consumidas como frutas frescas, desidratadas e embebidas em licor (AMAGASE, FARNSWORTH, 2011).

Estudos recentes indicam que os extratos das gojis berries possuem uma gama de atividades biológicas. Essas contribuições foram provadas e associadas em virtude do alto valor nutracêutico. A fruta é rica em polissacarídeos glicoconjugados solúveis em água, ao qual é atribuída a maior parte dos efeitos biológicos do fruto e, em adição a fração solúvel, níveis elevados de vitaminas B, ácido ascórbico, carotenoides e numerosos fitoquímicos polifenólicos e fitosteróis foram encontrados na fruta (REEVE, 2010; LI, 2007).

As frutas berries são frequentemente fonte de fitoquímicos antioxidantes entre frutas e vegetais (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012). Extensas pesquisas têm indicado que a atividade antioxidante da goji berry está relacionada com  $\beta$ -caroteno e compostos fenólicos, incluindo ainda os naturalmente existentes nas bagas como os compostos fenólicos, taninos, ligninas, flavonoides e outros compostos fenólicos simples (SONG, XU, 2013).

Os compostos fenólicos em extratos de bagas são caracterizados por terem uma forte capacidade de sequestrar radicais de oxigênio para inibir a

oxidação, bem como o crescimento de bactérias patogênicas (HEINONEN et al, 1998; MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012).

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular que constituem a maior parte da coloração amarela, vermelha e azul em frutas (LAMPILA et al., 2009). Estes fitoquímicos também são eficazes no sequestro dos radicais livres e são importantes antioxidantes devido ao seu elevado potencial redox e sua capacidade de quelar metais (HAMINIUK et al., 2012).

As antocianinas são efetivas doadoras de hidrogênio e se encontram largamente distribuídas na natureza. São responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e quase todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. São altamente instáveis e muito suscetíveis à degradação. (VINSON et al., 1999).

Existem relatos de pesquisas realizadas com objetivo de identificar e isolar substâncias com compostos ativos que sejam benéficas à saúde humana. Para isto, o uso de tecnologias avançadas é essencial na pesquisa destes compostos bioativos, principalmente devido à complexidade das matrizes originais em que estes compostos se encontram. Tecnologias avançadas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são as mais utilizadas (BERNAL et al., 2011; PIEKARSKI, 2013).

Assim, o estudo propõe ao avaliar o teor de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, potencial antioxidante e a caracterização dos compostos presente no extrato etanólico da fruta goji berry, integrará maior número de informações ao assunto abordado, e poderá incentivar a utilização desta fruta.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GOJI BERRY

*Lycium barbarum* (*Solanaceae*) vem sendo utilizado na medicina tradicional chinesa há séculos. Seus frutos (Figura 1) possuem de 1-2 cm de comprimento, são brilhantes, de coloração vermelho-alaranjado e com formato elipsoides (DONNO et al., 2014). São comumente conhecidos como Goji berries ou wolfberries, que vem do caráter "gou", relacionando-a com o que significa lobo. O nome da baga é uma extrapolação de uma série de palavras nativas, e foi originalmente cunhado em 1973 por pesquisadores do Instituto Tanaduk Botanical Research (TBRI) (AMAGASE, FARNSWORTH, 2011). Atualmente são valorizadas pela sua versatilidade de cor e sabor nas refeições comuns, lanches, bebidas e aplicações medicinais (KONCZAK et al., 2010).



**Figura 1** - Imagem ilustrativa da fruta Goji Berry

FONTE: <https://riquezanatural.com.br/blog/goji-berry-tem-poder-rejuvenescedor-e-ajuda-a-emagrecer-2/>

A fruta Goji berry tem sido amplamente utilizada como um ingrediente funcional em produtos nutracêuticos. Estudos indicam que os extratos das bagas possuem uma gama de atividades benéficas ao organismo, incluindo efeitos sobre o envelhecimento, neuroproteção, antifadiga/resistência, aumento do metabolismo, controle da glicose em diabéticos, glaucoma, propriedades

antioxidantes, imuno-modulação, atividade antitumoral, e citoproteção (LUO, 2002; LI, 2007; AMAGASE, NANCE, 2008; SONG, XU, 2013).

O goji contém 18 aminoácidos, incluindo os oito que são essenciais, tais como a isoleucina e triptofano; mais de 21 oligoelementos, incluindo o zinco, o ferro, o selênio e germânio; alto teor de proteína; contém carotenoides antioxidantes, incluindo  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, luteína, licopeno, criptoxantina e xantofilas. A fruta é considerada uma das fontes com maior concentração de vitamina C, contendo 500 vezes mais vitamina C do que a laranja; ainda são ricos em vitaminas B1, B2, B6 e vitamina E; contém fitonutrientes, ácidos graxos essenciais e ainda uma grande quantidade em fibra (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Ao lado do fruto seco de goji berry vendido no mercado, os produtos mais notáveis são a bebida goji e vinho goji (goji marinado em licor de grãos), que foram reconhecidas como bebidas funcionais (SONG, XU, 2013).

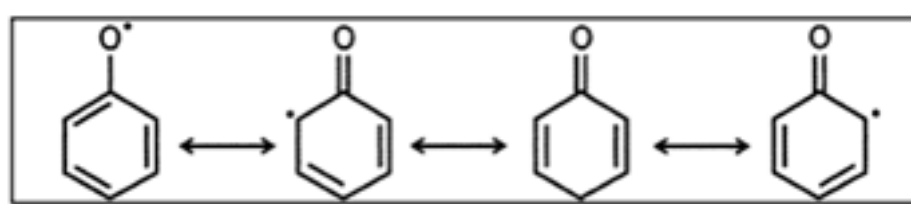
Os antioxidantes existentes naturalmente na goji berry são compostos fenólicos, incluindo taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos simples. É amplamente aceito que a atividade antioxidante significativa de alimentos está relacionada ao alto teor de compostos fenólicos totais (SONG, XU, 2013).

## 2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, com mais de 8000 compostos fenólicos que fazem parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SILVA et al., 2010).



Os compostos fenólicos possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas e sua estrutura pode ser simples, com apenas uma molécula fenólica ou complexa, com alto peso molecular (BALASUNDRAM et al., 2006). Devido à presença de hidroxilas em sua molécula, estas são capazes de eliminar os radicais livres pela formação de radicais fenoxil (SALVADOR, HENRIQUES, 2004), atuando como antioxidante, no qual os produtos intermediários formados são estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estes compostos, ou seja, estes retêm o elétron desemparelhado sem causar danos as estruturas (OETTERER, et al. 2006; SOARES, 2002), como observado na Figura 2.



**Figura 2** - Formas de estabilização do anel fenólico de uma molécula antioxidante por ressonância interna.

FONTE: Oetterer et al., 2006.

