



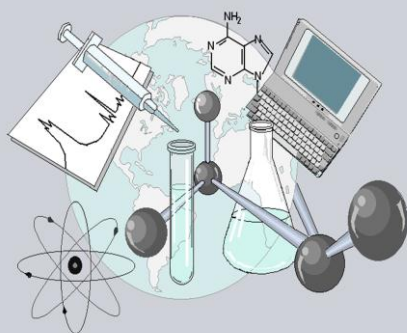
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante das frutas Bacupari (*Garcinia brasiliensis*), Calabura (*Muntingia calabura*) e Uva Japonesa (*Hovenia dulcis*) – Estudos de condições de extração de compostos fenólicos relacionados por CLAE-DAD



Centro de
Ciências Exatas

Dissertação apresentada por **Eliza Mariane Rotta** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

MARINGÁ, Fevereiro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante das frutas Bacupari (*Garcinia brasiliensis*), Calabura (*Muntingia calabura*) e Uva Japonesa (*Hovenia dulcis*) – Estudos de condições de extração de compostos fenólicos relacionados por CLAE-DAD

Dissertação apresentada por **Eliza Mariane Rotta** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer

MARINGÁ, FEVEREIRO/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R842c Rotta, Eliza Mariane
Caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante das frutas Bacupari (*Garcinia brasiliensis*), Calabura (*Muntingia calabura*) e Uva Japonesa (*Hovenia dulcis*) : estudos de condições de extração de compostos fenólicos relacionados por CLAE-DAD / Eliza Mariane Rotta. -- Maringá, 2015.
xii, 70 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Frutas - Atividade antioxidante. 2. Compostos fenólicos. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). 4. Calabura - Atividade antioxidante. 5. Bacupari - Atividade antioxidante. 6. Uva japonesa - Atividade antioxidante. 7. Validação de métodos analíticos - Compostos fenólicos. 8. Frutas - Análise minerais. I. Visentainer, Jesui Vergilio, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 543

GVS-002611



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Eliza Mariane Rotta**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 11 de fevereiro de 2015.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer
Presidente - DQI/UEM

Profa. Dra. Liane Maldaner
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior
Membro - IFPR

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida, pela tua grandeza, pelo seu amor incondicional, pelo cuidado com minha família, por me amparar em todos os momentos.

Aos meus pais, Ivete e Valter, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade, pela dedicação, doação, compreensão e que nunca mediram esforços quando o assunto era educação.

Aos meus irmãos Maracely e Fernando, minha cunhada Cristiane e ao meu namorado Leandro, por me apoiarem e incentivarem sempre.

Aos meus sobrinhos Nathalia e Thales pelos momentos felizes que me proporcionam.

Ao meu orientador, professor Jesuí, pela oportunidade mesmo quando estava no primeiro ano da faculdade como aluna de iniciação científica, e com certeza foi uma grande inspiração para dar continuidade a minha vida acadêmica.

Á professora Liane pela contribuição científica para o desenvolvimento desse projeto.

Ao técnico Marcos Vieira e ao professor Charles Haminiuk que me receberam na UTFPR-CM para que uma parte deste trabalho fosse executada.

Ao professor Makoto e aos parceiros do Laboratório CromAlimentos, Aline, Claudia, Erika, Antônio, Joana, Polyana, Aloisio, que estão dispostos a ajudar e também aos momentos do cafezinho.

Aos meus amigos que o curso de química me proporcionou conhecer, André, Brenno, Érika, Janaína, Suellen, Diogo, Juninho, Luiz Fernando, Karen e Murilo, pelos momentos de estudo e também das saidinhas.

Ás minhas amigas de Mamborê, Aline, Bruna, Carine, Fernanda e Mariana que apesar de cada uma morar em um cantinho do Paraná, estamos sempre tentando estar presente e apoiando uma a outra.

RESUMO

As frutas são compostas por micronutrientes como, minerais, fibras e compostos bioativos. Estudos epidemiológicos têm associado o consumo regular de frutas com a redução do risco de doenças. Dentre os compostos bioativos presentes em frutas, os compostos que apresentam atividade antioxidante são os compostos mais associados à prevenção de doenças, sendo que os antioxidantes mais abundantes na natureza pertencem ao grupo dos compostos fenólicos. Com isso surge a necessidade da caracterização de frutas desconhecidas para que haja novas fontes nutricionais. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi a caracterização físico-química, análise da composição de minerais, da composição de ácidos graxos e avaliação da atividade antioxidante por diferentes ensaios (FT, DPPH^{*}, FRAP, ABTS^{•+} e ORAC) realizadas nas frutas calabura, bacupari e uva japonesa. Foi também otimizado as melhores condições de extração líquido-sólido dos compostos fenólicos na casca da calabura, empregando diferentes procedimentos de extração, nos quais foi avaliado melhor solvente de extração (acetato de etila, metanol, etanol e água) e também avaliado a melhor técnica de extração (assistida por ultrassom e agitação magnética). Para a determinação de cinco compostos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e miricetina) foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados mostraram que dentre as partes das frutas analisadas, as partes normalmente descartadas, casca e semente, possuem teores de proteína bruta, quantidades de minerais e atividade antioxidante similares ou superiores ao da polpa. As sementes também apresentaram em sua composição ácidos graxos como o ácido linoléico, ácido alfa-linolênico e o ácido oléico. Foi estabelecida a melhor condição de extração dos compostos fenólicos da casca da calabura, tendo como condição ótima extração por agitação magnética e a combinação dos solventes metanol/água (80:20 v/v). O método desenvolvido se mostrou seletivo aos compostos fenólicos analisados, com exceção ao ácido clorogênico, pois interferentes co-eluíram no mesmo tempo de retenção, impossibilitando a identificação e quantificação do mesmo. A validação do método apresentou bons resultados para os parâmetros analíticos avaliados. A casca da calabura apresentou quantidades significativas dos compostos fenólicos, sendo que foi encontrado em maior quantidade o ácido gálico, seguido da miricetina, ácido ferúlico e por último o ácido vanílico.

ABSTRACT

The fruits are composed of micronutrients such as, mineral fibers and bioactive compounds. Epidemiological studies have related regular consumption of fruit by reducing the risk of disease. Among the bioactive compounds present in fruits, compounds that show antioxidant activity are more associated with disease prevention, and the most abundant antioxidants in nature belong to the group of phenolic compounds. Therefore, the research fruits unknown so there new sources of nutrition is important. In view of this, the objective of this study was the physical-chemical characterization, mineral composition, fatty acid composition and evaluation of the antioxidant activity of different parts of calabura, japanese grape and bacupari by different assays (FT, DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC). It was also optimized the best conditions for liquid-solid extraction of phenolic compounds in the calabura peel, using different procedures in which was rated best extraction solvent (ethyl acetate, methanol, ethanol and water) and also evaluated the best extraction technique (assisted by ultrasound and magnetic stirring). For determination of five phenolic compounds (gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, ferulic acid and myricetin) was developed and validated a method for high performance liquid chromatography – diode array detection (HPLC-DAD). The results showed that among the parts of the analyzed fruits, the parties usually thrown out, peel and seed, have crude protein, amounts of minerals and antioxidant activity similar or higher than the pulp. The seeds also presented in its composition fatty acids such as linoleic acid, alpha-linolenic acid and oleic acid. It has been established with the best condition of extraction of phenolic compounds calabura peel, having as optimal extraction conditions with magnetic stirring and the combination of solvents methanol/water (80:20 v/v). The method developed showed selective to phenolic compounds analyzed except for the chlorogenic acid because remaining impurities at the same retention time, damaging the identification and quantification of this compound. Validation of the method showed good results for the evaluated analytical parameters (linearity, matrix effect, recovery, accuracy, precision, detection and quantification limit). The calabura peel showed significant amounts of phenolic compounds and that the main component was gallic acid, followed by myricetin, ferulic acid and vanillic acid by the latter.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
2.1 Uva japonesa.....	1
2.2 Calabura	2
2.3 Bacupari	2
2.4 Antioxidantes	2
2.4 Compostos fenólicos.....	3
2.5 Extração de compostos fenólicos.....	5
2.6 Ensaio aplicado para avaliar a capacidade antioxidante.....	5
2.7 Métodos de análise de fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos	8
2.8 Validação de métodos analíticos.....	9
2.8.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos.....	9
2.8.2 Seletividade.....	9
2.8.3 Linearidade e faixa linear	10
2.8.4 Exatidão	11
2.8.5 Precisão	12
2.8.6 Limite de detecção	13
2.8.7 Limite de quantificação.....	13
2.8.8 Robustez.....	13
2.9 Compostos fenólicos analisados	14
2.9.1 Ácido Gálico	14
2.9.2 Ácido Clorogênico.....	14
2.9.3 Ácido Vanílico	15
2.9.4 Ácido Ferúlico	16
2.9.5 Miricetina.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Reagente e solventes.....	18

4.2 Equipamentos e materiais	18
4.3 Amostragem.....	19
4.4 Análise da composição proximal e minerais	20
4.5 Esterificação e transesterificação e análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos	21
4.6 Extração dos antioxidantes das partes das frutas	22
4.7 Determinação de fenólicos totais	22
4.8 Capacidade antioxidante determinada por DPPH•	23
4.9 Capacidade antioxidante determinada por ABTS ^{•+}	23
4.10 Capacidade antioxidante determinada pelo poder de redução – FRAP.....	24
4.11 Capacidade antioxidante pelo radical oxigênio – ORAC	24
4.12 Otimização do método de extração de compostos fenólicos da casca da calabura	25
4.13 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE- DAD)	26
4.14 Aplicação da metodologia	27
4.15 Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Análises físico-químicas	28
5.2 Análise de minerais.....	30
5.3 Identificação e quantificação de ácidos graxos nas sementes das frutas	32
5.4 Atividade antioxidante das partes das frutas.....	36
5.4.1 Correlação de Pearson entre os ensaios antioxidantes.....	38
5.5 Atividade antioxidante das diferentes extrações da casca da calabura	39
5.5.1 Análise dos componentes principais (PCA)	41
5.6 Desenvolvimento da metodologia dos compostos fenólicos por CLAE-DAD	44
5.7 Métodos de extração	45
5.7.1 Correlação de Pearson entre os ensaios antioxidantes e o total de compostos fenólicos quantificados por CLAE-DAD.....	48
5.8 Validação da Metodologia	49
5.8.1 Seletividade.....	49
5.8.2 Linearidade, efeito matriz, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação	50
5.8.3 Exatidão e precisão	53
5.8.4 Robustez.....	54
5.9 Aplicação do método desenvolvido	55
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de Neveu et al., 2010).....	4
Figura 2. Estrutura química dos Ácidos Hidroxibenzóicos (A) Ácidos Hidroxicinâmicos (B) e Flavonóides (C).....	4
Figura 3. Estrutura química do Lignan (A), Estilbenos (B) e Tirosol (C).....	5
Figura 4. Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ a ferroso $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ pela ação de antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2006).....	6
Figura 5. Reação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ na presença de um composto antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2007a).....	7
Figura 6. Redução do radical livre DPPH^{\bullet} pela ação do antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2007b).....	7
Figura 7. Reação do radical peroxila na presença de um composto antioxidante e fluoresceína (Adaptado de Zulueta et al., 2009).....	8
Figura 8. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira et al., 2009).....	8
Figura 9. Fórmula estrutural do ácido gálico.....	14
Figura 10. Fórmula estrutural do ácido clorogênico.....	15
Figura 11. Fórmula estrutural do ácido vanílico.....	15
Figura 12. Fórmula estrutural do ácido ferúlico.....	16
Figura 13. Fórmula estrutural da miricetina.....	16
Figura 14. Representação do cromatogramas A) Padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, B) Semente do bacupari, C) Semente da uva japonesa. Condições cromatográficas conforme item 4.5. Identificação dos Compostos: 1- 16:0, 2- 16:1n-7, 3- 18:0, 4- 18:1n-9, 5- 18:1n-7, 6- 18:3n-6, 7- 18:3n-3, 8- 20:0, 9- 23:0.....	34
Figura 15. Composição em ácidos graxos das sementes do bacupari e da uva japonesa.....	35
Figura 16. Coeficiente da Correlação de Pearson dos ensaios antioxidantes das partes das frutas.....	39
Figura 17. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante nas diferentes extrações dos compostos antioxidantes na casca da calabura liofilizada. I: Acetato de Etila, II: Etanol:Água, III: Metanol:Água, IV: Metanol:Água acidificada, V: Metanol:Água. I a IV por agitação magnética e V por ultrassom. Média dos valores \pm desvio instrumental (n=3).	

FT: Expresso em mgEAG g ⁻¹ de amostra seca. DPPH [•] , FRAP, ABTS ^{•+} e ORAC: Expresso em μmolET g ⁻¹ de amostra seca.....	40
Figura 18. Análise da Componente Principal (PCA). A) Variância explicada x Número de componentes principais. B) <i>Scores</i> PC1 x PC2. C) <i>Loadings</i> PC1 x PC2.....	43
Figura 19: Representação do cromatograma dos padrões dos compostos fenólicos; Condições cromatográficas: FM: água acidificada com ácido fosfórico (pH=3,00) como fase móvel A e a fase móvel B constituída por metanol, vazão de 1 mL min ⁻¹ , eluição por modo gradiente, com a seguinte programação: de 0-2 minutos (30% B), 2-3 min (30-60% B), 3-5 min (60% B), 5-6 min (60-50% B), 6-9 min (50% B), 9-10 min (50-30% B), 10-12 min (30% B). Coluna C18ec (4,6 x 250 mm, 5 μm) Maecherey-Nagel, detecção por arranjo de diodo a 280 nm. Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.....	44
Figura 20: Representação dos cromatogramas individuais dos padrões dos compostos fenólicos a 1 mg kg ⁻¹ (A) e seus respectivos espectros de absorção no UV-Vis (B). Condições Cromatográficas semelhantes à Figura 19.....	45
Figura 21: Representação dos cromatogramas em 280 nm dos A) Extração I, B) Extração II, C) Extração III, D) Extração IV, E) Extração V; Condições Cromatográficas semelhantes à Figura 4. Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.....	46
Figura 22. Quantidade de compostos fenólicos extraídos nos diferentes procedimentos de extração dos compostos antioxidantes da casca da calabura liofilizada por CLAE-DAD expressos em mg kg ⁻¹ . I: Acetato de Etila, II: Etanol:Água (80:20 v/v), III: Metanol:Água (80:20 v/v), IV: Metanol:Água acidificado (80:20 v/v), V: Metanol:Água (80:20 v/v). I a IV por agitação magnética e V por ultrassom.....	47
Figura 23. Coeficiente da Correlação de Pearson dos ensaios antioxidantes dos diferentes procedimentos de extração com os compostos fenólicos quantificados (CFQ) por CLAE-DAD.....	49
Figura 24. Cromatogramas no comprimento de onda máximo dos padrões dos compostos fenólicos (A) e na matriz da amostra (B). Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.....	50
Figura 25. Curvas analíticas dos compostos fenólicos nas concentrações 0,25, 0,50, 1, 2 e 4 vezes a quantidade endógena obtida empregando CLAE-DAD.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição proximal (%) das frutas calabura, bacupari e uva japonesa <i>in natura</i>	28
Tabela 2. Quantidade de minerais (mg Kg ⁻¹) nas partes das frutas calabura, bacupari e uva japonesa <i>in natura</i>	31
Tabela 3. Teor de fenólicos totais (FT) e capacidade antioxidante das diferentes partes das frutas.....	37
Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas para os compostos fenólicos.....	52
Tabela 5. Efeito matriz, limites de detecção e quantificação do equipamento (LDE e LQE).....	52
Tabela 6. Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida.....	54
Tabela 7. Quantidades dos compostos fenólicos extraídos da casca da calabura de diferentes colheitas.....	55

NOMENCLATURA

CV	Coeficiente de Variação
r	Coeficiente de Correlação
R	Recuperação
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Absoluto
t _R	Tempo de Retenção
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Na	Sódio
Zn	Zinco

Símbolos

Gregos

λ	Comprimento de Onda
-----------	---------------------

Abreviaturas

AAPH	2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) dicloridrato
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AC	Ácido Clorogênico
AF	Ácido Ferúlico
AG	Ácido Gálico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AV	Ácido Vanílico
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CG-DIC	Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Ionização em Chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos
CUPRAC	Capacidade Antioxidante por Redução do Cobre
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril hidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EM	Espectrômetro de Massas
EMAG	Estéres Metílicos de Ácidos Graxos

ERN	Espécies Reativas ao Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas ao Oxigênio
ERS	Espécies Reativas ao Enxofre
ET	Equivalente de Trolox
FAO	Food and Agriculture Organization
FRAP	Poder Antioxidante Redutor do Ferro
FT	Fenólicos Totais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Ácido Linoléico
LD	Limite de Detecção
LDE	Limite de Detecção do Equipamento
LQ	Limite de Quantificação
LQE	Limite de Quantificação do Equipamento
LNA	Ácido Alfa-Linolénico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIR	Miricetina
MRC	Materiais de referência certificados
NM	Nanômetros
PCA	Análise do Componente Principal
RNA	Ácido Ribonucléico
SANCO	Comission of the European Communities
TAH	Transferência de Átomo de Hidrogênio
TE	Transferência de Elétron
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
TRAP	Potencial Antioxidante Relativo Total
ORAC	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio
USP	United States Pharmacopeia Convention
US-FDA	United States Food and Drug Administration
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os cinco maiores países do mundo em extensão territorial, possuindo características climáticas e geográficas favoráveis à produção de frutas, nativas ou exóticas (IBGE, 2014). Logo, o Brasil ocupa a terceira posição do ranking dos maiores produtores mundiais de frutas, atrás apenas da China e da Índia (FAO, 2010; MAPA, 2012).

Estudos epidemiológicos têm associado o consumo regular de frutas e vegetais com a redução do risco de doenças, entre elas, tipos diferentes de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular e doenças neurodegenerativas. (Liu, 2004; Biglari et al., 2008; Rufino et al., 2011). Em vista disso, muitos consumidores têm deixado como segunda opção a questão de gosto pessoal e têm dado preferência ao consumo de frutas que estejam associadas às questões de saúde (Souza et al., 2012; Silva et al., 2014).

As frutas são compostas de nutrientes essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento, como hidratos de carbono e proteínas, além de apresentarem em sua composição os micronutrientes, sendo estes minerais, fibras e compostos bioativos, como vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos. Porém, muitas frutas ainda são desconhecidas para a ciência, por serem consumidas e comercializadas apenas na região em que são produzidas, devido ao seu caráter perecível e também devido à falta de informações nutricionais que estimulem o consumo e a comercialização das mesmas (Clerici e Carvalho-Silva., 2011; Gurak et al., 2014; Silva et al., 2014).

Com isso surge a necessidade em se caracterizar frutas para que novas fontes nutricionais sejam conhecidas e assim possa ser despertado tanto o interesse na comercialização como também direcionar o consumo de acordo com as necessidades alimentares (Souza et al., 2012; Silva et al., 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uva japonesa

Hovenia dulcis Thunberg, é uma espécie florestal que ocorre naturalmente na China, Japão e Coreia (Bampi et al., 2010). Devido à tolerância a geadas, a espécie apresenta boa adaptação na região sul do Brasil (Carvalho, 1994; Bampi et al., 2010). O fruto

(*Hovenia dulcis*) é conhecido no Brasil vulgarmente por uva japonesa, uva do japão, uva china, entre outros (Carvalho, 1994). O fruto formado por uma cápsula seca que contém as sementes, localizadas na ponta de um pedúnculo de cor castanha e contendo uma polpa suculenta, este pedúnculo também é chamado de fruto (Carvalho, 1994; Bampi et al., 2010). Wang et al. (2013) relata os pedúnculos da uva japonesa como fonte de nutrientes e compostos bioativos com atividade antioxidante.

