

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

**Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e
exóticas brasileiras.**

Juliana Fernanda Almeida Castro
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Araraquara

2012

JULIANA FERNANDA ALMEIDA CASTRO

**Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas
brasileiras.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Maria M. de Faria Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

C355e	<p>Castro, Juliana Fernanda Almeida Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras / Juliana Fernanda Almeida Castro. – Araraquara : [s.n], 2012 85 f. : il.</p>
	<p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira Coorientador: José Carlos Rebuglio Velloso</p>
	<p>1. Biotecnologia. 2. Antioxidantes. 3. Ácido gálico. 4. Frutas Tropicais. I. Título.</p>

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Juliana Fernanda Almeida Castro

Filiação: Elias de Castro e Lucia de Almeida Castro

Nascimento: 23/03/1982 – Taubaté – SP – Brasil.

Endereço Profissional

Laboratório de Bioquímica e Enzimologia.

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: castrojfa@gmail.com

Formação Acadêmica

2008

Graduação: Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

2010-2012

Mestrado: Biotecnologia, Área de Concentração - Bioquímica e Tecnologia Química.

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Maria M. de Faria Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

Bolsa: Cnpq

Produção Bibliográfica

Trabalhos recentes publicados em anais de eventos

- a) CASTRO, J. F. A.; ASSIS, R. P.; VELLOSA, J. C. R.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; Avaliação da capacidade antioxidante e o conteúdo de fenóis presentes em polpas congeladas de frutas nativas. In. III SIMPÓSIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: estratégias de desenvolvimento para o nordeste; II CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS e do IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS: avanços e perspectivas, Recife – PE, 2011.
- b) ASSIS, R. P.; CASTRO, J. F. A.; GUTIERRES, V. O.; COLETTI, T. M. S. F. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; BRUNETTI, I. L. Efeito dos solutos urêmicos no clareamento da crocina: sistema-modelo de lipoperoxidação. In. 38° CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS e 11° CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, Curitiba – PR, 2011

Participações em Reuniões Científicas

- a) III SIMPÓSIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: estratégias de desenvolvimento para o nordeste; II CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS e do IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS: avanços e perspectivas, Recife – PE, 2011

JULIANA FERNANDA ALMEIDA CASTRO

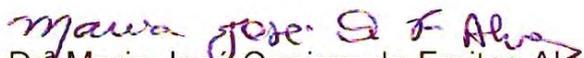
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 17 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria José Queiroz de Freitas Alves
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu



Profª Drª Mariza Pires de Melo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP , Pirassununga

Dedico esse trabalho a minha família, Elias, Lucia e Jordana.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me dar forças para nunca desistir de meus objetivos.

Aos meus queridos pais, Elias e Lucia.

Que sempre me apoiaram e me deram suporte em todos os momentos. Muito obrigada por sempre acreditar em mim. Sou muito grata por ser filha de vocês.

Amo vocês.

À minha querida irmã, Jordana.

Muito obrigada por sempre estar ao meu lado.

Amo você!

À orientadora, Profa. Olga M. M. de Faria Oliveira, obrigada pela oportunidade de realizar um sonho, pelos ensinamentos e a amizade.

Ao co-orientador José Carlos R. Velloso, obrigada por sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Iguatemy, muito obrigada pelos ensinamentos, orientação, ajuda no desenvolvimento desse trabalho, oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa e fazer com que eu me sentisse um membro de sua equipe. Obrigada pelos momentos de descontração.

À querida amiga Renata Pires de Assis, obrigada pelo companheirismo e paciência ao longo do trajeto. A sua amizade é uma conquista para mim.

Aos meus queridos amigos Carol Rabal, Ederson, Fernando, Lucy, Mônica e Vinicius, obrigada pela grande amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos da república, Carol, Aline, Lucy, Sara e Fernando, obrigada pela convivência.

Aos amigos do Laboratório da Química, Michele, Kamila, Mauro, Kátia, Omar, Daniele, Angela, Vanessa, muito obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório da Farmácia, Renata, Clara, Vânia, Aline, Marcos, obrigada pelo companheirismo, conversas e as risadas.

As minhas queridas e eternas prima/irmã, Fabia, Fabíola, Fabiana e Fernandinha, muito obrigada por estar sempre em suas orações.

Aos queridos amigos, Camila Cotrim, Rafael, Elaine Muniz, Higor, Elaine Rusgus, Simone, Hernane, Wanderson, Anne, Kíria, Luana, Veridiana, Renata Solcia, Denise, Maísa, Marcinha, obrigada pela torcida.

Aos amigos da Interação School, Andréia, Marcelo, Luciana, Ana Cláudia, Flávia, Carla, Juliana, mais que uma escola, uma família.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre prestativas.

*A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a bolsa concedida.*

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus.”

Aristóteles

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

Confúcio

RESUMO

Nos últimos anos houve uma explosão no interesse dos consumidores pelos alimentos denominados alimentos nutraceuticos. Estudos epidemiológicos têm sugerido que esses alimentos tem um importante papel na prevenção de doenças crônicas. Acredita-se que os antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, carotenóides, tocoferóis, naturalmente encontrados em frutas, vegetais e grãos, são os responsáveis por promover o efeito quimioprotetor contra o estresse oxidativo.

As frutas são um dos importantes componentes de uma dieta saudável. Seu consumo em quantidades adequadas pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Esse alimento é importante porque é uma fonte rica de micronutrientes, fibras e outros componentes com propriedades funcionais. Ademais, é um alimento de baixa densidade energética, isto é, com poucas calorias em relação ao volume da alimentação consumida, o que favorece a manutenção do peso corporal saudável.

Dentro desse cenário, o Brasil ostenta uma grande fonte de espécies tropicais e exóticas ainda pouco exploradas, as quais podem ter um potencial agroindustrial, representando uma excelente perspectiva de oportunidade econômica. Considerando os benefícios do consumo de frutas e o sua importância mercadológica, este trabalho procura estudar a atividade antioxidante de diferentes extratos de frutas, tropicais e exóticas, para avaliar o potencial antioxidante destes extratos, visando aplicações nos setores farmacêuticos, alimentícios e de cosméticos. Assim escolheu-se avaliar a atividade antioxidante frente a diferentes espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, bem como aplicá-los a um modelo que simula a lipoperoxidação lipídica. Determinando os respectivos valores de IC₅₀ para os testes utilizados.

Palavras chave: antioxidantes, frutas tropicais e exóticas, ácido gálico.

ABSTRACT

In recent years have seen an explosion in consumer interest in foods called nutraceutical foods. Epidemiological studies have suggested that these foods have an important role in preventing chronic diseases. It is believed that antioxidants, especially phenolic compounds, carotenoids, tocopherols naturally found in fruits, vegetables and grains, are responsible for promoting chemistryprotect effect against oxidative stress.

Fruits are one of the important components of a healthy diet. Its consumption in appropriate amounts can reduce the risk of cardiovascular disease and some cancers. This is important because food is a rich source of micronutrients, fiber and other components with functional properties. Moreover, food is a low energy density, that is, low in calories compared to the volume of feed consumed, which contributes to the maintenance of healthy body weight. Within this situation, Brazil have a great source of tropical and exotic yet unexplored, which may have a potential agrobusiness, representing an excellent economic opportunity. Considering perspective the benefits of consuming fruits and marketing its importance, this work study the antioxidant activity of different extracts of fruits, exotic and tropical to evaluate the antioxidant potential of these extracts, order at applications in pharmaceutical, food and cosmetics. So we chose to evaluate the antioxidant activity against different reactive oxygen species and reactive nitrogen species, as well as apply them to a model that simulates the lipoperoxidation. Determining their IC₅₀ values for the tests.

Keywords: antioxidants, tropical and exotic fruits, gallic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química de compostos fenólicos.....	28
Figura 2	Estrutura química dos flavonóides.....	29
Figura 3	Araçá (<i>Psidium cattleianum</i> Sabine).....	30
Figura 4	Cajá-mirim (<i>Spondias mombim</i> L.).....	31
Figura 5	Figo da Índia (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill).....	31
Figura 6	Granadilla (<i>Passiflora ligularis</i> Juss).....	32
Figura 7	Grumixama (<i>Eugenia brasiliensis</i>).....	32
Figura 8	Kiwano (<i>Cucumis metuliferus</i>).....	32
Figura 9	Mangostão (<i>Garcinia mangostana</i> L).....	33
Figura 10	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	33
Figura 11	Pitaya Rosa (<i>Cereus undatus</i> Haworth)	34
Figura 12	Uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i>)	34
Figura 13	Estruturas do ácido gálico e derivados.	35
Figura 14	Reação do ácido gálico com o molibdênio.	40
Figura 15	Formação do cromóforo flavonoíde-alumínio.....	41
Figura 16	Representação da formação do ABTS ^{•+}	44
Figura 17	Estabilização do radical livre DPPH.	45
Figura 18	Representação da oxidação do TMB pelo HOCl / OCl ⁻	46
Figura 19	Representação da oxidação do TNB à DTNB pelo H ₂ O ₂	47
Figura 20	Mecanismo de detecção do nitrito usando o reagente de Griess.	49
Figura 21	Representação da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante.....	50
Figura 22	Representação estrutural da crocina.....	51
Figura 23	Curva padrão da crocina.....	54

Figura 24	Variação da concentração de fenóis totais presentes nos extratos, aquosos e etanólicos, das amostras de frutas.....	56
Figura 25	Variação da concentração de flavonóides totais presentes nos extratos, aquosos e etanólicos, das amostras de frutas.....	57
Figura 26	Capacidade antioxidante determinado pelo método ABTS ^{•+}	59
Figura 27	Capacidade antioxidante determinado pelo método DPPH..	60
Figura 28	Valores de IC ₅₀ para o teste HOCl/OCl ⁻	61
Figura 29	Capacidade de captura do H ₂ O ₂ (IC ₅₀) pela catalase.....	62
Figura 30	Oxidação do Regente de Griess em função da concentração de nitrito de sódio.....	63
Figura 31	Valores de IC ₅₀ para o teste ânions superóxido (O ₂ ^{•-}).....	65
Figura 32	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ácido gálico.....	67
Figura 33	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de metila.....	67
Figura 34	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de etila.....	68
Figura 35	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de n-propila.....	68
Figura 36	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com n-butila.....	69
Figura 37	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de n-pentila.....	69
Figura 38	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de hexila.....	70

Figura 39	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de isopropila.....	70
Figura 40	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com galato de isobutila.....	71
Figura 41	Representação entre as razões das velocidades e concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com triacetato de ácido gálico.....	71
Figura 42	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Araçá (aquoso e etanólico).....	74
Figura 43	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Cajá (aquoso e etanólico).....	75
Figura 44	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Figo da Índia (aquoso e etanólico).....	75
Figura 45	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Grumixama (aquoso e etanólico).....	76
Figura 46	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Mangostão (aquoso e etanólico).....	76
Figura 47	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Maracujá (aquoso e etanólico).....	77
Figura 48	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Pitaya (aquoso e etanólico).....	77
Figura 49	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Uvaia (aquoso e etanólico).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	25
Tabela 2	Siglas do ácido gálico e seus derivados.....	35
Tabela 3	Frutas e período de aquisição.....	38
Tabela 4	Capacidade de captura do NO [*]	64
Tabela 5	Equação de competição cinética do ácido gálico e derivados.....	72
Tabela 6	Comparação entre as capacidades antioxidantes em equivalente de ácido gálico.....	72
Tabela 7	Comparação entre os valores da inclinação da regressão linear e IC ₅₀	73
Tabela 8	Equação de competição cinética dos extratos, aquosos e etanólicos, das frutas.....	79
Tabela 9	Comparação entre as capacidades antioxidantes das frutas em equivalente de ácido gálico.....	79

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1	Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH.....	52
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O ₂	Oxigênio
N ₂ O	Óxido nitroso
NO [•]	Óxido Nítrico
HNO ₂	Ácido Nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₃	Ozônio
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
•OH	Radical hidroxila
ROO [•]	Radical peroxila
RO [•]	Radical alcoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
MPO	Mieloperoxidase
¹ O ₂	Oxigênio singlete
LPO	Lipoperoxidação
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina)
PMS	Metassulfato de fenazina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos de Armazéns Gerais de São Paulo
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

GA	Ácido gálico
GM	Galato de metila
GE	Galato de etila
GPR	Galato de n-propila
GB	Galato de n-butila
GPE	Galato de n-pentila
GH	Galato de hexila
GIP	Galato de isopropila
GIB	Galato de isobutila
TAG	Triacetato de ácido acético
A [•]	Antioxidante
v ₀	Velocidade da reação da crocina com ROO [•]
k ₁	Constante de velocidade para a reação entre ROO [•] .
k ₂	Constante de velocidade para a reação entre ROO [•] e o antioxidante.
[C]	Concentração da crocina
[A]	Concentração do antioxidante
Ext. aq	Extrato aquoso
Ext. et	Extrato etanólico
DMSO	Dimetilsulfóxido
RU	Rutina
IC ₅₀	Porcentagem de inibição
<i>Nihil</i>	Sem efeito nas concentrações utilizadas
unid	Unidade

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	<i>Radicais Livres e o estresse oxidativo</i>	22
1.2	<i>Antioxidantes na defesa do organismo contra o estresse oxidativo</i>	25
1.3	<i>Compostos bioativos em alimentos</i>	27
2	OBJETIVOS GERAIS	36
2.1	<i>Objetivos específicos</i>	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	<i>Materiais</i>	37
3.1.1	<i>Sais e reagentes</i>	37
3.1.2	<i>Equipamentos</i>	37
3.2	<i>Métodos</i>	37
3.2.1	<i>Obtenção das matérias primas</i>	37
3.2.2	<i>Tratamento e obtenção das polpas</i>	38
3.2.3	<i>Obtenção dos extratos das polpas em diferentes solventes</i>	38
3.2.3.1	<i>Extrato Aquoso e Extrato Etanólico</i>	39
3.2.4	<i>Preparo do ácido gálico e derivados</i>	39
3.2.5	<i>Avaliação do conteúdo de Fenóis totais</i>	39
3.2.6	<i>Avaliação do conteúdo de Flavonóides Totais</i>	41
3.2.7	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	42
3.2.7.1	<i>Ensaio de captura para o ABTS^{•+}</i>	43
3.2.7.2	<i>Ensaio de captura para o DPPH</i>	44
3.2.7.3	<i>Ensaio de captura para o HOCl/OCl⁻</i>	45
3.2.7.4	<i>Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	46
3.2.7.5	<i>Ensaio de captura do óxido nítrico (NO[•])</i>	47
3.2.7.6	<i>Ensaio de captura do ânion superóxido (O₂^{•-})</i>	49
3.2.7.7	<i>Ensaio do Clareamento (Bleaching) da Crocina</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	<i>Avaliação do teor total de fenóis e de flavonóides</i>	55
4.2	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	57
4.2.1	<i>Ensaio de captura para o ABTS^{•+}</i>	58
4.2.2	<i>Ensaio de captura para o DPPH</i>	59

4.2.3 Ensaio de captura para o HOCl/OCl.....	60
4.2.4 Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	62
4.2.5 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO [•]).....	63
4.2.6 Ensaio de captura do ânion superóxido (O ₂ ^{•-}).....	64
4.2.7 Ensaio do Clareamento (Bleaching) da Crocina.....	65
4.2.7.1 Ácido gálico e derivados.....	65
4.2.7.2 Frutas (extratos).....	73
5 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radicais Livres e o estresse oxidativo.

O tema radical livre ganhou nos últimos anos grande notoriedade. Foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em diversos processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, inflamação, aterosclerose, etc. Devido ao seu caráter multidisciplinar, atrai a atenção de vários pesquisadores nas mais diversas áreas (Ferreira, 1997).

Por definição, radicais livres são espécies geradas durante processos de oxido-redução que ocorrem no metabolismo celular dos seres vivos, onde estão envolvidos com produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de biomoléculas importantes (Barreiros, 2006).

O radical livre é um átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Sabe-se que os elétrons são mais estáveis quando se encontram pareados. Desta forma os radicais livres são altamente reativos e instáveis. A reatividade dos radicais livres ocorre para uma variedade de moléculas ou substratos (Barreiros, 2006).

Em uma ligação química os elétrons envolvidos podem ser separados de duas formas: simetricamente, pela cisão homolítica da ligação covalente, e assimetricamente, pela cisão heterolítica da ligação covalente; neste ultimo caso, apenas um átomo recebe dois elétrons. Mas somente as espécies químicas formadas pelo processo homolítico são denominadas radicais livres, em razão da presença de elétrons não pareados. Logo os radicais livres são formado através da perda ou ganho de um elétron a partir de uma espécie não radical (Ferreira, 1997).

A ação dos radicais livres com outras moléculas pode ser de diferentes modos: I. Interação entre os próprios radicais, formando ligações covalentes $A^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow A - A$; II. Doação de um elétron não pareado para outra molécula (radical oxidado); aceitando o elétron de outra molécula para formar o par (radical reduzido); III. Adição a outras espécies não-radicais. Entretanto, se o

radical recebe ou libera o elétron para a espécie não radical, esta espécie torna-se um radical livre.

Portanto, as reações envolvendo os radicais livres acontecem em cadeia. Nos sistemas biológicos, os radicais livres podem ser formados pela ação da radiação ionizante, luz ultravioleta, reações catalisadas por metais de transição (ferro e cobre) ou por enzimas (Ferreira, 1997)

Temos vários tipos de moléculas e/ou átomos que atuam como radicais, e esse conjunto, envolvido em processos de oxido-redução é denominado de espécies reativas. Em sistemas biológicos as espécies reativas podem ser divididas principalmente em espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), ambas de grande importância. As principais ROS distribuem-se em dois grupos:

- I) Espécies radicalares como os radicais hidroxila (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcoxila (RO^\bullet) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$);
- II) Espécies não radicalares como oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl), que embora não possuam elétrons desemparelhados apresentam alta reatividade e podem gerar espécies radicalares na presença de algumas biomoléculas.

Dentre as espécies reativas de nitrogênio incluem-se os: a) radicalares como o óxido nítrico (NO^\bullet), e, b) os não radicalares óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-) (Chatterjee & Fisher, 2005).

Os radicais livres participam de importantes funções benéficas no organismo. Por exemplo, os radicais oriundos do oxigênio exercem ações críticas na transcrição e na regulação de genes em células. Entretanto, o excesso na produção dos radicais livres ou espécies reativas ocasiona ao organismo um desequilíbrio entre a produção de espécies e sua eliminação através de mecanismos protetores antioxidantes (Duracková, 2010; Reuter, 2010).

Esse desequilíbrio, conhecido como estresse oxidativo, apresenta vários efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica, agressão às proteínas tissulares e de membranas, enzimas, carboidratos e DNA, entre outros. O dano causado a esses componentes celulares pode se acumular com o passar dos anos, e contribuir para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônicas não transmissíveis. Especialmente associadas a doenças com o avanço da idade, destacam o mal de Parkinson, o mal de Alzheimer e a catarata. Por isso, em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos antioxidantes de defesa, os quais incluem-se antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Duracková, 2010; Reuter, 2010). A tabela 1 mostra as principais espécies reativas de interesse biológico provenientes do metabolismo celular e sua reatividade.