### 2.2.1 Quantificação dos compostos fenólicos

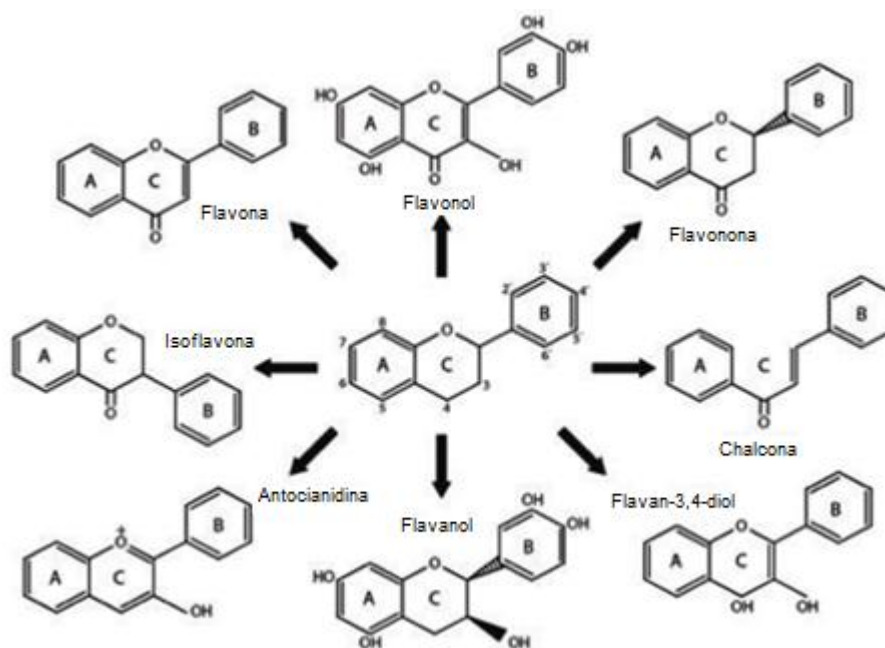
O conteúdo de fenóis totais pode ser determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ROSSI, 1965). Este método é sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação, sendo baseados nas reações de oxi-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. O método de Folin-Ciocalteu utiliza a redução pelos fenóis, em meio alcalino, do fosfomolibdato-fosfotungstato, a molibdênio, cuja coloração é azul (SILVA et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2008)

Para este teste, a quantidade de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas (ANGELO, JORGE 2007).

## 2.3 FLAVONOIDES

Pesquisas recentes têm reforçado a importância de flavonoides em virtude de seus papéis significativos em relação as atividades antioxidantes e as atividades biológicas (SONG, XU, 2013).

Os flavonoides (Figura 3) compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. Suas principais fontes são: frutas, vinho tinto e chá (GRAHAM, 1992; SILVA et al., 2010).



**Figura 3** - Estrutura básica dos flavonoides.

FONTE: Adaptado de Silva et al., 2010.

Os flavonoides presentes nos alimentos normalmente estão na forma glicosilada, ou seja, ligados a um açúcar. Apresentam ação direta no sequestro de radicais livres pela doação de elétrons ou transferência de moléculas de hidrogênio, apresentando, portanto, atividade antioxidante e demonstram ação

anti-inflamatória, sendo esta atribuída principalmente a modulação de citocinas. Os flavonoides apresentam ainda atividade antiviral e anticarcinogênica, além de serem capazes de proteger moléculas de LDL da oxidação e prevenir a agregação plaquetária. Pequenas diferenças existentes entre o tipo de ligação com monômeros, a isomerização ou a redução da polimerização influenciam nas atividades biológicas destes compostos. Quanto maior o número de hidroxilas na molécula, por exemplo, melhor será a atividade antioxidante dos flavonoides via sequestro de radical (CALIXTO et al., 2004; PIEKARSKI, 2013).

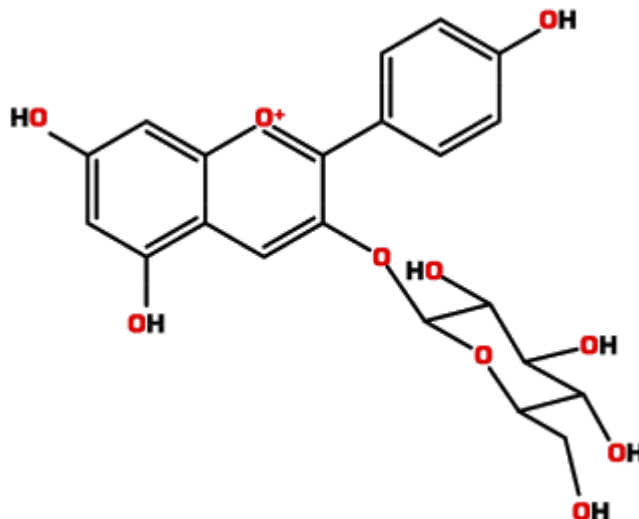
### 2.3.1 Quantificação dos flavonoides

Dentre os diversos métodos de quantificação dos flavonoides, o método colorimétrico com cloreto de alumínio de Chang et al. (2002) é um dos mais utilizados.

O  $AlCl_3$  é um composto utilizado como um reagente de deslocamento em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural dos compostos flavonoídicos (PONTIS et al., 2014). Baseia-se na formação de um complexo entre o íon alumínio, Al (III), e os grupos carbonilas e hidroxilas de flavonas e flavonóis que produzem uma cor amarela (POPOVA et al., 2004).

## 2.4 ANTOCIANINAS

As antocianinas (Figura 4) são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, amplamente distribuídos no reino vegetal. São responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul presentes em frutas, vegetais e grãos, bem como seus derivados. As antocianidinas são estruturas básicas das antocianinas e, quando são encontradas nas formas glicosiladas, são conhecidas como antocianinas (LEIDENS, 2011).



**Figura 4** - Estrutura geral de uma molécula de cianidina-3-glicosídeo.

FONTE: <http://umaquimicairresistivel.com.br/2011/03/antocianinas>

Além de serem responsáveis pela coloração, às antocianinas exercem importante atividade antioxidante (PIEKARSKI, 2013).

Estudos sobre as atividades biológicas das antocianinas foram realizados e notou-se grande influência das mesmas na melhora da capacidade visual, melhora da função cognitiva, redução do risco cardiovascular, prevenção contra certos tipos de câncer e auxílio na obesidade. (CHEN et al., 2005; PIEKARSKI, 2013).

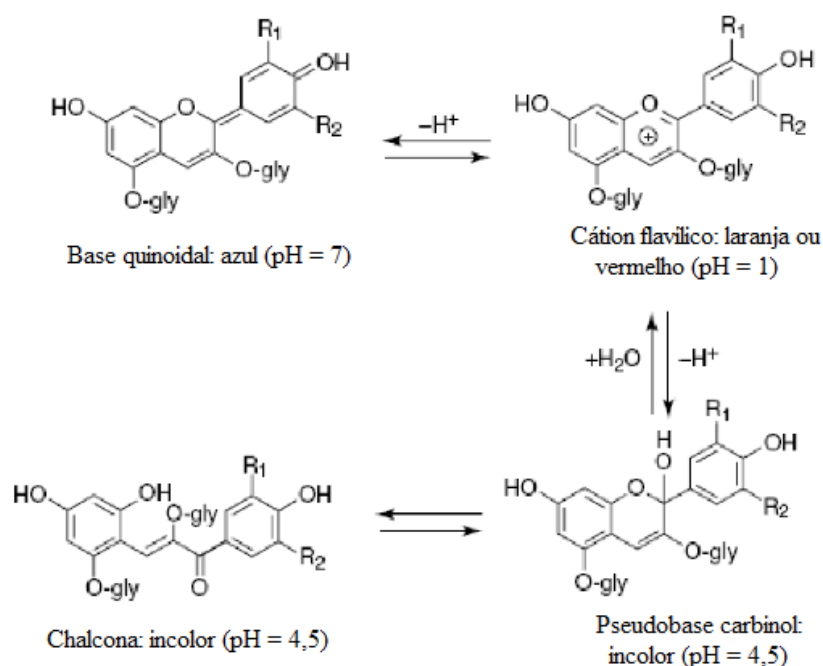
#### 2.4.1 Quantificação das antocianinas

Diversos estudos falam sobre os métodos existentes para a quantificação de antocianinas, dentre os quais se destacam aqueles que envolvem: polarografia, colorimetria, espectrofotometria UV-VIS, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (FAVARO, 2008).

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se, fundamentalmente, nas transformações estruturais que as antocianinas sofrem em função das mudanças de pH a que são submetidas. O método oficial internacional para a

quantificação de antocianinas é baseado no método do pH diferencial (LEE et al., 2005).