2.2 Calabura

A espécie *Muntingia calabura* Linn tem ocorrência natural do México, Peru e Bolívia (Lopes et al., 2002). É uma espécie que tem boa adaptação em solos pobres e apresenta tolerância a solos ácidos ou alcalinos (Preethi et al., 2012). Os frutos (*Muntingia calabura*) são conhecidos vulgarmente como calabura e cereja-das-Antilhas, entre outros. Os frutos apresentam coloração avermelhada na casca e a polpa apresenta coloração branca e sabor adocicado (Lopes et al., 2002; Preethi et al., 2012). Autores como Kubola et al. (2011) e Preethi et al. (2012) relatam que a calabura apresenta atividade anti-inflamatória, além de ser fonte de fibra bruta, vitamina C, açúcares e de compostos fenólicos, e, portanto apresenta potencial antioxidante.

2.3 Bacupari

A espécie *Garcinia brasiliensis* é uma planta nativa da região Amazônica (Santa-Cecilia et al., 2011). A espécie é cultivada em todo território brasileiro, sendo conhecida por bacupari, bacopari, baacuri-mirim, bacoparé, entre outros (Santa-Cecilia et al., 2011; Oliveira et al., 2012). O fruto tem formato arredondado com coloração amarela na casca, polpa branca e sabor ácido-adocicado, o fruto pode apresentar de 2 a 3 sementes (Oliveira et al., 2012). Autores como Martins et al. (2008) e Santa-Cecilia et al. (2011) relatam que o bacupari apresentam atividades anti-inflamatória, antioxidante e efeitos analgésicos.

2.4 Antioxidantes

O interesse na caracterização de compostos com atividade antioxidante presente nos alimentos está cada vez mais relevante na comunidade científica (Mattietto et al., 2010),

devido aos seus efeitos nutricionais e terapêuticos que promovem a prevenção, proteção ou redução dos efeitos causados pelos radicais livres (Ozsoy et al., 2008; Rufino et al., 2009; Souza et al., 2012).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas (Carocho e Ferreira, 2013). As oxidações são causadas por espécies reativas ao oxigênio (ERO), espécies reativas ao nitrogênio (ERN) e espécies reativas ao enxofre (ERS) e os seus principais alvos são as proteínas, o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês desoxirribonucleic acid), ácido ribonucleico (RNA, do inglês ribonucleic acid), açúcares e lipídios (Lu et al., 2010; Craft et al., 2012; Carocho e Ferreira, 2013). Os antioxidantes geralmente inibem os radicais livres, devido à capacidade de ressonância em sua estrutura molecular e, desta, forma conseguem estabilizar o elétron desemparelhado (Babbar et al., 2011).

2.4 Compostos fenólicos

Os antioxidantes mais abundantes na natureza pertencem ao grupo dos compostos fenólicos que engloba uma vasta gama de substâncias, as quais possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, ou seja, estes compostos podem doar o hidrogênio da hidroxila para um radical livre, sendo assim chamados de sequestradores de radicais livres (Soares, 2002; Angelo e Jorge, 2007).

Pelo grande número de substâncias pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, este é dividido em classes e sub-classes de acordo com a estrutura química. Deste modo, tal como representado na Figura 1, distinguem-se cinco classes de compostos fenólicos: os ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos e outros compostos fenólicos (Neveu et al., 2010).

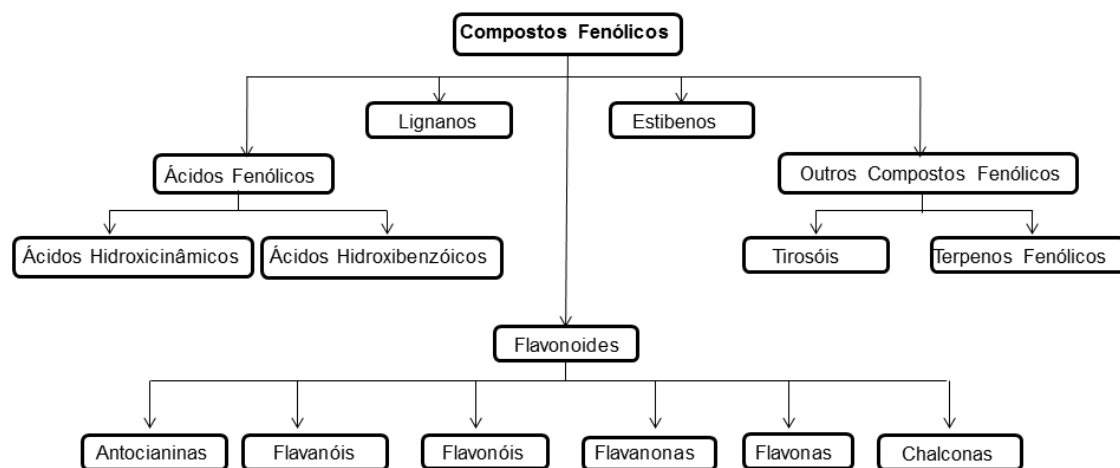


Figura 1. Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de Neveu et al., 2010).

Os ácidos fenólicos têm como característica um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupo hidroxílico ou metílico, que ainda sofrem a divisão em ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, representados na Figura 2A e 2B, respectivamente, por diferirem entre si pelo número de carbonos e dupla ligação da cadeia lateral. Os flavonoides são característicos por apresentarem em sua estrutura quinze átomos de carbono, distribuídos entre dois anéis aromáticos ligados a um anel heterocíclico, como pode ser visto na Figura 2C (Soares, 2002; Neveu et al., 2010).

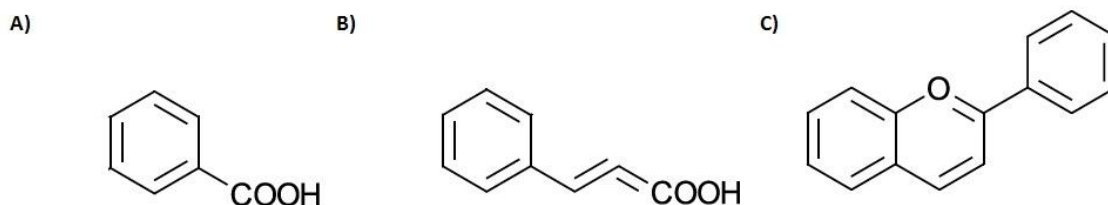


Figura 2. Estrutura química dos Ácidos Hidroxibenzóicos (A), Ácidos Hidroxicinâmicos (B) e dos Flavonoides (C).

Os lignanos são formados por um anel benzênico e um anel heterocíclico. Os estilbenos são característicos por apresentarem dois anéis aromáticos ligados por um etileno. Os compostos que não se enquadram em nenhum dos grupos citados acima, mas são compostos fenólicos, fazem parte do grupo denominado de outros compostos fenólicos, nos quais podem ser citados os alquimetoxifenóis, metoxifenóis, terpenos fenólicos, tirosóis entre outros. Nas Figuras 3A, 3B e 3C estão apresentados as

estruturas químicas dos lignanos, estilbenos e tirosóis, respectivamente (Soares, 2002; Neveu et al., 2010).

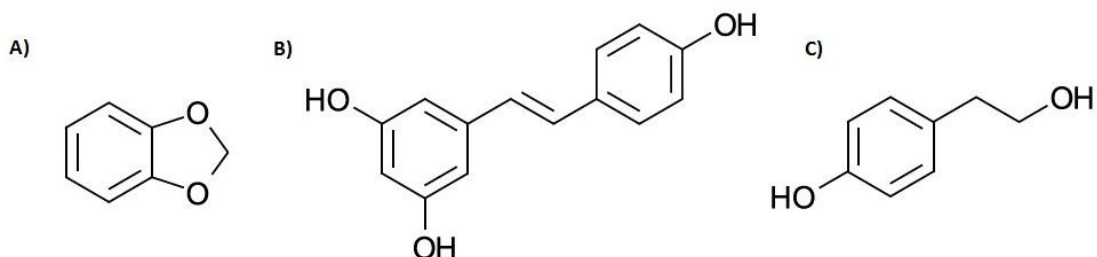


Figura 3. Estrutura química do Lignanos (A), Estilbenos (B) e do Tirosol (C).

2.5 Extração de compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos em matrizes complexas, como plantas, tem sido objeto de inúmeros estudos científicos da atualidade (Shui e Leong, 2006; Maruenda et al., 2013). É constatado que a polaridade do solvente e dos compostos fenólicos afetam a eficiência da extração destes compostos em matrizes alimentares. Solventes como água, metanol, etanol, acetona e acetato de etila são os mais utilizados em extrações convencionais (Shui e Leong, 2006; González-Montelongo et al., 2010; Maruenda et al., 2013). Outros fatores como tamanho da amostra, o tempo em que a amostra é submetida à extração, as condições de armazenamento, a presença de substâncias interferentes, tempo ou tipo de agitação, proporção de solvente, também influenciam a extração dos compostos fenólicos (Naczki e Shahidi, 2004; Cheng et al., 2012).

Dessa forma, estudos comparativos devem ser feitos individualmente para cada parte da planta ou da fruta, com o propósito de otimizar as condições de extração que resultem na extração de maior quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, apresente maior atividade antioxidante (González-Montelongo et al., 2010).

2.6 Ensaios aplicados para avaliar a capacidade antioxidante

Existem descritos na literatura inúmeros ensaios que podem ser empregados para a determinação da capacidade antioxidante de alimentos, como: DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril hidrazil) e ABTS^{•+} ((2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)), que levam o nome do próprio radical, e os ensaios de FRAP (poder antioxidante redutor do

ferro), ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio), CUPRAC (capacidade antioxidante por redução do cobre) e TRAP (potencial antioxidante relativo total), que levam o nome das siglas oriundas da língua inglesa, entre outras (Pérez-Jiménez et al., 2008; Rufino et al., 2010; Contreras-Calderón et al., 2011). Embora haja uma gama de técnicas disponíveis, é importante empregar técnicas rápidas, eficientes e confiáveis, para reduzir a quantidade de solventes orgânicos e os custos da análise (Krishnaiah et al., 2011).

Os ensaios DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e ORAC são os mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* (Rufino et al., 2010). Segundo Pérez-Jiménez et al., (2008) é recomendado que pelo menos duas análises sejam combinadas para provar a real capacidade antioxidante do alimento, pois a utilização de apenas uma técnica pode fornecer um resultado equivocado, uma vez que os ensaios atuam por diferentes mecanismos de reação (Carocho e Ferreira, 2013).

De acordo com Huang et al. (2005) os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante podem ser classificados em dois grupos, os que atuam pela transferência de elétron (TE) e aqueles que atuam por reações de transferência de átomo de hidrogênio (TAH). O ensaio de FRAP é baseado no poder de redução do composto antioxidante, no qual o antioxidante doa um elétron para o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina utilizado como reagente, como pode ser visto da Figura 4. E essa reação é monitorada pelo aumento da intensidade da coloração da solução do complexo no comprimento de onda de 593 nm (Benzie e Strain, 1996).

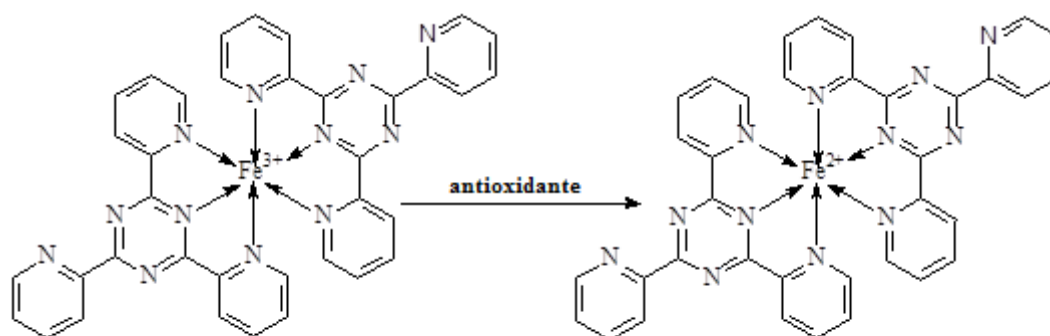


Figura 4. Redução do complexo férrico [Fe^{III}(TPTZ)₂]Cl₃ a ferroso [Fe^{II}(TPTZ)₂]Cl₂ pela ação de antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2006).

Os ensaios de $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ são baseados na captura ou sequestro do radical livre por um composto antioxidante (Ma et al., 2011; Rufino et al., 2010), e são monitorados pela mudança de coloração, mais precisamente a descoloração da solução que corresponde quantitativamente a concentração de antioxidantes presentes na amostra, como mostram as Figuras 5 e 6, respectivamente.

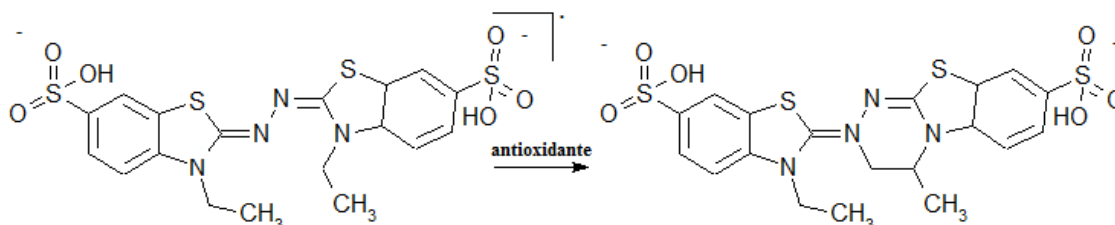


Figura 5. Reação do radical $ABTS^{\bullet+}$ na presença de um composto antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2007a).

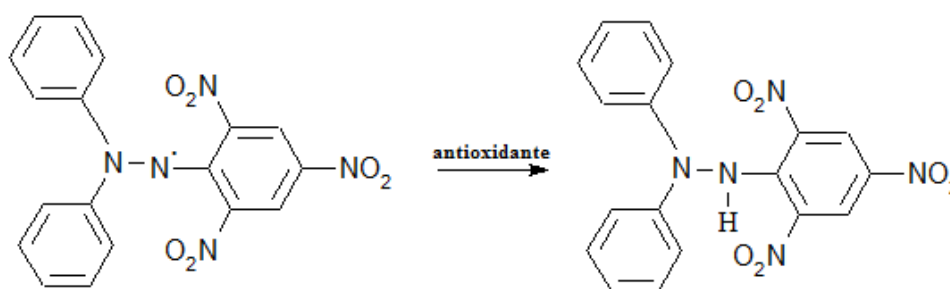


Figura 6. Redução do radical livre $DPPH^{\bullet}$ pela ação do antioxidante (Adaptado de Rufino et al., 2007b).

O ensaio ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio do composto antioxidante para o radical AAPH (dicloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)), no entanto é monitorado pelo decaimento de fluorescência, que por sua vez quanto mais tardio o decaimento da fluorescência maior é a atividade antioxidante da amostra, como pode ser visto na Figura 7 (Oliveira et al., 2006; Karadag et al., 2009; Zulueta et al., 2009).

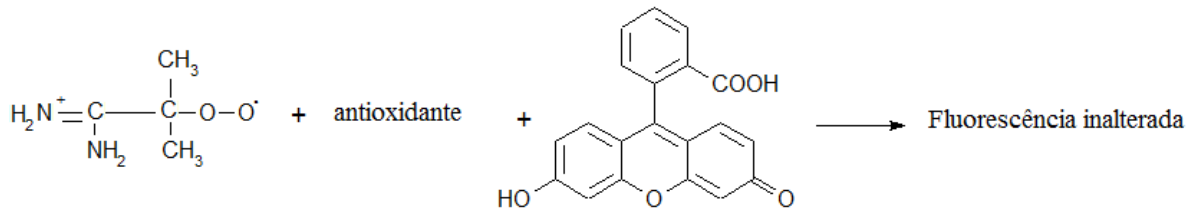


Figura 7. Reação do radical peroxila na presença de fluoresceína com um composto antioxidante (Adaptado de Zulueta et al., 2009).

2.7 Métodos de análise de fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos

Métodos espectrofotométricos são utilizados para avaliar compostos fenólicos totais em alimentos (Angelo e Jorge, 2007). O método de Folin-Ciocalteu é um dos ensaios mais populares, e o ensaio leva o nome do principal reagente (Singleton e Rossi, 1965; Angelo e Jorge, 2007). Esse reagente é constituído pelos ácidos de fosfomolibdênio e fosfotungstênio, os quais reagem com os compostos fenólicos, sendo reduzidos, resultando em uma coloração azul (Soares, 2002), como pode ser visto na Figura 8.

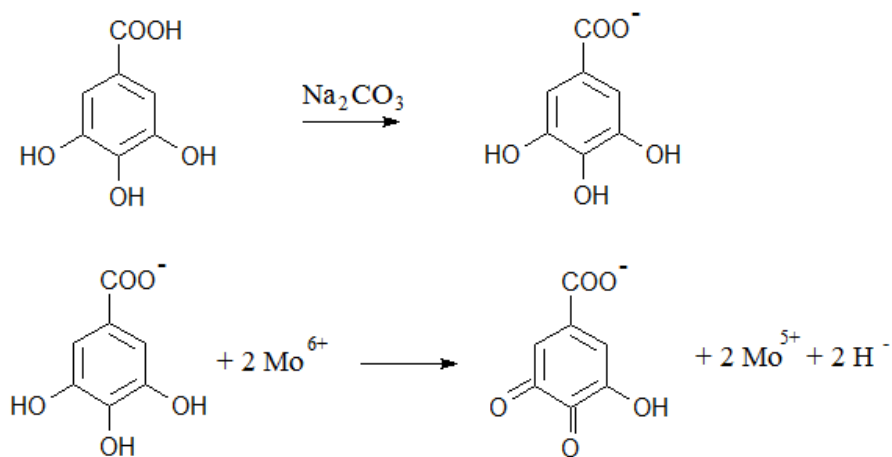


Figura 8. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira et al., 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação mais utilizada para a determinação individual de compostos fenólicos em alimentos, pois estes compostos são termicamente instáveis, não voláteis e de alta polaridade (Abu-Reidah et al., 2013). Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos os detectores mais utilizados são o espectrômetro de massas (EM) e os detectores por

arranjo de diodos (DAD). O DAD monitora simultaneamente todos os comprimentos de onda, permitindo desta forma a seleção do comprimento de onda máximo de cada composto para a realização da quantificação, aumentando a detectabilidade dos compostos. Além disso, fornece uma maior confiabilidade na identificação dos compostos, que pode ser realizada pela comparação dos espectros de absorvância obtidos para o padrão com os da amostra (Collins et al., 2006; Abu-Reidah et al., 2013).

2.8 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico requer um processo de avaliação para que os resultados sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Esse processo de avaliação é denominado validação. O objetivo da validação é assegurar que a metodologia analítica desenvolvida é adequada ao propósito da análise (Ribani et al., 2004; Lanças, 2009).

A validação em análises químicas vem se tornando cada vez mais importante devido à variabilidade dos resultados obtidos (Lanças, 2009). Órgãos como ISO (*International Standard Organization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), USP (*United States Pharmacopeia Convention*), SANCO (*Commission of the European Communities*), ANVISA (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*) e INMETRO (*Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial*), disponibilizam guias para validação de métodos analíticos, porém existem diferenças nas regras dos parâmetros analíticos (Ribani et al., 2004; Ribeiro, 2008).

2.8.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente avaliados são: seletividade, linearidade e faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Ribani et al., 2004; Lanças, 2009).

2.8.2 Seletividade

A seletividade avalia a capacidade que o método analítico possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (INMETRO, 2003; Aragão et al.,

2009). A avaliação da seletividade pode ser feita através da resposta obtida pelo detector de arranjo de diodos, em que é comparado o espectro de absorção do pico obtido na separação com o espectro de absorção do padrão do composto e utiliza-se isto como uma indicação da presença ou não do composto (Ribani et al., 2004; Lanças, 2009).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição (efeito matriz). Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (SANCO, 2009; INMETRO, 2010). Para verificar a ocorrência do efeito matriz utiliza-se os valores da curva construída somente no solvente e da curva construída na matriz da amostra e calcula-se o valor do efeito matriz pelo emprego da Equação 1.

$$\text{Efeito Matriz} = \left(\frac{x_1}{x_2} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

x_1 = média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no extrato da amostra, numa dada concentração, em que deve se desconsiderar a área endógena, sendo x_1 = área total (quantidade endógena + quantidade de padrão adicionado) – área endógena;

x_2 = média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado em solvente, numa dada concentração.