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

ESPÉCIES REATIVAS	SÍMBOLO	REATIVIDADE
Espécies reativas de oxigênio:		
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	HO^{\cdot}	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Formador do radical hidroxila
Radical peroxila	ROO^{\cdot}	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, etc., durante o dano oxidativo.
Oxigênio singlete	1O_2	Altamente reativo formado por fotossensibilidade e reações químicas.
Ozônio	O_3	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas produzindo 1O_2 .
Espécies reativas de nitrogênio:		
Óxido nítrico	NO^{\cdot}	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea.
Dióxido de nitrogênio	NO_2	Formado pela poluição do ar.
Peróxido nitrito	$ONOO^{\cdot-}$	Formado a partir do superóxido, é altamente reativo.

Fonte : Chatterjee & Fisher, 2005

1.2. Antioxidantes na defesa do organismo contra o estresse oxidativo.

Os radicais livres podem promover reações com substratos biológicos levando danos às biomoléculas, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Devido a esse fator, os organismos aeróbicos desenvolveram sistemas de defesa eficientes contra o estresse oxidativo, os chamados antioxidantes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, lesões oxidativa de caráter cumulativo podem ocorrer (NIKKI, 2010).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Um antioxidante pode

ser definido como um composto que, mesmo presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, impede ou inibe a oxidação do substrato de maneira eficaz. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados através da reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (NIKKI, 2010).

Os antioxidantes podem atuar em diferentes pontos do processo de oxidação. A sua forma de atuação permite-nos dividi-los em grupos de acordo com o seu mecanismo de ação (NIKKI, 2010):

- I) Sequestro de espécies ERO/ERN;
- II) Reparador de danos causados pela ação das espécies ERO/ERN;
- III) Quelante de metais.

Nos processos de ação de proteção contra os radicais livres também a inclui-se a ação de diversas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase, entre outras (NIKKI, 2010).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua solubilidade: hidrofílicos, solúveis em água, tais como a vitamina C e a maioria dos polifenóis, e lipofílicos, solúveis em óleos e gorduras, os quais incluem a vitamina E e os carotenoides.

Os lipofílicos assim como os hidrofílicos, apresentam um importante papel no processo de defesa. Indiferentemente dos hidrofílicos, os quais são excretados na urina, os antioxidantes lipofílicos se acumulam no corpo, penetram na membrana celular lipoproteica mais facilmente e alcançam um alto grau de biodisponibilidade. Desta forma sua eficiência é bastante dependente do seu ambiente (HALLIWELL, 1996).

Como suporte secundário ao mecanismo de ação antioxidante tem-se a ingestão de compostos com propriedades antioxidantes derivados da dieta que reforça o mecanismo de defesa, no controle dos danos causados nas células

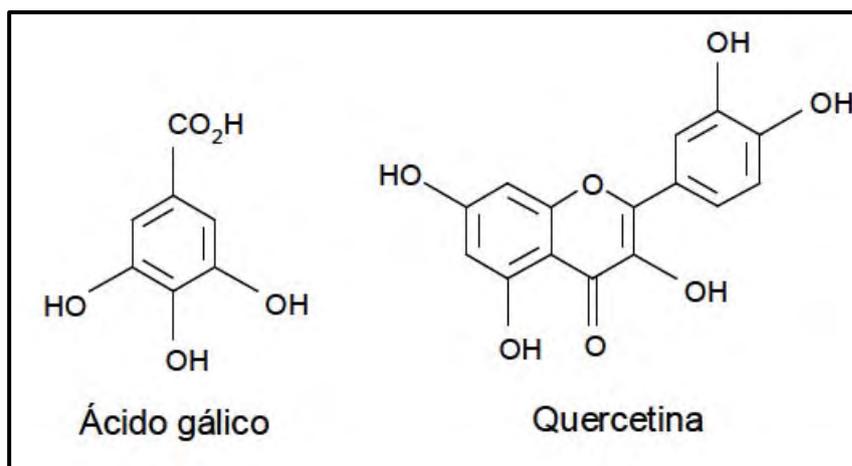
pelos radicais livres. Desta forma, o consumo regular de alguns alimentos que contém esses compostos, contribui para recompor o mecanismo de defesa endógeno dos antioxidantes, regulando as várias reações de oxidação-redução (HALLIWELL, 1996)

1.3. Compostos bioativos em alimentos

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, como as vitaminas, sais minerais e fibras. Mas também compostos bioativos cujas propriedades biológicas são importantes, promotoras de saúde, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Estudos clínicos e epidemiológicos tem evidência do que esses compostos bioativos dos alimentos são os principais fatores que contribuem para a redução significativa da incidência de doenças degenerativas e doenças crônicas (Silva, 2001).

Entre os compostos bioativos, aqueles que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica. Eles são a principal classe de metabólitos secundários presentes nas plantas e encontram-se amplamente distribuídos nesse meio (Xing, 1996).

Os compostos fenólicos são compostos que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligados ao anel. Eles são os principais componentes antioxidantes presentes em frutas e vegetais, constituem uma ampla classe de compostos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis, podem ter características lipofílicas, como os tocoferóis, e características hidrofílicas, como o flavonóide quercetina. Sua atividade antioxidante é dependente da sua da estrutura química e de ligação de hidroxilas ao anel aromático (Jiménez-Escrig, et al 2000).

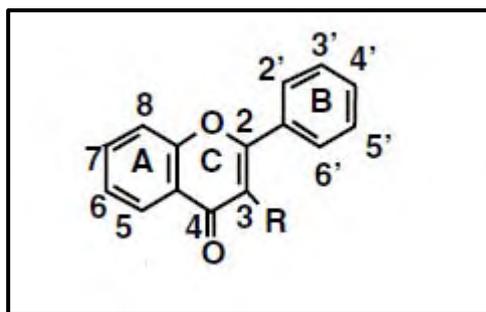
Figura 1: Estrutura química de compostos fenólicos.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou no sequestro de radicais livres ou quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Jiménez-Escrig, et al 2000).

Embora com eficiência comprovada como agente antioxidante, em estudos *in vitro* dos compostos fenólicos, essas espécies em algumas situações podem apresentar características pró-oxidantes (Jiménez-Escrig, et al 2000).

Dentre os compostos fenólicos, merece destaque os flavonóides. Eles são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos (Figura 2) com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A, B e C. A sua estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), dihidroflavanóis, isoflavonas e antocianinas. As diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da variação no número e no arranjo dos grupos hidroxilas, assim como a natureza e a quantidade de alquilações ou glicosilações destes grupos (Rufino, et al. 2010; Kang et al. 2011).

Figura 2: Estrutura química dos flavonóides.



A atividade de captura dos flavonóides sequestro está diretamente relacionada ao seu potencial de oxidação das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide maior é a sua atividade como sequestrador captura de radicais livres. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de hidrogênio e de elétrons (Rufino et al, 2010; Kang et al. 2011).

Um fator importante para sistemas biológicos que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é sua interação com biomembranas. A lipofilicidade dos flavonóides facilita sua incorporação membranas a qual é alvo da maioria das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Assim, para que a ação seja eficaz, uma concentração mínima é exigida do antioxidante por substrato biomolecular, de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próximas ao sítio de ataque do radical. Flavonoides que possuem uma cadeia de açúcares ligada a sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo (Rufino et al, 2010; Kang et al. 2011).

A nossa dieta pode ser rica nesses compostos capazes de diminuir e até mesmo inibir o efeito deletério das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em nosso organismo. Esses compostos estão presentes em alimentos como folhas, frutas, raízes, entre outros (Finley, 2011).

Vários estudos têm evidenciado o potencial antioxidante de uma larga variedade de frutas. Este benefício, através dos alimentos, gerou um mercado,

em crescente expansão, de alimentos funcionais ou nutracêuticos. Os sucos de frutas são bons exemplos de produtos presentes no mercado que tiveram maior agregação de valor, em função de suas propriedades antioxidantes. Outro tipo de mercado é a comercialização de preparações de compostos isolados, ou extratos vendidos na forma de suplementos alimentares. (Finley, 2011).

O Brasil ostenta grande variedade de frutas nativas e exóticas ainda não totalmente exploradas, geralmente consumidas apenas por população regional. Essas frutas são de interesse em potencial para a agroindústria, representando uma excelente perspectiva de oportunidade econômica, como exemplo tem-se o açaí, o qual teve um aumento na sua exportação e hoje é mundialmente reconhecido por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Rufino, et al, 2010; Kang, et al. 2011).

A fruticultura brasileira apresenta grande importância não somente no setor primário, mas também para a indústria e o comércio (Hansen, et al. 2008)

O Brasil possui um bioma rico, o qual tem várias espécies nativas pouco exploradas comercialmente. Tendo em vista o recente interesse pelo consumo de frutas, instiga-se o estudo de espécies ainda pouco estudadas (Alves, R. E., et al., 2008).

O **Araçá** (*Psidium cattleianum* Sabine) originário dos biomas subtropical e temperado, com frutos amarelos e vermelhos, o araçá é apreciado devido aos seus atributos sensoriais e propriedades funcionais (Medina et al , 2011); (figura 3)

Figura 3: Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine)



Fonte: Frutas exóticas, Jaboticabal 1998.

O **Cajá-mirirm** (*Spondias mombim* L.): também conhecido como no Brasil como taperebá, é uma fruto encontrada nas regiões Norte e Nordeste do país. É muito utilizada para a produção de sucos, sorvetes e geléias (Tiburski et al, 2011); (figura 4)

Figura 4: Cajá-mirirm (*Spondias mombim* L.)



Fonte: Frutas exóticas, Jaboticabal 1998.

O **Figo da Índia** (*Opuntia ficus-indica* Mill): a fruta é rica em vitaminas (A e C), cálcio e magnésio. Reconhecida pela população mexicana como fonte benéficos medicinais no tratamento da diabetes e gastrite (Cayupán et al, 2011). (figura 5)

Figura 5: Figo da Índia (*Opuntia ficus-indica* Mill)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

A **Granadilla** (*Passiflora ligularis* Juss): originária de regiões tropicais e subtropicais, esta fruta, da família das Passifloraceae, é considerada uma excelente fonte de fibras (Letterme et al, 2006); (figura 6)

Figura 6: Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

A **Grumixama** (*Eugenia brasiliensis*): ainda pouco conhecida, esta fruta, originária da região de Mata Atlântica, pode ser chamada de “Berry Brasileira”, devido a sua forte coloração. Frutas coloridas são potencialmente fontes de compostos fenólicos (Reynertson et al, 2008); (figura 7)

Figura 7: Grumixama (*Eugenia brasiliensis*)



Fonte: www.sitiodobello.com.br, acessado em julho de 2011.

O **Kiwano** (*Cucumis metuliferus*): é uma fruta nativa do continente sul africano, com condições climáticas semelhantes a nossa. Rico em potássio e pobre em sódio é muito indicado como diurético (Souza et al, 2006); (figura 8)

Figura 8: Kiwano (*Cucumis metuliferus*)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

O **Mangostão** (*Garcinia mangostana* L): a fruta é rica em compostos fenólicos, incluindo xantonas, proantocianinas, antocianinas e ácidos fenólicos, normalmente encontrados na polpa da fruta (Nacz et al, 2011); (figura 9)

Figura 9: Mangostão (*Garcinia mangostana* L)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

O **Maracujá** (*Passiflora edulis* Sims): é uma espécie fortemente cultivada e consumida no Brasil, sua polpa é utilizada para a produção de sucos. Estudos recentes têm proposto seu uso como anti-hipertensivo devido as suas propriedades vasodilatadoras (Zeraik et al, 2011); (figura 10)

Figura 10: Maracujá (*Passiflora edulis* Sims)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

A **Pitaya Rosa** (*Cereus undatus* Haworth): esta fruta recebe bastante atenção não somente pela sua coloração, mas também por suas propriedades antioxidantes advindas de seu conteúdo de betocianinas (Wu et al, 2006); (figura 11)

Figura 11: Pitaya Rosa (*Cereus undatus* Haworth)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

A **Uvaia** (*Eugenia pyriformis*): é uma espécie nativa da família das Myrtaceae, presente do Rio Grande do Sul a São Paulo. Possui uma alta perecibilidade, por isso a fruta é preferencialmente comercializada na forma de polpa (Rufino et al, 2009). (figura 12)

Figura 12: Uvaia (*Eugenia pyriformis*)



Fonte: www.todafruta.com.br, acessado em julho de 2011.

O ácido gálico (GA; ácido 3,4,5 trihidróxibenzoico) é encontrado abundancia em frutas, como a uva, e em folhas, como o chá-verde (*Camellia sinensis*). Esse apresenta efeitos biológicos diversos, como a inibição da liberação histaminas de mastócitos, supressão na formação de citocinas pró-inflamatórias, as quais têm um papel fundamental no desenvolvimento de úlcera gastrointestinal, e atividade antioxidante como a proteção do organismo dos danos causados pelo H_2O_2 ao hepatócito humano. Por isso esse composto foi utilizado como “padrão” nos ensaios, uma vez que o mesmo encontra-se presente em diversas frutas e tem reconhecidas propriedades antioxidantes. (Pal et al, 2010)

O ácido gálico apresenta uma estrutura, figura 13, na qual a hidroxila do grupamento carboxílico do ácido gálico foi acrescentada cadeias carbônicas alifáticas de até seis carbonos, bem como cadeias com pequenas ramificações.

Às hidroxilas ligadas ao anel benzênico foram adicionados três grupamentos acetato, totalizando uma soma de nove amostras, tabela 3.

Figura 13: Estruturas do ácido gálico e derivados (1 e 2).

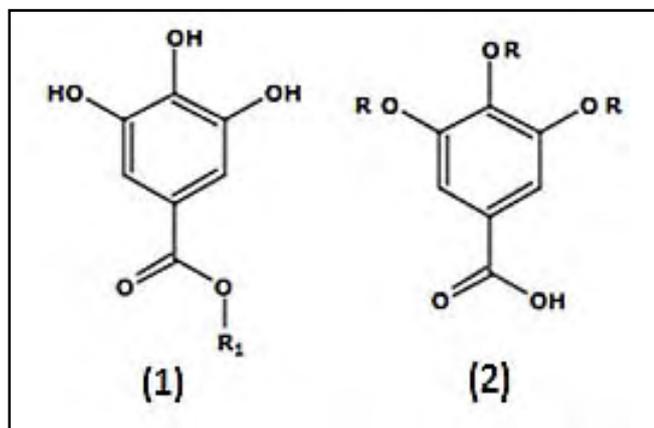
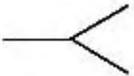


Tabela 2: Siglas do ácido gálico e seus derivados.

Amostra	Substituinte	Sigla
Ácido Gálico (1)	$R_1 = H$	AG
Galato de Metila (1)	$R_1 = CH_3$	GM
Galato de etila (1)	$R_1 = CH_2CH_3$	GE
Galato de n-propila (1)	$R_1 = (CH_2)_2CH_3$	GPR
Galato de n-butila (1)	$R_1 = (CH_2)_3CH_3$	GB
Galato de n-pentila (1)	$R_1 = (CH_2)_4CH_3$	GPE
Galato de n-hexila (1)	$R_1 = (CH_2)_5CH_3$	GH
Galato de isopropila (1)	$R_1 = $ 	GIP
Galato de isobutila (1)	$R_1 = $ 	GIB
Triacetato de ácido acético (2)	$R = $ 	TAG

2. OBJETIVOS GERAIS

2.1 Objetivos específicos

Considerando que os estudos sobre os benefícios dos compostos bioativos à saúde cresceram de forma vertiginosa na última década, este trabalho tem por objetivo avaliar/realizar:

- i) Obtenção de extratos aquosos e extratos etanólicos a partir de amostras de frutas (tropicais e exóticas) liofilizadas previamente;
- ii) Quantificação dos níveis de fenóis totais e flavonóides totais presentes nas amostras;
- iii) Avaliação da capacidade antioxidante frente a diferentes espécies oxidantes, representados por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio;
- iv) Avaliação da estrutura atividade do ácido gálico e derivados.

Para análise da ação antioxidante serão realizados vários ensaios de atividade antioxidantes, em “sistemas químicos” *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Sais e reagentes

Os sais e reagentes foram obtidos dos seguintes laboratórios: Persulfato de potássio, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), Crocina, Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH), Metassulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), da Sigma-Aldrich; Ácido acético glacial, Peróxido de hidrogênio, da Merck. Os demais sais e reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

3.1.2. Equipamentos

Utilizou-se balança analítica (Acculab), banho-maria, pHmetro (Marconi), Sonicador Ultra Sonic Cleaner (Unique), espectrofotômetros, de placas Biotek (Power Wave XS2) e com cubetas: OceanOptics USB 4000 com agitação magnética e termostatização com peltier e Femto 600 Plus.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das matérias-primas

As frutas foram adquiridas da Companhia de Entrepostos de Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), a saber: figo da índia (*Opuntia ficus-indica Mill*), Kiwano (*Cucumis metuliferus*), granadilla (*Passiflora ligularis Juss*), maracujá (*Passiflora edulis Sims*), mangostão (*Garcinia mangostana L*) e pitaya vermelha (*Cereus undatus Haworth*). A escolha dos cultivares se deu conforme a disponibilidade no mercado de cada das frutas, na época de aquisição das mesmas, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3: Frutas e período de aquisição.

Fruta	Período (mês/ano)
Figo da Índia (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill)	Dezembro/2010
Kiwano (<i>Cucumis metuliferus</i>)	Dezembro/2010
Granadilla (<i>Passiflora ligularis</i> Juss)	Dezembro/2010
Mangostão (<i>Garcinia mangostana</i> L)	Dezembro/2010
Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	Julho/2010
Pitaya Rosa (<i>Cereus undatus</i> Haworth)	Dezembro/2010

Também foram adquiridas polpas comerciais de frutas nativas, fornecidas pelo “Sítio do Bello – Produtor de polpas de frutas nativas”, a saber: araçá (*Psidium cattleianum* S.), cajá-mirim (*Spondias mombim* L.), grumixama (*Eugenia brasiliensis* La M.) e uvaia (*Eugenia pyriformis*).

As amostras do ácido gálico e derivados foram obtidas em parceria com o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), coordenado pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, do Instituto de Química – UNESP – Araraquara.

3.2.2. Tratamento e obtenção das polpas

Após a lavagem das frutas em água corrente, procedeu-se a separação das frutas em casca e “polpa” (polpa + sementes). Uma vez separada as partes, a parte denominada polpa foi triturada em liquidificador. Subtendo-se posteriormente ao congelamento, temperatura de -32°C, e seguido à liofilização com vácuo de 60 – 100 µHg e temperatura de -45°C. As amostras comerciais foram submetidas diretamente à liofilização. Uma vez liofilizadas, as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas à -18°C até o momento das análises.

3.2.3. Obtenção dos extratos das polpas em diferentes solventes

Diversos métodos e solventes são utilizados para o estudo de antioxidantes de frutas e plantas em geral. Muitos fatores influenciam na natureza e quantidade dos compostos bioativos extraídos, como por exemplo, a natureza do solvente extrator, pH, temperatura, número de etapas da extração, e tamanho das partículas da amostra.

Neste estudo utilizaram-se dois tipos de solventes para a extração: água (extrato aquoso) e etanol 80% v/v (extrato etanólico). Fez-se uso destes solventes devido à facilidade de manipulação, a fim de comparar a eficiência dos mesmos.