Na Figura 5 estão apresentadas as quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa: o cátion flavílico (AH<sup>+</sup>), a base quinoidal (A), a pseudobase carbinol (B) e a chalcona (C). As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas. Em condições ácidas (pH inferior a 3,0), a antocianina existe primariamente na forma de cátion flavílico, na cor laranja ou vermelha. Aumentando o pH, ocorre a perda do próton para produzir as formas quinoidais, azuis ou violetas. Em paralelo, ocorre a hidratação do cátion flavílico gerando a pseudobase carbinol, também incolor. As quantidades relativas de cátion flavílico, formas quinoidais, pseudobase carbinol e chalcona na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (GIUSTI, WROLSTAD, 2001; LEIDENS, 2011)

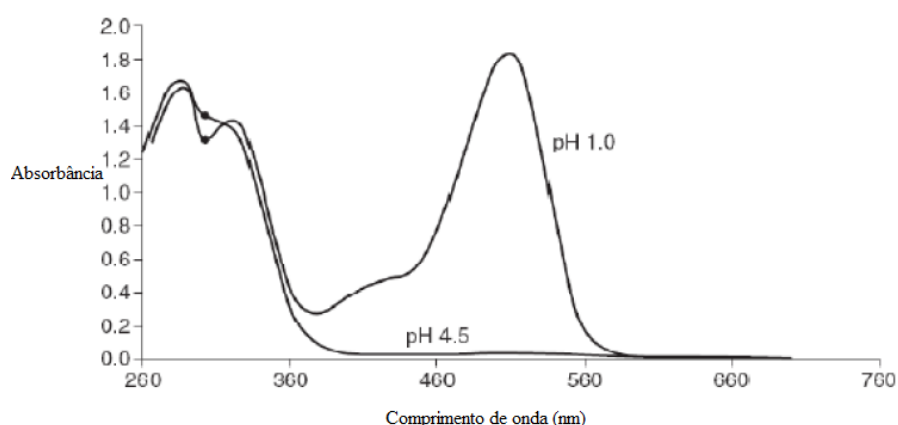


**Figura 5** - Formas estruturais das antocianinas em diferentes pH.

FONTE: Constant, 2003.

Antocianinas isoladas são altamente instáveis e suscetíveis à degradação. A sua estabilidade é afetada por fatores como temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes,

presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos. No entanto, o maior problema na estabilidade das antocianinas é a mudança de comportamento sob diferentes faixas de pH. As antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com uma mudança de pH manifestada por diferentes espectros de absorvância. Pode-se notar por meio da Figura 6, que a coloração predominante e maior absorvância é em pH 1,0 e coloração menos intensa e de menor absorvância é em pH 4,5 (WROLSTAD, 1993; LEIDENS, 2011).



**Figura 6** - Características espectrais de antocianinas de rabanete purificadas em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5.

FONTE: Giusti e Wrolstad, 2001.

## 2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na atualidade, uma maior preocupação dos consumidores com a saúde e foco na prevenção de doenças tem sido notada e, conseqüentemente em virtude desse fator, tem-se observado um grande aumento no consumo de frutas em todo o mundo, pois várias evidências científicas apontam efeitos benéficos à saúde de dietas ricas em frutas, hortaliças e vegetais, que apresentam em sua composição vários compostos com capacidade antioxidante, como vitaminas A e C, carotenoides e compostos fenólicos. Muitos autores têm demonstrado correlação entre a concentração destes compostos e a capacidade antioxidante (ALVES, et al., 2007; CRUZ, 2008)

Aliado ao interesse de alimentos com alto valor nutracêutico, o estudo na composição da fruta Goji berry tem se intensificado cada vez mais por causa de uma maior consciência de seus possíveis efeitos benéficos para a saúde, pois são ricas fontes de micronutrientes e fitoquímicos, tais como ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012). Alguns destes fitoquímicos, que atuam como antioxidantes foram recentemente identificados, e dados recentes mostram que elas ajudam a otimizar a saúde humana ao neutralizar os radicais livres no corpo (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012; DONNO et al., 2014).

A capacidade que um composto possui em doar elétrons ou hidrogênio, em deslocar ou estabilizar um elétron desemparelhado, em reagir com outro antioxidante ou com um oxigênio molecular é definida como potencial antioxidante, sendo assim, estes apresentam ação anticancerígena quando são causados devido à ação de radicais livres, ou seja, um antioxidante é uma substância química que impede a oxidação de outros produtos químicos (MORAES, COLLA, 2006).

Vários métodos *in vitro* são realizados para avaliação da capacidade de eliminação de radicais livres, no qual diferentes compostos artificiais têm sido usados, tais como: 2,2'-azinobis-ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e 1,1'-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Porém, por serem radicais artificiais, eles não se reproduzem em situação *in vivo*, o que é uma desvantagem.

Entretanto, esses compostos artificiais são úteis para classificar a atividade antioxidante de substâncias e de alimentos que os contêm, ou seja, podem servir para avaliar a influência do processo na elaboração de um determinado alimento, por exemplo, a influência sobre a atividade antioxidante do produto e, além disso, podem ser um indicador do potencial antioxidante antes do consumo dos alimentos avaliados (VILLAÑO et al., 2007).

## 2.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CLAE

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis ou dos componentes de uma mistura (LA TORRE, 2013).

As técnicas cromatográficas ficam atuais ao se incluir a cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE (LA TORRE, 2013). É um tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (SKOOG, 1992).

A CLAE é uma técnica de ultra microanálise podendo, dependendo da substância e do detector empregado, quantificar massas de componentes inferiores a  $10^{-18}$  g. As misturas que podem ser separadas por CLAE são líquidos e sólidos, iônicos ou covalentes com massa molar de 32 até 4.000.000. Para uma substância qualquer poder ser “arrastada” por um líquido ela deve dissolver-se nesse líquido, não tendo limitação de volatilidade ou de estabilidade térmica (COLLINS, 1988).

As vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência se dão por não necessitar que a amostra seja volátil, quando comparadas a cromatografia gasosa. Ainda a CLAE, possui um tempo reduzido de análise, fornecendo alta resolução, boa detectabilidade, bons resultados qualitativos e quantitativos e por fim sua versatilidade e automação. No entanto, entre as suas desvantagens, pode ser citado o alto custo de instrumentação e operação, falta de detector universal sensível, a necessidade de experiência no seu manuseio e por ser pouco usada para análises qualitativas (SNYDER, 1979; COLLINS, 1988).



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral estudar os compostos bioativos e a atividade antioxidante da fruta goji berry.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os compostos bioativos utilizando diferentes concentrações de etanol;
- Quantificar o teor dos compostos fenólicos totais;
- Quantificar a concentração dos flavonoides totais;
- Quantificar o teor das antocianinas monoméricas;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos etanólicos da baga por meio do sequestro dos radicais do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) e do 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS+•);
- Identificar, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), os compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos etanólicos da amostra.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS DE GOJI BERRY

As amostras desidratadas de goji berry foram adquiridas em estabelecimento comercial na cidade de Campo Mourão (PR), Brasil. As frutas foram armazenadas em ultrafreezer por 3 dias em temperatura de aproximadamente -40 °C e posteriormente liofilizadas. Por fim, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos fechados à vácuo e armazenadas em ambiente protegido da luz e a temperatura de refrigeração. Para a utilização, as amostras foram trituradas em um mini processador doméstico.

### 4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a extração dos compostos fenólicos totais, utilizaram-se diferentes concentrações de etanol, em condições de 20%, 40%, 60% e 80%. A extração ocorreu em tubos do tipo falcon, na razão 1:20, sendo 1,5 g de amostra seca e moída e 30 mL do solvente. Durante 12 horas, os tubos foram agitados em um homogeneizador de amostras (30 rpm), sob abrigo da luz. Posteriormente, o material foi centrifugado durante 15 minutos, à 20 °C e 4000 rpm. O sobrenadante coletado foi utilizado nas análises de compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas, avaliação da capacidade antioxidante, utilizando os métodos de sequestro dos radicais do DPPH e do ABTS, e ainda para análise por CLAE.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor dos compostos fenólicos foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo metodologia de Singleton e Rossi (1965). Para o

desenvolvimento da reação foram utilizados tubos *ependorf* e assim, foram pipetados 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, 2370  $\mu\text{L}$  de água destilada, e 150  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu. Após 2 minutos de repouso, adicionou-se 450  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 15%. As soluções foram incubadas ao abrigo da luz por 2 horas para completa reação do reagente. A seguir, a absorbância foi determinada a 765 nm em espectrofotômetro (modelo UV / VIS T-80, PG Instruments Limited, Pequim, China). O procedimento foi realizado em triplicata.