2.8.3 Linearidade e faixa linear

A linearidade está relacionada com a capacidade do método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito (Lanças, 2009). As agências reguladoras brasileiras ANVISA (2006) e INMETRO (2010) recomendam que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Os valores são expressos em uma equação de reta (Equação 2) chamada de curva analítica, sendo que o coeficiente de correlação (r) aceitável deve ser $\geq 0,99$ (ANVISA, 2003).

$$y = a + bx \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

y = resposta do detector

x = concentração do analito

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

A curva analítica pode ser obtida por padronização interna, padronização externa e adição padrão. A padronização interna consiste na adição de um padrão interno em concentrações conhecidas, desde que esse padrão apresente requisitos como, ser ausente na amostra, não reaja com substâncias presentes na amostra, apresente elevado grau de pureza, entre outros. A padronização externa consiste na comparação da área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir dos padrões das substâncias. O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo (Ribani et al., 2004).

A faixa linear é definida como o intervalo de trabalho em que é possível a determinação dos resultados com precisão e exatidão (INMETRO, 2010).

2.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é medida pela a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (Ribani et al., 2004; ANVISA, 2006; SANCO, 2009; INMETRO, 2010). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação (Ribani et al., 2004).

Em matrizes complexas, quando for difícil obtenção de um branco da matriz isenta da substância de interesse, os ensaios de recuperação são realizados pelo método de adição padrão (Ribani et al., 2004; SANCO, 2009). No método de adição padrão, quantidades conhecidas de substância padrão devem ser adicionadas na matriz da amostra. Segundo Ribani et al. (2004) a concentração deve estar entre 0,25 e 1, e segundo SANCO (2009) a concentração deve estar entre 1 e 5 vezes a quantidade endógena estimada da substância a ser analisada na matriz. A recuperação média (R) em cada nível de concentração e para cada matriz da amostra deve estar no intervalo de 70% - 120% (ANVISA, 2006; SANCO, 2009), calculada pela Equação 3.

$$R (\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada (concentração endógena + concentração determinada na amostra fortificada);

C2 = concentração usada para fortificação (concentração endógena + concentração adicionada após o procedimento de extração).

2.8.5 Precisão

A precisão é a medida do grau da concordância entre vários resultados analíticos de ensaios independentes obtidos numa mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2010; Lanças, 2009). A precisão é determinada em pelo menos dois níveis de concentração em cinco replicatas, e cada nível de concentração deve apresentar coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$ (ANVISA, 2006; SANCO, 2009), calculado pela Equação 4.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{X}_m} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

s = estimativa do desvio padrão $[\sum(x_i - \bar{X}_m)^2 / (N - 1)]^{1/2}$

x_i = valores individuais

\bar{X}_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas

As maneiras mais comuns de expressar a precisão são por meio da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade, sendo estas, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (Ribani et al., 2004; ANVISA, 2006). E a precisão intermediária avalia o efeito das variações dentro de um mesmo laboratório

devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou ainda a combinação destes fatores (Ribani et al., 2004; ANVISA, 2006).

2.8.6 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (SANCO, 2009; INMETRO, 2010). Existem vários meios para determinar o limite de detecção, sendo estes, método visual, método da relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani et al., 2004).

No método da relação sinal-ruído é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em concentrações baixas e conhecidas do composto de interesse, na matriz e no branco destas amostras (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004). Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 como estimativa do limite de detecção (Ribani et al., 2004).

2.8.7 Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (SANCO, 2009; INMETRO, 2010). O limite de quantificação pode ser determinado utilizando-se os mesmos critérios do limite de detecção, porém utilizando a relação sinal-ruído de 10:1 (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004).

2.8.8 Robustez

A robustez é a medida da capacidade de um método de não sofrer alterações frente a pequenas variações (Lanças, 2009; INMETRO, 2010). Para um método cromatográfico fatores como, pH da fase móvel, temperatura da coluna, vazão da fase móvel podem ser avaliados para medir a robustez do método (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

2.9 Compostos fenólicos analisados

A escolha dos compostos fenólicos foi baseada no trabalho de Kubola et al. (2011) que investigou os compostos fenólicos na polpa de calabura, e os resultados mostraram que os compostos fenólicos presentes em maior quantidade foram, o ácido gálico (AG), o ácido clorogênico (AC), o ácido vanílico (AV), o ácido ferúlico (AF) e a miricetina (MIR).

2.9.1 Ácido Gálico

Nome químico: ácido 3,4,5-triidroxibenzóico

Número no CAS: 149-91-7

Classe do Compostos Fenólicos: ácidos fenólicos

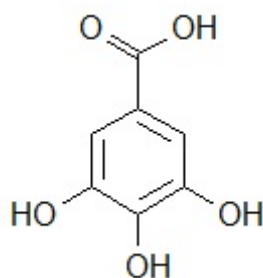


Figura 9. Fórmula estrutural do ácido gálico.

2.9.2 Ácido Clorogênico

Nome químico: ácido 5-cafeoilquínico

Número no CAS: 327-97-9

Classe do Compostos Fenólicos: ácidos fenólicos

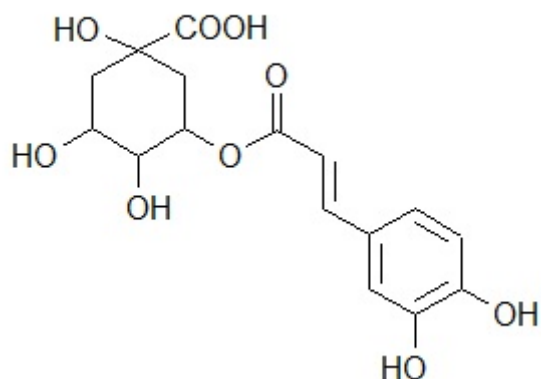


Figura 10. Fórmula estrutural do ácido clorogênico.

2.9.3 Ácido Vanílico

Nome químico: ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico

Número no CAS: 121-34-6

Classe do Compostos Fenólicos: ácidos fenólicos

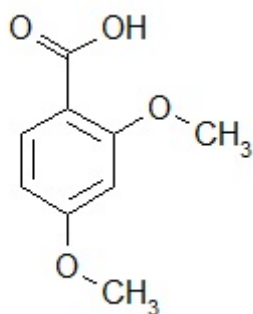


Figura 11. Fórmula estrutural do ácido vanílico.

2.9.4 Ácido Ferúlico

Nome químico: ácido 4-hidróxi-3-metóxi-t-cinâmico,

Número no CAS: 537-98-4

Classe do Compostos Fenólicos: ácidos fenólicos

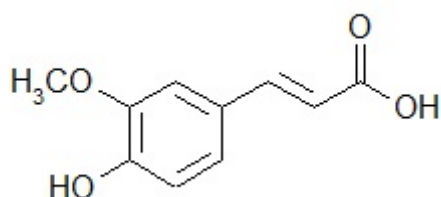


Figura 12. Fórmula estrutural do ácido ferúlico.

2.9.5 Miricetina

Nome químico: 3,3',4',5,5',7-Hexahidroxiflavona

Número no CAS: 529-44-2

Classe do Compostos Fenólicos: Flavonóides

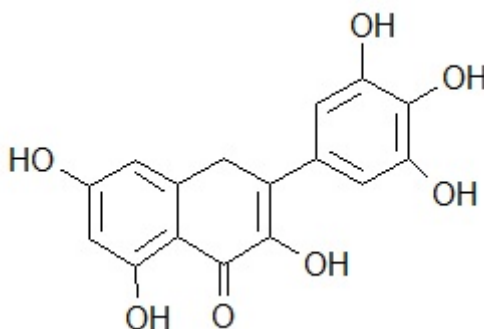


Figura 13. Fórmula estrutural da miricetina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização físico-química e de minerais e avaliação da capacidade antioxidante das diferentes partes das frutas calabura, bacupari e uva japonesa.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição de ácidos graxos das sementes das frutas;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das diferentes partes das frutas *in natura*;
- Otimizar os métodos de extração dos compostos fenólicos empregando diferentes solventes e os métodos de extração líquido-sólido;
- Avaliar as quantidades de compostos fenólicos extraídos e a capacidade antioxidante dos diferentes métodos de extrações avaliados por metodologias *in vitro*;
- Otimizar as condições de separação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo (CLAE-DAD) ;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos por CLAE-DAD;
- Correlacionar a atividade antioxidante com os compostos fenólicos quantificados;
- Validar o método analítico desenvolvido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagente e solventes

- AAPH 97% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- ABTS^{•+} Grau Ultra Puro (Amresco, São Paulo, Brasil);
- Ácido Clorogênico $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Ácido Ferúlico $\geq 99\%$ (Fluka, São Paulo, Brasil);
- Ácido Fosfórico 85% (Nuclear, São Paulo, Brasil);
- Ácido Gálico $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Ácido Vanílico 97% (Fluka, São Paulo, Brasil);
- Acetato de Etila 99,5% (Anidrol, São Paulo Brasil);
- Água Grau Milli Q (Millipore, São Paulo, Brasil);
- Carbonato de Sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Férrico 99% (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- DPPH[•] (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Etanol 95% (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Fluoresceína (Fluka, São Paulo, Brasil);
- Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Metanol Grau HPLC $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Metil-tricosanoato $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Miricetina $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Padrão 189-19 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Persulfato de potássio 99% (Neon, São Paulo, Brasil);
- Sulfato Ferroso (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- TPTZ $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Trolox 97% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

4.2 Equipamentos e materiais

- Cromatógrafo a líquido da marca Thermo Scientific Dionex Modelo: UltiMateTM 3000, bomba analítica quaternária, modelo LPG-3400SD, amostrador automático modelo WPS-3000TSL, com temperatura controlada a 10°C. Detector por arranjo

de diodos, modelo DAD-3000, módulo do compartimento da coluna com controle de temperatura, modelo TCC-3000SD (Bannockburn, IL, EUA);

- Coluna C18ec (4,6 x 250 mm, 5 µm) Maecherey-Nagel;
- Cromatógrafo a gás da marca Thermo, modelo Trace Ultra 3300, com detector de ionização de chama (Milão, Itália);
- Coluna capilar de sílica fundida CP – 7420 (Select FAME, 100m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil);
- Espectrofotômetro modelo Genesys 10 uv (Thermo Scientific, Madison, EUA);
- Fluorímetro Wallac VictorTM 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, EUA);
- Espectrômetro de absorção atômica (Analytik Jena novAA® 300, Alemanha).
- Liofilizador (Christ, Alemanha);
- Banho Ultrassônico (Ultronique, Brasil);
- Banho Maria (Fisatom, Brasil);
- Centrífuga (Sanyo, Inglaterra);
- pH metro (JKI, Brasil);
- Balança Analítica (Bel Equipamentos, São Paulo Brasil);
- Agitador Magnético (Fistom, Brasil);
- Mixer (Philips-Walita, Brasil);
- Rotaevaporador (Fisatom, Brasil);
- Geladeira;
- Pipeta (Gilson, França);
- Membrana Nylon 0,45 µm (Millipore, Brasil);
- Filtros Millex 0,45 µm (Millipore, Brasil);
- Balões Volumétricos (10 e 5 mL);
- Balões de Rotaevaporação;
- Seringa de Vidro;
- Tubos de Centrífuga.

4.3 Amostragem

A calabura (*Muntingia calabura*) foi colhida na Universidade Estadual de Maringá (UEM) na cidade de Maringá – PR nos meses de setembro e outubro de 2013 e no mesmo período do ano de 2014. A uva japonesa (*Hovenia dulcis*) e o bacupari

(*Garcinia brasiliensis*) foram colhidos no Parque Municipal da cidade de Apucarana – PR em abril de 2014. As frutas frescas foram lavadas em água corrente, e separadas manualmente em casca, polpa e semente e posteriormente foram embaladas a vácuo e mantidas a temperatura de -20°C. As análises foram realizadas com as diferentes partes da fruta *in natura*, sendo essas homogeneizadas em processador antes de cada análise.

4.4 Análise da composição proximal e minerais

As análises de umidade, cinzas e proteína bruta foram realizadas conforme técnicas descritas pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1998) para análise de alimentos. O teor de umidade foi determinado gravimetricamente por aquecimento em estufa (105°C) durante 4 horas. O teor de cinzas foi determinado por aquecimento em forno mufla (600°C) durante 6 horas. A análise de proteína bruta foi realizada através do método semi-micro Kjeldahl, o qual determina o teor de nitrogênio total que é convertido à proteína bruta.

Os lipídios totais foram analisados nas diferentes partes das frutas sendo extraídos por clorofórmio, metanol e água conforme descrito por Bligh e Dyer (1959). As amostras foram pesadas (15 gramas de amostra com 80% de umidade) em um béquer de 250 mL, no qual foi transferido 30 mL de metanol e 15 mL de clorofórmio e submetidos a agitação constante por 5 minutos, em seguida foram adicionados mais 15 mL de clorofórmio e deixados sob agitação por mais 2 minutos e por último foi adicionado a água e agitado por mais 5 minutos. Logo após, a mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro quantitativo. A solução resultante foi transferida para um funil de separação de 250 mL. Após a separação das fases, a fase inferior contendo o clorofórmio e os lipídios foi drenada para um balão de 250 mL previamente pesado, e o solvente foi removido por um rotaevaporador com pressão reduzida a uma temperatura de 30°C. O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente.

Para a análise da composição mineral as amostras foram calcinadas em mufla a 550°C durante 6 horas para posterior recuperação com uma solução de ácido nítrico (5% v/v) segundo metodologia descrita por AOAC (1998). Os minerais foram então quantificados por um espectrofotômetro de absorção atômica e os valores foram expressos em mg de minerais por Kg de amostra, utilizando os parâmetros de calibração de cada mineral de acordo com a técnica mencionada acima.

4.5 Esterificação e transesterificação e análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A esterificação e transesterificação dos lipídios foi realizada segundo o procedimento de Hartman e Lago (1973). A solução do padrão interno metiltricosanoato (23:0), previamente preparada em isoctano, foi transferida para um tubo de ensaio de capacidade de 20 mL e o solvente foi evaporado com gás nitrogênio. No mesmo tubo de ensaio foi pesado aproximadamente 0,025 gramas de lipídios e adicionados 4 mL de uma solução de hidróxido de sódio em metanol ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), esta solução foi submetida a um banho maria na temperatura de 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento dos tubos em água corrente, foi adicionado 5 mL da solução de reagente esterificante e novamente aquecido a 100°C por mais 5 minutos. Após o resfriamento novamente, foi adicionado 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio e agitado por 30 segundos e então, adicionados 2 mL de isoctano e agitados novamente por 30 segundos. A solução foi refrigerada por 24 horas para separação de fases, na qual a fase superior, que continha os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foi recolhida para análise cromatográfica.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram separados em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao detector de ionização em chama (CG-DIC). As condições cromatográficas de trabalho foram as seguintes, as vazões dos gases foram de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para o gás de arraste (H_2); 30 mL min^{-1} para o gás auxiliar (N_2) e 35 e 350 mL min^{-1} para o H_2 e para o ar sintético da chama, respectivamente, para a chama do detector. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente de 200°C e 240°C . Os analitos foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida CP -7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e $0,25 \mu\text{m}$ de cianopropil) de acordo com Martin et al., (2008). A temperatura da coluna foi programada a 165°C durante 7 minutos, seguido por uma rampa de aquecimento de 4°C min^{-1} até atingir 185°C , permanecendo assim por 3 minutos, seguindo de uma segunda rampa de aquecimento de 6°C min^{-1} até a temperatura de 235°C , permanecendo por mais 3,67 minutos, totalizando 27 minutos de análise. As injeções foram realizadas em triplicatas e os volumes de injeção foram de 2 μL .

As identificações dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foram realizadas pela comparação dos tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos (padrão 189-19).

Para a quantificação foi realizada segundo descrito por Visentainer (2012). A quantidade de ácidos graxos foi calculada usando a Equação 5 e os resultados foram apresentados em mg g⁻¹ de lipídio.

$$M_x = \frac{A_x M_p F_{CT}}{A_p M_A F_{CEA}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

M_x = mg de ácido graxo por g de lipídios totais;

A_x = área do pico dos ácidos graxos;

A_p = área do padrão interno;

M_p = massa (mg) de 23:0 adicionado;

M_A = massa (g) de lipídio;

F_{CT} = fator de correção teórico;

F_{CEA} = fator de conversão éster metílico para ácido graxo.

4.6 Extração dos antioxidantes das partes das frutas

A extração foi realizada segundo Santos et al. (2011). As amostras foram previamente trituradas em um processador de alimentos. Em um béquer foi pesado 2 gramas de cada parte da fruta *in natura* e transferidos 20 mL de metanol. O procedimento de extração foi realizado ao abrigo da luz sob agitação magnética durante 2 horas a 25°C. Posteriormente o extrato foi centrifugado por 10 minutos em 4000 rpm, para a remoção dos resíduos sólidos. O sobrenadante foi retirado e empregado nas análises subsequentes.

4.7 Determinação de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Soluções metanólicas dos extratos foram preparadas e 250 µL destas soluções foram transferidos para tubos de ensaio, nos quais também foram adicionados 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:1, v/v), 500 µL de uma solução saturada de Na₂CO₃ e 4,0 mL de água destilada. As soluções foram incubadas no escuro por 25 minutos, centrifugadas por 10

minutos a 1000 rpm e a absorvância foi medida no comprimento de onda de 725 nm empregando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg de equivalente ácido gálico (EAG) g^{-1} de amostra fresca, sendo calculado pela equação da reta obtida a partir da curva de calibração com o padrão ácido gálico ($y = 0,00559x + 0,00791$, $r^2 = 0,9996$).

4.8 Capacidade antioxidante determinada por DPPH•

O ensaio envolvendo a captura do radical livre DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilidrazil) foi realizado de acordo com Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações (Ma et al., 2011). Alíquotas de 25 μ L de solução dos extratos em metanol foram adicionadas com 2,0 mL de uma solução metanólica de $6,25 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} do radical livre DPPH•. A solução foi deixada no escuro por 30 minutos e em seguida a absorvância foi medida em 517 nm. Soluções metanólicas de Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) em diferentes concentrações foram utilizadas para a construção da curva de calibração ($y = -0,000254333x + 0,69784$, $r^2 = 0,9944$). Os resultados foram expressos em μ mol de equivalente Trolox (ET) g^{-1} de amostra.

4.9 Capacidade antioxidante determinada por ABTS^{•+}

O ensaio envolvendo a captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) foi realizado de acordo com Rufino et al. (2010). O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL de solução estoque de ABTS^{•+} (7 mmol L^{-1}) com 88 μ L de solução estoque de persulfato de potássio (140 mmol L^{-1}). Manteve-se a solução no escuro, sob refrigeração por 16 horas antes do uso. Posteriormente, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até obtenção de um valor de absorvância de $0,700 \pm 0,005$ no comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas de 30 μ L de solução dos diferentes extratos foram adicionadas a 3,0 mL da solução diluída de ABTS^{•+}. A solução foi mantida ao abrigo da luz por 6 minutos e em seguida a absorvância foi medida em 734 nm. Soluções etanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a construção da curva de calibração ($y = -0,000272467x + 0,69228$,

$r^2=0,9957$), sendo a capacidade antioxidante expressa em μmol de equivalente Trolox (ET) g^{-1} de amostra.

4.10 Capacidade antioxidante determinada pelo poder de redução – FRAP

A análise do poder de redução pelo método FRAP foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996). Inicialmente, preparou-se o reagente FRAP a partir de uma solução tampão acetato (acetato de sódio e ácido acético 300 mmol L^{-1} , pH 3,6), uma solução de TPTZ (tripiridiltriazina 10 mmol L^{-1} em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl) e uma solução de FeCl_3 (20 mmol L^{-1}) na proporção de 10:1:1 (v/v/v) respectivamente. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, a 37°C e a leitura inicial da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 593 nm , empregando-se $3,0 \text{ mL}$ do reagente FRAP adicionado de $400 \mu\text{L}$ de água destilada. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ da solução do extrato das partes das frutas foram transferidos para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de água destilada e $3,0 \text{ mL}$ do reagente FRAP. A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 30 minutos. Foi utilizado padrão de Trolox para a construção da curva de calibração ($y = 0,0013x + 0,01161$, $r^2=0,9996$). Os resultados foram expressos em μmol de equivalente Trolox (ET) g^{-1} de amostra.