3.2.3.1. Extrato Aquoso e Extrato Etanólico.

Os extratos das frutas foram obtidos da seguinte forma: 1,0 g das amostras liofilizadas foram transferidas para béqueres, onde se adicionou 10 mL dos solventes extratores (aquoso = água; etanólico = etanol 80%). Os béqueres contendo as amostras e os solventes foram submetidos à agitação, em agitador magnético, por 5 minutos e a temperatura ambiente. Em seguida, os extratos passaram por um processo de filtração, sendo a primeira etapa com gases e a segunda com papel de filtro Whatman nº6. Na seqüência os extratos foram armazenados em frascos tipo eppendorf e congelados à temperatura de -18°C até o momento da análise.

3.2.4. Preparo do ácido gálico e derivados

O ácido gálico e seus derivados, tabela 2, foram dissolvidos em uma solução de etanol 2,5%, totalizando uma concentração de 2 mmol L⁻¹. Para a realização dos ensaios foram feitas diluições de acordo com cada teste, todas em água.

3.2.5. Avaliação do conteúdo de Fenóis totais

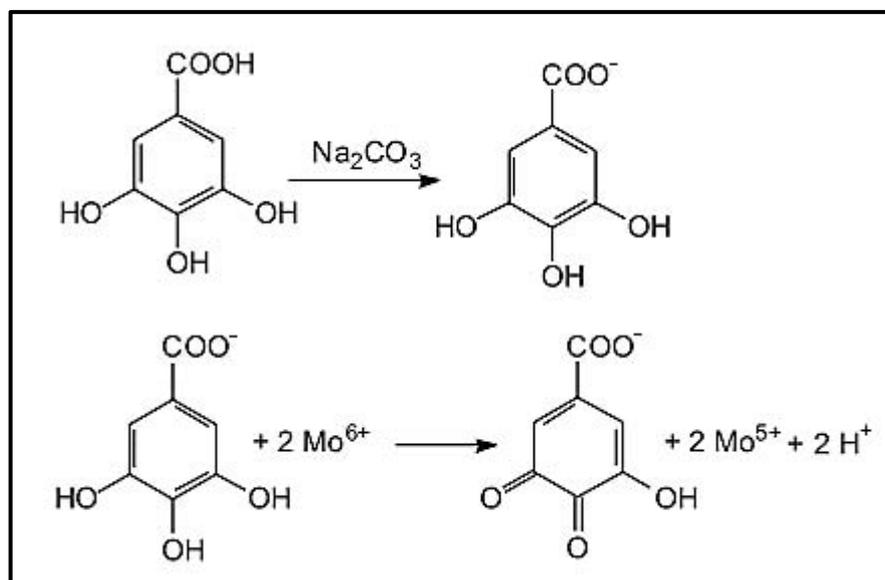
Os compostos fenólicos possuem uma elevada capacidade antioxidante. Capacidade essa fortemente atribuída à sua habilidade em complexar íons

metálicos e inativar reações com radicais livres. A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de diversos métodos, todavia o mais empregado é o método Folin-Ciocalteu (Oliveira et al, 2009).

A quantidade de fenóis totais presentes nas amostras foi obtida de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), com modificações e utilizando-se ácido gálico como padrão. O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungstícos. A reação do teste consiste na transferência de elétrons para compostos fenólicos, com redução do reagente Folin-Ciocalteu, e formando um complexo azul que pode ser monitorado espectrofotometricamente.

A figura 14 mostra um exemplo de reação de um composto fenólico (ácido gálico) em meio básico, gerando ânions fenolatos. Seguido, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente Folin, na qual, segundo Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), o molibdênio, componente do reagente Folin, sofre redução. O meio reacional passa de amarelo para azul. A intensidade da coloração depende da quantidade e disponibilidade do composto fenólico presente na amostra.

Figura 14: Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu. (Oliveira et al, 2009)

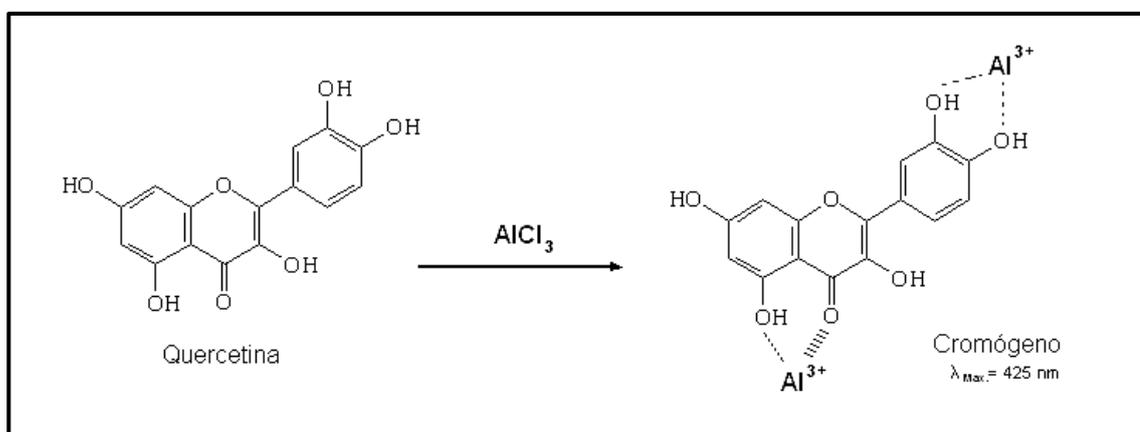


Os extratos obtidos foram diluídos na proporção 1:5 com volume final de 0,5 mL, o qual foi transferido para um tubo de ensaio e adição 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% em água. Em seguida foram adicionados 2,0 mL da solução aquosa de Carbonato de Sódio 7,5% e posteriormente os tubos foram incubados por 5 minutos em banho maria a 50°C. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Uv-Vis Diode Array Hewlett-Packard, modelo Agilent 8453 a 750 nm. Uma amostra contendo o extrato sem o reagente de Folin, foi usada como branco. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em porcentagem equivalente de ácido gálico (mg AG) calculados por meio da curva de calibração do ácido gálico com concentrações que variaram de 20 – 100 µg/mL.

3.2.6. Avaliação do conteúdo de Flavonóides Totais

A quantificação de flavonóides totais presentes dos extratos das frutas foi obtida espectrofotometricamente utilizando o método descrito por Chang et al (2002); Woisky & Salatino (1998) e Markham (1982), com modificações. O método baseia-se no uso de cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio batocrômico. O complexo flavonóide-Al absorve em comprimentos de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os compostos fenólicos, mesmo os que formam complexos com o AlCl_3 (Figura 15), absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas.

Figura 15: Formação do cromóforo flavonoíde-alumínio (Marcucci et al, 1998).



Os extratos obtidos foram diluídos na proporção 1:2 para volume final de 0,5 mL. Uma alíquota de 250 µL foi transferida para um tubo de ensaio e adicionou-se 1,25 mL de água destilada e 75 µL de solução aquosa Nitrato de Sódio 5%, deixando-se em repouso por 6 minutos. Passado o repouso, adicionou-se 150 µL de cloreto de alumínio hexaidratado 10% em água. Novamente deixou-se a reação em repouso por 5 minutos, na ausência de luz. Após 5 minutos adicionou-se ao meio reacional 500 µL de hidróxido de sódio 1mol L^{-1} e 275 µL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Uv-Vis Diode Array Hewlett-Packard, modelo Agilent 8453 a 510nm. Uma amostra contendo o extrato, sem a solução de cloreto de alumínio, foi utilizada como branco. Os resultados da quantificação de flavonóides totais foram expressos em porcentagem equivalente de rutina (mg RU) calculados por meio da curva de calibração da rutina com concentrações que variaram de 20 – 100 µg/mL.

3.2.7. Avaliação da atividade antioxidante

Os compostos bioativos presentes em frutas e outros alimentos de origem vegetal apresentam uma capacidade antioxidante dependente da estrutura molecular e da concentração das biomoléculas. A concentração destes compostos no alimento é influenciada pela genética da planta, condição ambiental, variedade, entre outros. (Oliveira et al 2009)

Durante um ensaio de avaliação da capacidade antioxidante, os resultados da análise são influenciados pelo tipo de solvente extrator, técnica empregada no ensaio e o substrato. Por exemplo, no que se refere ao solvente utilizado, o metanol tem se mostrado um eficiente extrator, entretanto, o mesmo apresenta uma alta toxicidade. Sendo, desta forma, prejudicial sua utilização em pesquisas voltadas para o consumo humano. (Oliveira et al 2009)

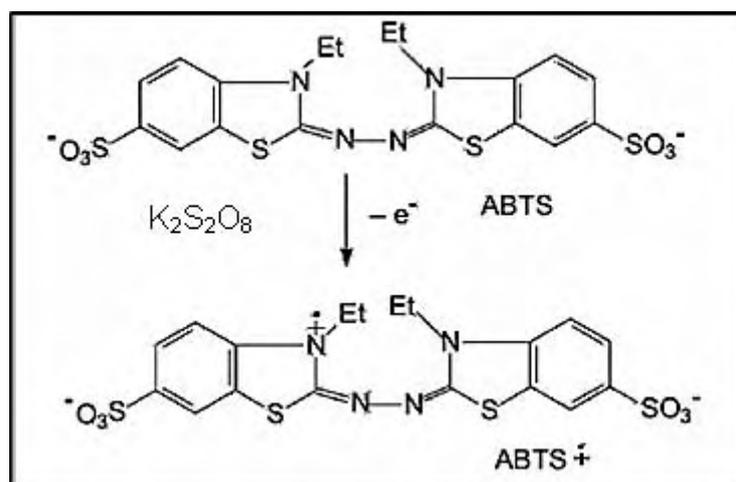
Devido à existência de diversos tipos de compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos, tem-se desenvolvido vários métodos de análise da capacidade antioxidante. Alguns destes métodos avaliam a capacidade observando apenas o sequestro de radicais livres, outros observam a quelação de metais. (Oliveira et al 2009)

Como os ensaios utilizados podem diferir com relação ao método de análise, de acordo com o substrato a ser analisado, não existe um método universal de avaliação da capacidade antioxidante. Esse fato implica a necessidade da utilização de vários ensaios frente a vários tipos de espécies reativas. Obtendo vários resultados em escala de valores distintos. (Oliveira et al 2009)

3.2.7.1. Ensaio de captura para o ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método do ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin- 6 - sulfônico)] foi avaliada conforme metodologia descrita por Re et al., 1999, com algumas modificações. O radical ABTS^{•+} (figura 16) foi formado pela reação de 140 mmol L⁻¹ de persulfato de potássio com 7 mmol L⁻¹ de ABTS no escuro e a temperatura ambiente, por 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído em tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ (pH 7) até a obtenção do valor de absorvância de $0,750 \pm 0,020$, a 734 nm.

A partir do extrato de cada fruta, conforme anteriormente descrito diferentes diluições foram preparadas, de acordo com a capacidade antioxidante de cada fruta, foram previamente analisadas. As leituras das absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro para microplacas a Biotek, após 15 minutos de incubação no escuro. O volume total da reação foi de 300 µL, com o volume fixo de ABTS^{•+} de 100 µL e os volumes de tampão e amostra totalizando 200 µL. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição (IC₅₀).

Figura 16: Representação da formação do ABTS^{•+}

3.2.7.2. Ensaio de captura para o DPPH

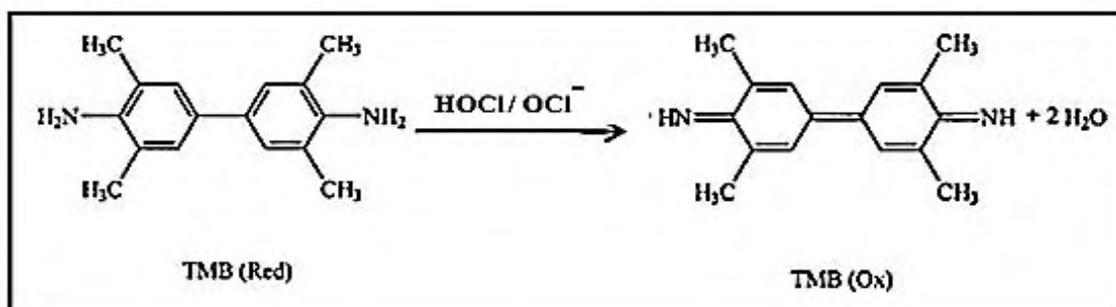
O método para DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado conforme metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS et al. (1995), com modificações. O DPPH é um radical livre (figura 17) obtido diretamente a partir da dissolução do reagente em meio orgânico, gerando um cromóforo com absorvância máxima no intervalo de 515 a 520 nm. Uma vez capturado, observa-se um decréscimo na absorvância. Este método é considerado fácil e rápido para se avaliar a capacidade antioxidante.

A partir do extrato de cada fruta, diferentes diluições dos mesmos, de acordo com a capacidade antioxidante de cada fruta, foram previamente analisadas. As leituras das absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro para microplacas a 515 nm, após 20 minutos de incubação no escuro. O volume total da reação foi de 300 µL, onde o volume fixo de DPPH foi de 150 µL e os volumes de etanol e amostra somam 150 µL.

No ensaio para o DPPH, extratos aquosos foram diluídos em etanol, na proporção de 1:1 e centrifugados a 15.000 rpm por 5 minutos, previamente a realização do teste. Esta etapa foi realizada uma vez que na presença de solvente orgânico as proteínas presente nos extratos precipitam, impossibilitando desta forma a realização do ensaio.

extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 292 nm, ZGLICZYNSKI et al., 1971). Em tubos de ensaio pipetou-se a amostra (em diferentes concentrações), seguido do tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1}), HOCl ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e por fim TMB ($2,8 \text{ mmol L}^{-1}$), totalizando 2 mL de volume de reação final. Incubou-se por 15 minutos na ausência de luz, à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi a 655 nm.

Figura 18: Representação da oxidação do TMB pelo HOCl / OCl⁻.



3.2.7.4. Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O H₂O₂ é uma espécie reativa que se encontra envolvida em um processo de redução pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo de redução do O₂. Por definição, o H₂O₂ não é um radical livre, todavia, porém exerce um papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de permear membranas celulares facilmente, gerando o radical hidroxila (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A capacidade de captura do H₂O₂ foi determinada segundo Ching *et al.* (1994) pelo ensaio em que o H₂O₂ oxida o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB) (figura 19), com diminuição da absorvância a 412 nm e o aumento a 325 nm (Figura 20). O TNB foi preparado segundo Ching *et al.* (1994) e sua concentração foi determinada com o coeficiente de extinção molar em 412 nm de $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (CHING *et al.*, 1994), e a concentração do H₂O₂ foi determinada de acordo com Brestel (1985), ($\epsilon = 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a 230 nm).

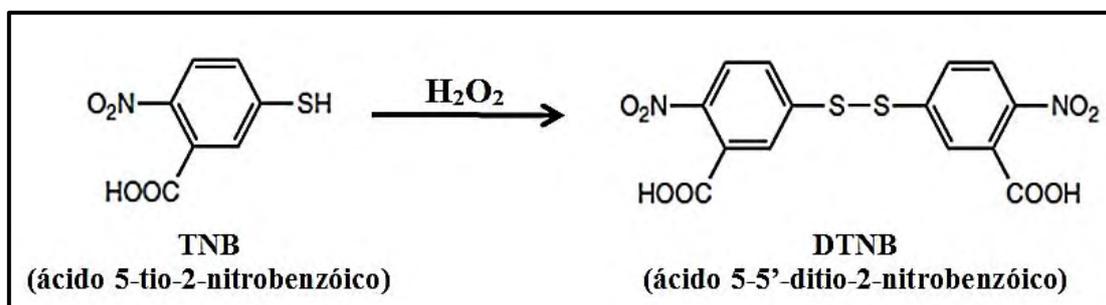
Realizou-se o ensaio em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,4, com diferentes concentrações dos solutos urêmicos, H₂O₂ (0,3 mmol L⁻¹) e incubação por 30 minutos a 37°C; adicionou-se TNB (53 μmol L⁻¹), e incubou-se por mais 1 hora a 37°C. A leitura de absorbância foi realizada a 412 nm.

A porcentagem de inibição da oxidação do TNB (% de captura do H₂O₂) é calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{1 - (\text{Abs}_{\text{Máx}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) \times 100}{(\text{Abs}_{\text{Máx}} - \text{Abs}_{\text{Min}})}$$

Onde: Abs Máx., representa a absorbância na ausência do agente oxidante (H₂O₂) e da amostra; Abs_{Amostra} é a absorbância na presença do agente oxidante e da amostra; e Abs_{Min} é a absorbância na presença do agente oxidante e na ausência da amostra.

Figura 19: Representação da oxidação do TNB à DTNB pelo H₂O₂ (LANDINO *et al.*, 2008).



3.2.7.5. Ensaio de captura do óxido nítrico (NO[•])

O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio é sintetizado em organismos vivos através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina NO[•] + L-citrulina (outro aminoácido). É um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. (Vasconcelos, 2007).

Sabe-se que o composto nitroprussiato de sódio em solução aquosa de pH fisiológica produz óxido nítrico. Esse por sua vez, um radical lipossolúvel e hidrossolúvel, reage rapidamente com o oxigênio para formar outras espécies reativas, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). (Velloso, 2007)

O reagente de Griess é usado para determinar nitrito através de espectrofotometria. Esse reagente é composto por duas substâncias, ácido sulfanílico e N-(1-naftalenodiamina). Em condições ácidas, o ácido sulfanílico reage com o nitrito formando um sal diazônio, que por sua vez reage rapidamente com o N-(1-naftalenodiamina) formando um composto azo colorido que pode ser detectado espectrofotometricamente, com um pico de absorvância a 570 nm (Figura 20).

Antioxidantes e o oxigênio competem pelo óxido nítrico, que uma vez que sequestrado pelo primeiro, leva a diminuição da produção de nitrito, diminuindo conseqüentemente a formação do composto azo colorido.

O efeito sequestrador das amostras em estudo sobre o radical óxido nítrico foi medido de acordo com Yen et al (2001), em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0 e nitroprussiato de sódio 25 mmol L^{-1} .

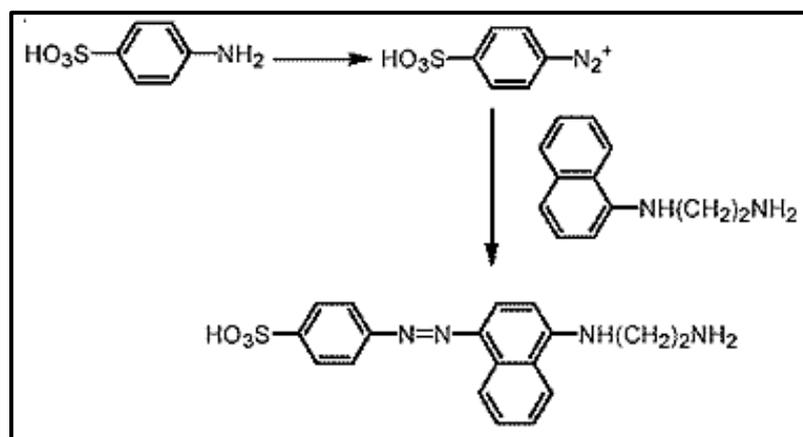
Uma solução padrão de nitrito de sódio foi tratada da mesma forma com a finalidade de observar a relação entre a concentração de nitrito e o composto azo colorido formado.