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por litro e miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de amostra em base seca ( $\text{mg EAG.L}^{-1}$  e  $\text{mg EAG.100 g}^{-1}$ ).

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação dos flavonoides totais foi baseado no método colorimétrico com cloreto de alumínio de acordo com a metodologia de Chang et al. (2002). Em triplicata, pipetou-se 250  $\mu\text{L}$  de amostra, 1250  $\mu\text{L}$  de água destilada e 75  $\mu\text{L}$  de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5%. Após 6 minutos, acrescentou-se 150  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio hexaidratado ( $\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ) a 10%. Esperou-se 5 minutos e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a 1 M e 275  $\mu\text{L}$  de água destilada. Calibrou-se o espectrofotômetro (modelo UV / VIS T-80, PG Instruments Limited, Pequim, China) e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 510 nm.

Os resultados foram interpolados com a curva de calibração de catequina e expressos em miligramas de equivalentes de catequina por litro e miligramas de equivalentes de catequina por 100 gramas de amostra em base seca ( $\text{mg EC.L}^{-1}$  e  $\text{mg EC.100 g}^{-1}$ ).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

O teor de antocianinas foi determinado segundo o método de pH diferencial, proposto por Giusti e Wrolstad, 2001. Foi realizado em triplicata a medição espectrofotométrica (modelo UV / VIS T-80, PG Instruments Limited, Pequim, China) em 520 nm e 700 nm das absorvâncias das amostras de extrato puro de antocianinas em duas faixas de pH, 1 e 4,5, por meio das soluções de cloreto de potássio (KCl) a 0,025 mol.L<sup>-1</sup> e de acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) a 0,4 mol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os cálculos dos teores de antocianinas foram feitos através da equação (1) e da equação (2).

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

$$MA = \frac{A \times M \times DF \times 1000}{\lambda \times \varepsilon} \quad (2)$$

Onde:  $A_{520}$  = Absorvância medida em 520 nm e  $A_{700}$  = Absorvância medida em 700 nm; MA é a concentração do pigmento de antocianina monomérica (mg/L); M é a massa molar das antocianinas (g/mol); DF é o fator de diluição da amostra;  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar (L<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>) e  $\lambda$  é o comprimento do caminho óptico da cubeta (1 cm).

Segundo Giusti e Wrolstad (2001), quando não se tem conhecimento o tipo de antocianina majoritário na amostra, calcula-se o teor de pigmento como cianidina-3-glicosídeo, onde  $M = 449,2$  g/mol e  $\varepsilon = 26900$  L<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>.

Assim, os resultados foram expressos em mg cia-3-gli.L<sup>-1</sup> e mg cia-3-gli.100 g<sup>-1</sup> em base seca.

## 4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.6.1 Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> foi realizada segundo Thaipong et al., (2006). Uma solução de trabalho foi preparada pela agitação de duas soluções estoque (solução 7,4 mmol.L<sup>-1</sup> de ABTS e solução 2,6 mmol.L<sup>-1</sup> de persulfato de potássio) em quantidades iguais, deixando reagir por 12 horas em temperatura ambiente no escuro. Decorrido o tempo da reação, a solução foi diluída pela mistura de 1 mL de solução de ABTS<sup>•+</sup> com 60 mL de metanol para se obter uma absorbância de 1,1 a 734 nm. Para a análise, um volume de 150 µL do extrato foi misturado com 2850 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup>. Após 2 horas em ambiente escuro, a absorbância das amostras foi lida a 734 nm e como controle negativo utilizou-se água.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram comparados à curva de calibração de Trolox e expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em µmol.TEAC L<sup>-1</sup> e µmol.TEAC 100 g<sup>-1</sup>.

### 4.6.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O ensaio do DPPH foi realizado segundo metodologia de Mensor et al. (2001) com algumas modificações. Inicialmente, 2500 µL de extrato diluído foram adicionados à 1000 µL de solução métanólica de DPPH 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>. Também foi preparado um controle negativo contendo 2500 µL da solução extratora (etanol) e 1000 µL de DPPH, e quatro brancos para desconsiderar a coloração dos extratos (2500 µL do extrato e 1000 µL de etanol 20, 40, 60 e 80%). As misturas foram armazenadas ao abrigo da luz durante 30 minutos e a absorbância foi registrada a 518 nm em espectrofotômetro (modelo UV / VIS T-80, PG Instruments Limited, Pequim, China). Etanol foi utilizado como branco para calibração do equipamento.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram comparados à curva de calibração de Trolox e expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em  $\mu\text{mol.TEAC L}^{-1}$  e  $\mu\text{mol.TEAC } 100 \text{ g}^{-1}$ .

#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

A análise de compostos fenólicos foi baseada na metodologia descrita por Haminiuk et al. (2012), com algumas modificações. Os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, São Paulo, Brasil). A análise de CLAE foi realizada em triplicata, usando um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemanha) equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna do compartimento de amostra Ultimate 3000, detector de fotodiodo Ultimate 3000. O software Chromeleon foi utilizado para controlar o amostrador automático, configurar os gradientes e realizar a aquisição de dados.

As fases móveis utilizadas foram ácido acético 1% (A) e metanol (B) para um total de tempo de execução de 65 min. O gradiente foi programado como segue: 5-10% B (0-2 minutos), 10-12% B (2-3 minutos), 12-16% B (3-5 minutos), 16-23% B (5-10 minutos), 23-33% B (10-20 minutos), 33-45% B (20-30 minutos), 45-65% B (30-40 minutos), 65-80% B (40-45 minutos), 80-100% B (45-50 minutos), 100% B (50-55 minutos), 100-5% B (55-60 minutos) e 5% B (60-65 min). O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ . As separações foram realizadas numa coluna Acclaim® 120, C18 5  $\mu\text{m}$  120 A (4,6 mm x 250 mm), operando a 40 °C com vazão de 1,0  $\text{mL.min}^{-1}$ .

Como padrões para a identificação dos compostos fenólicos das amostras, foram utilizados os compostos mostrados na Tabela 1, com as respectivas curvas de calibração e seus coeficientes de determinação.

**Tabela 1-** Compostos utilizados como padrão para CLAE e sua respectiva curva de calibração

<b>Padrão</b>	<b>Equação da curva de calibração</b>	<b>Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup>)</b>
Ácido gálico	$y = 0,0608x$	0,9952
Catequina	$y = 0,0108x$	0,9973
Ácido siríngico	$y = 0,0545x$	0,9974
Naringenina	$y = 0,0261x$	0,9970
Ácido vanílico	$y = 0,0886x$	0,9968
Ácido clorogênico	$y = 0,0512x$	0,9970
Ácido cafêico	$y = 0,0914x$	0,9973
Ácido p-coumárico	$y = 0,1054x$	0,9974
Ácido ferúlico	$y = 0,0886x$	0,9973
Piceatanol	$y = 0,0171x$	0,9973
Rutina	$y = 0,0233x$	0,9969
Quercetina	$y = 0,0616x$	0,9940