4.11 Capacidade antioxidante pelo radical oxigênio – ORAC

A análise da capacidade antioxidante pelo método ORAC foi realizada de acordo com Zulueta et al. (2009). Uma solução estoque de fluoresceína ($1,03 \text{ mmol L}^{-1}$) preparada em solução tampão fosfato (fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico, 75 mmol L^{-1} , pH= 7,00) foi empregada para obtenção da solução de trabalho. Os extratos das amostras foram diluídos em solução tampão fosfato e $25 \mu\text{L}$ destas soluções foram transferidas para poços de microplacas, as quais foram adicionados $150 \mu\text{L}$ da fluoresceína e deixadas em repouso a 37°C por um período de 5 minutos antes de serem adicionados $25 \mu\text{L}$ de AAPH ((dicloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)) para dar início a leitura. O preparo do branco foi realizado de forma semelhante, porém foram adicionados $25 \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato em substituição ao extrato das amostras. A leitura da fluorescência foi realizada em um fluorímetro com filtros de fluorescência para excitação no comprimento de onda de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 535 nm . Soluções de Trolox em

diferentes concentrações foram utilizadas para a construção da curva de calibração ($y=0,3635x + 0,8517$ $r^2=0,9997$). Os resultados foram expressos em μmol de equivalente Trolox (ET) g^{-1} de amostra.

4.12 Otimização do método de extração de compostos fenólicos da casca da calabura

Para manutenção das características de matérias primas com alto teor de umidade, como frutas, diferentes processos de secagem têm sido utilizados. No entanto, alguns processos de secagem são realizados em altas temperaturas, o que pode afetar o conteúdo da matéria-prima, como os compostos antioxidantes (Chang, et al., 2006; Henriquez, et al., 2012). A fim de assegurar as características da matéria prima, autores têm sugerido a liofilização, o qual é um processo de secagem que não utiliza altas temperaturas (Henriquez et al., 2012; Alberti et al., 2014; Moo-Huchin et al., 2015). Logo, a casca da calabura foi submetida ao processo de secagem por liofilização antes do processo de extração.

Diferentes procedimentos de extração líquido-sólido foram empregados na casca de calabura liofilizada, nos quais foi avaliado o melhor solvente de extração, acetato de etila, etanol/água (80:20 v/v), metanol/água (80:20 v/v) e metanol/água acidificada (80:20 v/v), sendo que a proporção entre os solventes foi estabelecida de acordo com Robles-Sanchez et al. (2011) e Moo-Huchin et al. (2014). Também foi avaliada a melhor técnica de extração (extração assistida por ultrassom e extração por agitação magnética), de acordo com Bucic-Kojić et al. (2011) e Peralbo-Molina et al. (2012).

Foram realizados cinco procedimentos de extração, na Extração I foi utilizado como solvente o acetato de etila, no procedimento de Extração II foi utilizada a combinação dos solventes etanol/água (80:20 v/v), na Extração III os solventes utilizados foram metanol/água (80:20 v/v) e na Extração IV foi utilizada uma combinação de metanol/água (80:20 v/v) com água acidificada com ácido fosfórico (pH= 3,00), e todas as extrações foram realizadas por agitação magnética. A Extração V também foi realizada com uma combinação dos solventes metanol/água (80:20 v/v), porém, a extração foi realizada por agitação assistida em banho ultrassônico.

Para cada procedimento de extração foi pesado 1 grama da casca liofilizada em um béquer e foram adicionados 6 mL do solvente. O processo de extração foi realizado durante 30 minutos quando foi utilizada a agitação magnética e durante 10 minutos

quando foi utilizada a agitação assistida em banho ultrassônico. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, e o sobrenadante foi separado e recolhido, e o resíduo sólido da amostra foi submetido a mais duas etapas de extração nessas mesmas condições. Ao final os sobrenadantes recolhidos das três etapas foram combinados e os solventes foram removidos por um rotaevaporador com pressão reduzida a uma temperatura de 35°C. O extrato seco obtido foi ressuspendido em 4 mL de metanol, do qual foi retirado uma alíquota de 1 mL e diluído para volume final de 10 mL em metanol para análise cromatográfica.

4.13 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE- DAD)

A análise cromatográfica foi realizada por CLAE-DAD. Foram preparadas soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de cada um dos compostos fenólicos, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e miricetina, em metanol, solvente o qual os compostos fenólicos tem boa solubilidade. Estas soluções foram armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração. A partir dessas soluções foram realizadas diluições necessárias para preparar as soluções de trabalho.

Para a otimização da separação cromatográfica dos compostos fenólicos estudados, foram testadas as seguintes condições, eluição no modo isocrático e no modo gradiente, solventes e vazão da fase móvel e a temperatura da coluna.

Os solventes utilizados como fase móvel, tanto o orgânico como a água foram filtrados em um sistema de filtração apropriado empregando filtros de membrana de 0,45 µm, e submetidos ao banho ultrassônico para degaseificação dos solventes. Para a preparação da fase aquosa, o pH foi ajustado para pH 3,00 utilizando uma solução de ácido fosfórico e pHmetro previamente calibrado.

As condições de separação foram definidas e a confirmação dos compostos fenólicos foi realizada pela injeção individual de cada composto obtendo o tempo de retenção (t_R) e o espectro de absorção na faixa de comprimento de onda do Ultravioleta - Visível (UV-Vis) fornecido pelo detector de arranjo por diodos (DAD) e comparados com os resultados obtidos a partir da análise das soluções padrão dos compostos fenólicos nas mesmas condições.

As condições de trabalho utilizadas foram as seguintes, os analitos foram separados em uma coluna C18ec (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) Maecherey-Nagel em uma vazão de 1

mL min⁻¹ usando água acidificada com ácido fosfórico (pH=3,00) como fase móvel A e a fase móvel B constituída por metanol. A eluição foi realizada em modo gradiente, com a seguinte programação 0-2 minutos (30% B), 2-3 min (30-60% B), 3-5 min (60% B), 5-6 min (60-50% B), 6-9 min (50% B), 9-10 min (50-30% B), 10-12 min (30% B). O volume de injeção foi de 5 µL, a temperatura da coluna foi de 30°C, e a detecção foi realizada no comprimento de onda máximo de cada composto e os espectros foram registrados na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. O comprimento de onda de 280 nm foi escolhido para apresentação dos cromatogramas, no qual todos os compostos fenólicos estudados apresentam absorvância.

Os compostos fenólicos foram identificados pela comparação do tempo de retenção e do espectro de UV-Vis fornecidos pelo DAD dos compostos no extrato da amostra com os tempos de retenção e espectro de UV-Vis fornecidos pelo DAD das soluções padrões dos compostos. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de adição padrão, sendo os resultados expressos em mg kg⁻¹.

4.14 Aplicação da metodologia

Após a validação da metodologia foram analisadas duas amostras da casca da calabura colhidas em anos diferentes (2013 e 2014) para avaliação do método desenvolvido.

4.15 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com 95% de confiança, e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey, através do programa Statistica 8.0[®], submetidos também a análise de correlação de Pearson pelo programa Microsoft Office Excel[®] e a análise da componente principal (PCA) pelo programa Matlab[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas

A composição proximal das frutas calabura, bacupari e da uva japonesa está apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição proximal (%) das frutas calabura, bacupari e uva japonesa *in natura*.

Composição Proximal		Calabura*	Bacupari	Uva Japonesa**
Umidade	Polpa	76,14 ^{aA} ±0,34	86,10 ^{aA} ±0,23	53,23 ^{bA} ±0,96
	Semente	-	41,22 ^{bC} ±0,73	13,95 ^{bB} ±0,07
	Casca	72,75 ^{bB} ±0,13	82,37 ^{aB} ±0,81	-
Cinzas	Polpa	0,83 ^{bB} ±0,01	0,15 ^{bC} ±0,01	1,44 ^{aB} ±0,02
	Semente	-	1,16 ^{aA} ±0,02	2,63 ^{aA} ±0,02
	Casca	1,95 ^{aA} ±0,02	0,45 ^{bB} ±0,02	-
Proteína Bruta	Polpa	2,04 ^{aA} ±0,32	0,69 ^{bB} ±0,01	2,07 ^{aB} ±0,02
	Semente	-	2,34 ^{bA} ±0,10	16,36 ^{aA} ±0,69
	Casca	1,73 ^{aA} ±0,02	0,76 ^{bB} ±0,08	-
Lipídios	Polpa	0,13 ^{bB} ±0,02	0,76 ^{aC} ±0,07	0,40 ^{bB} ±0,05
	Semente	-	4,65 ^{aA} ±0,37	4,05 ^{aA} ±0,02
	Casca	0,78 ^{bA} ±0,30	1,23 ^{aB} ±0,25	-

Média ± desvio padrão (n=3). *Parte comestível: Polpa e Semente. **Parte comestível: Casca e Polpa. Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna e letras minúsculas apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey na mesma linha (p<0,05).

A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição (Borges et al., 2010). Nota-se que entre as partes das frutas analisadas, as sementes apresentaram os menores teores de umidade, que foram de 13,95% para a uva japonesa e de 41,22% para a semente de bacupari, enquanto que as polpas apresentaram valores que variaram de 53,23% a 86,10% para a polpa de uva japonesa e para a polpa de bacupari respectivamente, e as cascas apresentaram teores de umidade que variaram de 72,75% para a casca de calabura a 82,37% para casca de bacupari. Esses valores indicam que a casca e a polpa são mais susceptíveis a degradação que a semente, devido aos altos teores de umidade observados. Pande e Akoh (2010) analisaram as partes das frutas nêpera, cereja do mato, mamão e figo, e neste estudo as sementes das frutas também foram as partes que apresentaram menores porcentagens de umidade com

valores na faixa de 30 a 60%, e as polpas e as cascas foram as partes que apresentaram os maiores teores de umidade com valores semelhantes aos das frutas analisadas neste trabalho, que foram na faixa de 70 a 90%.

Cinzas é o nome dado ao resíduo inorgânico da matéria obtido da queima do material orgânico, em outras palavras, cinzas é a quantidade total de minerais presentes nos alimentos (Cecchi, 2003). Com relação aos teores de cinzas encontrados nas partes das frutas analisadas, a polpa e a casca de bacupari apresentaram os menores teores que foram de 0,15 e 0,45%, respectivamente. Enquanto que os maiores teores de cinzas foram verificados na casca da calabura, 1,95%, e na semente da uva japonesa que apresentou teor de 2,63%.

Em estudo realizado por Marques et al. (2010) o teor de cinzas encontrado para a polpa de manga foi de 0,34%. Pode-se verificar que o teor de cinzas na polpa de bacupari foi inferior ao reportado na literatura, enquanto que os teores de cinzas da polpa da calabura e da polpa da uva japonesa foram superiores. Gondin et al. (2005) analisaram o teor de cinzas em casca de sete frutas, sendo estas, abacate, abacaxi, banana, mamão, maracujá, melão e tangerina, relatando valores que variaram na faixa de 0,57 a 1,75% para a casca de maracujá e tangerina, respectivamente. Com relação aos teores de cinzas obtidos neste trabalho para as cascas, o teor de cinzas da casca de bacupari foi inferior aos teores de cinzas das cascas de frutas analisadas por Gondin et al. (2005). Com relação ao teor de cinzas das sementes, os valores obtidos neste trabalho foram superiores ao relatado por Jorge et al. (2009) que obteve 1,47% para semente de maracujá.

A ingestão de proteína é de importância vital para o ser humano, tanto que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) recomenda que a ingestão diária de proteínas para um indivíduo adulto seja de 50 gramas. O teor de proteína bruta das partes das frutas analisadas variou de 0,69 a 16,36%, sendo que a polpa e a casca de bacupari apresentaram os menores valores, 0,69 e 0,79%, respectivamente, enquanto que a semente da uva japonesa apresentou o maior teor de proteína, 16,36%. As demais partes, polpa e casca da calabura, semente da bacupari e polpa da uva japonesa apresentaram teores de aproximadamente 2%. Almeida et al. (2013) apresentaram dados de quantidades proteicas de alguns produtos cárneos e produtos de origem vegetal. A quantidade de proteína em produtos cárneos variou de 23 a 27 g 100g⁻¹, para carne de peixe cozida e carne de boi cozida, respectivamente, enquanto que produtos de origem vegetal apresentaram valores de 0,21 g 100g⁻¹ para maçã *in natura* e de 17 g 100g⁻¹ de

soja *in natura*. Em geral os produtos de origem vegetal são mais pobres em conteúdo proteico que os de origem animal, porém a soja, por exemplo, é considerada uma boa fonte proteica vegetal, devido a alta quantidade de proteína. Nota-se que o valor de proteína bruta encontrado para a semente de uva japonesa (16,36%) é bem próximo ao apresentado por Almeida et al. (2013) para a soja, assim pode-se considerar a semente de uva japonesa como uma fonte proteica tão boa quanto a soja.

Os lipídios são fontes energéticas, atuam no organismo em diversas funções e, além disso, os lipídios de origem vegetal em geral, são ricos em ácidos graxos essenciais, os quais apresentam efeitos benéficos para a saúde do consumidor (Ribeiro et al., 2013). As quantidades de lipídios geralmente são baixas em partes de frutas, como casca e polpa, podendo ser encontrados em maiores quantidades nas sementes (Somerville et al., 2000). Foram avaliados os teores lipídicos nas partes das frutas, uva japonesa, bacupari e calabura. Os valores obtidos foram de 0,13% e 4,65%, para parte comestível da calabura e para semente do bacupari, respectivamente. Roesler et al. (2007) reportaram os teores lipídicos das sementes de quatro frutas, sendo estas, banha de galinha, cagaita, lobeira e araticum, com valores de 0,45, 0,49, 3,73 e 15,91%, respectivamente. A partir dos resultados publicados pode-se verificar que os teores de lipídios encontrados para as sementes das frutas analisadas nesse trabalho foram superiores as sementes da banha de galinha, cagaita e lobeira e inferiores a semente do araticum.

5.2 Análise de minerais

Seis minerais foram determinados nas diferentes partes das frutas, Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn), Magnésio (Mg) e Sódio (Na), e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Os níveis de Ingestão Diária Recomendada (IDR) dos minerais analisados para adultos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) são de 900 mg dia⁻¹, 14 mg dia⁻¹, 2,3 mg dia⁻¹, 7 mg dia⁻¹, 260 mg dia⁻¹, e de 2000 mg dia⁻¹ para o Cu, Fe, Mn, Zn, Mg e Na, respectivamente. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar que as frutas analisadas possuem quantidades de minerais significativas, e porções dessas frutas incluídas na dieta alimentar podem ser aliadas na suplementação desses minerais no organismo humano.

Quando comparadas separadamente as partes das frutas em relação à quantidade de minerais analisados, pode-se verificar na Tabela 2, que entre as polpas, a polpa de uva japonesa apresentou maiores quantidades, entre as sementes, a semente da uva japonesa e dentre as cascas, a casca da calabura apresentou as maiores quantidades. Comparando os teores de cinzas, apresentados na Tabela 1, com a quantidade de minerais analisados, pode-se verificar a forte relação entre os valores obtidos, pois as partes que apresentaram os maiores teores de cinzas também apresentaram as maiores quantidades de minerais.

Tabela 2. Quantidade de minerais (mg Kg⁻¹) nas partes das frutas calabura, bacupari e uva japonesa *in natura*.

Minerais		Calabura	Bacupari	Uva Japonesa
Cu	Polpa	3,28 ^{bB} ±0,33	1,46 ^{bB} ±0,48	4,02 ^{aB} ±0,23
	Semente	-	7,11 ^{aA} ±0,39	11,67 ^{aA} ±0,16
	Casca	6,11 ^{aA} ±0,73	1,73 ^{bB} ±0,54	-
Fe	Polpa	6,80 ^{aB} ±1,41	1,94 ^{bB} ±0,71	24,49 ^{aB} ±2,37
	Semente	-	5,36 ^{bA} ±0,55	58,77 ^{aA} ±4,71
	Casca	10,54 ^{bA} ±2,24	3,29 ^{cB} ±0,41	-
Mn	Polpa	4,21 ^{aB} ±0,06	4,98 ^{aC} ±1,77	4,12 ^{bB} ±0,40
	Semente	-	19,61 ^{bA} ±2,50	24,10 ^{aA} ±0,86
	Casca	5,73 ^{bA} ±0,19	9,61 ^{aB} ±1,25	-
Zn	Polpa	3,47 ^{aA} ±0,38	2,28 ^{bB} ±1,78	1,23 ^{aB} ±0,05
	Semente	-	5,19 ^{bA} ±0,46	6,50 ^{aA} ±0,26
	Casca	3,43 ^{aA} ±0,14	2,32 ^{aB} ±0,13	-
Mg	Polpa	226,91 ^{aB} ±13,44	55,77 ^{bC} ±8,48	227,28 ^{aB} ±18,51
	Semente	-	257,83 ^{bA} ±5,52	915,25 ^{aA} ±48,23
	Casca	259,46 ^{aA} ±5,38	90,08 ^{bB} ±5,01	-
Na	Polpa	54,96 ^{aB} ±9,26	17,45 ^{bB} ±2,20	59,78 ^{bB} ±7,45
	Semente	-	70,92 ^{bA} ±9,41	104,15 ^{aA} ±6,69
	Casca	160,88 ^{aA} ±74,05	62,17 ^{bA} ±4,89	-

Média ± desvio padrão (n=3). *Parte comestível: Polpa e Semente. **Parte comestível: Casca e Polpa. Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna e letras minúsculas apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey na mesma linha (p<0,05).

Gondin et al. (2005) analisaram os mesmos minerais, exceto o manganês, em cascas e polpas de sete frutas, abacate, abacaxi, banana, mamão, maracujá, melão e tangerina. A partir dos resultados publicados, pode-se verificar que os valores encontrados para as frutas analisadas nesse trabalho foram semelhantes aos valores encontrados por Gondin et al.,

(2005), sendo que as cascas também apresentaram quantidade de nutrientes superiores aos valores encontrados nas polpas.

A suplementação de nutrientes na alimentação é primordial para a saúde humana e os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 mostram que as partes das frutas que normalmente são descartadas, como as cascas e as sementes, em geral possuem maiores teores de proteína bruta e maiores quantidades de minerais do que a parte tradicionalmente consumida. Assim pode-se destacar a importância do aproveitamento integral dos alimentos (casca, polpa e semente) para aumentar a qualidade nutricional da alimentação e, além disso, diminuir o desperdício dos alimentos.

5.3 Identificação e quantificação de ácidos graxos nas sementes das frutas

A ingestão de alimentos que contenham ácidos graxos da família ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3) em sua composição é essencial para a nutrição humana (Martin et al., 2006; Perini et al., 2010). Uma vez que os seres humanos não são capazes de sintetizar esses ácidos graxos, devemos encontrar fontes como vegetais e frutas em que estes ácidos graxos estejam presentes (Martin et al., 2006; Perini et al., 2010).

Após a ingestão dos ácidos graxos linoléico (LA, 18:2n-6) e alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), estes competem pelas mesmas enzimas envolvidas em reações importantes para nosso organismo como, a formação de outros ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e muito longa (Perini et al., 2010), redução de doenças cardiovasculares (Scoditti et al., 2014), efeitos anti-inflamatórios, redução do risco de doenças crônicas neurodegenerativas (Youdim et al., 2000) como o mal de Alzheimer (Tully et al., 2003), benefícios à gravidez e a saúde materno-infantil (Dunstan et al., 2004).

Devido aos ácidos graxos da família n-6 e n-3 competirem pelas mesmas enzimas, o excesso de componentes de uma determinada família de ácidos graxos pode interferir no metabolismo dos ácidos graxos da outra família (Martin et al., 2006; Perini et al., 2010). Com isso, há uma necessidade no equilíbrio da ingestão dos ácidos graxos da família n-6 e n-3, e recentemente tem sido recomendado que a razão de 1:1 até 2:1 na ingestão dos ácidos graxos n-6/n-3 (Simopoulos, 2011).