A porcentagem de inibição do óxido nítrico (% de captura do NO^*) é calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Onde: A_0 representa a absorvância na ausência do antioxidante e A_1 é a absorvância na presença do antioxidante.

Figura 20: Mecanismo de detecção do nitrito usando o reagente de Griess.



3.2.7.6. Ensaio de captura do ânion superóxido (O₂^{•-}).

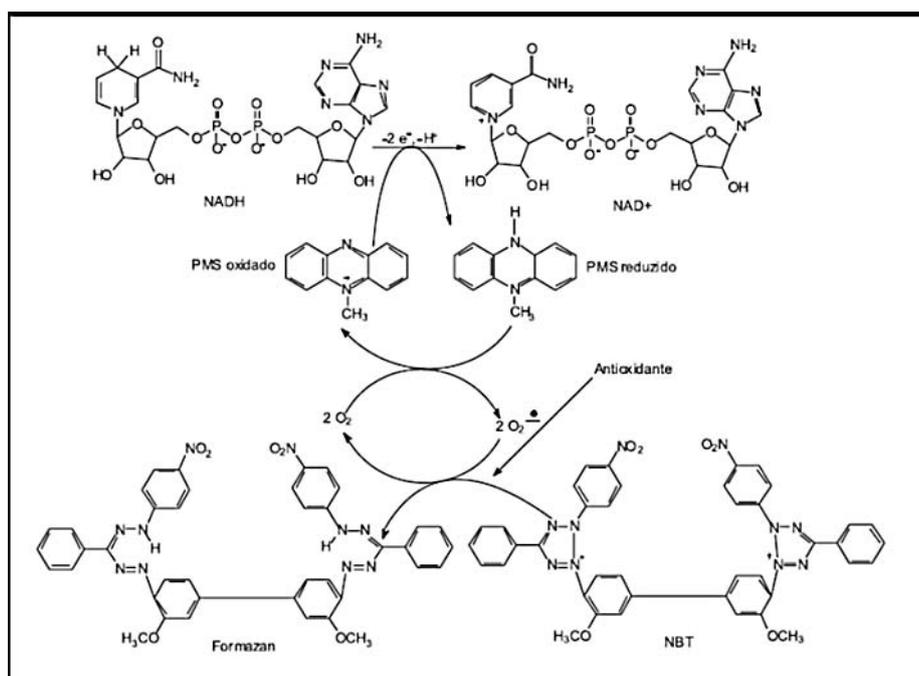
A produção do ânion superóxido (O₂^{•-}), uma espécie reativa de oxigênio, é essencial para a defesa de organismos vivos. Esse radical atua na transferência de sinais entre células vivas. Entretanto a superprodução do ânion superóxido provoca o estresse oxidativo e está envolvida em diversas patologias.

O ânion superóxido é gerado pela reação entre o NADH e o PMS (metassulfato de fenazina). Uma vez produzido o mesmo é revelado em solução através da reação com o NBT (sal de tetrazólio). Esse último possui uma coloração amarelo pálido e uma vez que reage com o O₂^{•-} forma um composto de coloração púrpura, a formazana, podendo desta forma ser monitorado espectrofotometricamente; as moléculas que atuam como antioxidantes interagem com o O₂^{•-} inibindo a produção da formazana (figura 21). (ALVES *et al.*, 2010).

O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3 – 25 mmol L⁻¹), contendo PMS (372 μmol L⁻¹), NBT (600 μmol L⁻¹), NADH (1560 μmol L⁻¹), diferentes concentrações dos extratos das frutas, em um volume final de reação de 900 μL. Após incubação de 7 minutos a temperatura ambiente, foi

monitorada a absorvância em 560 nm, a fim de determinar a quantidade de formazana gerada (HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (IC_{50}).

Figura 21: Representação da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante (OLIVEIRA et al., 2009)



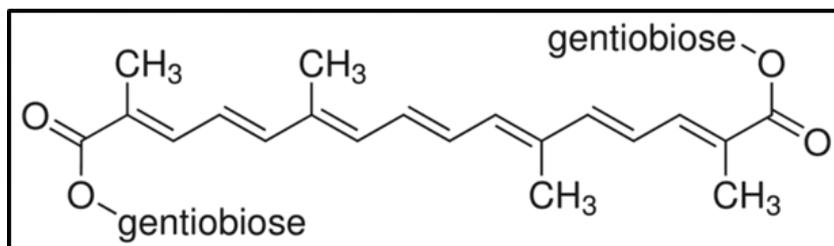
3.2.7.7. Ensaio do Clareamento (Bleaching) da Crocina.

O radical peroxila (ROO^{\bullet}) é normalmente encontrado em alimentos e amostras biológicas, sendo gerado durante a oxidação de lipídios. A membrana celular lipoproteica é um dos componentes mais atingidos por esse radical, o que acarreta em alterações de sua estrutura e funcionalidade como a seletiva, entre outros danos. Em função de sua importância vários sistemas-modelo simulam a lipoperoxidação, com a finalidade de avaliar a capacidade antioxidante frente a esse tipo de atividade oxidativa.

O ensaio do clareamento (bleaching) da crocina, proposto inicialmente por BORS et al.(1984), mostra-se adequado para avaliar a atividade antioxidante frente ao processo de lipoperoxidação. Nesse sistema-modelo mede-se a

habilidade de antioxidantes em proteger um carotenóide, a crocina (Figura 22), um pigmento natural extraído da planta *Crocus sativus* L., frente a um composto gerador de radicais livres.

Figura 22: Representação estrutural da crocina.

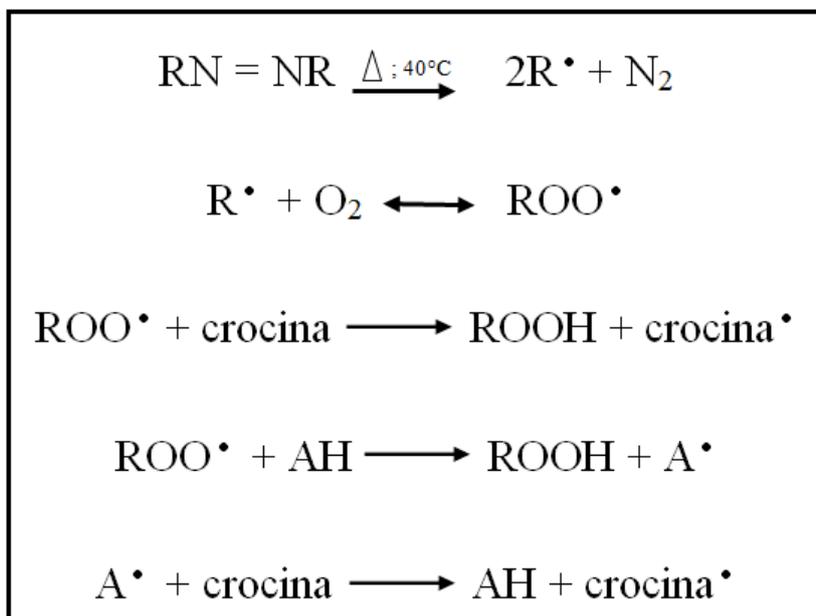


Tubaro et al. (1998) aplicaram o método para análise da capacidade antioxidante do plasma sanguíneo humano. Campanella et al (2004) utilizaram o teste para medir a capacidade antioxidante de vinhos, comparando o mesmo com outros métodos espectrofotométricos. Este teste também vem sendo utilizado para a determinação da relação estrutura-atividade de flavononas presentes em frutas cítricas (Di Majo et al, 2008).

A reação é iniciada pela adição do azo composto AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine dihydrochloride), que através da termólise à 40°C, gera um radical livre que reage com o oxigênio, em um meio aerado, e forma o radical peroxíla que por sua vez é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio, da estrutura da crocina, resultando no rompimento do seu sistema de duplas ligações conjugadas, provocando o seu clareamento. Esse clareamento é conseqüentemente, observado em uma redução da absorbância na região do visível. Na presença de uma molécula antioxidante esta redução é menor e registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade de clareamento.

A velocidade de clareamento da crocina é monitorada a 443 nm, durante 10 minutos. Antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO[•], e o grau de inibição da oxidação da crocina depende da capacidade de captura das amostras. A reação descrita acima pode ser descrita através do esquema 1.

Esquema 1: Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH (adaptado de ORDOUDI & TSIMIDOU, 2006); A[•], representa um antioxidante (amostra).



Experimentalmente, a reação ocorreu em um volume final de 2 mL em tampão fosfato, 0,12 mol L⁻¹, pH 7,0, 25 μmol L⁻¹ de crocina (a partir de uma solução estoque em DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,6 mmol L⁻¹) e diferentes concentrações de antioxidante (extratos aquosos e etanólicos). A reação inicia-se com adição de 50 μl (12,5 mmol L⁻¹) de AAPH partindo de uma solução preparada diariamente, a 0,5 mol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio, 0,12 mol L⁻¹, pH 7,0. A mistura reacional é monitorada a 443 nm, sob agitação constante e temperatura de 40 °C.

A velocidade do clareamento (bleaching) da crocina torna-se linear aproximadamente 1 minuto após a adição do AAPH, foi monitorada pelos 10 minutos subsequentes em espectrofotômetro (OceanOptics USB 4000). Para eliminar possíveis interferentes da crocina com a amostra a ser analisada, foi realizado um ensaio sem crocina, considerando este como branco da reação.

Mediante a competição cinética, o bleaching da crocina pela geração do radical peroxil (v_0), diminui na presença de um antioxidante. O antioxidante

compete com a crocina pelo radical peroxil e uma nova velocidade de bleaching (v) corresponde a:

$$v = v_0 \times \frac{k_c [C]}{k_c [C] + k_a [A]}$$

Onde: $v_0 = k_1 \times [\text{ROO}^\cdot] \times [C]$; $k_c = k_1 \times [\text{ROO}^\cdot]$; $k_a = k_2 \times [\text{ROO}^\cdot]$; $[\text{ROO}^\cdot]$ = concentração do radical peroxil; v_0 = velocidade da reação da crocina com ROO^\cdot ; k_1 = constante de velocidade para a reação entre ROO^\cdot e crocina; k_2 = constante de velocidade para a reação entre ROO^\cdot e o antioxidante; $[C]$ =concentração da crocina; $[A]$ =concentração do antioxidante (extratos aquosos e etanólicos).

A velocidade de clareamento da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (v) é obtido através da seguinte equação:

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c [C] + k_a [A]}{k_c [C]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[A]}{[C]}$$

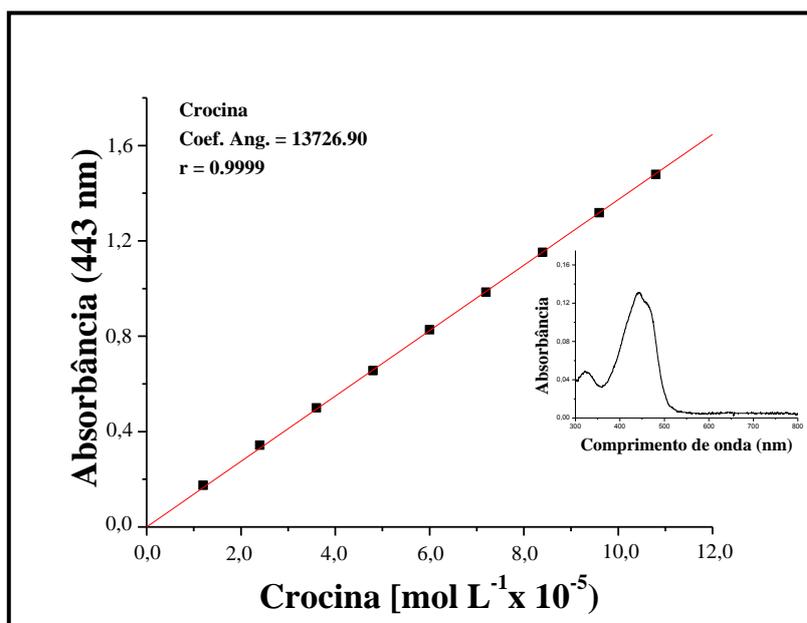
O valor de k_a/k_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico $v_0 / v \times [A] / [C]$ indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o radical peroxil.

Pela divisão do k_a/k_c dos extratos obtidos pelo k_a/k_c de um antioxidante padrão como o ácido gálico, obtemos a razão entre as constantes e os valores para a capacidade antioxidante relativa das amostras (extratos) analisadas, podendo, desta forma, expressar os resultados em equivalentes ao ácido gálico. Para a realização deste teste houve a necessidade de determinar o coeficiente de extinção molar da crocina em DMSO. Tubaro et al (1998) faz uso do coeficiente de extinção molar do solvente metanol dado na literatura para ajustar a concentração de uma solução de crocina, isolada a partir do *saffron* (*Crocus sativus L.*).

Para determinação do coeficiente de extinção molar foram preparadas três soluções estoque de crocina a $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ em DMSO, e a partir delas

foram feitas as diluições necessárias. A partir das médias obtidas das leituras de absorvância, fez-se a regressão linear destas, obtendo assim o valor do coeficiente de extinção molar, $\epsilon = 13.727 \text{ mol/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 443 nm (Figura 23).

Figura 23: Curva padrão da crocina. (O gráfico inserido representa o espectro de absorção da crocina em DMSO).



4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

A identificação de novas fontes de antioxidantes é de grande interesse para a saúde como um todo. Frutas do cerrado, como a araçá, são consumidas pela população local na forma de sorvetes, sucos, pois por ser uma fruta muito ácida limita seu consumo in natura.

No presente estudo dois solventes foram utilizados, água e etanol 80%, com objetivo de se avaliar a capacidade de antioxidante no caso de um suco de frutas (extrato aquoso) e a extração de compostos bioativos para a indústria farmacêutica ou de bebidas, por exemplo. Diferentes solventes, tais como metanol, etanol, acetona, propanol, acetato de etila e dimetilformamida, são comumente utilizados para a extração de compostos bioativos, pois é conhecido que a quantidade e a natureza dos fenóis são influenciada pelo solvente utilizado para o processo de extração. Portanto a polaridade do solvente tem uma implicação direta na composição do extrato, conseqüentemente na capacidade antioxidante do mesmo.

4.1 Avaliação do teor total de fenóis e de flavonóides.

O teor de fenóis determinado em triplicata, nos extratos das amostras de frutas está apresentado na figura 24. Verifica-se uma grande variação de teor de fenóis totais presentes nestes extratos. Das amostras analisadas o extrato etanólico do mangostão é o que apresenta uma maior quantidade de compostos fenólicos, frente às demais amostras, entretanto seu extrato etanólico não apresenta um teor alto. A fruta mangostão é uma fonte rica de ácidos fenólicos, antocianinas e taninos condensados, por isso é possível observarmos nesse estudo uma diferença considerável entre o extrato aquoso e o extrato etanólico (Naczki et al., 2011).

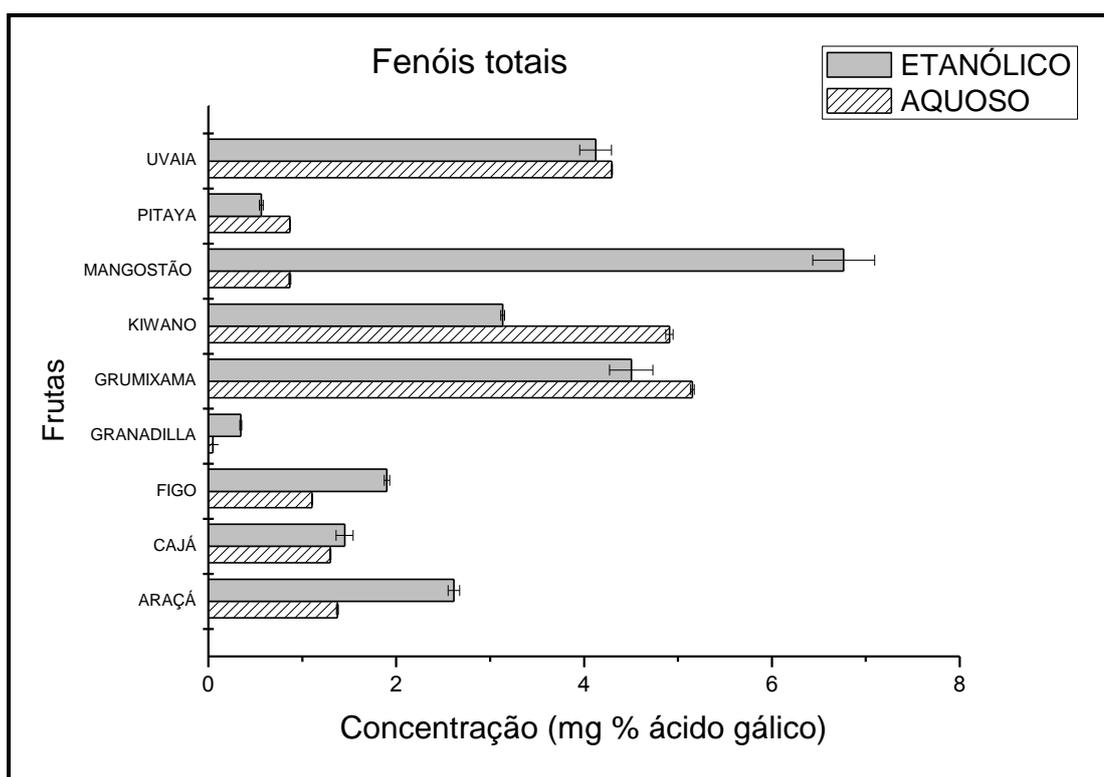
Para a amostra uvaia, de acordo com os valores apresentados na figura 24, seus extratos apresentam valores próximos. Das amostras estudadas a que apresentou um menor teor foi o extrato aquoso da granadilla.

Apesar dos resultados serem expressos em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples, para o teor de fenóis totais, essa

metodologia não apresenta uma seletividade para os diversos tipos de compostos fenólicos de fontes vegetais.

Os flavonóides são compostos fenólicos mais comumente encontrados em frutas, vegetais e grãos. Eles são responsáveis pela coloração de frutas, flores e algumas vezes de folhas. Quando não são vistos a olho nu, eles atuam como co-pigmentos, protegendo os tecidos, bem como metabólitos secundários, dos danos causados pela radiação ultravioleta (UV). A variação na estrutura dos flavonóides gera uma ampla diversidade de coloração de flores e frutas, que variam de acordo com seguintes fatores: número de grupos metoxila e hidroxila, número e tipos de açúcares ligados a estrutura e a presença de íons metálicos.