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

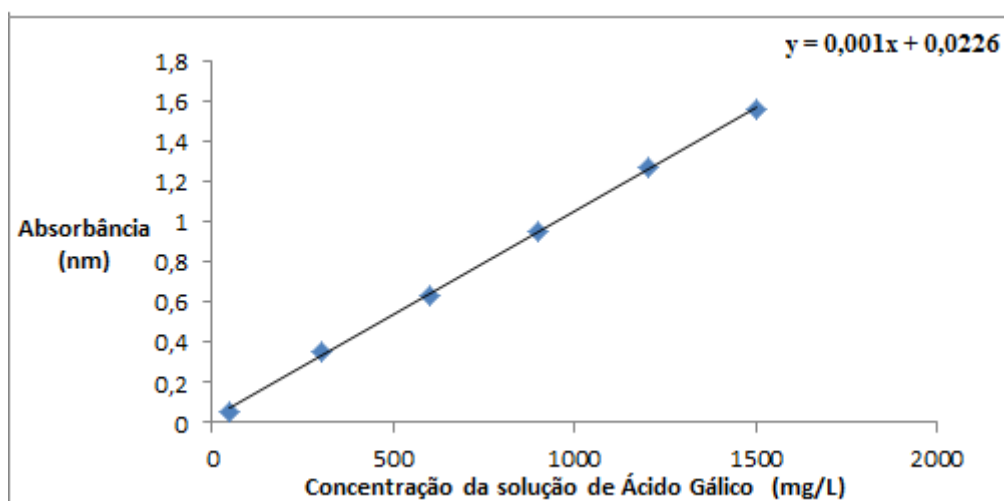
Os dados experimentais foram apresentados por meio das médias e os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, utilizando software *STATISTICA 7.0* (Statsoft, OK, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTROLE ANALÍTICO

#### 5.1.1 Curva padrão de ácido gálico

Para a determinação de compostos fenólicos totais, elaborou-se uma curva padrão de ácido gálico (Figura 7), com ajuste linear ( $R^2$ ) de 0,9993 e a equação da reta apresentado abaixo.

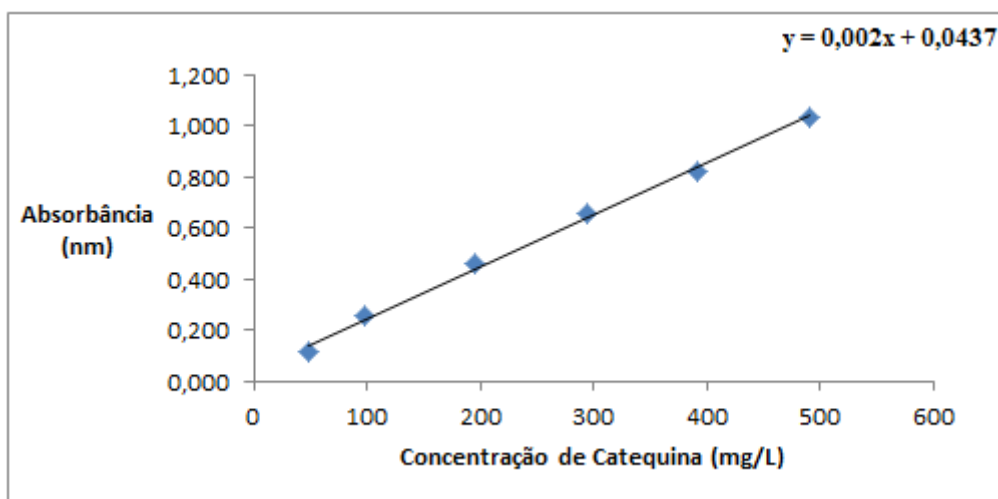


**Figura 7** - Curva padrão de ácido gálico utilizada para a quantificação dos compostos fenólicos totais.

#### 5.1.2 Curva padrão de catequina

A curva padrão de catequina (Figura 8), obtida para quantificação de flavonoides totais, foi representada pela equação abaixo e um ajuste linear ( $R^2$ ) de 0,9961.





**Figura 8** - Curva padrão de catequina utilizada para a quantificação dos flavonoides totais.

## 5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

As médias das determinações do conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas monoméricas, extraídos da amostra são observadas na Tabela 2

**Tabela 2** - Conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas quantificados em extratos de diferentes concentrações etanólicas da fruta goji berry.

Concentrações Etanólicas	20%	40%	60%	80%
<b>Fenólicos Totais (mg.EAG.L<sup>-1</sup>)</b>	654,4 <sup>a</sup> ± 30,61	679,4 <sup>b</sup> ± 58,28	713,7 <sup>d</sup> ± 24,70	699,1 <sup>c</sup> ± 33,56
<b>Fenólicos Totais (mg.EAG.100 g<sup>-1</sup>)</b>	1308,8 <sup>a</sup> ± 61,22	1358,80 <sup>a</sup> ± 116,56	1427,47 <sup>c</sup> ± 49,40	1398,13 <sup>b</sup> ± 67,12
<b>Flavonoides Totais (mg EC.L<sup>-1</sup>)</b>	57,32 <sup>a</sup> ± 3,25	62,8 <sup>b</sup> ± 2,93	78,3 <sup>c</sup> ± 2,75	90,02 <sup>d</sup> ± 2,56
<b>Flavonoides Totais (mg EC.100 g<sup>-1</sup>)</b>	114,63 <sup>a</sup> ± 6,51	125,63 <sup>b</sup> ± 5,86	156,63 <sup>c</sup> ± 5,51	179,97 <sup>d</sup> ± 5,13
<b>Antocianinas (mg cia-3-gli.L<sup>-1</sup>)</b>	1,447 <sup>b</sup> ± 0,19	0,724 <sup>a</sup> ± 0,09	3,562 <sup>c</sup> ± 0,38	15,252 <sup>d</sup> ± 0,19
<b>Antocianinas (mg cia-3-gli.100 g<sup>-1</sup>)</b>	2,894 <sup>b</sup> ± 0,38	1,447 <sup>a</sup> ± 0,19	7,125 <sup>c</sup> ± 0,77	30,503 <sup>d</sup> ± 0,38

Nota: Resultados expressos em média ± desvio-padrão. Médias com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes (p<0,05).

Durante os últimos anos, a busca de alimentos alternativos com alto valor nutricional tem aumentado o interesse na fruta goji berry, no entanto, estudos sobre os compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, e a maioria dos agentes potenciais de promoção da saúde da baga permanecem sem muitos resultados. Apesar de relatos sobre os compostos fenólicos e atividade antioxidante em frutas comumente disponíveis, como mirtilo, kiwi, laranja e maçã, existe pouca informação disponível para frutas atualmente subutilizadas (SONG, XU, 2013; DONNO et al., 2014).

Como pode-se notar, a maior concentração de compostos fenólicos totais foi encontrada na extração com 60% de etanol, enquanto para os teores de flavonoides e antocianinas foram maiores na extração de 80%. Segundo, Wang et al. (2010) essa diferença de quantificação aos compostos fenólicos totais pode ser explicada devido a superestimação do conteúdo fenólico pelo método de Folin-Ciocalteu, em virtude de que o reagente adicionado também pode reagir com compostos não fenólicos, tais como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos. É também possível que diferentes compostos fenólicos respondem de forma diferente ao reagente de Folin-Ciocalteu. Por exemplo, enquanto catequina, ácido cafeico, rutina e ácido gálico mostram comportamentos de absorção semelhantes com o reagente, vários flavonoides podem apresentar uma absorção baixa, resultando em subestimação do teor de fenólicos totais.

Neste estudo, o teor de compostos fenólicos totais presentes nas extrações etanólicas de goji berry foi maior para a concentração de 60% de etanol,  $1427,47 \pm 49,40$  mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em base seca (b.s.) e menor para a concentração de 20%,  $1308,8 \pm 61,22$  mg EA G.100 g<sup>-1</sup> em base seca.