Outro ácido graxo importante na dieta humana é o ácido graxo monoinsaturado da família ômega 9 (n-9), o ácido oléico (18:1n-9), importante para o cérebro, pois compõe a bainha de mielina (Bourre, 2004).

Foi investigada a composição em ácidos graxos das sementes do bacupari e da uva japonesa, por terem sido as partes das frutas que apresentaram as quantidades maiores de lipídios totais, como apresentado na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos a partir da injeção das amostras da semente do bacupari e uva japonesa estão apresentados nas Figuras 14B e 14C, respectivamente. A identificação foi realizada por comparação do tempo de retenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) do padrão 189-19 (Figura 14A) e os resultados dos ácidos graxos quantificados estão apresentados na Figura 15.

A partir dos resultados da quantificação dos ácidos graxos apresentados na Figura 15 e da análise dos cromatogramas apresentados na Figura 14, pode-se verificar que os ácidos graxos majoritários observados na semente do bacupari foram o ácido palmítico (16:0) e o ácido oléico (18:1n-9), com quantidades de 65,33 e 84,75 mg g⁻¹ de lipídios totais, respectivamente. Para semente da uva japonesa os ácidos graxos majoritários foram o ácido oléico (18:1n-9), ácido linoléico (LA,18:2n-6) e ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), com valores de 165,60, 127,91 e 280,39 mg g⁻¹ de lipídios totais, respectivamente.

Comparando-se os valores dos ácidos graxos quantificados nas sementes, pode-se verificar que a semente da uva japonesa apresentou quantidades superiores de ácidos graxos em sua composição, com exceção ao ácido palmítico (16:0) e ao ácido palmitoléico (16:1n-7), que foram superiores na semente do bacupari.

Com relação à razão entre os ácidos graxos da família n-6 e da família n-3, as sementes do bacupari e da uva japonesa apresentaram razão de 2,49 e 0,45, respectivamente. Estes valores estão próximos ao recomendado por Simopoulos (2011) que estabelece que essa razão seja de 1:1 até 2:1.

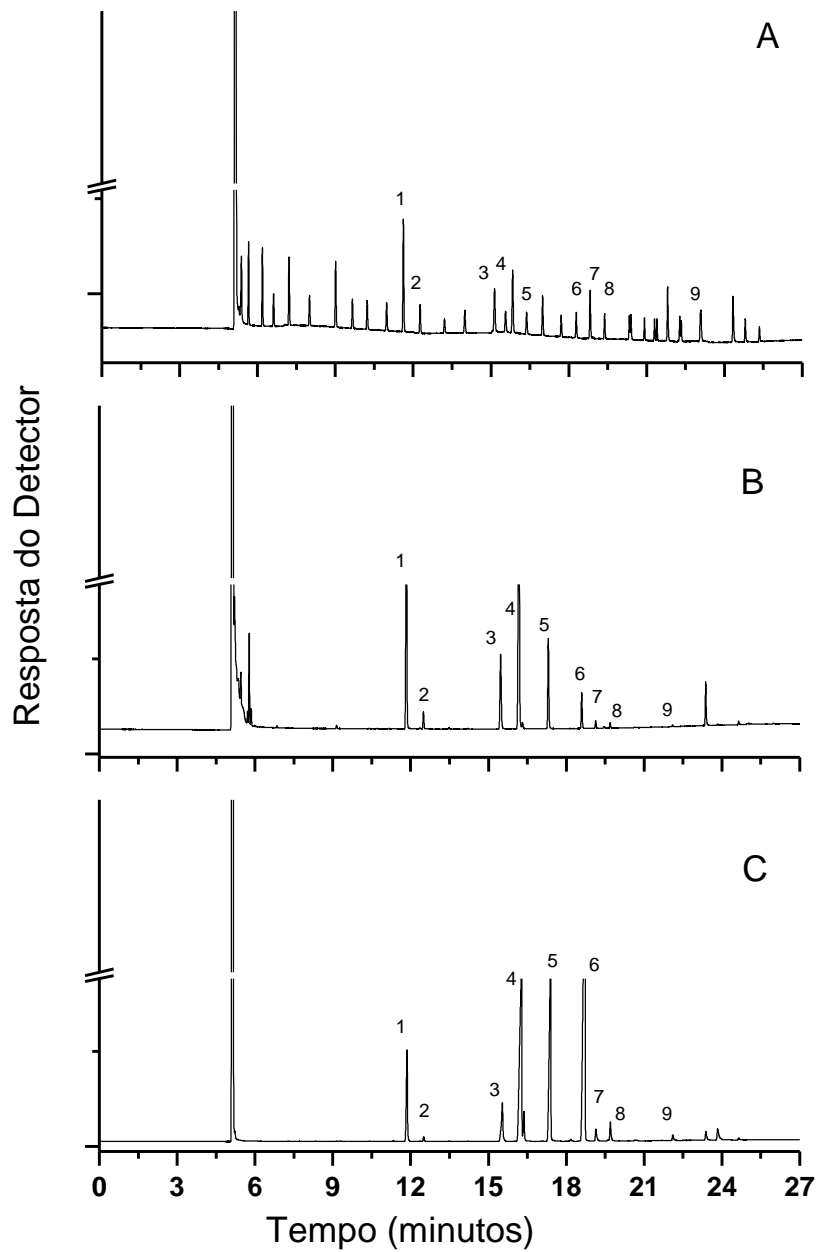


Figura 14. Representação do cromatogramas A) Padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, B) Semente do bacupari, C) Semente da uva japonesa. Condições cromatográficas conforme item 4.5. Identificação dos Compostos: 1- 16:0, 2- 16:1n-7, 3- 18:0, 4- 18:1n-9, 5- 18:1n-7, 6- 18:3n-6, 7- 18:3n-3, 8- 20:0, 9- 23:0.

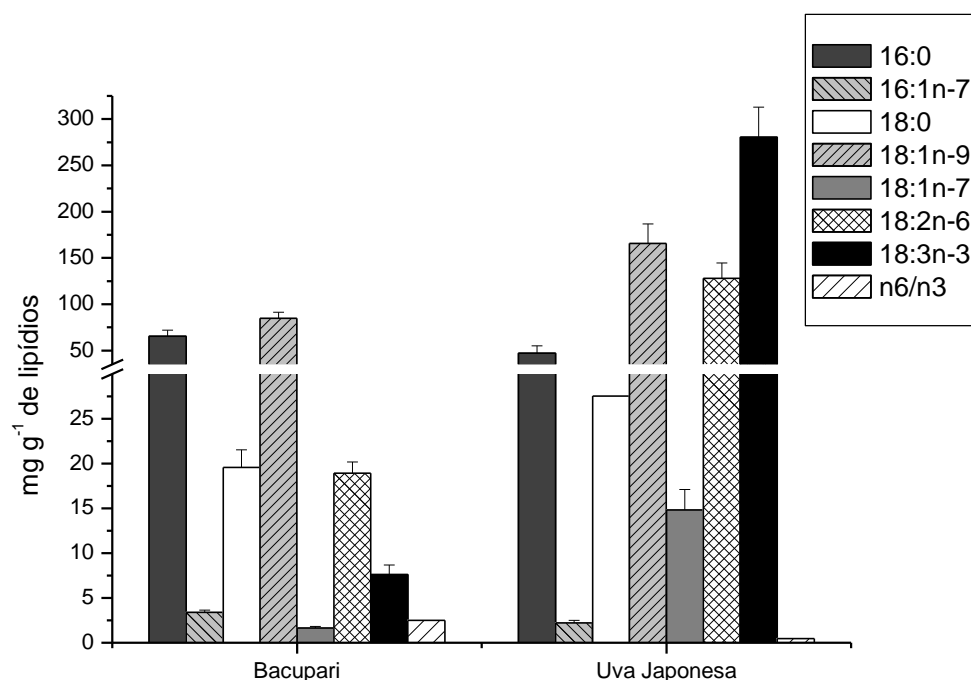


Figura 15. Composição em ácidos graxos (mg g⁻¹ de lipídios totais) das sementes do bacupari e da uva japonesa.

Lutterodt et al. (2011) analisaram a composição em ácidos graxos de sementes de uvas (chardonnay, muscadine, rubi e concórdia) reportando valores de 0,1, 0,7 e 0,4 mg g⁻¹ de lipídios totais de ácido oleico (18:1n-9), ácido linoléico (LA,18:2n-6) e ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), respectivamente. Fazio et al. (2013) analisaram a composição em ácidos graxos de sementes de frutos silvestres (*Rubus ulmifolius* S. e *Sambucus nigra* L.) reportando valores para o ácido oleico, ácido linoléico e ácido alfa-linolênico de 0,62, 0,13 e 0,70 mg g⁻¹ de lipídios totais, respectivamente. A partir dos valores obtidos nesse trabalho, pode-se verificar que as sementes do bacupari e da uva japonesa apresentaram quantidades maiores dos ácidos oleico, linoléico e alfa-linolênico que as sementes estudadas por Lutterodt et al. (2011) e Fazio et al. (2013).

As sementes de frutas geralmente são partes descartadas dos alimentos. A partir dos valores obtidos de composição em ácidos graxos das sementes do bacupari e da uva japonesa, é possível perceber o potencial nutritivo que essas sementes possuem com relação a sua composição em ácidos graxos. Logo, o consumo dessas sementes associada a uma dieta e hábitos saudáveis pode trazer benefícios à saúde humana.

5.4 Atividade antioxidante das partes das frutas

Os resultados obtidos de teor de compostos fenólicos totais (FT) e de capacidade antioxidante das diferentes partes das frutas analisadas estão apresentados na Tabela 3. Pode-se verificar que os valores de teor de FT obtidos para as diferentes partes das frutas analisadas variaram de 0,97 a 18,21 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca, sendo que a polpa de bacupari apresentou o menor valor e a semente da uva japonesa apresentou o maior. Vasco et al. (2008) classificou as frutas em três categorias com relação a quantidade de FT. Quantidades menores que 1 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca foram classificadas como frutas com baixo teor de compostos fenólicos, quantidades maiores que 1 mgEAG g⁻¹ e menores que 5 mgEAG g⁻¹ foram classificadas como valores médios e quantidades maiores que 5 mgEAG g⁻¹ são consideradas frutas com altos teores de compostos fenólicos. Conforme a classificação estabelecida por Vasco et al. (2008) a polpa de bacupari pode ser considerada como parte da fruta com baixo teor de FT, pois apresenta valor abaixo de 1 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca. A casca do bacupari e a polpa da calabura podem ser classificadas como parte das frutas com quantidades médias de FT, pois apresentam valores na faixa de 2,83 e 3,16 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca. A casca da calabura, a semente do bacupari, a semente e a polpa da uva japonesa, podem ser classificadas como partes das frutas que apresentam altas quantidades de FT, uma vez que apresentam quantidades de 5,38, 7,97, 10,21 e 18,21 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca, respectivamente.

A atividade antioxidante das partes das frutas foi avaliada por quatro metodologias (DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. A polpa do bacupari apresentou os menores valores de atividade antioxidante em todas as metodologias empregadas, assim como também apresentou a menor quantidade de FT entre as frutas analisadas. A polpa da uva japonesa apresentou os maiores valores de atividade antioxidante em todos os ensaios avaliados e também apresentou a maior quantidade de FT. As outras partes das frutas apresentaram valores intermediários de fenólicos totais e atividade antioxidante em todos os ensaios.

Tabela 3. Teor de fenólicos totais (FT) e capacidade antioxidante das diferentes partes das frutas.

		Calabura*	Bacupari	Uva Japonesa**
FT (mgEAG g ⁻¹)	Polpa	3,16 ^{bB} ±0,02	0,97 ^{cC} ±0,02	18,21 ^{aA} ±1,63
	Semente	-	10,11 ^{aA} ±0,46	7,97 ^{bB} ±0,36
	Casca	5,38 ^{aA} ±0,10	2,83 ^{bB} ±0,07	-
DPPH' (µmolET g ⁻¹)	Polpa	28,03 ^{bB} ±6,83	6,29 ^{cC} ±0,11	169,45 ^{aA} ±12,15
	Semente	-	144,66 ^{aA} ±10,39	86,43 ^{bB} ±7,35
	Casca	59,58 ^{aA} ±1,68	34,78 ^{bB} ±1,01	-
FRAP (µmolET g ⁻¹)	Polpa	30,88 ^{bA} ±2,77	6,47 ^{cC} ±0,36	209,62 ^{aA} ±6,25
	Semente	-	56,79 ^{bA} ±0,66	100,46 ^{aB} ±4,66
	Casca	68,62 ^{aA} ±3,53	20,22 ^{bB} ±0,36	-
ABTS⁺ (µmolET g ⁻¹)	Polpa	27,29 ^{bA} ±1,71	6,79 ^{cB} ±0,26	131,37 ^{aA} ±19,65
	Semente	-	108,44 ^{aA} ±21,72	96,44 ^{aB} ±4,95
	Casca	58,86 ^{aB} ±0,37	33,55 ^{bB} ±2,60	-
ORAC (µmolET g ⁻¹)	Polpa	22,34 ^{bB} ±3,54	8,32 ^{cC} ±0,88	146,57 ^{aA} ±9,37
	Semente	-	48,42 ^{aA} ±0,66	42,48 ^{aB} ±3,68
	Casca	31,82 ^{aA} ±4,69	18,34 ^{bB} ±0,49	-

Média ± desvio instrumental (n=3). *Parte comestível: Polpa e Semente. **Parte comestível: Casca e Polpa. Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna e letras minúsculas apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey na mesma linha (p<0,05).

Vasco et al. (2008) também classificou as frutas em três categorias com relação a atividade antioxidante. Frutas que apresentam valores de até 10 µmolET g⁻¹ de amostra fresca são consideradas frutas com atividade antioxidante baixa, as que apresentam valores na faixa de 10 µmolET g⁻¹ a 30 µmolET g⁻¹ de amostra fresca são consideradas frutas com atividade antioxidante média e as frutas que apresentam valores acima de 30 µmolET g⁻¹ de amostra fresca são consideradas amostras com atividade antioxidante alta. Conforme a classificação proposta por Vasco et al. (2008) a polpa do bacupari pode ser considerada como parte da fruta com baixa atividade antioxidante segundo todos os ensaios avaliados. A polpa da calabura e a casca do bacupari podem ser classificadas como parte da fruta com atividade antioxidante média segundo os ensaios de ABTS⁺ e ORAC, entretanto pelo ensaio de FRAP somente a casca do bacupari pode ser caracterizada como parte da fruta com atividade antioxidante média, e pelo ensaio de DPPH' somente a polpa da calabura pode ser classificada como parte da fruta com atividade antioxidante média. Considerando a classificação de Vasco et al. (2008) as partes das frutas com atividade antioxidante alta são a casca da calabura, a semente e a polpa da uva japonesa e a semente do bacupari por todos os ensaios empregados.

Thaipong et al. (2006) analisaram a atividade antioxidante e a composição de fenólicos totais de extratos metanólicos de quatro genótipos de goiaba pelas mesmas metodologias empregadas nesse trabalho. A quantidade de compostos fenólicos totais variou de 1,7 a 3,4 mgEAG g⁻¹ de amostra fresca, e a atividade antioxidante avaliada variou de 16,2 a 32,0 µmolET g⁻¹ de amostra fresca, de 15,5 a 33,3 µmolET g⁻¹ de amostra fresca, de 22,3 a 37,9 µmolET g⁻¹ de amostra fresca, e de 18,2 a 25,5 µmolET g⁻¹ de amostra fresca, para os ensaios de DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC, respectivamente. Comparando os resultados obtidos por Thaipong et al. (2006) com os valores apresentados na Tabela 3, pode-se verificar que as frutas analisadas nesse trabalho, em geral, apresentaram quantidades similares ou superiores de atividade antioxidante.

Contreras-Calderón et al. (2011) determinaram a quantidade de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de frutas exóticas da Colômbia, empregando os ensaios de Folin-Ciocalteu, ABTS^{•+} e FRAP. A partir dos resultados publicados pode-se verificar que os valores encontrados nesse trabalho foram semelhantes aos valores encontrados por Contreras-Calderón et al. (2011), sendo que as partes tradicionalmente não consumidas, como casca e semente, em geral, também apresentaram valores superiores de atividade antioxidante e maiores conteúdos de compostos fenólicos totais do que as polpas, que são as partes tradicionalmente consumidas das frutas.

5.4.1 Correlação de Pearson entre os ensaios antioxidantes

A Correlação de Pearson (r) mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. Os valores variam de -1 a 1, sendo que a intensidade deste valor reflete na força de relação entre as variáveis e o sinal indica a direção positiva ou negativa da relação (Figueiredo-Filho e Silva-Júnior, 2009). Para interpretação dos valores Dancey e Reidy (2006) apresentam uma classificação para força de r, em que r = 0,10 até 0,30 (fraco); r = 0,40 até 0,6 (moderado); r = 0,70 até 1 (forte).

Na Figura 16 estão apresentados os coeficientes da Correlação de Pearson das análises de antioxidantes das frutas analisadas. Segundo a classificação de Dancey e Reidy (2006), é possível afirmar que todos os ensaios de atividade antioxidante apresentaram uma forte correlação, uma vez que todas as combinações de variáveis apresentaram coeficientes superiores a 0,80. Estes resultados indicam que os compostos

fenólicos totais apresentam alta contribuição para a atividade antioxidante das frutas analisadas, e que houve uma forte correlação entre os diferentes ensaios de atividade antioxidante. Estudos como os de Almeida et al. 2011, Ma et al., 2011, Ribeiro et al., 2013 e Souza et al., 2014 reportam essa correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidantes pelos diferentes ensaios, bem como os resultados apresentaram forte correlação entre os diferentes ensaios de atividade antioxidante.

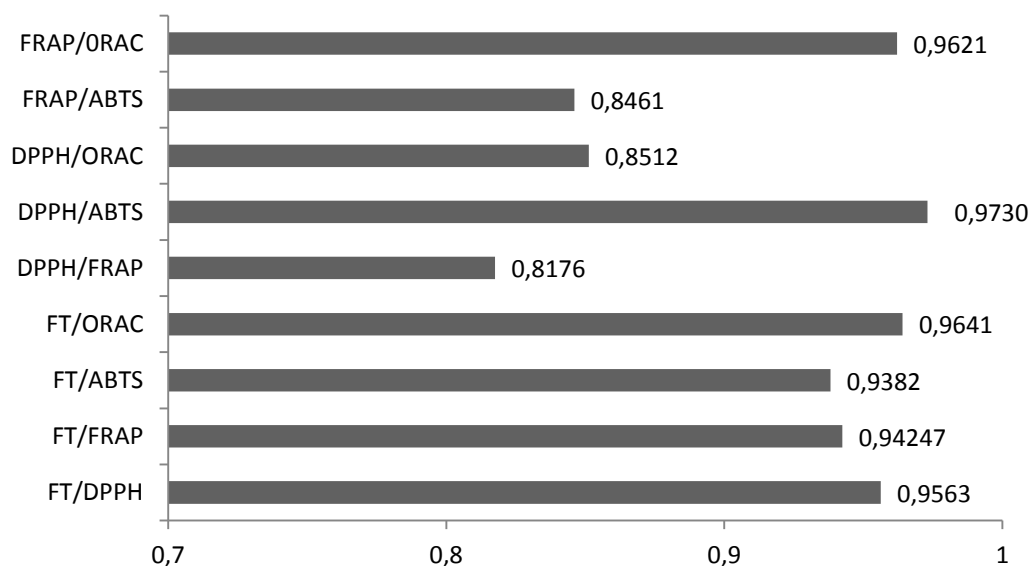


Figura 16. Coeficiente da Correlação de Pearson dos ensaios antioxidantes das diferentes partes das frutas analisadas.

5.5 Atividade antioxidante das diferentes extrações da casca da calabura

Partes tradicionalmente não consumidas de frutas geralmente são descartadas, como a casca de diversas frutas, porém os resultados neste trabalho, bem como outros da literatura já citados, mostram que essas partes podem apresentar compostos nutritivos. Desta forma, escolheu-se a casca da calabura para a realização de uma investigação mais avançada, a respeito do tipo e da quantidade de compostos antioxidantes presentes.