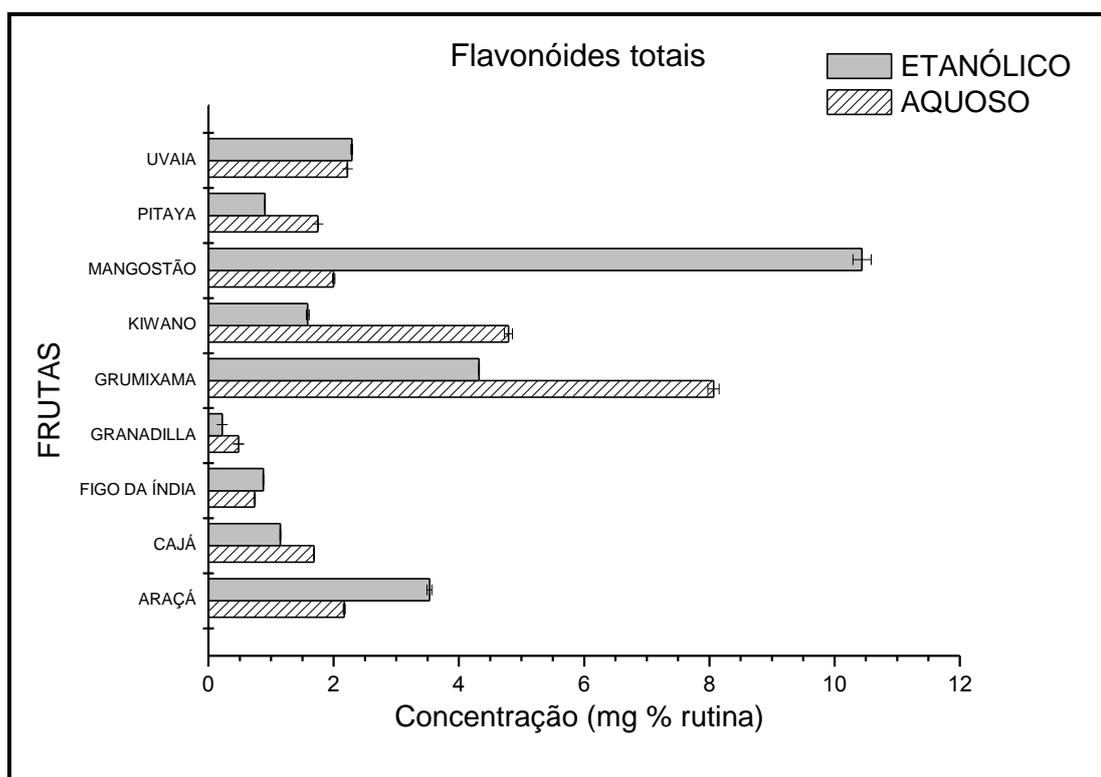
Figura 24: Variação da concentração de fenóis totais presentes nos extratos, aquosos e etanólicos, das amostras de frutas.



O teor de flavonóides totais presente nos extratos pode ser visto na figura 25. A faixa de flavonóides presentes variou 0,5 a 8 mg % RU/100 g para o extrato aquoso. Já para o extrato etanólico 0,5 a 11 mg % RU/100 g. Desta

forma, pode-se classificar as amostras analisadas em três categorias: baixa (<2 mg RU/100g), média (2-6 mg RU/100g) e alta (>6 mg RU/100g). De acordo com esta classificação, o extrato etanólico do mangostão apresenta um alto teor de flavonóides, bem como o extrato aquoso da grumixama. A granadilla apresenta um baixo teor de flavonóides tanto para o extrato aquoso quanto etanólico.

Figura 25: Variação da concentração de flavonóides totais presentes nos extratos, aquosos e etanólicos, das amostras de frutas.



4.2 Avaliação da atividade antioxidante.

Os testes *in vitro* da capacidade antioxidante, tornaram-se importantes instrumentos na procura por novas substâncias bioativas, assim como, na análise das já conhecidas. Existem diversos métodos sendo aplicados para esse tipo de análise, através dos vários mecanismos existentes. Entretanto, devido à complexidade em uma amostra de origem vegetal, por exemplo, como no caso das frutas, a possibilidade de interação entre os antioxidantes faz com que a utilização de um método de análise seja menos representativa, do que um conjunto de medidas. Uma vez que as metodologias para a determinação

da capacidade antioxidante são espécies-específicas e podem ser objetos de interferentes, por isso foi realizada várias técnicas de análise, para comparar a capacidade antioxidante das amostras. (Genovese, 2008).

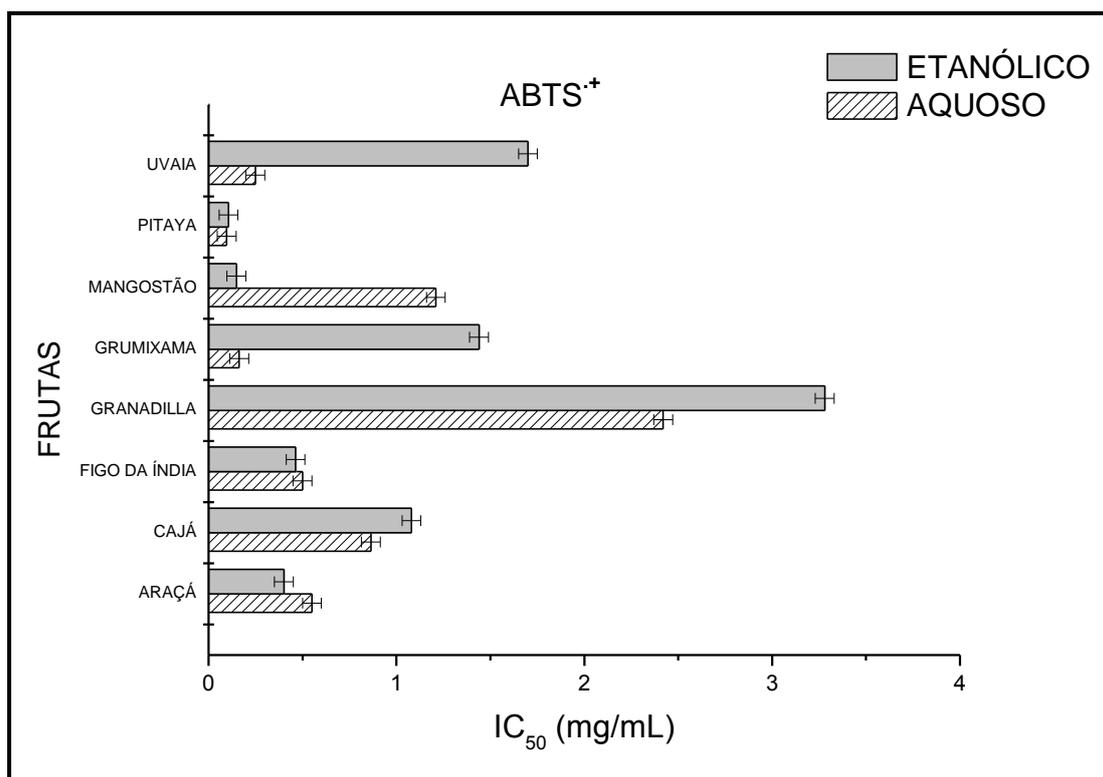
4.2.1 Ensaio de captura para o ABTS^{•+}

A figura 26 mostra os resultados para a capacidade de captura do radical ABTS^{•+} do extrato aquoso e etanólico das frutas. Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade do antioxidante capaz de seqüestrar metade dos radicais livres ABTS^{•+} presentes na solução. Esse índice denomina-se IC₅₀. Quanto menor o valor de IC₅₀ apresentado pelo extrato, menor quantidade do extrato será necessária para reduzir 50% do radical livre ABTS^{•+}. Todas as análises foram determinadas em triplicata.

O padrão ácido gálico apresentou um IC₅₀ de $8,2 \times 10^{-4}$ mg/mL. Para o extrato aquoso, as frutas que apresentaram menor IC₅₀ foram: pitaya < grumixama < uvaia < figo da Índia < araçá < cajá < mangostão < granadilla. Já para o extrato etanólico: pitaya < mangostão < araçá < figo da Índia < cajá < grumixama < uvaia < granadilla. Sendo que a posição da granadilla é mantida, menos eficiente quando comparada as demais amostras.

Percebe-se uma semelhança na amostra, pitaya, que apresentou melhor atividade antioxidante (menor IC₅₀) tanto para o extrato aquoso quanto para o etanólico. Entretanto os extratos da uvaia, grumixama e mangostão não apresentaram o mesmo resultado.

Figura 26: Capacidade antioxidante determinado pelo método ABTS^{•+}.



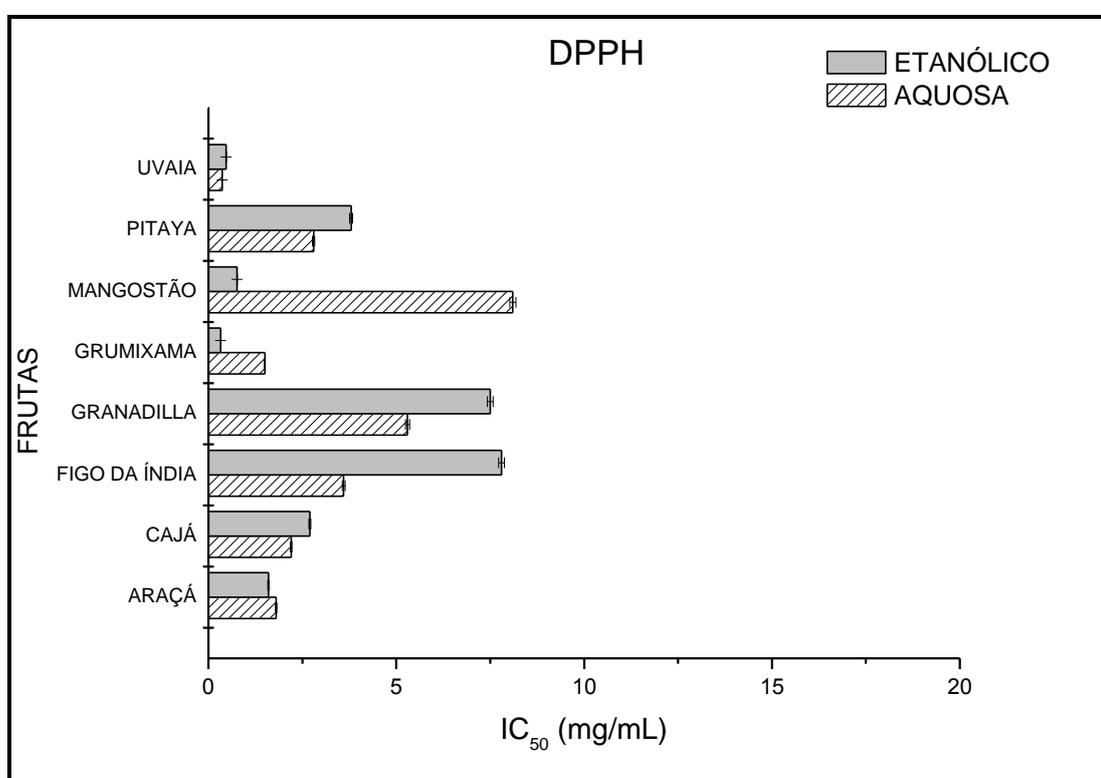
4.2.2 Ensaio de captura para o DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante por este método, realizada em triplicata, o radical livre DPPH reage com o antioxidante, convertendo-se a sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela; e o grau de descoloração, monitorado espectrofotometricamente, indica a habilidade em seqüestrar o radical livre. No presente estudo, avaliou-se a capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de polpa de frutas liofilizadas. Na figura 27 são apresentados os resultados obtidos, expressos em porcentagem de inibição (IC₅₀).

Para o extrato aquoso, as amostras que apresentaram menor IC₅₀ foram: uvaia < grumixama < araçá < cajá < pitaya < figo da índia < granadilla < mangostão. Para os extratos etanólicos: grumixama < uvaia < mangostão < araçá < cajá < pitaya < granadilla < figo da índia.

O padrão utilizado para o teste foi o ácido gálico, para tal este apresentou um IC_{50} de $7,57 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,3 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$). Dentre as amostras estudadas a que apresentou um menor valor de IC_{50} foi a uvaia para o extrato aquoso, já para o extrato etanólico foi a grumixama. Comparando ambas as amostras com o padrão, vemos que elas apresentam valores bem elevados, entretanto, considerando que o padrão é um composto isolado e as amostras constituem-se de uma mistura complexa, pode-se concluir que as amostras mencionadas acima possuem uma boa capacidade antioxidante.

Figura 27: Capacidade antioxidante determinado pelo método DPPH, porcentagem de inibição (IC_{50}).



4.2.3 Ensaio de captura para o HOCl/OCl⁻

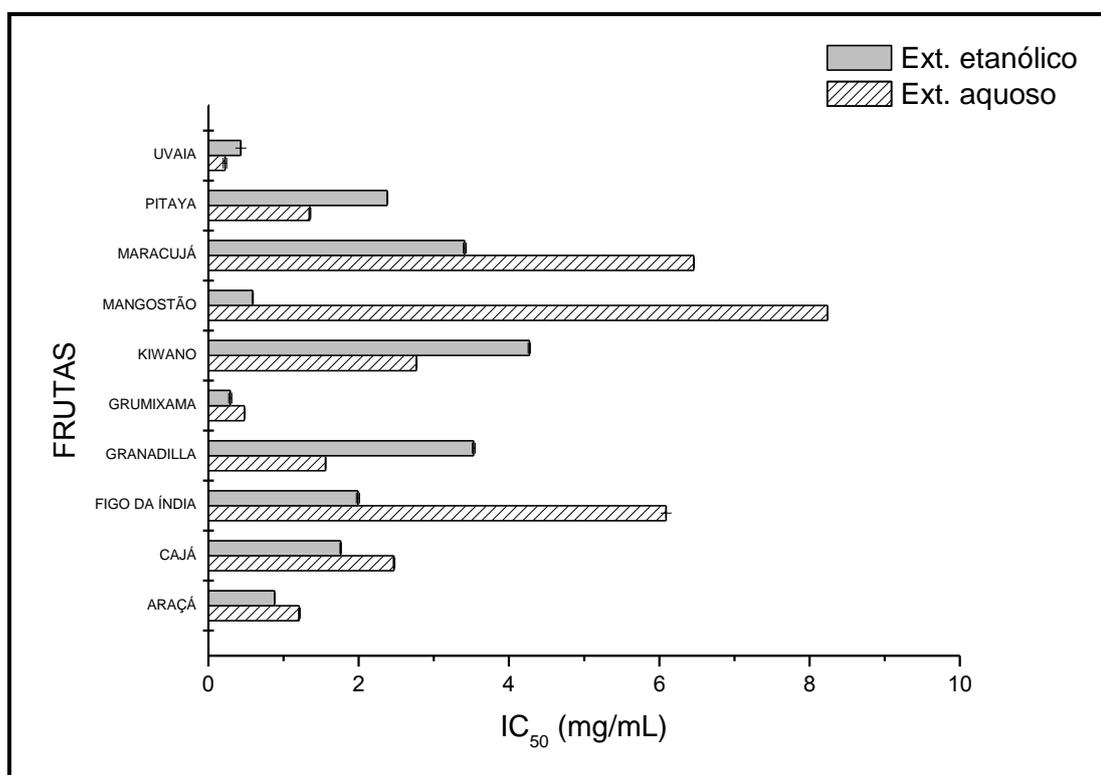
Os resultados da atividade antioxidante, pelo ensaio de captura para o HOCl, apresentados na figura 28, foram expressos em termos de IC_{50} .

O padrão utilizado para o teste foi o ácido gálico, para tal este apresentou um IC_{50} de $6,8 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$. Com relação ao extrato aquoso, a uvaia foi a que apresentou menor quantidade de extrato necessária para inibir

50% da atividade do ácido hipocloroso. Já com relação ao extrato etanólico a grumixama e a uvaia mostraram-se mais eficiente, ambas tiveram valores próximos de IC_{50} .

Analisando as amostras, em conjunto geral, a maioria dos extratos aquosos mostrou-se mais efetivo na captura de ácido hipocloroso do que os extratos etanólicos, com exceção do extrato etanólico da pitaya.

Figura 28: Valores de IC_{50} para o teste HOCl/OCl⁻



Para o extrato aquoso as amostras que apresentaram menor IC_{50} foram: uvaia < grumixama < araçá < pitaya < granadilla < cajá < kiwano < figo da índia < maracujá < mangostão. Para o extrato etanólico seguiu-se a seguinte ordem: grumixama < uvaia < mangostão < araçá < cajá < figo da índia < pitaya < maracujá < granadilla < kiwano. Vemos, com estes resultados que as frutas grumixama e uvaia são bastante efetivas, tanto no extrato aquoso quanto no etanólico para este tipo de radical.

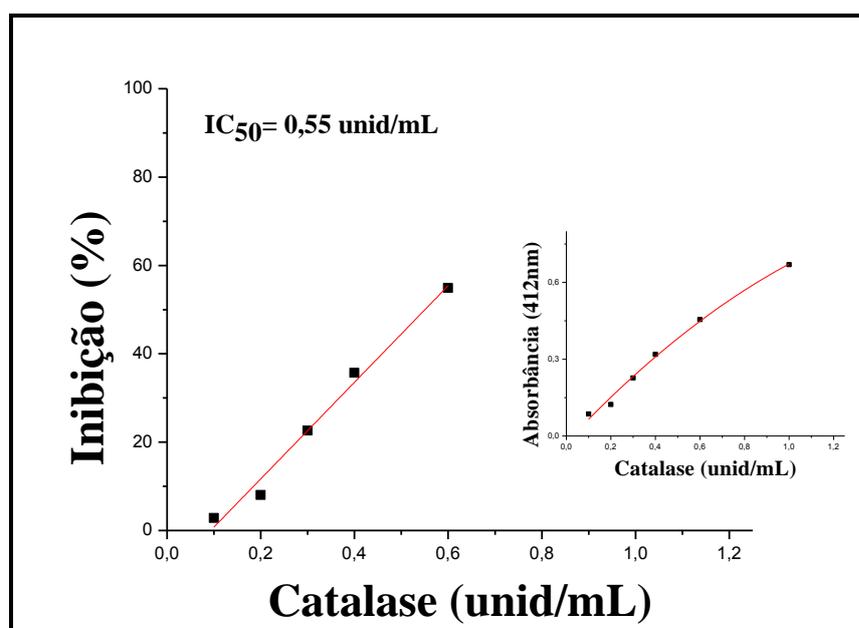
4.2.4 Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Neste ensaio, das amostras analisadas, nenhuma promoveu inibição, isto é, capturou o peróxido de hidrogênio, inclusive o padrão ácido gálico. As concentrações utilizadas foram as mesmas para o restante dos ensaios.

Tendo em vista o efeito negativo do sequestro do H₂O₂ pelas amostras, houve a necessidade de utilizar a catalase para validar o ensaio, uma vez que é reconhecido a eficiência e especificidade da mesma na catálise da conversão do H₂O₂ em água e oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

A concentração da catalase está expressa em unidades/mg de sólidos, a partir da qual preparou-se uma solução com concentração de 20 unidades/mL para realização do ensaio. A fim de comparação e assumindo que a massa de sólidos pesada estivesse pura, ou seja, só catalase, e ainda considerando sua massa molecular de 240.000 Da (BUDAVARI *et al.*, 2006), pode-se converter o valor obtido do IC₅₀ de 0,55 unid/mL para 18,6 µg/mL ou 77,5 nmol L⁻¹ (Figura 29).