Segundo os estudos de Cai et al. (2004), para a extração feita com cinco gramas de amostra em pó da baga com 100 mL de água (1:20) a 80 °C durante 20 minutos em um agitador, foi obtido um valor de 700 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em base seca, valor inferior ao obtido no presente estudo. Já para a extração com cinco gramas de amostra em 100 mL de um solução metanólica de 80% (1:20) a 35 °C durante 24 horas, os autores obtiveram 2580 mg EAG.100 g<sup>-1</sup>. Liu et al. (2008), utilizando condições de extração muito similares a este trabalho, encontraram a concentração de 1253 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em base seca.

Alguns estudos apresentam os resultados analisados do teor dos compostos fenólicos expressos em peso fresco. Para Donno et al. (2014), a extração destes compostos foi realizada com quinze bagas, com média de 0,67 gramas no total, as quais foram moídas e extraiu-se com 25 mL de solução de metanol e água acidificada com HCL a 37%, durante uma hora e obteve-se um valor médio de 268.35 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em base úmida (b.u.). Mikulic-Petkovsek et al. (2012), utilizaram cinco gramas de amostra triturada e extraída com 10 mL de metanol com 3% (v / v) de ácido fórmico durante 1 hora. O valor encontrado foi de 131,9 mg EAG.100 g<sup>-1</sup>, em base úmida. Dessa forma, para comparar com os resultados deste trabalho, deve-se levar em consideração a umidade perdida (42,96%). Assim, o teor de compostos fenólicos para o extrato obtido com etanol a 60% foi de 613,24 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em b.u. e para a solução de 20%, de 562,26 de mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em base úmida, mostrando que ambos os estudos acima referenciados apresentaram valores inferiores ao do presente trabalho.

Alguns fatores influenciam na diferença da composição e teor de compostos fenólicos, por isso, muitas vezes não há uma concentração padrão para comparação. Em gojis berries, o que poderia contribuir para essas diferenças são os estágios de maturação, espécies de bagas analisadas, atributos genéticos, bem como condições ecológicas, que dificultam a comparação destas concentrações com demais estudos (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012; DONNO et al., 2014). Além disso, em uma análise de compostos fenólicos, o método de extração influencia diretamente na eficiência do processo, no qual qualquer alteração, no pH, temperatura, tipo de solvente, número de passos para a extração, razão solvente/sólido e tamanho da partícula do sólido, por exemplo, altera a concentração destas substâncias na amostra analisada (ESCRIBANO-BAILÓN, SANTOS-BUELGA, 2003).

Na China, uma das aplicações mais populares da goji berry é fazer vinho por meio da maceração da fruta no licor de grãos. No entanto, sabe-se que o processo de maceração afeta as capacidades antioxidantes e os fitoquímicos da baga. Segundo Song & Xu (2013), o efeito da concentração de etanol afeta diretamente os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante da fruta. Por determinação em espectrofotômetro UV-Visível, os resultados mostraram que concentração elevada, em geral, aumenta a difusão de flavonoides e reduzem

a atividade antioxidante.

Os flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies de vegetais e frutos (PONTIS, 2014). No presente trabalho, a quantificação dos compostos flavonoídicos foi maior na extração com etanol 80%, sendo de  $179,97 \pm 5,13$  mg EC.100 g<sup>-1</sup> em base seca e menor na de 20%, com  $114,63 \pm 6,51$  mg EC.100 g<sup>-1</sup> em base seca.

Por meio dos estudos de Wang et al., (2010), cuja extração foi feita com 10 gramas de frutos moídos de *L. Barbarum* e misturados com 50 mL de solução de sulfato de sódio anidro 10%, agitados por 3 minutos, e adicionados de 100 mL de uma solução de hexano:etanol:acetona:tolueno (10:6:7:7, em volume) e por fim agitados durante 1 hora. O resultado encontrado para o teor de flavonoides foi de 11,6 mg EC.100 g<sup>-1</sup> em base seca. Enquanto para o trabalho de Liu et al. (2008), com o método de extração descrito anteriormente, obteve-se um teor de 351 mgRE.100 g<sup>-1</sup> em base seca, aproximadamente o dobro do valor encontrado para esse trabalho.

Segundo Huber (2008), diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam na composição e quantificação do teor dos flavonoides. Os perfis de flavonoides em cada espécie vegetal são determinados por um sistema intrínseco de enzimas controladas geneticamente que regulam a síntese e distribuição nas plantas. Em adição aos fatores intrínsecos, o conteúdo de flavonoides é fortemente influenciado por fatores extrínsecos, como estação do ano, incidência de radiação UV, clima, composição do solo, preparo e processamento do alimento.

As antocianinas são corantes naturais que conferem cor a folhas, flores e frutas, são derivados glicosilados do cátion flavílio, da classe dos flavonoides e apresentam potencial para uso como corante, além de atividade antioxidante e terapêutica (COELHO, 2011)

Os valores encontrados neste trabalho foram maiores para a extração etanólica 80%, sendo de  $30,503 \pm 0,38$  mg cia-3-gli.100g<sup>-1</sup> e menores para a extração de 40%, correspondendo a  $1,447 \pm 0,19$  mg cia-3-gli.100g<sup>-1</sup>. Em estudos realizados com a planta *Lycium intricatum*, do mesmo gênero da

*Lycium barbarum* e possuindo bagas vermelhas semelhantes aos frutos de goji berry, com extração feita por uma solução composta de n-hexano, éter de petróleo e clorofórmio. Os frutos apresentaram um teor de 7,90 mg por 100 gramas de amostra em peso seco (ABDENNACER et al., 2015).

Segundo Liu et al. (2014), a pigmentação vermelha da fruta madura *L. barbarum* é devido à elevada acumulação de carotenoides específicos, enquanto nos frutos da planta do mesmo gênero, *Lycium ruthenicum*, a pigmentação é em virtude do acúmulo de antocianinas.

Em seu estudo, Zenga et al. (2014) comparou o teor das antocianinas dos frutos de dois tipos de *Lycium*, a *L. barbarum* e a *L. ruthenicum*. A extração feita com metanol em diferentes fases de maturação do fruto mostrou que o conteúdo de antocianina em *L. ruthenicum* aumentou de forma constante e atingiu níveis máximos no último estágio, enquanto o teor de antocianinas foi indetectável em todas as fases dos frutos da *L. barbarum*.

Para Kosar et al. (2003), a extração de antocianinas para os frutos da *L. barbarum* e *L. ruthenicum* foi feita com diversos solventes, como éter de petróleo, acetato de etilo, metanol, n-butanol, água e etanol 70%. O teor de antocianinas foi detectado com teores significativos apenas nos extratos metanólicos e etanólicos a 70% dos frutos da *L. ruthenicum*. Para os demais extratos e para a fruta goji berry, foram quantificados traços de antocianinas.

Sabe-se que a estabilidade das antocianinas é influenciada por diversos fatores, tais como temperaturas de extração e de armazenamento, genótipos, exposição à luz, variações de pH e ação de agentes oxidantes. A interação destes parâmetros também pode afetar a estabilidade e ainda, eles não seguem um padrão, pois são específicos e independentes para cada alimento, ou seja, como exemplo temos que para extratos de jambolão, a temperatura e o tempo de armazenamento influenciam menos que 1% na degradação de antocianinas, enquanto que o efeito do pH é de 87% (FAVARO, 2008).

### 5.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante foi avaliado por meio de métodos *in vitro*, sendo estes a atividade sequestrante do DPPH e do ABTS<sup>•+</sup>. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Atividade antioxidante em extratos de diferentes concentrações etanólicas da fruta goji berry pelos ensaios de DPPH e ABTS<sup>•+</sup>.