Foram avaliadas quantidades de compostos fenólicos totais (FT) extraídos e a atividade antioxidante da casca da calabura a partir de cinco procedimentos de extração diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17. Analisando-se os resultados apresentados na Figura 17 para a extração I que foi realizada com o solvente acetato de etila, que é um solvente com características apolares, pode-se verificar que foram obtidas as menores quantidades de FT e também a menor atividade antioxidante em

comparação com as extrações de II, III, IV e V, nas quais foram utilizadas combinações de solventes polares. Isso comprova que a polaridade do solvente aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos, facilitando a extração dos mesmos (Naczk e Shahidi, 2006).

Comparando-se os resultados apresentados na Figura 17 para quantidades de FT e atividade antioxidante para as extrações II, III, IV e V, nas quais foram empregadas combinação de solventes polares, pode-se verificar que os valores obtidos para os compostos fenólicos totais variaram de 20,92 $\mu\text{molET g}^{-1}$ a 25,07 $\mu\text{molET g}^{-1}$ e que os valores obtidos para os ensaios de avaliação de atividade antioxidante DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP foram similares para cada procedimento de extração. Somente os valores obtidos pela metodologia de ORAC foram diferentes para os procedimentos de extração.

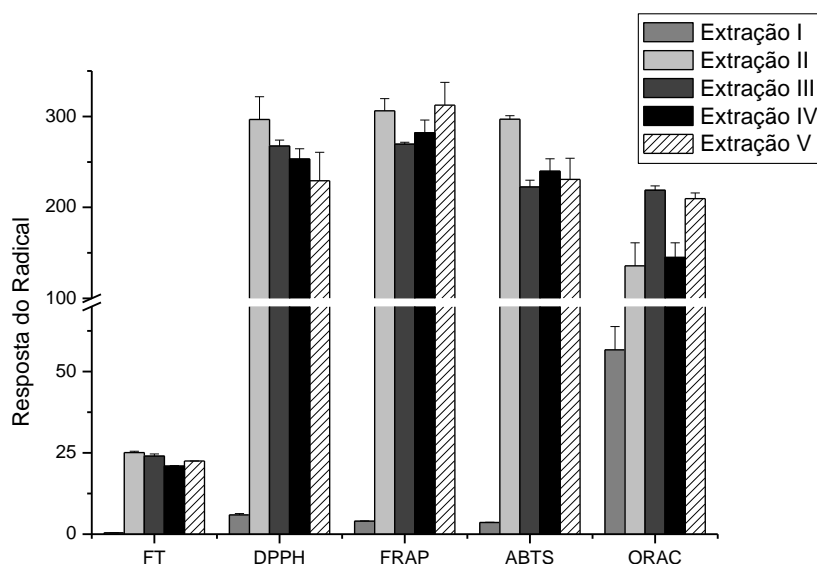


Figura 17. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante nas diferentes extrações dos compostos antioxidantes na casca da calabura liofilizada. I: Acetato de Etila, II: Etanol:Água (80:20 v/v), III: Metanol:Água (80:20 v/v), IV: Metanol:Água acidificada (80:20 v/v), V: Metanol:Água (80:20 v/v). I a IV por agitação magnética e V por ultrassom. Média dos valores \pm desvio padrão (n=3). FT: Expresso em mgEAG g^{-1} de amostra seca. DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC: Expresso em $\mu\text{molET g}^{-1}$ de amostra seca.

González-Montelongo et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante da casca de banana liofilizada pelos ensaios de DPPH[•] e ABTS^{•+}. Os valores obtidos para metodologia de DPPH foram de 0,4 e 3,4 $\mu\text{molET g}^{-1}$ de amostra seca para as extrações que utilizaram

etanol e metanol como solvente, respectivamente. Pela técnica de ABTS⁺ os resultados para as extrações com metanol e etanol foram iguais com valor de 13,5 $\mu\text{molET g}^{-1}$ de amostra seca.

Moo-Huchin et al. (2015) analisaram a quantidade de compostos fenólicos totais e avaliaram a atividade antioxidante pelos ensaios de ABTS⁺ e DPPH das cascas liofilizadas das frutas, caimito (*Chrysophyllum cainito* L.), caju amarelo e caju vermelho (*Anacardium occidentale*). Os valores obtidos de fenólicos totais variaram na faixa de 63,3 a 131 $\mu\text{molEAG g}^{-1}$, os valores de atividade antioxidante pela metodologia ABTS⁺ variaram de 305 a 332 $\mu\text{molET g}^{-1}$, enquanto que pelo ensaio de avaliação de atividade antioxidante de DPPH os valores variaram de 157 a 168 $\mu\text{molET g}^{-1}$.

Comparando-se com os resultados publicados na literatura, pode-se verificar que os valores encontrados nesse trabalho são superiores aos encontrados por González-Montelongo et al. (2010) para avaliação da atividade antioxidante por ABTS⁺ e DPPH, porém quando comparados com aos valores encontrados por Moo-Huchin et al. (2015) os valores obtidos nesse trabalho para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pela técnica de ABTS⁺ foram inferiores, mas pela metodologia de DPPH os valores foram superiores. As divergências verificadas entre as respostas das metodologias de avaliação da atividade antioxidante fortalecem as recomendações de alguns autores de que a atividade antioxidante deve ser avaliada por mais de uma metodologia para determinar-se a real atividade antioxidante (Pérez-Jiménez et al., 2008; Carochio et al., 2013). Além disso, há necessidade de desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas para obtenção do perfil de compostos fenólicos, uma vez que a metodologia de Folin-Ciocalteu não é uma técnica seletiva e outros compostos redutores podem reagir, resultando numa superestimação dos compostos fenólicos presentes nas amostras (Angelo e Jorge, 2007).

5.5.1 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Components Analysis) é uma ferramenta de análise multivariada utilizada para resumir um conjunto de dados complexos, bem como torná-los mais interpretáveis (Ribeiro et al., 2013). A análise de PCA foi aplicada para melhorar a interpretação dos resultados de atividade antioxidante (FT, DPPH, ABTS⁺, FRAP e ORAC) e para os diferentes procedimentos

de extração dos compostos fenólicos em que a casca de calabura foi submetida (I, II, III, IV e V). Para isso, os resultados de atividade antioxidante para todos os ensaios foram denominados *loadings* e para os diferentes procedimentos de extração foram denominados *scores*.

Na Figura 18 estão apresentados os resultados da análise de PCA, na qual é possível observar na Figura 18A que a PC1 (Componente Principal 1) explica cerca de 91,61% da variância dos dados originais. A PC2 explica 7,69%, e em conjunto as duas PC explicam 99,30% da variância dos dados originais. Conforme mostra a Figura 18B, pode-se verificar que em PC1 os resultados obtidos da atividade antioxidante para o procedimento de extração I não foi similar os demais procedimentos. Analisando-se PC2, é possível visualizar dois agrupamentos, entre os ensaios III e V, e entre II e IV, e pode-se verificar por esses agrupamentos que as extrações III e V, realizadas pelos mesmos solventes metanol:água (80:20 v/v) mas por diferentes técnicas de extração, por agitação magnética e assistida por ultrassom, apresentaram respostas similares frente aos ensaios antioxidantes, evidenciando assim, que solvente é mais relevante para a extração dos compostos fenólicos analisados que as técnicas de extração. Os *loadings* são mostrados na Figura 18C, na qual é verificado que todas as variáveis analisadas contribuíram em PC1, e analisando-se PC2 pode-se observar a separação em dois grupos, sendo estes, o ensaio de ORAC e outro grupo com os demais ensaios.

Associando os *scores* e *loadings* apresentados nas Figuras 18B e 18C, é possível dizer que a extração I, não apresentou boa resposta de atividade antioxidante por nenhum dos ensaios analisados, enquanto que os procedimentos de extração II e IV foram similares frente aos ensaios realizados por FT, FRAP, DPPH[•] e ABTS^{•+}, sendo ainda possível observar que os procedimentos III e V foram similares frente ao ensaio ORAC.

Estes resultados evidenciam a necessidade da realização da análise antioxidante por vários ensaios, pois é observado que houve agrupamento entre os ensaios FT, DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP, enquanto que o ORAC não se agrupou com nenhum dos ensaios. Isto pode ser devido às características similares entres os mecanismos de reação dos ensaios FT, DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP, os quais atuam pela transferência de elétrons, enquanto que o ensaio de ORAC tem mecanismo de atuação pela transferência de hidrogênio (Huang et al., 2005, Ribeiro et al., 2013).

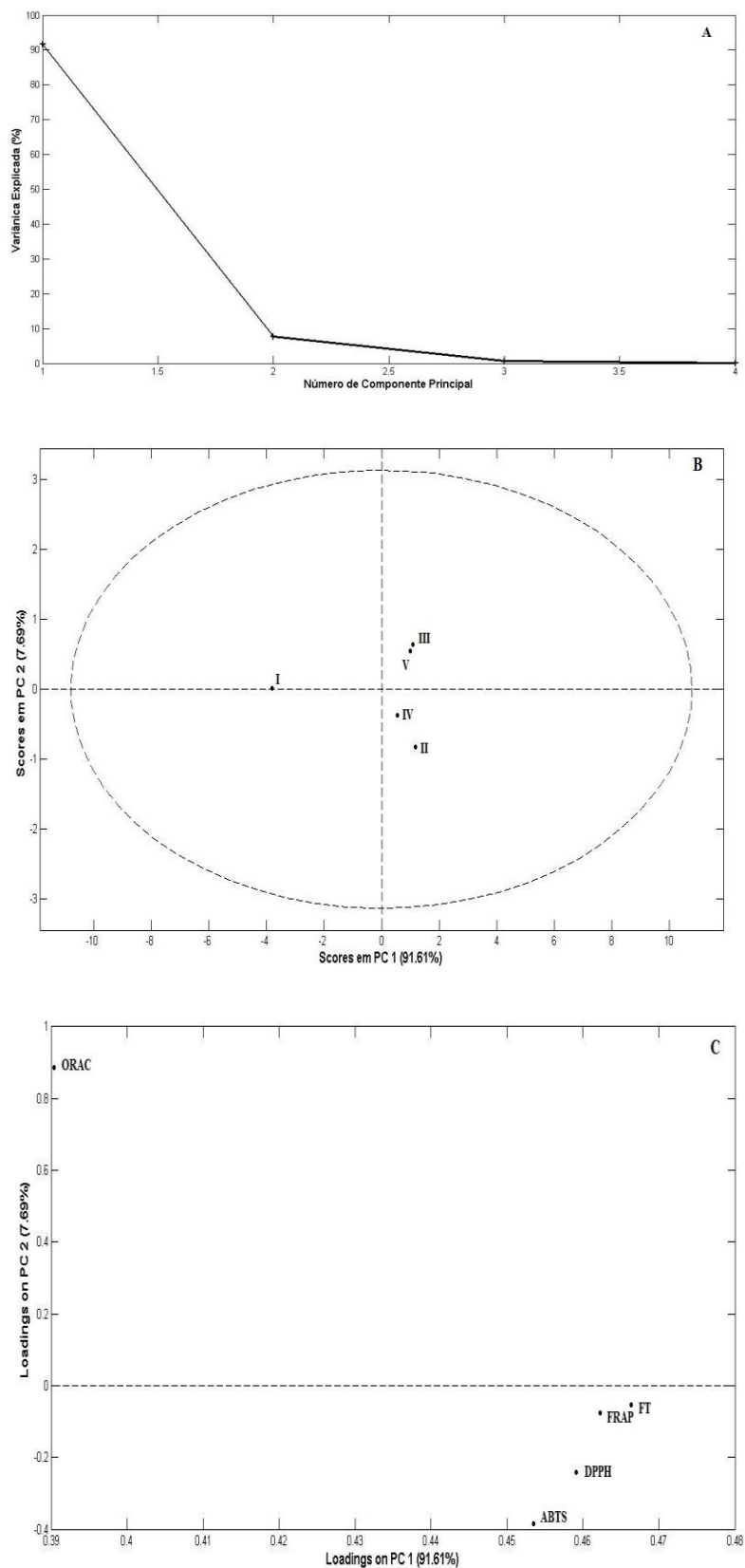


Figura 18. Análise da Componente Principal (PCA). A) Variância explicada x Número de componentes principais. B) Scores PC1 x PC2. C) Loadings PC1 x PC2.

5.6 Desenvolvimento da metodologia dos compostos fenólicos por CLAE-DAD

O desenvolvimento de metodologias de análise é baseado em fatores como, finalidade da análise, disponibilidade de reagentes, rapidez, custo baixo, simplicidade, entre outros. O método desenvolvido para a separação dos compostos fenólicos está apresentado na Figura 19, e analisando-se o cromatograma pode-se verificar que houve uma boa separação entre os compostos fenólicos, boa resolução dos picos e um tempo de análise curto.

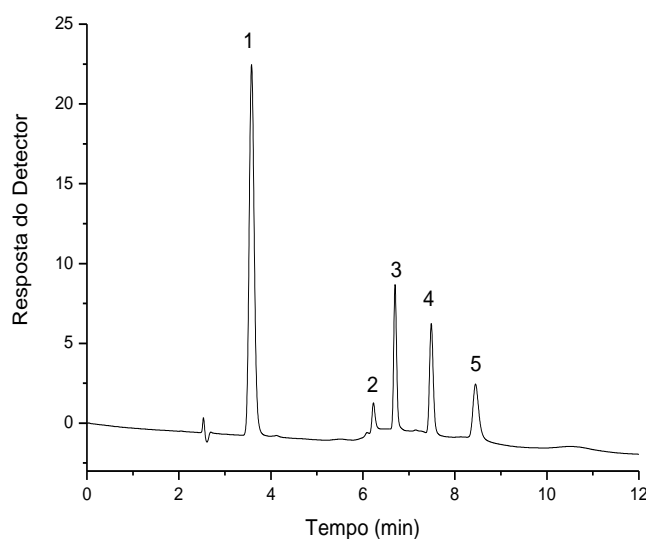


Figura 19: Cromatograma da separação dos compostos fenólicos na concentração de 1 mg kg⁻¹; Condições cromatográficas: FM: água acidificada com ácido fosfórico (pH=3,00) como fase móvel A e a fase móvel B constituída por metanol, vazão de 1 mL min⁻¹, eluição por modo gradiente, com a seguinte programação: de 0-2 minutos (30% B), 2-3 min (30-60% B), 3-5 min (60% B), 5-6 min (60-50% B), 6-9 min (50% B), 9-10 min (50-30% B), 10-12 min (30% B). Coluna C18ec (4,6 x 250 mm, 5 µm) Maecherey-Nagel, detecção por arranjo de diodo a 280 nm. Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.

Após a otimização das condições cromatográficas para a separação dos compostos fenólicos, foi realizada a identificação e confirmação dos compostos fenólicos. Para isso, cada um dos compostos fenólicos foi injetado individualmente, como pode ser observado na Figura 20, e comparados com o tempo de retenção (t_R) dos compostos fenólicos quando a solução padrão contendo todos os compostos e a amostra foi analisada. Os compostos fenólicos foram confirmados a partir da comparação dos espectros de absorção UV-Vis do padrão com o espectro da amostra fornecidos pelo

detector (DAD). Os espectros de cada um dos compostos em estudo estão apresentados na Figura 20.

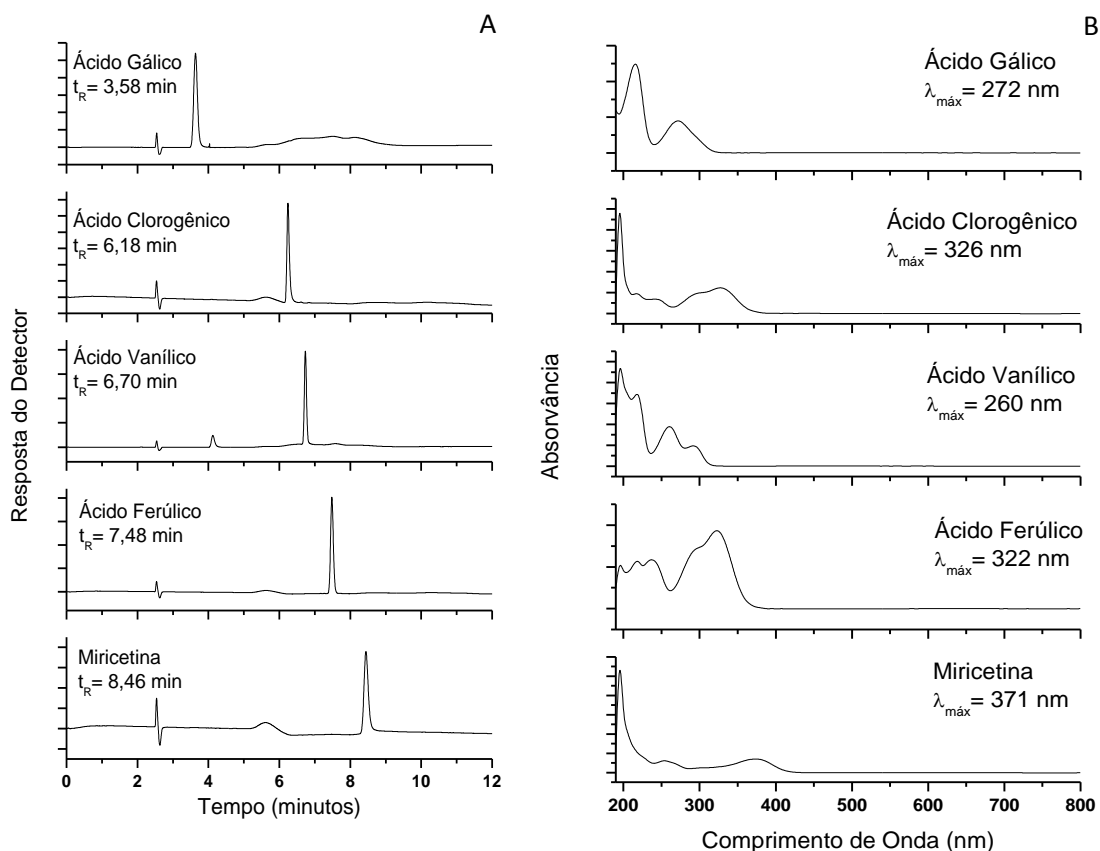


Figura 20: Representação dos cromatogramas individuais dos padrões dos compostos fenólicos a 1 mg kg^{-1} (A) e seus respectivos espectros de absorção no UV-Vis (B). Condições Cromatográficas semelhantes à Figura 19.

5.7 Métodos de extração

Os cromatogramas obtidos a partir da injeção dos extratos obtidos para cada procedimento de extração da casca liofilizada da calabura estão apresentados na Figura 21. A partir dos resultados da quantificação dos principais compostos fenólicos apresentados na Figura 22 e da análise dos cromatogramas apresentados na Figura 21, pode-se verificar que o solvente utilizado no procedimento de extração afeta tanto a quantidade de compostos fenólicos extraídos, quanto à quantidade de interferentes extraídos. O procedimento de extração que apresentou a menor quantidade de compostos fenólicos extraídos e também forneceu um cromatograma com menor quantidade de interferentes foi o procedimento de Extração I, o qual utilizou como solvente de extração acetato de etila, enquanto que os outros procedimentos de extração,

que empregaram solventes polares, apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos extraídos, bem como maiores quantidades de interferentes também foram extraídas. O ácido clorogênico não pode ser quantificado, pois outros compostos extraídos que não são de interesse para este estudo eluíram no mesmo tempo de retenção. Conforme apresentado na Figura 21, nota-se também que nenhum procedimento de extração forneceu um cromatograma isento de interferentes.