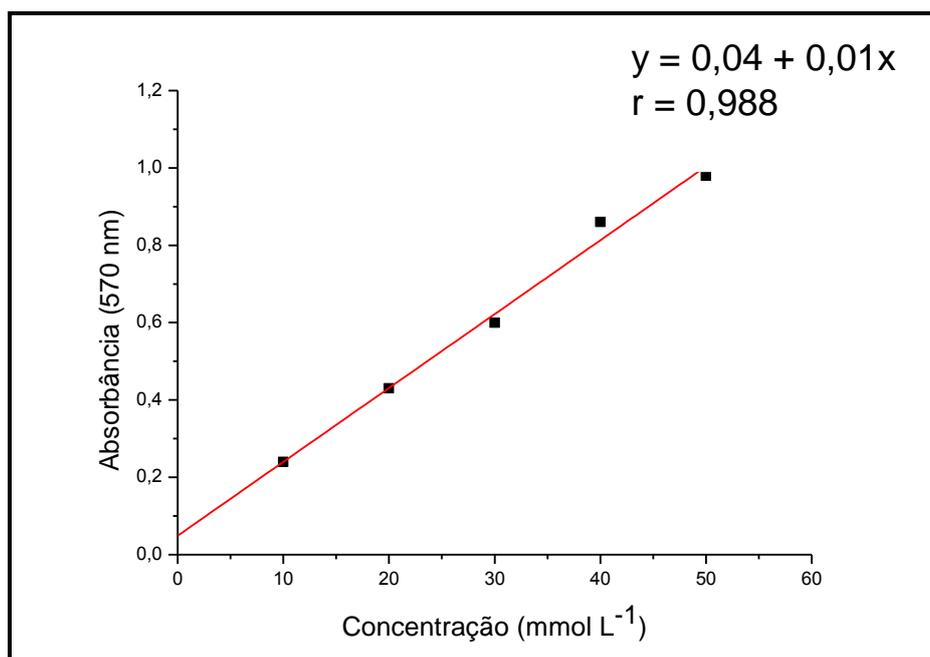
Figura 29: Capacidade de captura do H₂O₂ (IC₅₀) pela catalase. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TNB na presença de diferentes concentrações da catalase.



4.2.5 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO[•])

No ensaio da ação das amostras estudadas sobre o óxido nítrico foi determinado, a partir da curva analítica do nitrito de sódio figura 30, o nível de NO[•] liberado na hidrólise do nitroprussiato de sódio em função da oxidação do reagente de Griess. A concentração de NO[•] avaliado foi de 46 mmol L⁻¹.

Figura 30: Oxidação do Regente de Griess em função da concentração de nitrito de sódio.



Os dados obtidos para as amostras das frutas, Figo da Índia, Uvaia, Kiwano e Granadilla não apresentaram uma ação sequestradora do NO[•], pois mesmo em concentrações elevadas não houve inibição. Para as demais frutas, a porcentagem de inibição não foi elevada, não atingindo o IC₅₀, tabela 4. Aumentando a concentração das frutas no teste, essas apresentavam interferência no teste, impossibilitando a realização do mesmo.

Comparando com as demais amostras, o extrato etanólico e o extrato aquoso da fruta grumixama foram os que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes frente ao radical óxido nítrico.

Tabela 4: Capacidade de captura do NO^{\bullet} , expressa como a porcentagem de inibição (%).

Amostra	Porcentagem de inibição (%)	
	Aquoso	Etanólico
ARAÇÁ	10	11
CAJÁ	19	7
FIGO DA ÍNDIA	<i>**Nihil</i>	<i>**Nihil</i>
GRANADILLA	<i>**Nihil</i>	<i>**Nihil</i>
GRUMIXAMA	30	32
KIWANO	<i>**Nihil</i>	<i>**Nihil</i>
MANGOSTÃO	8	27
MARACUJÁ	10	10
PITAYA	17	16
UVAIA	<i>**Nihil</i>	<i>**Nihil</i>

***Nihil*, sem efeito (nas concentrações utilizadas).

O padrão utilizado nos testes, o ácido gálico, apresentou um IC_{50} de $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As baixas porcentagens de inibição atingidas podem ser justificadas pelo fato do óxido nítrico ser um radical de grande instabilidade, dificultando dessa forma a captura do mesmo.

4.2.6 Ensaio de captura do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

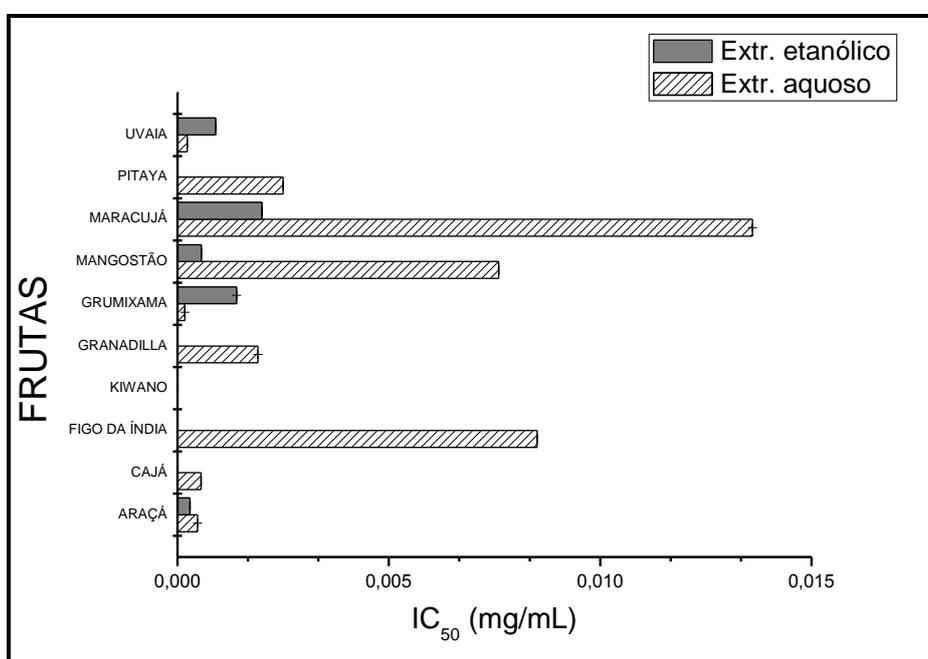
Os resultados da atividade antioxidante, pelo ensaio de captura para o $\text{O}_2^{\bullet-}$, apresentados na figura 31, foram expressos em termos de IC_{50} . O padrão utilizado para o teste foi o ácido gálico, para tal este apresentou um IC_{50} de $5,7 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$.

Nesse teste, as amostras de frutas Granadilla (extrato aquoso), Kiwano (extrato aquoso e extrato etanólico), Figo da Índia (extrato etanólico) e Cajá (extrato etanólico) não apresentaram uma ação sequestradora do ânion superóxido. Quando testadas em altas concentrações, essas amostras apresentavam interferentes no teste, impedindo a realização do mesmo.

O extrato aquoso da amostra grumixama é destaque entre as demais, porque apresentou uma maior eficiência frente, isto é, menor IC_{50} . Para as demais amostras de frutas do extrato aquoso, as que apresentaram menor IC_{50} foram: grumixama < uvaia < araçá < cajá < granadilla < pitaya < mangostão < figo da índia < maracujá.

Para os extratos etanólicos das amostras de frutas, as que apresentaram menor IC_{50} foram: araçá < mangostão < uvaia < grumixama < maracujá.

Figura 31: Valores de IC_{50} para o teste $O_2^{\cdot-}$



4.2.7 Ensaio do Clareamento (Bleaching) da Crocina(CBA).

4.2.7.1 Ácido gálico e derivados

O ensaio de clareamento da crocina é um instrumento sensível para análise de misturas complexas, como o plasma sanguíneo, vinhos e alimentos. Campanella et al (2004), comparou este ensaio a demais ensaios, mas difundidos, de atividade antioxidante total e encontrou boa correlação entre eles.

Estudos recentes vêm utilizando o ensaio para estudo de estrutura-atividade de flavonóides, compostos fenólicos e derivados (Ordouni et al, 2011). No presente trabalho, analisou o ácido gálico e uma série de nove derivados com a finalidade de verificar a eficácia do teste primeiramente para compostos sintéticos, partindo posteriormente para a análise de frutas, uma vez que o ácido gálico é o padrão escolhido. Os resultados para o teste de clareamento da crocina podem ser visualizados abaixo nas figuras de 32 a 41. Comparando os resultados, valores de inclinação, podemos ver que a ordem de eficiência, maior capacidade antioxidante, encontrada para este método foi: galato de n-butila > galato de metila > triacetato de ácido gálico > galato de n-propila > galato de n-pentila > galato de etila > galato de isopropila > galato de hexila > ácido gálico > galato de isobutila.

Estes resultados indicam que a substituição de um hidrogênio por uma metila causa um aumento na capacidade antioxidante. Já quando temos uma substituição por uma isobutila, a capacidade sofre um decréscimo, voltando a aumentar somente para o substituinte n-butila. O derivado galato de hexila apresenta um declínio no valor da capacidade comparativamente ao galato de metila, indicando que quando o substituinte tem uma cadeia longa a capacidade dele é menor, apresentando valores próximos do ácido gálico. O galato de isobutila foi o que apresentou a menor capacidade, esses resultados sugerem que o impedimento estérico também tem um papel importante na atuação da molécula.

Figura 32: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG. V_0 , velocidade na ausência do AG; v , velocidade na presença do AG; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do AG ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

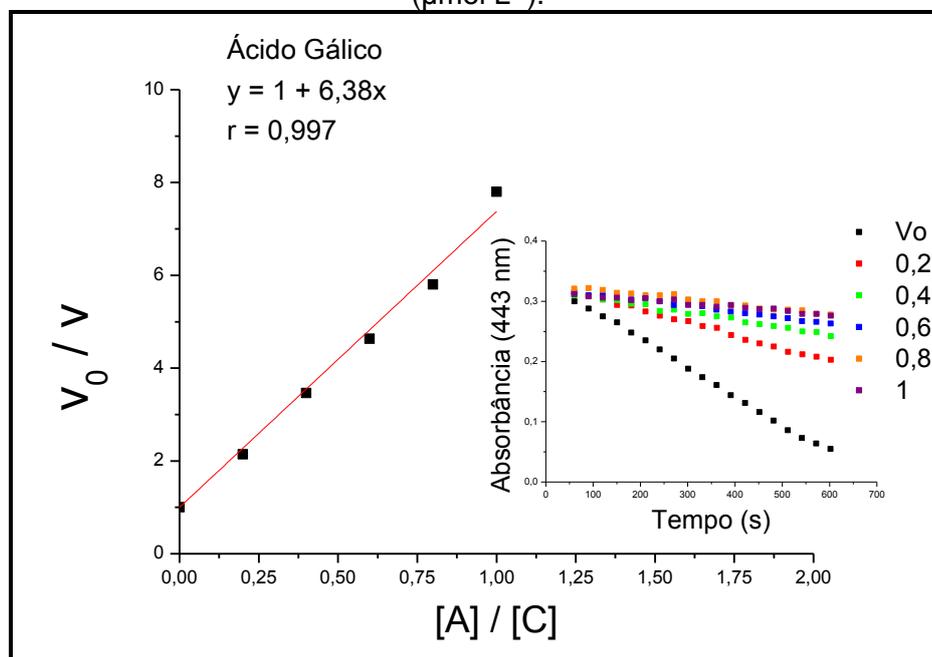


Figura 33: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GM. V_0 , velocidade na ausência do GM; v , velocidade na presença do GM; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GM. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GM ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

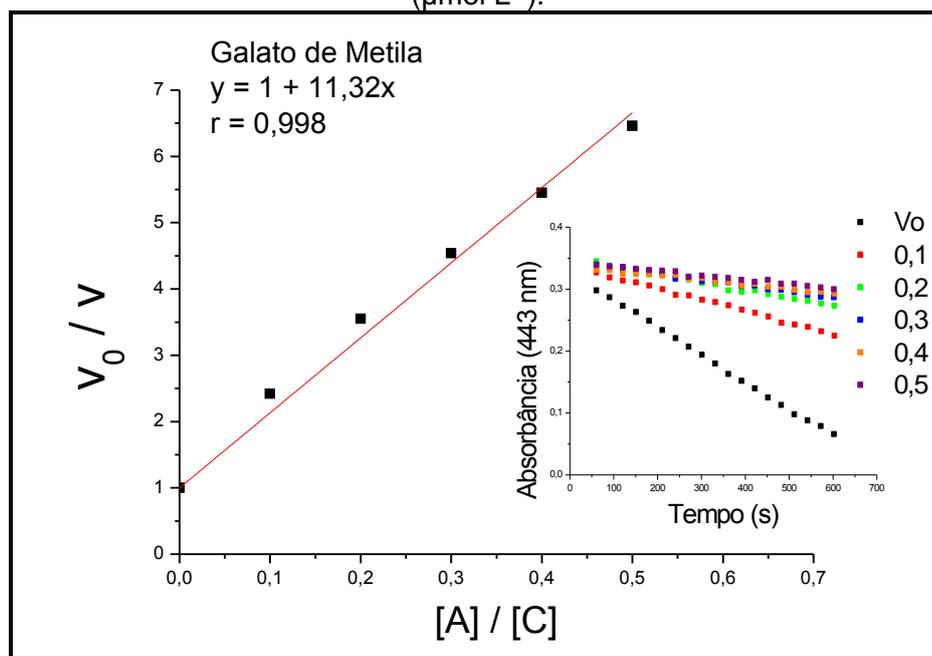


Figura 34: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GE. V_0 , velocidade na ausência do GE; v , velocidade na presença do GE; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GE. O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GE ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

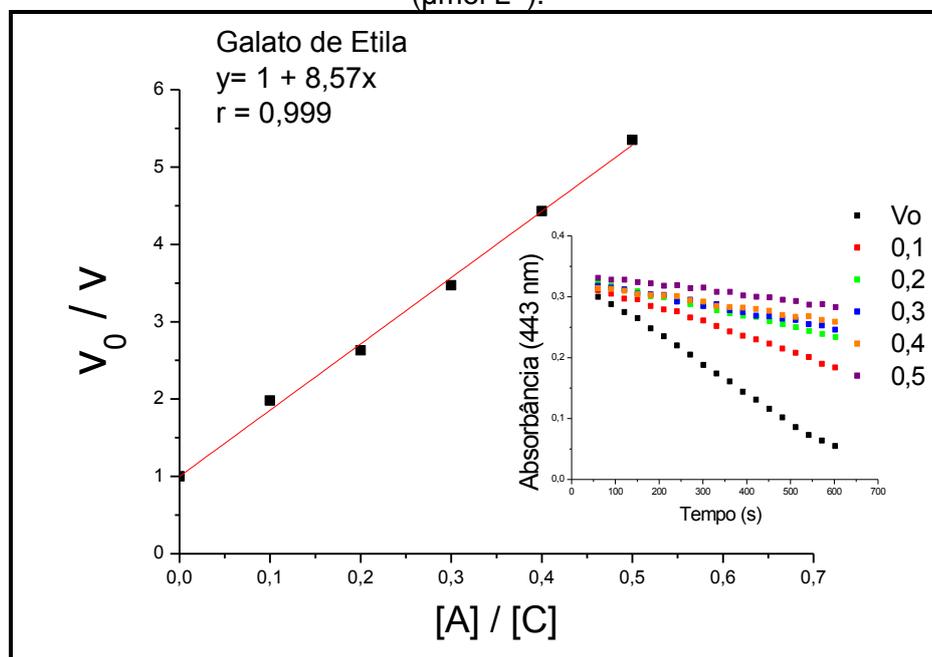


Figura 35: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GPR. V_0 , velocidade na ausência do GPR; v , velocidade na presença do GPR; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GPR. O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GPR ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

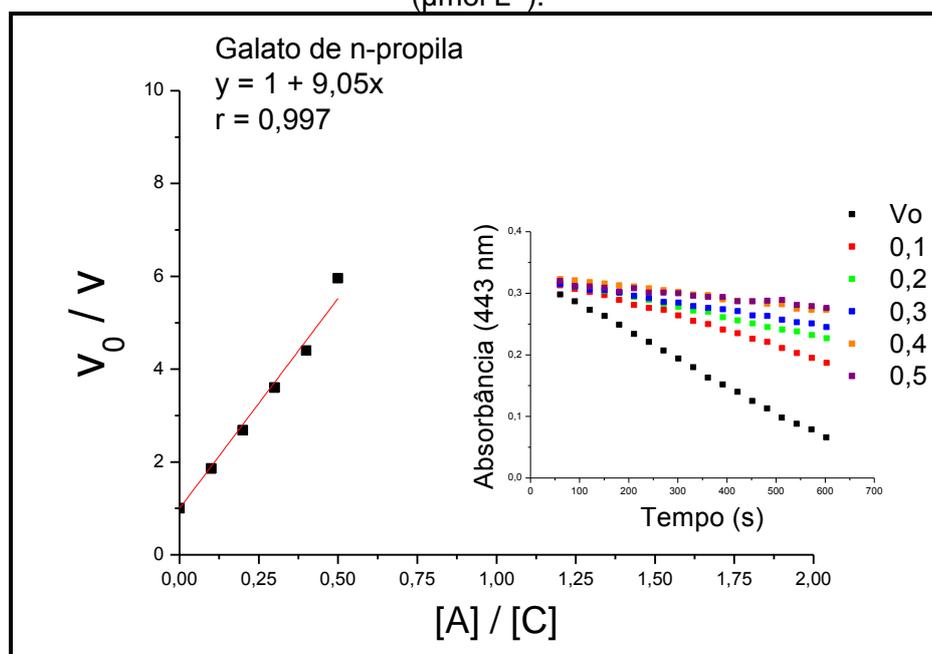


Figura 36: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GB. V_0 , velocidade na ausência do GB; v , velocidade na presença do GB; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GB. O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GB ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

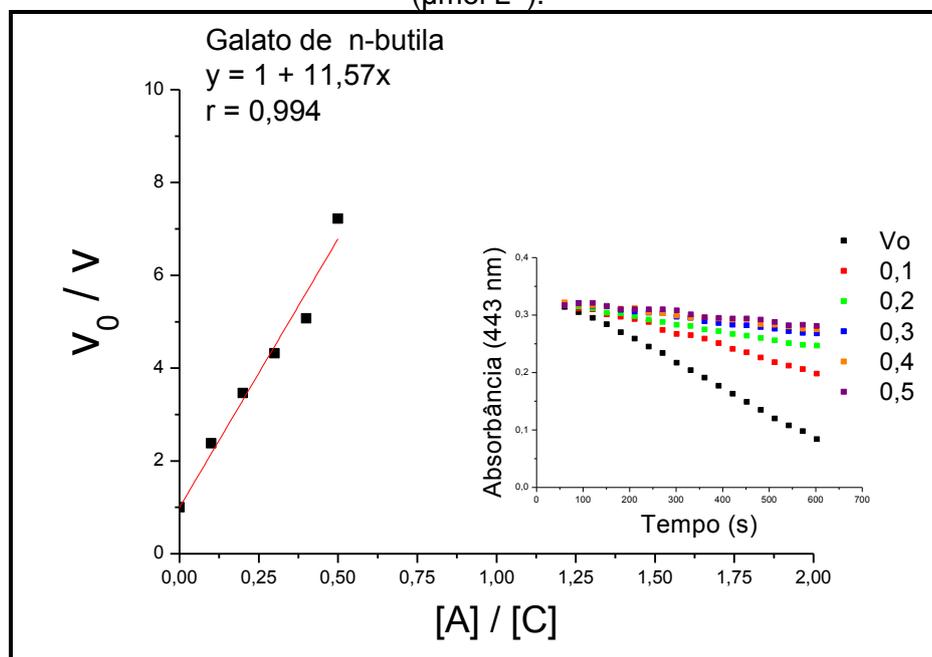


Figura 37: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GPE. V_0 , velocidade na ausência do GPE; v , velocidade na presença do GPE; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GPE. O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GPE ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