Concentrações Etanólicas	20%	40%	60%	80%
DPPH ( $\mu\text{mol TEAC.L}^{-1}$ )	3101,66 <sup>d</sup> $\pm$ 167,21	2501,29 <sup>c</sup> $\pm$ 30,42	2282,14 <sup>b</sup> $\pm$ 110,68	2000,37 <sup>a</sup> $\pm$ 80,50
DPPH ( $\mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$ )	6203,31 <sup>d</sup> $\pm$ 334,43	5002,58 <sup>c</sup> $\pm$ 60,86	4564,27 <sup>b</sup> $\pm$ 221,36	4000,74 <sup>a</sup> $\pm$ 161,01
ABTS <sup>•+</sup> ( $\mu\text{mol TEAC.L}^{-1}$ )	5002,18 <sup>c</sup> $\pm$ 160,29	4911,56 <sup>c</sup> $\pm$ 311,07	4452,18 <sup>b</sup> $\pm$ 198,43	3477,18 <sup>a</sup> $\pm$ 245,73
ABTS <sup>•+</sup> ( $\mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$ )	10004,4 <sup>c</sup> $\pm$ 320,58	9823,13 <sup>c</sup> $\pm$ 320,58	8904,38 <sup>b</sup> $\pm$ 396,86	6954,38 <sup>a</sup> $\pm$ 491,45

Nota: Resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Médias com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A determinação da atividade antioxidante foi considerada uma importante metodologia para avaliar as propriedades nutracêuticas de frutas, destacando assim as da fruta goji berry (DONNO et al., 2014).

Segundo o trabalho de Song e Xu, (2013), sabe-se que a concentração de álcool tem uma relação direta com a atividade antioxidante, ficando definido que a baixa concentração de etanol aumenta a atividade antioxidante da baga. Sendo assim, notou-se no presente trabalho, que a extração de 20% de etanol, alcançou a maior concentração de equivalente trolox em relação a atividade antioxidante. Pelo método do DPPH, obteve-se o valor de  $6203,31 \pm 334,43 \mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  e para o método ABTS<sup>•+</sup>  $10004,4 \pm 320,58 \mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$ . O menor valor encontrado esteve de acordo com o comportamento descrito em literatura. A extração de 80% representou o valor de  $4000,74 \pm 161,01 \mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  e  $6954,38 \pm 491,45 \mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  respectivamente.

Por meio do estudo de Cai et al. (2004), o ensaio da capacidade antioxidante total foi realizada através da atividade sequestrante de radicais

livres, ABTS<sup>•+</sup>. Pela metodologia da sua extração já citada anteriormente, obteve-se para o extrato metanólico, o valor de 490,8  $\mu\text{mol TEAC}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  e para o extrato com água, 389,4  $\mu\text{mol TEAC}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , sendo ambos os valores menores do que o encontrado por este trabalho.

Para, Le et al. (2007), a fruta foi seca em estufa e 30 gramas de amostra seca foram moídas e extraiu-se por 2 h com 600 mL de etanol a 95% a 90 °C, com agitação. O extrato foi reduzido até um pequeno volume por evaporação rotativa sob vácuo a 40 °C e, em seguida, liofilizado que posteriormente, foi dissolvido em metanol a 100 mg por mL de concentração e mantido a -20 ° C até serem usadas. Sua avaliação da atividade antioxidante deu-se pelo método ABTS e seu resultado obtido foi de 3600  $\mu\text{mol TEAC}$  por 100 gramas de frutas secas.

Segundo Rockenbach (2008), a atividade antioxidante pode depender de diversos fatores, incluindo as propriedades coloidais dos substratos, as condições e etapas de oxidação, os diferentes solventes extratores, a formação e estabilidade dos radicais, assim como a possível localização dos antioxidantes e estabilidade em distintas fases do processamento nos alimentos. O autor diz ainda que há diferenças significativas na atividade antioxidante pelo método ABTS, influenciadas pela polaridade e pelo pH do solvente, com valores maiores em solventes mais polares e pHs maiores. Assim, pode-se declarar que a capacidade antioxidante é dependente do teor e da composição dos compostos fenólicos presentes na amostra.

#### 5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A pesquisa de identificação dos compostos fenólicos nos extratos etanólicos da fruta goji berry foi realizada por meio da cromatográfica líquida de alta eficiência, no qual os compostos determinados por meio dos 12 padrões existentes são observados na Tabela 4,

**Tabela 4** - Compostos fenólicos extraídos de goji berry em função do teor de etanol na solução extratora.

Etanol (%)	Compostos (mg/100 g)							
	Catequina		Ácido clorogênico		Ácido p-cumárico		Rutina	
20	87,82 <sup>a</sup>	± 0,73	4,63 <sup>a</sup>	± 0,03	6,32 <sup>b</sup>	± 0,01	5,18 <sup>a</sup>	± 0,06
40	90,19 <sup>a</sup>	± 1,67	6,15 <sup>b</sup>	± 0,17	4,36 <sup>a</sup>	± 0,20	18,15 <sup>b</sup>	± 0,09
60	88,31 <sup>a</sup>	± 0,49	7,54 <sup>c</sup>	± 0,17	4,35 <sup>a</sup>	± 0,02	21,36 <sup>c</sup>	± 0,07
80	111,34 <sup>b</sup>	± 1,57	12,05 <sup>d</sup>	± 0,17	4,31 <sup>a</sup>	± 0,05	19,32 <sup>b</sup>	± 0,06

Nota: Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A catequina foi o composto fenólico majoritário encontrado nas diferentes extrações etanólicas, sendo a concentração com 80% de etanol a que apresentou a maior concentração, com  $111,34 \pm 1,57 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra. A catequina é um nutriente da família dos compostos fenólicos e tem uma forte ação antioxidante. São poderosos antioxidantes, inibindo os danos causados ao DNA pelos radicais livres, a imunossupressão e a inflamação cutânea induzida pelos raios UV. A atividade antioxidante da catequina deve-se ao mecanismo de transferência de elétrons desta para os radicais livres, estabilizando assim essas substâncias (SÁ et al., 2010).

A rutina foi o segundo maior composto encontrado nas amostras etanólicas, a qual apresentou o maior teor na ordem de  $21,36 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra na extração etanólica de 60%. Sendo um flavonol glicosídico, a rutina pertence a uma importante classe dos flavonoides, sendo extensamente encontrados na natureza. Ela apresenta uma importância terapêutica em virtude de determinar a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, além de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios (PEDRIALI, 2005).

O ácido clorogênico foi o terceiro composto identificado em relação à quantidade. Este apresentou um valor maior de  $12,05 \pm 0,17 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra, encontrado na extração etanólica de 80%. O ácido clorogênico é uma família de ésteres polifenólicos encontrado em plantas medicinais e amplamente distribuído em diversos alimentos. Ele atua em diversos sistemas biológicos, evidenciados por atividades anti-mutagênica, antitumoral, no controle da obesidade, analgésica, antipirética, ansiolítica, anti-microbica,



antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anti-angiogênica (FARSKY, 2013).

O ácido p-cumárico foi o composto que apresentou menor concentração em relação aos outros compostos. Seu valor máximo foi de  $6,32 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra na extração com 20% de etanol. O ácido para-cumárico é um ácido hidroxicinâmico, um derivado do ácido cinâmico com um grupo hidroxilo no carbono 4 do anel benzênico. Existem três isoformas deste ácido, cujas diferenças advêm da posição do grupo hidroxila, sendo o ácido p-cumárico o mais abundante. Também são conhecidos pela sua atividade antioxidante (LIANDA, 2009).

Estes mesmos componentes foram encontrados por outros autores, como Donno et al. (2014) e Wang et al. (2010). Para Donno, a análise de compostos bioativos com o CLAE é hoje uma ferramenta de caracterização generalizada e bem desenvolvida. O seu estudo aponta que os compostos fenólicos identificados na baga contribuem significativamente para o fitocomplexo e a atividade antioxidante. E ainda, segundo Wang et al. (2010), vários picos durante o processo da cromatografia líquida de alta eficiência não são identificados devido a diferença do comprimento de onda, ou seja o pico padrão não corresponde ao pico da análise, podendo assim, explicar a divergência nos valores encontrados em outros trabalhos.