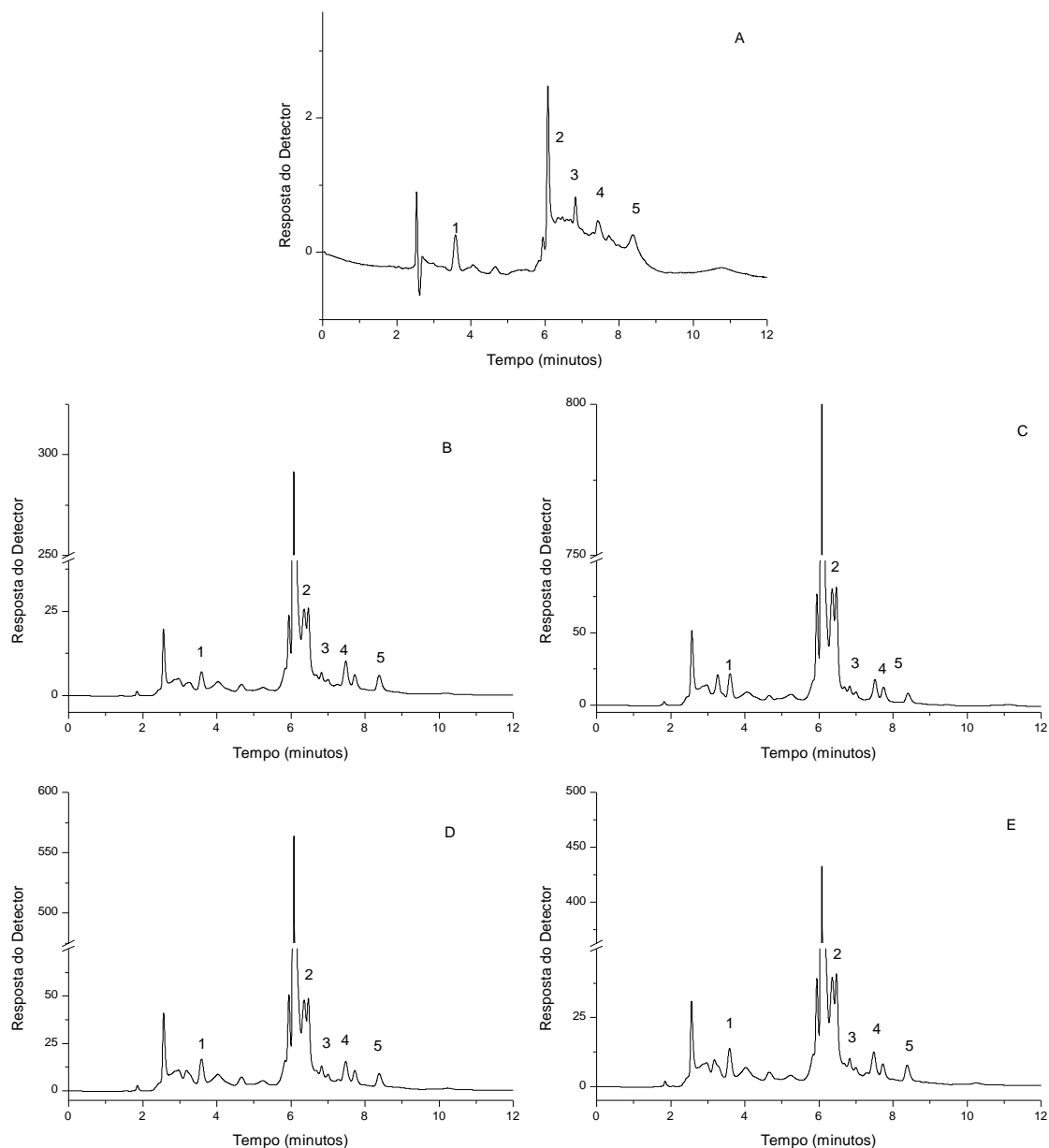


Figura 21: Representação dos cromatogramas em 280 nm dos compostos fenólicos A) Extração I, B) Extração II, C) Extração III, D) Extração IV, E) Extração V; Condições Cromatográficas semelhantes à Figura 19. Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.

Comparando-se os resultados das extrações que utilizaram solventes polares (II, III, IV e V) apresentados na Figura 22, pode-se verificar que a Extração II, que utilizou como solvente o etanol, apresentou menores quantidades extraídas de compostos fenólicos que as extrações III, IV e V, nas quais foi utilizado metanol como solvente de extração, o que evidencia o metanol como sendo o melhor solvente de extração para os compostos fenólicos analisados.

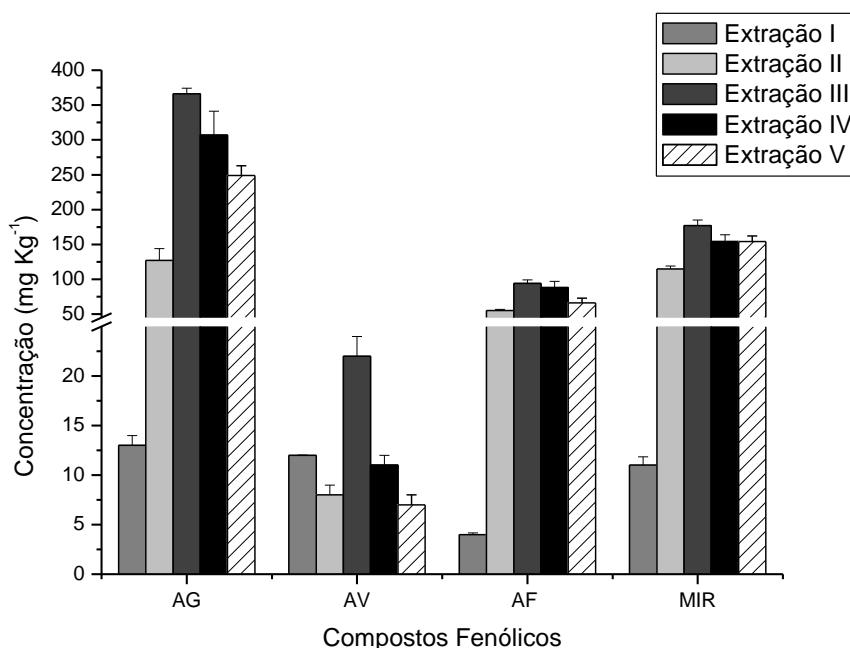


Figura 22. Quantidade de compostos fenólicos extraídos nos diferentes procedimentos de extração dos compostos antioxidantes da casca da calabura liofilizada por CLAE-DAD expressos em mg Kg⁻¹. I: Acetato de Etila, II: Etanol:Água (80:20 v/v), III: Metanol:Água (80:20 v/v), IV: Metanol:Água acidificada (80:20 v/v), V: Metanol:Água (80:20 v/v). I a IV por agitação magnética e V por ultrassom.

Pode-se verificar também que outros fatores, além do solvente de extração, afetam a quantidade de compostos fenólicos extraídos, pois nas extrações III, IV e V, nas quais foi utilizado metanol como solvente de extração em diferentes condições de agitação e pH do meio, quantidades diferentes de compostos fenólicos foram extraídas. Pode-se verificar que a agitação magnética foi mais eficaz que a agitação assistida em banho ultrassônico, pois as extrações submetidas à agitação magnética (III e IV) obtiveram valores superiores de compostos fenólicos que a extração assistida em banho ultrassônico (V). Pode-se verificar também que a acidificação do meio não foi eficaz

para a extração dos compostos fenólicos analisados, pois na extração III quantidades superiores de compostos fenólicos foram extraídas quando comparadas com a extração IV em que o meio foi acidificado.

Dentre as condições de extração analisadas pode-se verificar que a Extração III, que emprega metanol/água (80:20 v/v) como solvente e extração por agitação magnética por 90 minutos apresentou as maiores quantidades de compostos fenólicos extraídos da casca liofilizada de calabura.

5.7.1 Correlação de Pearson entre os ensaios antioxidantes e o total de compostos fenólicos quantificados por CLAE-DAD

A correlação entre os ensaios da atividade antioxidante com os compostos fenólicos quantificados (CFQ) por CLAE-DAD está apresentada na Figura 23. É possível verificar que houve uma forte correlação entre os ensaios de atividade antioxidante com os compostos fenólicos quantificados nos diferentes procedimentos de extração, de acordo com a classificação de Dancey e Reidy (2005).

Em comparação com os ensaios de atividade antioxidante utilizados, pode-se destacar a alta correlação entre compostos fenólicos quantificados e o ensaio de ORAC, que apresentou valor 0,9268. Dentre os ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, o ORAC tem sido considerado o ensaio mais eficaz e de maior relevância biológica. (Bisby et al., 2008 ; Ma et al., 2011; Fu et al., 2014). O ensaio de ORAC apresenta algumas vantagens como, a atualização do radical peroxila como reagente, que apresenta mecanismo de reação semelhante aos oxidantes fisiológicos, e também ao fato da utilização de uma solução tampão fosfato (fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico, 75 mmol L⁻¹, pH= 7,00), sendo este o mesmo pH fisiológico (Bisby et al., 2008 ; Fu et al., 2014).

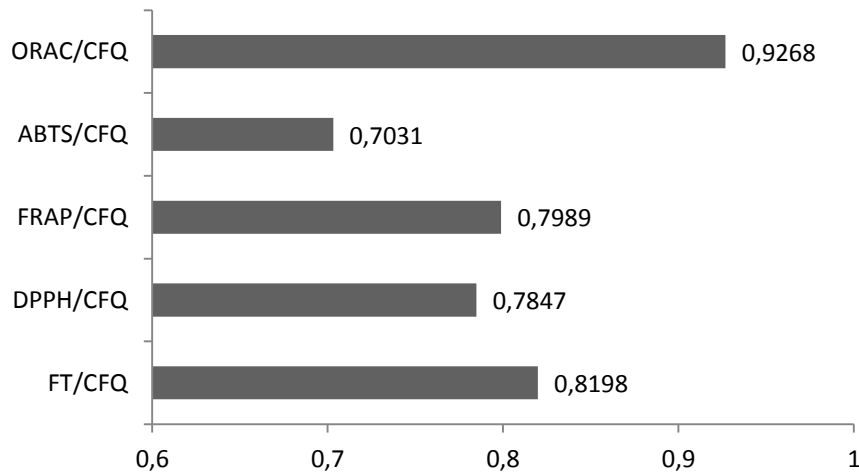


Figura 23. Coeficiente da Correlação de Pearson das análises antioxidantes dos diferentes procedimentos de extração com compostos fenólicos quantificados (CFQ) por CLAE-DAD.

5.8 Validação da Metodologia

Definidas as melhores condições de separação e o melhor procedimento de extração dos compostos fenólicos, realizou-se a validação do método. O método desenvolvido foi validado pela obtenção das seguintes figuras de mérito: seletividade, limites de detecção e de quantificação, curva analítica, linearidade, seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação) e robustez.

5.8.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos para cada um dos padrões dos compostos fenólicos no seu comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e os cromatogramas obtidos da análise do extrato da amostra estão apresentados na Figura 24 A e B, respectivamente.

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas da solução padrão preparada em solvente e dos extratos da amostra, no comprimento de onda máximo de cada composto. Estes cromatogramas estão apresentados nas Figuras 24 A e B, respectivamente, e mostram que o método desenvolvido é seletivo para quatro compostos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido ferúlico, miricetina) dos cinco compostos fenólicos estudados, uma vez que não houve a eluição de interferentes, nos mesmos tempos de retenção destes compostos e os espectros de absorção no UV foram idênticos

aos espectros dos padrões puros. Entretanto, o método desenvolvido não foi seletivo para o ácido clorogênico, uma vez que interferentes eluíram no mesmo tempo de retenção do composto, o que foi comprovado pela comparação do espectro de absorção do composto no extrato da amostra com o espectro do padrão puro, o qual não foi correspondente.

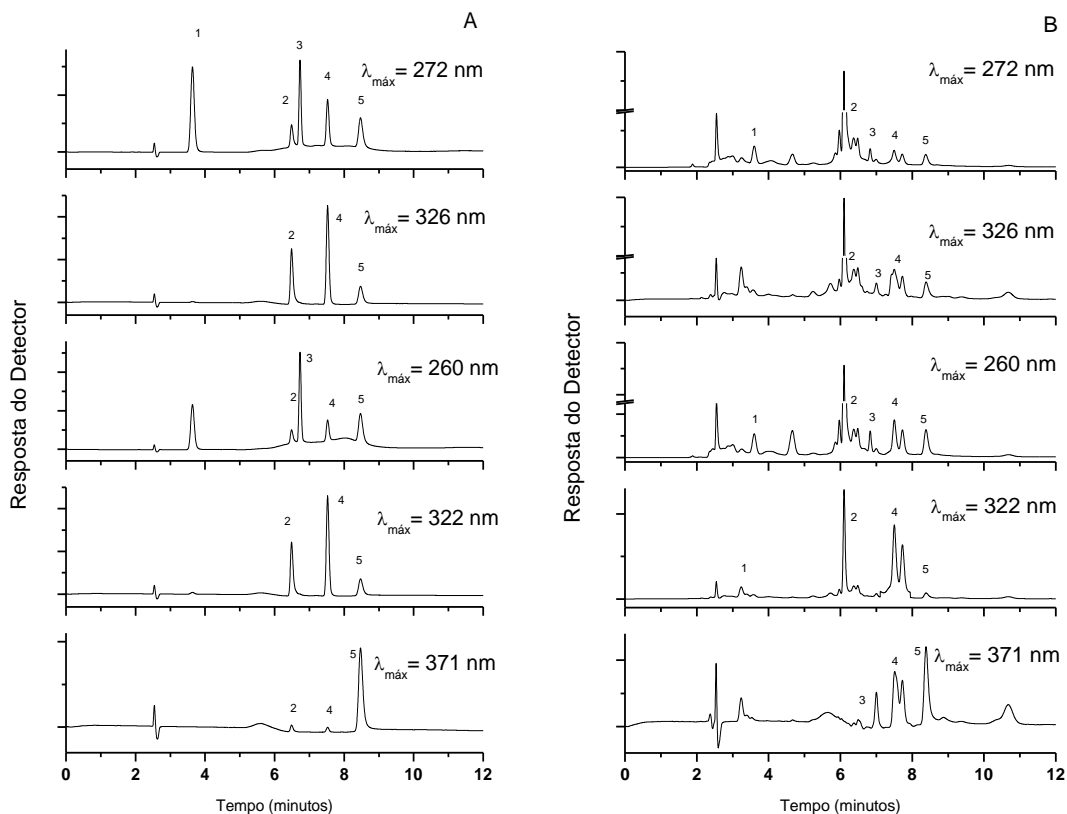


Figura 24. Cromatogramas no comprimento de onda máximo dos padrões dos compostos fenólicos no solvente (A) e no extrato da amostra (B). Identificação dos Compostos: 1-Ácido Gálico, 2-Ácido Clorogênico, 3-Ácido Vanílico, 4-Ácido Ferúlico, 5-Miricetina.

5.8.2 Linearidade, efeito matriz, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação

As curvas analíticas foram preparadas em solvente e no extrato da amostra, devido a complexidade da matriz. As mesmas foram construídas a partir da injeção de cinco concentrações diferentes (0,25, 0,50, 1, 2 e 3 vezes a quantidade endógena), em triplicata em cada nível, conforme Ribani et al (2004), e foram calculadas pela Equação 2. As curvas analíticas estão apresentadas na Figura 25.

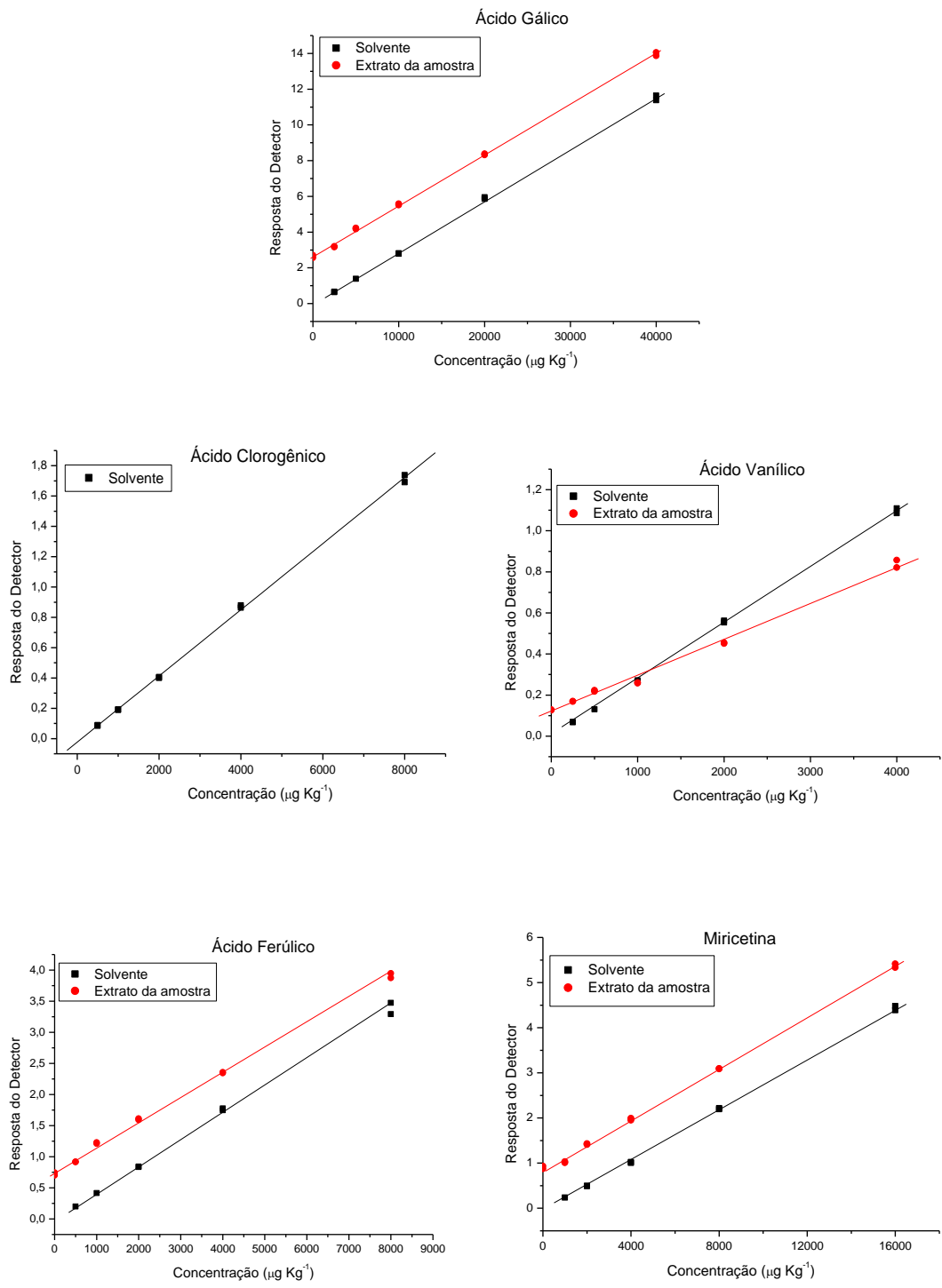


Figura 25. Curvas analíticas dos compostos fenólicos preparadas em solvente e no extrato da amostra.

A partir da construção das curvas analíticas, foram obtidas as equações da reta e os coeficientes de correlação (r) para cada um dos compostos fenólicos em estudo que estão apresentados na Tabela 4.

Através dos coeficientes de correlação (r) de cada composto fenólico, é possível estimar a qualidade da curva obtida, uma vez que esses valores são satisfatórios quanto mais próximos de 1,0. A ANVISA (2003) descreve que um coeficiente de correlação igual a 0,99 é satisfatório, desta forma, os resultados obtidos são adequados e confirmam a linearidade do método para região de interesse. A faixa linear obtida é satisfatória, uma vez que abrange todas as concentrações de trabalho.

Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas para os compostos fenólicos.

	Faixa Linear ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Curva no Solvente		Curva na Matriz	
		Equação da Reta	(r)	Equação da Reta	(r)
AG	2500 – 40000	$Y = -0,5202 + 0,29052x$	0,999	$Y = 2,67271 + 0,28287x$	0,999
AC	500 – 8000	$Y = -0,2315 + 0,21821x$	0,999	-	-
AV	250 – 4000	$Y = -0,00302 + 0,27582x$	0,999	$Y = 0,11084 + 0,17896x$	0,996
AF	500 – 8000	$Y = -0,000390 + 0,42596x$	0,999	$Y = 0,76261 + 0,39583x$	0,999
MIR	1000 – 16000	$Y = -0,06703 + 0,28136x$	0,999	$Y = 0,80706 + 0,28582x$	0,999

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados do efeito matriz, assim como, LDE, LQE.