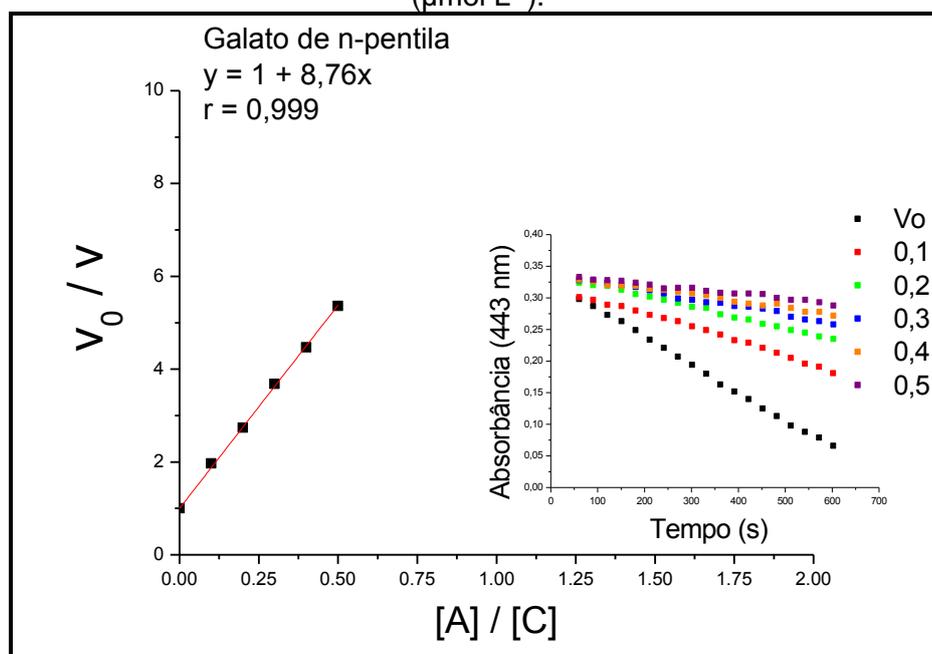


Figura 38: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GH. V_o , velocidade na ausência do GH; v , velocidade na presença do GH; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GH. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_o) e na presença (v) do GH ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

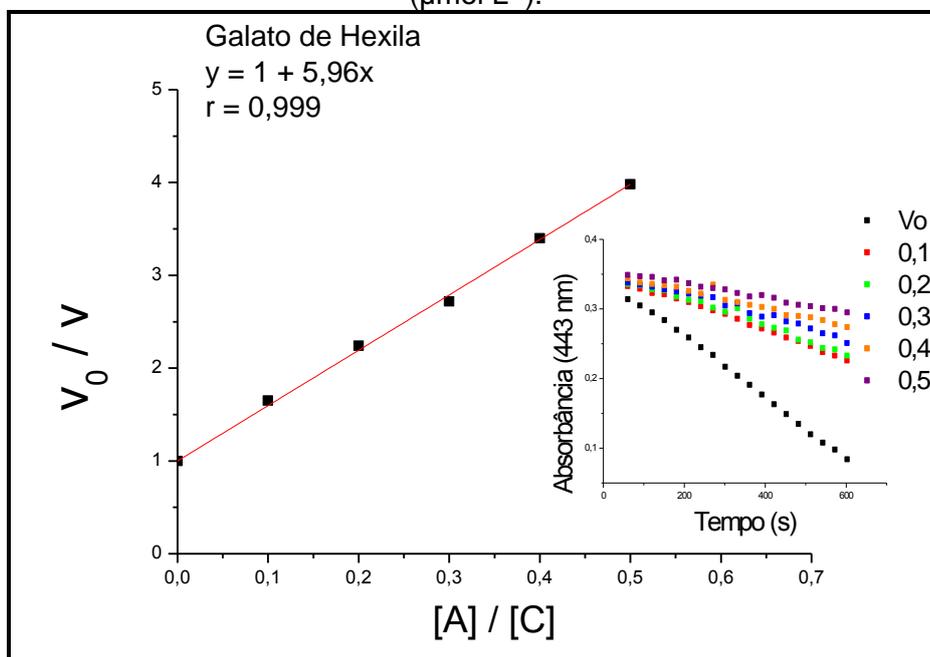


Figura 39: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GIP. V_o , velocidade na ausência do GIP; v , velocidade na presença do GIP; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GIP. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_o) e na presença (v) do GIP ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

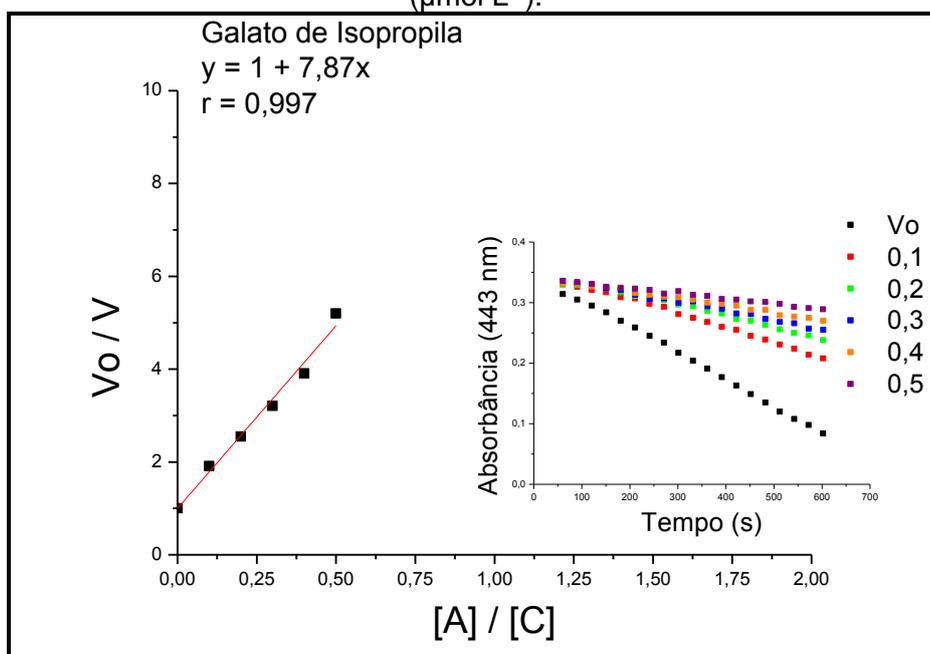


Figura 40: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com GIB. V_0 , velocidade na ausência do GIB; v , velocidade na presença do GIB; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do GIB. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do GIB ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

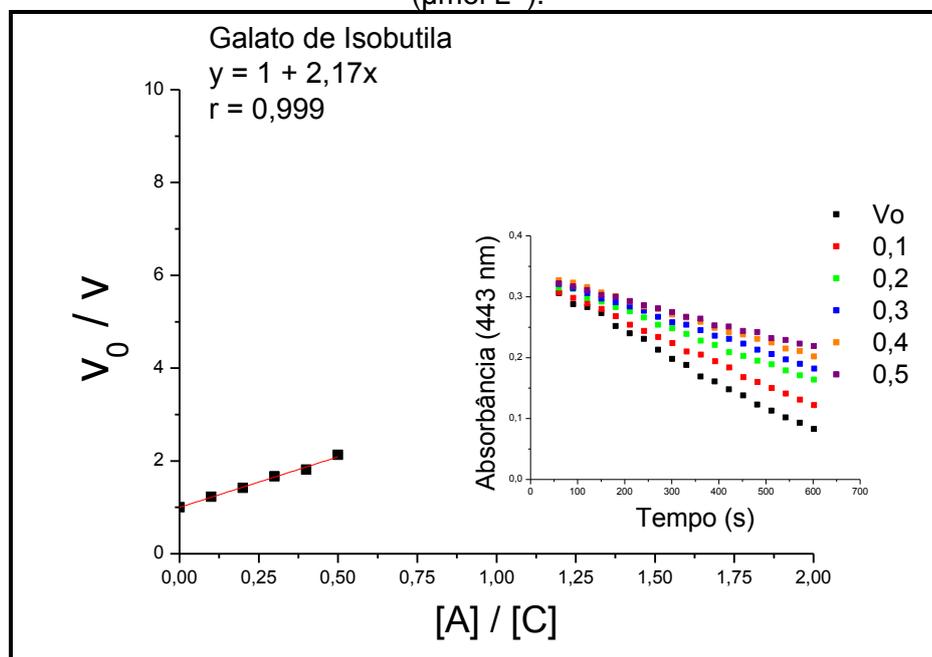


Figura 41: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com TAG. V_0 , velocidade na ausência do TAG; v , velocidade na presença do TAG; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do TAG. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e na presença (v) do TAG ($\mu\text{mol/l}$).

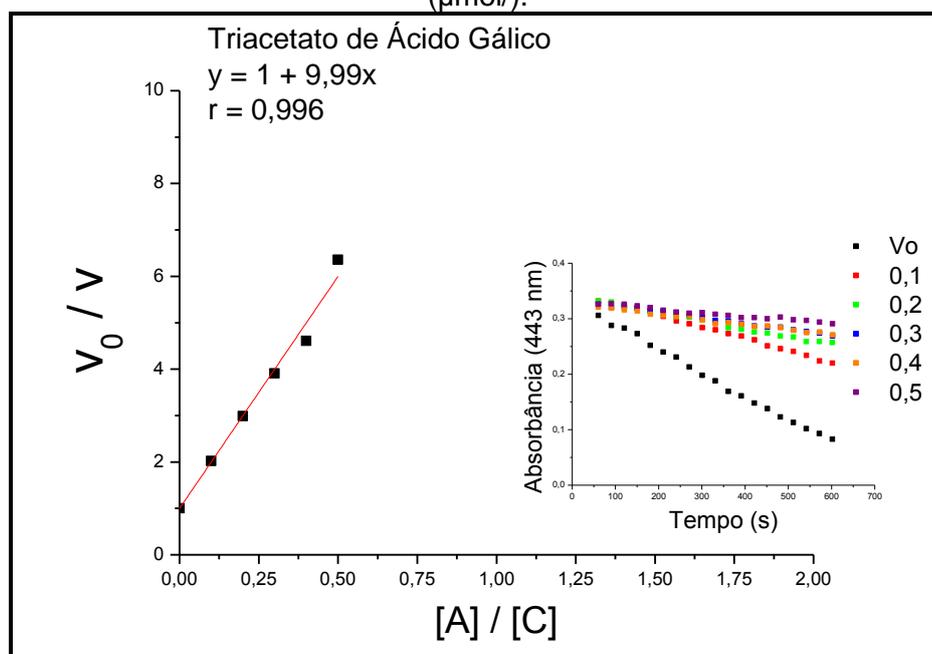


Tabela 5: Equação de competição cinética do ácido gálico e derivados*.

Amostra	Equação da competição cinética	r
AG	$y = 1 + 6,38x$	0,997
GM	$y = 1 + 11,32x$	0,998
GE	$y = 1 + 8,57x$	0,999
GPR	$y = 1 + 9,05x$	0,997
GB	$y = 1 + 11,57x$	0,992
GPE	$y = 1 + 8,76x$	0,999
GH	$y = 1 + 5,96x$	0,999
GIP	$y = 1 + 7,87x$	0,997
GIB	$y = 1 + 2,17x$	0,997
TAG	$y = 1 + 9,99x$	0,996

* A análise foi realizada segundo descrito no item de materiais e métodos, onde $y = v_0 / v$; $x = [A] / [C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante da amostra (k_a / k_c).

A partir dos dados mencionados na tabela 5 podemos calcular o valor de ácido gálico equivalente de cada derivado, tabela 6.

Tabela 6: Comparação entre as capacidades antioxidantes em equivalente de ácido gálico.

Antioxidante	Equivalentes de Ácido Gálico*
GA	1,00
GB / GA	1,81
GM / GA	1,77
TAG / GA	1,57
GPR / GA	1,42
GPE / GA	1,37
GIP / GA	1,23
GH / GA	0,93
GE / GA	0,74
GIB / GA	0,34

* Equivalente ácido gálico foi calculado pela divisão do k_a/k_c do antioxidante, mostrado na tabela 5, pelo k_a/k_c do ácido gálico.

Outra forma de analisar o ensaio da crocina é pelo valor porcentagem de inibição do clareamento da crocina (%In), introduzido por Lussignoli et al, 1999, o qual podemos achar o valor de IC_{50} . Os valores de IC_{50} encontrado para ácido gálico e seus derivados seguem a mesma ordem de eficiência dos valores encontrados para a inclinação da competição, tabela 7, isto é, para o IC_{50} quanto menor o valor significa que o composto é mais eficiente e para a

inclinação da regressão linear, quanto mais alto este valor, maior a eficiência. Tal constatação demonstra a sensibilidade desta metodologia para mostrar que diferenças na estrutura do antioxidante implicam na sua eficiência neste sistema complexos.

Tabela 7: Comparação entre os valores da inclinação da regressão linear e IC₅₀.

Amostra	Inclinação da regressão linear*	IC₅₀ (μmol L⁻¹)**
GB	11,57	0,30
GM	11,32	0,38
TAG	9,99	1,98
GPR	9,05	3,01
GPE	8,76	3,50
GE	8,57	3,75
GIP	7,87	3,81
AG	6,38	4,07
GH	5,96	4,86
GIB	2,17	12,50

* Valores da inclinação da regressão linear, em ordem decrescente de eficiência. ** Valores de IC₅₀, em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação: %In = (1 - (Δv / Δv₀)) x 100.

4.2.7.2 Frutas (extratos)

A capacidade de inibir o clareamento da crocina foi analisada para os extratos aquosos e etanólicos das frutas. Nas figuras, de 42 a 49, podemos visualizar gráficos comparativos de inclinação entre os extratos das frutas e o ácido gálico. Comparativamente ao ácido gálico, as frutas apresentam uma inclinação inferior. Entretanto frutas são misturas complexas, que embora tenham uma grande quantidade de compostos bioativos capazes de inibir o clareamento da crocina, as mesmas em virtude de sua complexidade tem a disponibilidade comprometida, ao contrário do ácido gálico que é um composto isolado. Por isso o mesmo apresenta uma capacidade maior que as frutas.

Fazendo uma análise entre os extratos, aquoso e etanólico, vemos que para a maioria deles, o extrato etanólico mostrou-se mais eficiente do que o

aquoso, com exceção para a pitaya e a uvaia. Em alguns casos a diferença entre os extratos não foi tão expressiva.

Figura 42: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Araçá (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Araçá; v , velocidade na presença do AG ou Araçá; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Araçá.

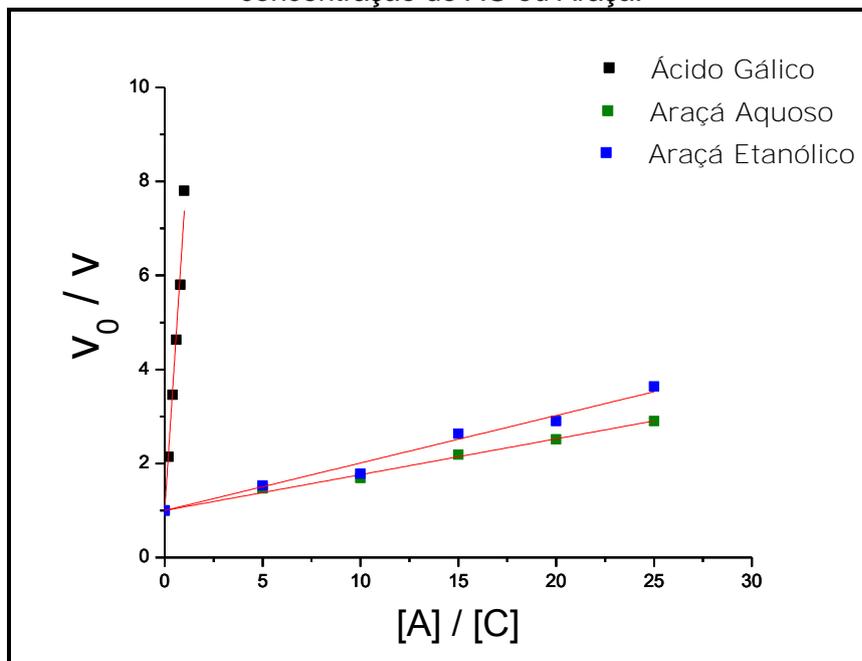


Figura 43: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Cajá (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Cajá; v , velocidade na presença do AG ou Cajá; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Cajá.

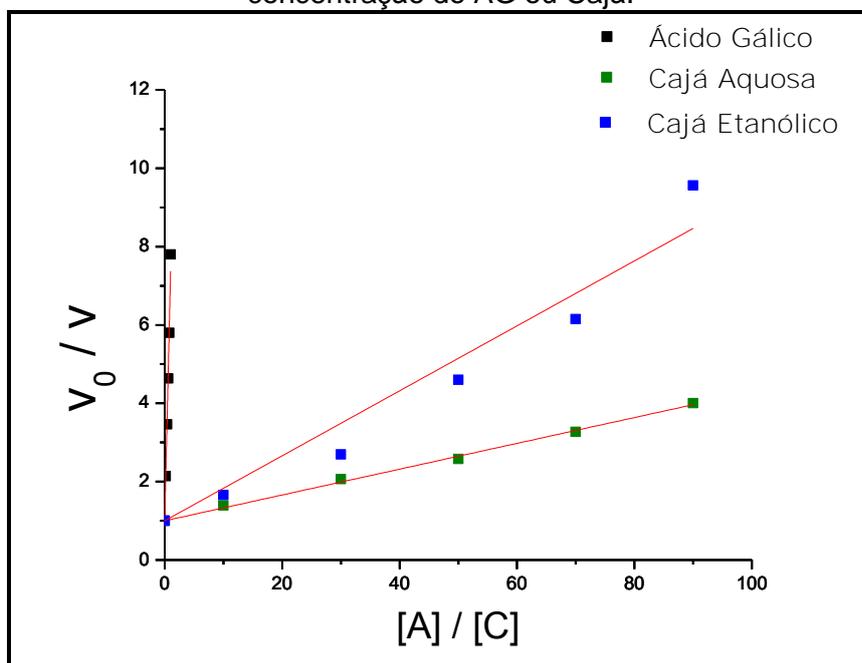


Figura 44: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Figo da Índia (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Figo da Índia; v , velocidade na presença do AG ou Figo da Índia; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Figo da Índia.