## 6 CONCLUSÕES

A pesquisa dos compostos bioativos na Goji berry é de grande importância em virtude da escassez de estudos sobre a fruta. Sua gama de efeitos benéficos à saúde se dá pela presença dos compostos fenólicos presentes na mesma e outros fitoquímicos.

A investigação do teor dos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas, atividade antioxidante e caracterização dos compostos fenólicos por CLAE dos frutos da *Lycium barbarum*, foram realizados a partir de quatro diferentes concentrações etanólicas. Os resultados indicaram que a quantificação dos compostos foram superiores nas maiores concentrações etanólicas, enquanto o potencial antioxidante se sobressaiu nas menores concentrações. Na análise dos compostos fenólicos por meio da cromatográfica líquida de alta eficiência, foram identificadas substâncias como a catequina, a rutina, o ácido clorogênico e o ácido p-cumárico, que podem apresentar efeitos positivos no organismo.

Portanto, todos os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser aceitos quando comparados a outros estudos. Nota-se que a pesquisa sobre as variabilidades que influenciam na composição da fruta abre novas possibilidades de desenvolvimento da *L. barbarum* como cultura que contém fitoquímicos influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo dessa forma otimizar a composição química da fruta, dando a ela um melhor valor agregado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDENNACER, B.; KARIM, M.; YASSINE, M.; NESRINE, R.; MOUNA, D.; MOHAMED, B. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. **Food Chemistry**, v. 174, p. 577–584, 2015.

ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; SAURA-CALIXTO, F. D.; RUFINO, M. S. M.; PÉREZ-JIMENEZ, J. Compostos com propriedades funcionais em frutas. II **Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita**, p. 179 – 187, 2007.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1702-1717, 2011.

AMAGASE, H.; NANCE, D. M. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Study of the General Effects of a Standardized *Lycium barbarum* (Goji) Juice, *GoChi*<sup>TM</sup>. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 14, n. 4, p. 403-412, 2008.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 66, n. 1, 2007.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203. 2006.

BERNAL, J.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, n. 4, p. 758-74, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life sciences**, v. 74, p. 2157 -2184, 2004.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta med.**, v. 70, n. 2, p. 93-103, 2004.

CARNÉS, J.; LARRAMENDI, C. H.; FERRER, A.; HUERTAS, A. J. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to Goji berries (*Lycium barbarum*). **Food Chemistry**, v. 137, p. 130-135, 2013.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178–182, 2002.

CHEN, C. C.; LIU, L. K.; HSU, J. D. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Food Chem.**, v. 91, n. 4, p. 601-607, 2005.

COELHO, A. G. **Estudo da degradação térmica de antocianinas de extratos de uva (*Vitis vinífera* L. 'Brasil') e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).** 2011. Tese (Mestrado) –Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia líquida de alta eficiência.** In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, p. 179 – 243, 1988.

CONSTANT, P. B. L. **Antocianinas de açaí (*Euterpis oleracea* M.): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos.** 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2003.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante,** 2008. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium spp.*): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation, **Journal of Functional Foods**, 2014.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Polyphenol extraction from foods. Methods in Polyphenol Analysis. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, p. 383, 2003.

FARSKY, S. H. P. **Efeitos do ácido clorogênico sobre as propriedades de adesão do endotélio.** 2013. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FAVARO, M. M. A. **Extração, Estabilidade e Quantificação de Antocianinas de Frutas Típicas Brasileiras para Aplicação Industrial como Corantes**. 2008, p.105. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Alimentos vs doenças**, 2010. Disponível em: < <http://www.revista-fi.com/materias/132.pdf>> Acessado em: 11/01/2015.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV–visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (edited by R.E. Wrolstad & S.J. Schwartz), New York: Wiley, p. 1–13, 2001.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023–2044, 2012.

HAMINIUK, C. W. I.; MATTOS, G.; CARPES, S. T.; PLATA-OVIEDO, M. V.; BRANCO, I. G. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1-5, 2012.

HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 46-56, 1998.

HUBER, L. S. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr**, v. 19, p. 97-108, 2008.

KONCZAK, I.; ZABARAS, D.; DUNSTAN, M.; AGUAS, P. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. **Journal Food Chemistry**, v. 122, p. 260–266, 2010.

KOSAR, M.; ALTINTAS, A.; KIRIMER, N.; BASER K. H. C. Determination of the free radical scavenging activity of *Lycium* extracts. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, 2003.

LA TORRE, C. A. L. **Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de amins biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

LAMPILA, P.; VAN LIESHOUT, M.; GREMMEN, B; LAHTEENMAKI, L. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. **Food Research International**, v. 42, p. 122–129, 2009.

LE, K.; CHIU, F.; ENG, K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 353-363, 2007.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E.; Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC**, v. 88, p. 1269, 2005.

LEIDENS, N. **Extração, Purificação e Fracionamento das Antocianinas do Bagaço de Uva**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LI, X. M. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 461-465, 2007.

LIANDA, R. L. P, **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Niterói, 2009.

LIU, H.; QIU, N.; DING, H.; YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, v. 41, p. 363–370, 2008.

LIU, Y.; ZENG, S.; SUN, W.; WU, M.; HU, W.; SHEN, X. Comparative analysis of carotenoid accumulation in two goji (*Lycium barbarum* L. and *L. Ruthenicum* Murr.) fruits. **BMC plant biology**, v. 14, p. 269, 2014.

LUO, Q.; YAN, J.; ZHANG, S. Isolation and purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and its antifatigue effect. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 31, p. 118-119, 2002.



MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITAO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. HPLC-MS' Identificaton and Quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. **Food Chemistry**, v. 1, p. 2138-2146, 2012.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SCHMITZER, V.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. **Journal of Food Science**, v. 77, 2012.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos da Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, p. 613, 2006.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PIEKARSKI, P. **Análise nutricional e fitoquímica de frutos da *Morus nigra* L.** 2013. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PONTIS, J. A.; COSTA, L. A. M. A.; SILVA, S. J. R.; FLACH, A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 1, p. 69-73, 2014.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; DAMYANOVA, B. N.; SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 235-240, 2004.

REEVE, V. E.; ALLANSON, M.; ARUN, S. J.; DOMANSKI, D.; PAINTER, N. Mice Drinking Goji Berry Juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways. **The Royal Society of Chemistry - Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, p. 601-607, 2010.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M., FETT, R. Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

SÁ, R. S.; TURELLA, T. K.; BETTEGA, J. M. P. R. **Os efeitos dos polifenóis: catequinas e flavonoides da *Camellia sinensis* no envelhecimento cutâneo e no metabolismo dos lipídeos.** 2010. Artigo Científico – Universidade do Vale do Itajaí, Balneário Camboriú, 2010.

SALVADOR, M., HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: ULBRA, 2004. 211 f.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J., **High-Performance liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis**, 4 ed., Harcourt Brace College Publishers, p 628 – 669, 1992.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 2 ed. John Wiley & Sons, New York, 1979.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, Y.; XU, B. Diffusion Profiles of Health Beneficial Components from Goji Berry (*Lyceum barbarum*) Marinated in Alcohol and Their Antiozidant Capacities as Affected by Alcohol Concentration and Steeping time. **Journal of Food and Science**, v. 2, p. 32-42, 2013.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓNA, M. S.; MOYÁB, M. L.; TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLAA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

VINSON, J. A.; JANG, J.; YANG, J.; LIANG, X. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 184-192, 2010.

WROLSTAD, R. E. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. **Agricultural Experiment Station**, Station Bulletin, v. 624, p. 17, 1993.

ZENGA, S.; WUA, M.; ZOUA, C.; LIUA, X.; SHENB, X.; HAYWARD, A.; LIUC, C.; WANGA, Y. Comparative analysis of anthocyanin biosynthesis during fruit development in two *Lycium* species. **Physiologia Plantarum**. v. 150, p. 505–516, 2014.