Tabela 5. Efeito matriz, limites de detecção e quantificação do equipamento (LDE e LQE).

	Efeito Matriz		No Solvente		Na Matriz	
	F1	F2	LDE ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LQE ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LDE ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LQE ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
AG	-17	11	25	75	60	100
AC	-	-	200	500	-	-
AV	-43	-31	20	50	60	200
AF	-5	-18	20	50	50	200
MIR	-51	2	100	250	100	400

F1 = 0,25 x a quantidade endógena; F2 = 0,50 x a quantidade endógena.

O efeito matriz foi avaliado em dois níveis de concentração, sendo estes correspondentes a 0,25 e 0,50 vezes a quantidade endógena, nomeados de F1 e F2, respectivamente, e foram calculados a partir da Equação 1. A partir dos valores obtidos pode-se verificar a influência da matriz no sinal do analito. Valores negativos indicam uma supressão do sinal do analito e valores positivos indicam um aumento de sinal, ocasionado pela matriz. Desta forma, para corrigir os efeitos da matriz provocados pelos interferentes co-extraídos, a curva analítica deve ser construída na matriz para a quantificação dos compostos fenólicos extraídos.

Os parâmetros limite de detecção e limite de quantificação do equipamento (LDE e LQE) foram determinados pela relação sinal do analito e o ruído da linha de base, a partir da injeção dos padrões dos compostos fenólicos preparados em metanol e também adicionados no extrato da amostra, em concentrações cada vez menores até a obtenção de picos com altura de 3 e 10 vezes maior que o sinal do ruído. Os valores estão apresentados na Tabela 5, pode-se observar que os valores de LDE e LQE aumentaram na presença da matriz, o que está intimamente relacionado com os resultados obtidos do efeito matriz, que indicam uma supressão do sinal na presença da matriz, logo esse fato implica no aumento dos limites de detecção e quantificação.

5.8.3 Exatidão e precisão

A exatidão foi determinada através de ensaios de recuperação obtida em dois níveis de concentração (0,25 e 0,50 vezes a quantidade endógena pré-determinada), com cinco replicatas em cada um dos níveis conforme SANCO (2009), utilizando a Equação 3.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada em dois níveis de concentração (0,25 e 0,50 vezes a quantidade endógena pré-determinada), em um mesmo dia com cinco replicatas de cada um dos níveis de concentração. A precisão intermediária foi determinada em dois níveis de concentração (0,25 e 0,50 vezes a quantidade endógena pré-determinada), em dois dias diferentes, com cinco replicatas de cada nível. A repetitividade (em um mesmo dia) e a precisão intermediária (em dias diferentes) foram expressas pelo coeficiente de variação (CV) de cinco e 10 medidas de recuperação dos analitos, respectivamente, utilizando a Equação 4.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método desenvolvido.

Tabela 6. Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método desenvolvido.

	Recuperação ^a (%)		Repetitividade (CV%)		Recuperação ^b (%)		Precisão Intermediária (CV %)	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
AG	89	100	1	0	93	92	0	1
AV	77	75	4	3	77	72	1	4
AF	98	102	3	1	100	95	2	2
MIR	91	107	3	2	107	104	2	2

F1 = 0,25 x a quantidade endógena; F2= 0,50 x a quantidade endógena. ^a Média das recuperações obtidas no primeiro dia. ^b Média das recuperações obtidas no segundo dia.

A partir da Tabela 6, pode-se verificar a exatidão do método pelas porcentagens de recuperação para os compostos fenólicos estudados, que variaram de 72 a 107%. Estes valores foram satisfatórios nos dois níveis de fortificação, uma vez que estão dentro da faixa de recuperação aceitável, de 70 - 120%, conforme SANCO (2009).

Com relação à precisão, avaliada em termos de repetitividade e da precisão intermediária, pode-se verificar pelos resultados apresentados na Tabela 6, que o método apresenta boa precisão, valores de CV \leq 20%, quando a repetição ocorre no mesmo dia e também quando é realizada em dias diferentes.

5.8.4 Robustez

A metodologia analítica desenvolvida pode ser considerada robusta, pois fatores como pH da fase móvel e a temperatura da coluna apresentaram pequenas variações, de $\pm 0,03$ e $\pm 0,5$, respectivamente, porém a metodologia não foi afetada por essas mudanças.

5.9 Aplicação do método desenvolvido

Após a validação do método analítico desenvolvido foram analisadas duas amostras da casca da calabura provenientes de colheitas diferentes. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos a partir da análise das duas amostras.

Tabela 7. Quantidades (mg kg^{-1}) dos compostos fenólicos determinados na casca da calabura provenientes de diferentes colheitas.

	AG	AV	AF	MIR
CC13¹	382±12,35	29±1,28	75±2,53	131±4,64
CC14²	314±0,81	21±0,28	66±0,28	116±17,64

Média dos valores \pm desvio padrão (n=3).

¹ Calabura colhida nos meses de setembro e outubro de 2013.

² Calabura colhida nos meses de setembro e outubro de 2014.

A partir destes resultados, pode-se verificar que as quantidades determinadas dos compostos fenólicos foram similares para as amostras analisadas e que o ácido gálico foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade, seguido pela miricetina, ácido ferúlico e ácido vanílico. Moo-Huchin et al. (2015) analisaram compostos fenólicos em cascas de três frutas. A partir dos valores obtidos nesse trabalho, pode-se verificar que a casca da calabura apresentou quantidade maior de ácido gálico que o caju vermelho e quantidades maiores de ácido ferúlico e miricetina que a caimito, ambas analisadas por Moo-Huchin et al. (2015).

6. CONCLUSÕES

Entre as frutas analisadas, as partes tradicionalmente não consumidas, casca e semente, mostraram que podem ser consideradas boas fontes de nutrientes como proteína bruta, minerais e de compostos antioxidantes, com conteúdos similares ou superiores as polpas.

Com relação aos lipídios, as sementes do bacupari e da uva japonesa apresentaram quantidades superiores que a casca e a polpa. Foi investigado a composição em ácidos graxos dessas sementes, nas quais foi constatado a presença dos ácidos graxos essenciais, ácido linoléico (LA, 18:2n-6) e ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3) e a presença do ácido oleico (18:1n-9). Além disso, as sementes apresentaram valores da razão entre os ácidos graxos da família n-6 e da família n-3 de acordo com valores estabelecidos na literatura.

Os resultados obtidos da atividade antioxidante dos extratos metanólicos das partes das frutas pelos diferentes ensaios (FT, DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC) apresentaram correlações positivas com valores superiores a 0,80, segundo a Correlação de Perason.

O presente trabalho visou avaliar um método de extração para os compostos fenólicos da casca liofilizada da calabura. A partir dos resultados obtidos de atividade antioxidante pelos ensaios de FT, DPPH[•], FRAP, ABTS^{•+} e ORAC, foi verificado que o procedimento de extração I, apresentou as menores respostas para os ensaios avaliados, enquanto que os demais procedimentos de extração (II, III, IV e V) apresentaram valores bastante similares entre os ensaios realizados, com exceção ao ensaio de ORAC, o que foi confirmado pela análise de componente principal (PCA) que se diferenciou dos demais ensaios avaliados.

As condições cromatográficas otimizadas para a separação dos compostos fenólicos, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e miricetina, permitiram uma boa separação entre os picos em um tempo de análise de 12 minutos. Dentre os cinco compostos fenólicos investigados, quatro foram identificados e quantificados nos diferentes procedimentos de extração, com exceção ao ácido clorogênico, pois inteferentes co-eluíram no mesmo tempo de retenção.

A partir dos resultados obtidos por CLAE-DAD, é possível verificar que entre os procedimentos de extração avaliados, a extração por agitação magnética foi mais eficaz que a extração assistida por ultrassom e entre os solventes avaliados, a combinação dos

solventes metanol/água na proporção 80:20 (v/v) foi mais eficaz que os demais solventes utilizados.

Correlacionando as respostas da atividade antioxidante obtidas para os procedimentos de extração e os resultados obtidos da quantificação dos compostos fenólicos por CLAE-DAD, utilizando a correlação de Pearson, é verificado que o ensaio que teve maior correlação com os valores de compostos fenólicos quantificados por CLAE-DAD foi o ensaio de ORAC.

Com relação ao método desenvolvido para a separação dos cinco compostos fenólicos, a metodologia se mostrou seletiva para quatro compostos fenólicos, por isso, a validação foi realizada somente para os quatro compostos fenólicos, com exceção ao ácido clorogênico. Todos os parâmetros avaliados para a validação da metodologia estão dentro das condições aceitáveis.

A casca de calabura apresentou quantidades significativas de compostos fenólicos quando comparadas com outras frutas reportadas na literatura. Dos compostos fenólicos analisados, o ácido gálico foi o mais abundante, seguido da miricetina, ácido ferúlico e por último ácido vanílico.

Em suma, este trabalho mostrou que as frutas analisadas são fontes de nutrientes, como minerais, ácidos graxos e compostos antioxidantes, portanto, podem estar associadas aos efeitos benéficos que o consumo destes compostos oferece a saúde humana, podendo então, ser aproveitadas na alimentação humana. O método desenvolvido e validado se mostrou satisfatório para a análise dos compostos fenólicos da casca da calabura, podendo ser ampliado para estudos de outras partes das frutas já caracterizadas neste trabalho, que se apresentaram fontes promissoras de compostos antioxidantes.

7. REFERÊNCIAS

Abu-Reidah, I. M., David Arráez-Román, D., Antonio Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI–QTOF–MS). *Food Research International* 51, 354–362, 2013.

Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em outubro de 2014.

Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Consulta Pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004.

<<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>>. Acessado em julho de 2014.

Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006). Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº. 216, de 15 de dezembro de 2006.

<<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2006-12-15-216>>. Acessado em outubro de 2014.

Alberti, A., Zielinski, A. F., Zardo, D. M., Demiate, A. N., Mafra, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149, 151-158, 2014.

Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155-2159, 2011.

Almeida, V. V., Canesin, E. A., Suzuki, R. M., Palioto, G. F. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos por meio de reação de complexação do íon cúprico. *Química Nova na Escola*, 35, 34-40, 2013.

Angelo, P. M., Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 232-240, 2007.

Aragão, N. M., Veloso, M. C. C., Andrade, J. B., Validação em métodos cromatográficos de análise – Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, 32, 2476-2481, 2009.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC); Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed.; AOAC: Arlington, EUA, 1998.

Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., Patil, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44, 391-39, 2011.

Bampi, M., Bicudo, M. O. P., Fontoura, P. S. G., Ribani, R. H. Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. *Ciência Rural*, 40, 2361-2367, 2010.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, 1996.

Bisby, R.H., Brooke, R., Navaratnam, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1002-1007, 2008.

Biglari, F., Alkarkhi, A. F. M., Easa, A. M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, 1636-1641, 2008.

Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Biochemistry Physiology*. 37, 911-917, 1959.

Borges, A. M., Pereira, J., Silva-Junior, A., Lucena, E. M. P., Sales, J. C. Estabilidade da pré mistura de bolo com 60% de farinha de banana verde. *Ciência e Agrotecnologia*, 34,173-181, 2010.

Bourre, J. M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 8, 3, 163-74 2004.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30, 1995.

Bucić-Kojić, A., Mirela Planinić, M., Tomas, S., Stela Jokić, S., Ibrahim Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food Nutrition Sciences*, 61, 3, 195-199, 2011.

Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25, 2013.

Carvalho, P. E. R. Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). *Boletim Técnico*, 23, Colombo: Embrapa – CNPFloresta, 1994.

Cecchi, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos. 2ª Edição, Editora Unicamp, Campinas-SP, 2003.

Chang, C., Lin, H., Chang, C., Liu, Y. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77, 478-485, 2006.

Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. 2ª Edição, Editora Unicamp, Campinas-SP, 2006.

Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International* 44, 2047–2053, 2011.

Cheng, V. J., Bekhit, A. E. A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134, 474–482, 2012.

Clerici, M. T. P. S., Carvalho-Silva, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, 44 1658-1670, 2011.

Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148-173, 2012.

Comission of the European Communities (SANCO, 2009). Documento n° SANCO/10684/2009. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.

<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf>. Acessado em outubro de 2013.

Dancey, C. e Reidy, J. *Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows*. Porto Alegre, Artmed, 2006.

Dunstan J. A.; Roper, J.; Mitoulas, L. The effects of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition. *Clinical e. Experimental Allergy*, 34, 1237-1242, 2004.

Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., Gabriele, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry* 140, 817-824, 2013.

Figueiredo-Filho, D. B., Silva-Junior, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje*, 18, 115-146, 2009.

Food and Agriculture Organization (FAO, 2010). Medium-term prospects for agricultural commodities.

<<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e1a.htm>>. Acessado em junho de 2014.

Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., Liu, F., Chen, F. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant. *Industrial Crops and Products*, 58, 265-270, 2014.

Gondin, J. A. M., Moura, M. F., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., Santos, K. M. Composição centesimal e minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 825-827, 2005.

González-Montelongo, R., Lobo, M. G., González, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119, 1030-1039, 2010.

Gurak, P. D., Bona, G. S., Tessaro, I. C., Marczak, L. D. F. Jaboticaba Pomace Powder Obtained as a Co-product of Juice Extraction: A Comparative Study of Powder Obtained from Peel and Whole Fruit. *Food Research International*, 62, 786-792, 2014.

Hartman, L., Lago, R. C. A. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. 22, 475-476, 1973.

Henriquez, M., Almonacid, S., Lutz, M., Simpson, R., Valdenegro, M. Comparison of three drying processes to obtain an apple peel food ingredient. *CyTA Journal of Food*, 1, 1-9, 2012.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 1841-56, 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014). <<http://cod.ibge.gov.br/20UES>>. Acessado em 10 de junho de 2014.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010). Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, 2010.

<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acessado em outubro de 2014.

Jorge, N., Malacrida, C. R., Angelo, P. M., Andreo, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 39, 380-385, 2009.

Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60, 2009.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217-233, 2011.

Kubola, J., Siriamornpin, S., Meeso, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126, 972-981, 2011.

Lanças, F. M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, São Paulo, Editora Átomo, 2009.

Liu, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. The Journal of Nutrition, 3479-3485, 2004.

Lopes, J. C., Pereira, M. D., Martins-Filho, S. Germinação de sementes de calabura (*Muntingia calabura* L.). Revista Brasileira de Sementes, 24, 59-66, 2002.

Lu, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 14, 840-860, 2010.

Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., Yu, L. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours Food Chemistry, 128,391-399, 2011.

Marques, A., Chicaybam, G., Araujo, M. T., Manhães, L. R. T., Sabaa-Sur, A. U. O. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. Revista Brasileira de Fruticultura, 32, 1206-1210, 2010.

Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshusita, M., Souza, N. E., Visentainer, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Revista de Nutrição, 19, p.761-770, 2006.

Martin, C. A., Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., Matsuhita, M., Souza, N. E. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of *trans* fatty acids. Journal of Chromatography A, 1194, 111-117, 2008.

Martins, F. T., Doriguettoa, A. C., Souza, T. C., Souza, K. R., Santos, M. H., Moreira, M. E. C., Barbosa, L. C. C., Composition, and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis*. Chemistry & Biodiversity, 5, 251-258, 2008.

Mattietto, R. A., Lopes, A. S., Menezes, H. C. Caracterização física e físicoquímica dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de duas polpas obtidas por dois tipos de extrator. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13, 156-164, 2010.

Ma, X., Wu, H., Liu, L., Yao, Q., Wang, S., Zhan, R., Xing, S., Zhou, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, 129, 102-107, 2011.

Maruenda, H. Vico, M. L., Householder, J. E., Janovec, J. P., Cañari, C., Naka, A., Gonzalez, A. E. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 138, 161-167, 2013.

Ministério de Agricultura e Agropecuária (MAPA, 2012). Fruticultura - Análise da Conjuntura Agropecuária.

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf> Acessado em Junho de 2014.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-Leon, Raciél., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vazquez, E., Vargas, M. L. V., Betancur-Ancona, D., Sauri-Duch, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152,508-515, 2014.

Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortez-Vázquez, E., Betancur-Ancona, D., Sauri-Duch, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17-22, 2015.

Naczki, M., Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542, 2006.

Neveu, V, Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. Phenol-Explorer: an online

comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi:10.1093/database/bap024, 2010.

Oliveira, A. C., Valentin, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*, 32, 3, 689-702, 2009.

Oliveira, A. L., Lopes, R. B., Cabral, F. A., Eberlin, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, 99, 1-5, 2006.

Oliveira, V. B., Yamada, L. T., Fagg, C. W., Brandão, M. G. L., Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*, 48, 170-179, 2012.

Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N. Antioxidant of *Smilax excels* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110, 571-583, 2008.

Pande, G., Akoh, C. C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry* 120, 1067-1075, 2010.

Peralbo-Molina, A., Priego-Capote, F., Castro, M. L. D., Comparison of extraction methods for exploitation of grape skin residues from ethanol distillation. *Talanta*, 101, 292-298, 2012.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285, 2008.

Perini, J. A. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. O., Matsushita, M., Souza, N. E., Visentainer, J. V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. *Revista de Nutrição*, 23, 1075-1086, 2010.

Preethi, K., Premasudha, P., Keerthana, K. Anti-inflammatory Activity of Muntingia calabura Fruits. *Pharmacognosy Journal*, 5, 51-56, 2012.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 5, 771-780, 2004.

Ribeiro, F. A. L., Ferreira, M. M. C., Morano, S. C., Silva, L. R., Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos invariados. *Química Nova*, 31, 1, 164-171, 2008.

Ribeiro, A. B., Bonafé, E. G., Silva, B. C., Montanher, P. F., Santos-Junior, O. O., Boeing, J. S., Visentainer, J. V. Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content, Fatty Acids and Correlation by Principal Component Analysis of Exotic and Native Fruits from Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 797-804, 2013.

Robles-Sanchez, M., Astiazaran-Garcia, H., Martin-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Yepiz-Plascencia, G., González-Aguilar, G. A. Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44, 1386-1391, 2011.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 53-60, 2007.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico on line 125, ISSN 1679-6535, 2006.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. Comunicado Técnico on line 128, ISSN 1679-6535, 2007a.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH[•]. Comunicado Técnico on line 127, ISSN 1679-6535, 2007b.

Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., Brito, E. S. Free radical scavenging behavior of some North-east Brazilian fruits in DPPH system. Food Chemistry, 114, 693-695, 2009.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chemistry, 121, 996-1002, 2010.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Fernandes, F. A. N., Brito, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. Food Research International, 44, 2072-2075, 2011.

Santa-Cecilia, Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, D. F., Cavalcante, G. P., Freitas, L. A. S., Santos, M. H., Giusti-Paiva, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. Journal of Ethnopharmacology, 133, 467-473, 2011.

Santos, L. P., Morais, D. R., Souza, N. E., Cottica, S. M., Boroski, M., Visentainer, J. V. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. Food Research International, 44, 1414-1418, 2011.

Scoditti, E., Capurso, C., Capurso, A., Massaro, M. Vascular effects of the Mediterranean diet—Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. Vascular Pharmacology, 63, 127-134, 2014.

Shui, G., Leong, L. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. Food Chemistry, 97, 277-284, 2006.

Silva, L. M. R., Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., Gomes, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398-404, 2014.

Simopoulos, A. P. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, 44, 203-215, 2011.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, 1965.

Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71-81, 2002.

Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Queiroz, S. V. B., Carneiro, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, 134, 381-386, 2012.

Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Silva, T. L. T., Lima, L. C. O., Pio, R. Queiroz, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368, 2014.

Somerville, C. C., Browse, J., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B.. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 456-458, 2000.

Statistica 8.0 Software. Tucksá: Statsoft.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675, 2006.

Tully, A. M.; Roche, H. M.; Doyle, R. Low serum cholesterol ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: A case-control study. *British Journal of Nutrition*, 89, 483-489, 2003.

Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Edin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816-823, 2008.

Visentainer, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274-279, 2012.

Wang, M., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Cao, L., Liu, J., Zeng, X., Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food Chemistry*, 138, 41-47, 2013.

Zulueta, A., Esteve, M. J., Frigola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316, 2009.

Youdim, K. A.; Martin, A.; Joseph, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 383-399, 2000.