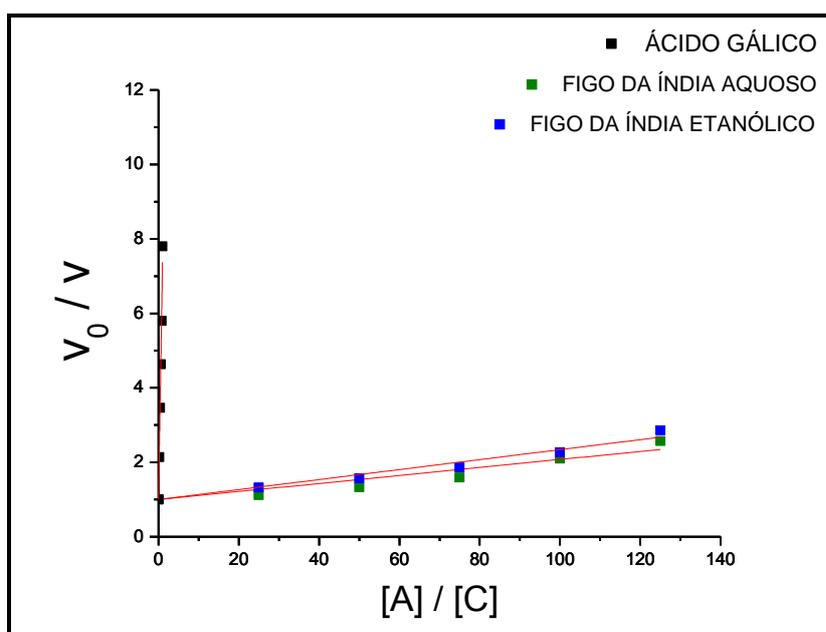


Figura 45: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Grumixama (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Grumixama; v , velocidade na presença do AG ou Grumixama; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Grumixama.

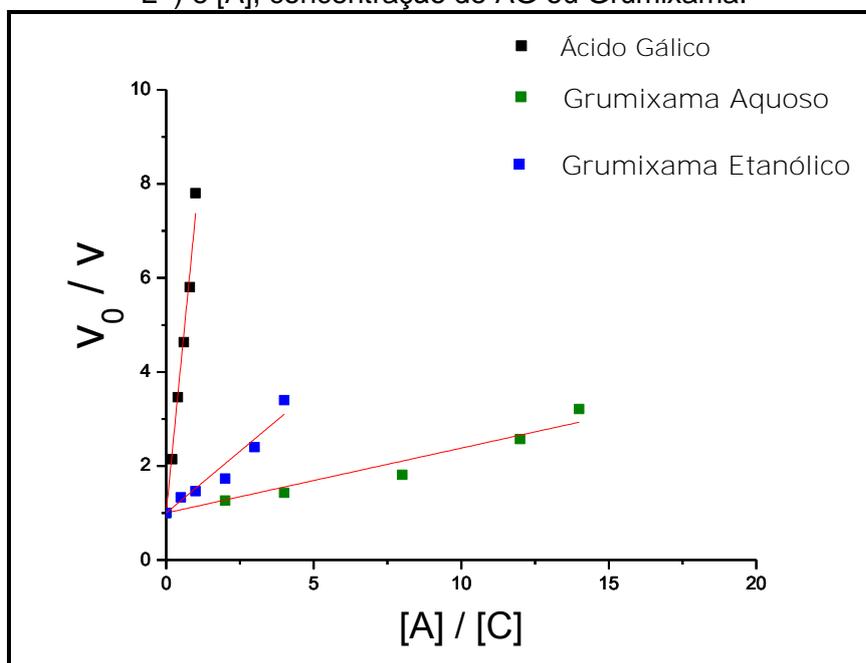


Figura 46: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Mangostão (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Mangostão; v , velocidade na presença do AG ou Mangostão; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Mangostão.

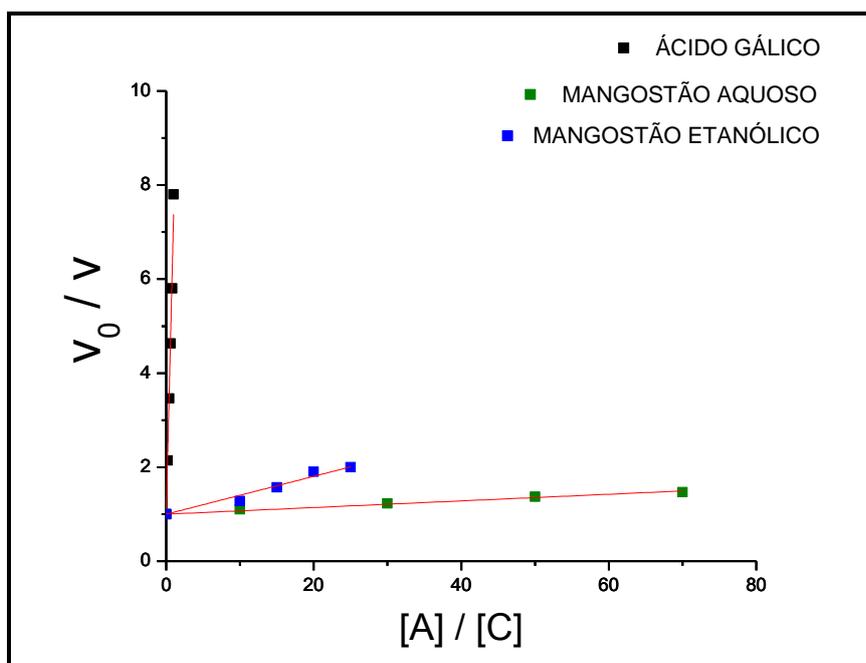


Figura 47: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Maracujá (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Maracujá; v , velocidade na presença do AG ou Maracujá; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Maracujá.

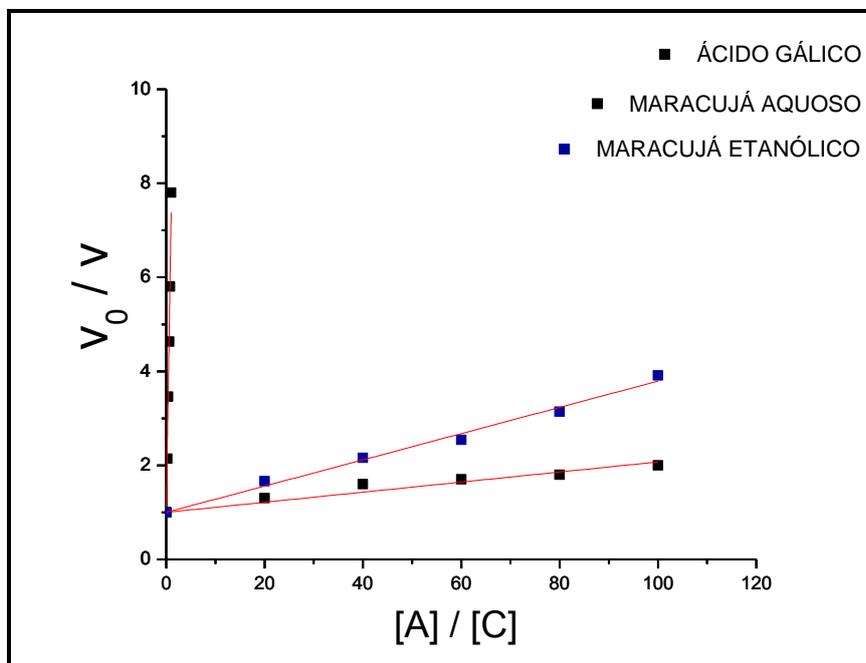


Figura 48: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Pitaya (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Pitaya; v , velocidade na presença do AG ou Pitaya; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Pitaya.

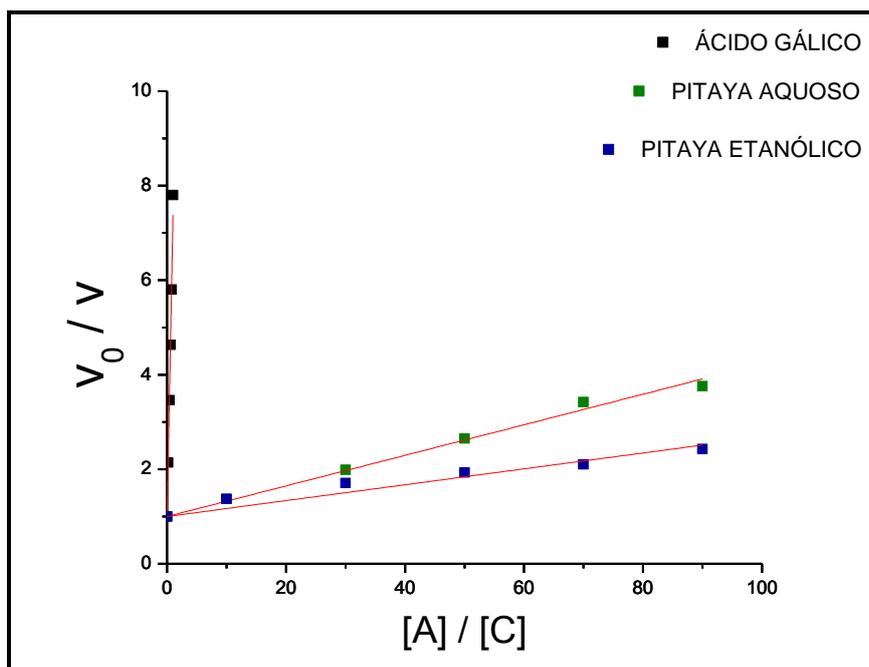
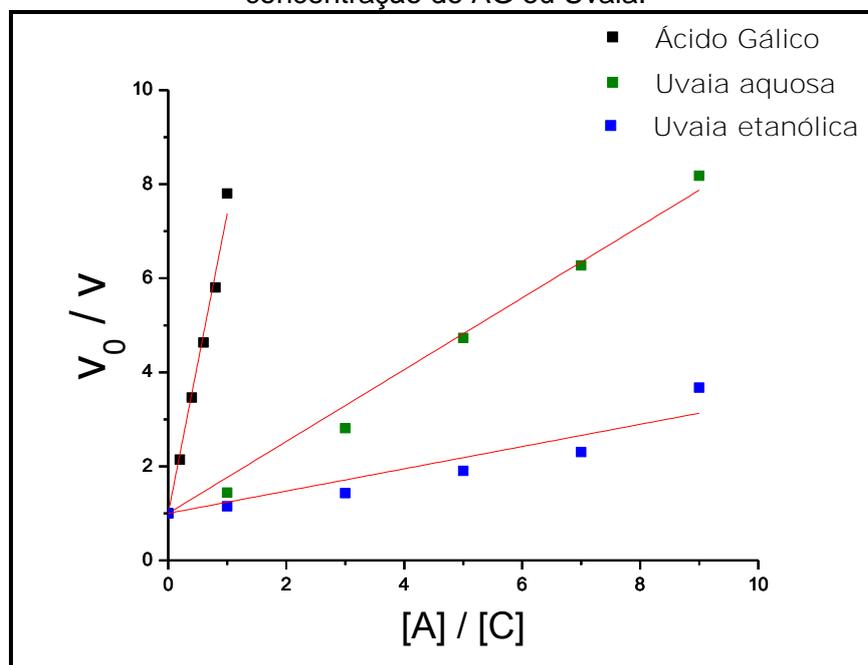


Figura 49: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AG e extrato de Uvaia (aquoso e etanólico). v_0 , velocidade na ausência do AG ou Uvaia; v , velocidade na presença do AG ou Uvaia; $[C]$, concentração da crocina constante ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[A]$, concentração do AG ou Uvaia.



A tabela 8 mostra as respectivas equações de competição cinética, nela podemos ver os valores da inclinação de cada extrato. Observando os valores, vemos que as maiores inclinações são dadas pelas frutas uvaia e grumixama, respectivamente. O mesmo observa para o teor de fenóis totais, onde as mesmas frutas também apresentaram os maiores valores, demonstrando desta forma uma correlação entre o teor de fenóis e a capacidade de inibir o clareamento da crocina. Tubaro et al (1999), analisando amostras de vinhos (vermelho e branco) também encontrou uma boa correlação entre a dosagem de fenóis totais presentes nos vinhos e a atividade sob o ensaio da crocina.

Tabela 8: Equação de competição cinética dos extratos, aquosos e etanólicos, das frutas*.

FRUTAS	EXTRATO*	
	AQUOSO	ETANÓLICO
ARAÇÁ	$y = 1 + 0,080x$	$y = 1 + 0,101x$
CAJÁ	$y = 1 + 0,033x$	$y = 1 + 0,083x$
FIGO DA ÍNDIA	$y = 1 + 0,011x$	$y = 1 + 0,013x$
GRANADILLA	$y = 1 + 0,025x$	$y = 1 + 0,027x$
GRUMIXAMA	$y = 1 + 0,140x$	$y = 1 + 0,520x$
MANGOSTÃO	$y = 1 + 0,007x$	$y = 1 + 0,040x$
MARACUJÁ	$y = 1 + 0,011x$	$y = 1 + 0,027x$
PITAYA	$y = 1 + 0,032x$	$y = 1 + 0,017x$
UVAIA	$y = 1 + 0,760x$	$y = 1 + 0,240x$

* A análise foi realizada segundo descrito no item de materiais e métodos, onde $y = v_0 / v$; $x = [A] / [C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante da amostra (k_a / k_c).

A partir dos dados mencionados na tabela 8 podemos estimar a capacidade antioxidante dos extratos em ácido gálico equivalente, tabela 9.

Tabela 9: Comparação entre as capacidades antioxidantes das frutas em equivalente de ácido gálico*.

Antioxidante	Equivalentes de Ácido Gálico*	
	Aquoso	Etanólico
ÁCIDO GÁLICO	1	
ARAÇÁ	0,013	0,016
CAJÁ	0,005	0,013
FIGO DA ÍNDIA	0,002	0,002
GRANADILLA	0,004	0,004
GRUMIXAMA	0,020	0,080
MANGOSTÃO	0,001	0,006
MARACUJÁ	0,002	0,004
PITAYA	0,005	0,003
UVAIA	0,120	0,040

* Equivalente ácido gálico foi calculado pela divisão do k_a/k_c do antioxidante, mostrado na tabela 5, pelo k_a/k_c do ácido gálico.

Os dados, tabela 9, mostram que os valores de capacidade de inibição (equivalente ao ácido gálico) do clareamento da crocina encontrados para o extrato aquoso e etanólico das amostras de frutas se aproximam entre si. Entretanto, em termos de valores, para grumixama o mesmo não é observado,

observa uma diferença entre o extrato aquoso e o extrato etanólico, sendo o último o que apresentou um maior valor.

O mesmo acontece com a amostra uvaia, sendo que para essa o extrato aquoso foi o que apresentou um valor mais elevado.

5. CONCLUSÃO

Os níveis de fenóis e flavonóides presentes nas amostras demonstra haver a uma relação entre a atividade antioxidante e a quantidade destes compostos presentes nas amostras. A mesma dosagem permitiu a afirmação que o teor de compostos bioativos varia de amostra para amostra e que o solvente extrator utilizado influencia na quantidade encontrada.

Encontrou-se uma correlação entre o teor de fenóis e atividade antioxidante, pelo método DPPH e o ensaio de clareamento da crocina, bem como para o ensaio de captura do HOCL. Dentre as frutas analisadas muitas apresentaram bons resultados de capacidade antioxidante, entretanto duas frutas, a grumixama e a uvaia, merecem atenção especial para análises futuras, pois as mesmas se destacaram.

O trabalho realizado com o ácido gálico e seus derivados, bem como com os extratos de frutas, permitiu uma avaliação da potencialidade antioxidante de acordo com o substituinte presente na molécula. Este estudo da relação estrutura-atividade, utilizando o ensaio de clareamento da crocina mostrou-se satisfatório para tal, confirmando desta forma a importância da presença de determinados grupos presentes na molécula do ácido gálico. Os valores de inclinação da regressão linear e de IC_{50} para este ensaio tiveram a mesma ordem.

Considerando estudos in vitro, as amostras estudadas tiveram uma boa resposta para a capacidade antioxidante frente às diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Dando destaque para as amostras de fruta grumixama, pitaya e uvaia.

Referências

- ALVES, R. E. et al. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. **Acta Horticulturae**, v. 773, p. 299-305, 2008.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química dos alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Ed. UFV, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2009.
- BORS, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p. 312-319, 1984.
- BUDAVARI, S. (Ed.). **The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Whitehouse Station: Merck, 2006.
- CAMPANELLA, L. et al. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 641-651, 2004.
- CAYUPÁN, Y. S. C. et al. Health-promoting substances and antioxidant properties of Opuntia SP. Fruits. Changes in biocative-compound contents during ripening process. **Food Chemistry**, v. 126, p. 514-519, 2011.
- CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, 178-182, 2002.
- CHATTERJEE, S.; FISHER, A. B. Free radicals, oxidative stress, and cancer. In: BAGOLI, D.; PREUSS, H. G. **Phytopharmaceutical in cancer chemoprevention**. New York: CRC Press, 2005. p. 1-16.
- DENISOV, E. T. **Oxidants and antioxidants in organic chemistry and biology**. New York: Taylor & Francis, 2005.
- DI MAJO, D. et al. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, v. 111, p. 45-49, 2008.
- DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINLEY, W. J. Antioxidants in food: state of the science important to the food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6837-6846, 2011.

GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.

HANSEN, D. S. et al. Caracterização química de frutos de jenipapeiros nativos do recôncavo baiano visando ao consumo natural e industrialização. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 964-969, 2008.

JIMÉNEZ- ESCRIG, A. et al. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1686-1690, 2000.

JUNG, H. et al. Antioxidant xanthonenes from the pericarp of garcinia mangostana (Mangosteen). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2077-2082, 2006.

KANG, J. et al. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea Mart.*) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, p. 152-157, 2011.

LETTERME, P. et al. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v. 95, p. 644-652, 2006.

LU, Z. et al. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry Internacional**, v. 48, p. 263-274, 2006.

LUSSIGNOLI, S. et al. A microplate based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 38-44, 1999.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MEDINA, A. L. Araçá (*Psidium cattleianum Sabine*) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and proliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916-922, 2011.

NACZK, M. et al. Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Gracinia mangostana*). **Food Chemistry**, v. 128, p. 292-298, 2011.

NIKKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ORDOUDI, S. A.; TSIMIDOU, M. Z. Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9347-9356, 2006.

ORDOUDI, S. A. et al. Structure-radical scavenging activity relationship of alkannin/shikonin derivatives. **Food Chemistry**, v. 124, p. 171-176, 2011.

PAL, C. et al. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 258–267, 2010.

POTHITIRAT, W. et al. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 8, p. 442-447, 2009.

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

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

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

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, p. 693-695, 2009.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIVAM, G. Analysis of flavonoids. In: HURST, W. J. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. New York: CRC Press, 2002. p. 1-22.

SOUZA, A. D. et al. Caracterização de frutos de *Cucumis metuliferus* na serra da Cantareira, São Paulo. **Thesis**, v. 5, p. 146-160, 2006.

- TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombim (*Spondias mombim* L.) pulp. **Food Chemistry**, v. 44, p. 2326-2331, 2011.
- TUBARO, F. et al. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1228-1234, 1998.
- TUBARO, F. et al. Kinetic analysis of antioxidant capacity of wine. **Biofactors**, v. 9, n. 8, p. 37-47, 1999.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VELÁZQUEZ, D. A.; ZEVALLOS-CISNEROS, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 107-113, 2009.
- VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 119-130, 2007.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods of Enzymology**, v. 233, p. 502-512, 1994.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- XING, Y.; WHITE, P. J. Antioxidants from cereals and legumes in natural antioxidants chemistry, health effects, and applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1996. p. 25-63.
- YEN, G. C.; DUH, P. D.; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307-313, 2002.
- YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471-478, 2001.
- ZERAIK, M. L. et al. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, p. 259-265, 2011.
- ZGLICZYNSKI, T. J. M. et al. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.