**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Composição fenólica e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de frutas nativas
brasileiras**

Jackeline Cintra Soares

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2018**

Jackeline Cintra Soares
Bacharela em Engenharia de Alimentos

**Composição fenólica e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de frutas nativas
brasileiras**

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Soares, Jackeline Cintra

Composição fenólica e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de frutas nativas brasileiras / Jackeline Cintra Soares. - - Piracicaba, 2018.

156 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Frutas nativas 2. ERO 3. ERN 4. Migração de neutrófilos 5. NF- κ B 6.LC-ESI-QTOF-MS I. Título

À Deus, a minha família pelo apoio e confiança e a todos que me ajudaram a obter mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por todas as bênçãos e oportunidades.

Aos meus pais Geraldo Garcia Soares e Débora Cintra Soares e à minha irmã, Layanne Cintra Soares, pelo amor incondicional e pelo incentivo nos momentos mais importantes da minha vida. Meu eterno amor, gratidão e respeito. Ao meu namorado Thiago S. Teles que me incentivou, apoiou em todas minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Matias de Alencar por toda atenção, compreensão, disponibilidade, prontidão em me ajudar, pela experiência e oportunidades oferecidas, com as quais muito aprendi.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em especial ao Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição, pela oportunidade da realização deste trabalho e por me acolherem durante esse período.

À todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos.

Ao prof. Dr. Pedro Rosalen pela contribuição com as análises anti-inflamatórias.

Ao prof. Dr. Erick S. S. Salinas pela oportunidade concedida e por todos os conhecimentos e experiências que tive durante minha estadia na Universidade de La Frontera-Chile.

À minha amiga Josy G. Lazarini e também parceira no projeto de pesquisa, não só pelos ensinamentos científicos mas também pelos ensinamentos bíblicos que me fez crescer como pessoa e ter mais fé em Deus.

Ao Helton que disponibilizou as frutas nativas para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos de laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental –

ESALQ-USP: Adna P. Massarioli, Ivani A. M. Moreno, Fernanda F. Juliano, Camila F. da Silva, Thalita A. Obara, Anna Paula de S. Silva, Daniel V. de Moraes, Helóisa M., Priscilla S. Melo, Maria A. Tremocoldi, que me ajudaram na execução das análises, desde a compreensão de metodologias até na formatação da tese.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram nas minhas decisões e nas minhas escolhas. Em especial à minha amiga Beatriz Silva Moraes de Freitas que disponibilizou o fruto cajá. À minha amiga Fanny P. Fernández e seu esposo Cristhian Delgado que me acolheram durante a minha estadia no Chile.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, através da bolsa de estudos.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Nenhum se susterá diante de ti, todos os dias da tua vida. Como fui com Moisés, assim serei contigo; não te deixarei nem te desampararei”.

Js 1:5

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1.1 A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DA DIVERSIDADE DAS FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS	16
1.1.2. FRUTAS NATIVAS POUCO CONHECIDAS	18
1.1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS	19
1.1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E DE NITROGÊNIO (ERN)	25
1.1.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA VERSUS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	30
REFERÊNCIAS.....	32
<u>2. FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS: ESTUDO EXPLORATÓRIO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES E DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO.....</u>	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	45
2.1. INTRODUÇÃO	46
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.2.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	48
2.2.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	49
2.2.3 PREPARO DOS EXTRATOS.....	50
2.2.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS	50
2.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
2.2.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS ^{•+}	50
2.2.5.2 SEQUESTRO DO RADICAL PEROXILA (ROO [•]).....	51
2.2.6. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	51
2.2.6.1 CULTURA CELULAR E ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	51
2.2.6.2 ANIMAIS	52
2.2.6.2.1 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO.....	52
2.2.7. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA.....	53
2.2.7.1. REMOÇÃO DE AÇÚCARES E INTERFERENTES	53
2.2.7.2. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ON-LINE POR CLAE-DAD-UV	53
2.2.7.3. DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CLAE-DAD	55
2.2.7.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	56
2.2.7.4.1 DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA – FORMAÇÃO DE DERIVADOS DO TRIMETILSILIL (TMS).....	56
2.2.7.4.2 INJEÇÃO E ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR CG-EM	56
2.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57

2.3.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS	57
2.3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	60
2.3.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES E O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	61
2.3.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	63
2.3.4.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	63
2.3.4.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO	65
2.3.5. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ON-LINE PELA TÉCNICA DE CLAE-DAD-UV	67
2.3.5.1 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS PELA TÉCNICA DE CLAE-DAD	81
2.3.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELA TÉCNICA DE CG-EM.....	85
2.3.7 ANÁLISE DE CLUSTER E COMPONENTES PRINCIPAIS	96
2.4. CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104

3. CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA DE FRUTAS NATIVAS COM ALTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA POR LC-ESI-QTOF-MS 110

RESUMO	111
ABSTRACT	111
3.1. INTRODUÇÃO	112
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	113
3.2.1 COLETA DAS AMOSTRAS	113
3.2.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	114
3.2.3 PREPARO DOS EXTRATOS	115
3.2.4 CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	116
3.2.4.1 SEQUESTRO DO RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$)	116
3.2.4.2 SEQUESTRO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO ($HOCl$).....	116
3.2.4.3 SEQUESTRO DO ÓXIDO NÍTRICO ($NO^{\bullet}$)	116
3.2.5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	117
3.2.5.1. CULTURA CELULAR	117
3.2.5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NF-KAPPA B (NF-kB).	117
3.2.6 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DAS FRUTAS NATIVAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-QTOF-MS).	118
3.2.6.1. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	118
3.2.6.2. INJEÇÃO E ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	118
3.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	119
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.3.1 CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	120
3.3.2 CORRELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES	123
3.3.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	123
3.3.3.1. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NF-kB	123
3.3.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-QTOF-MS).....	126
3.3.4.1. ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS E DERIVADOS	126
3.3.4.2. ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS E DERIVADOS	126
3.3.4.3. FLAVONOIDES.....	127
3.3.4.3.1. FLAVANOIS E DERIVADOS	128
3.3.4.3.2. FLAVONOIS E DERIVADOS	129

3.3.4.3.3 FLAVANONES E DERIVADOS	130
3.3.4.3.4. FLAVONAS	131
3.3.4.3.5 ISOFLAVONA.....	131
3.3.4.4 ANTOCIANINAS	131
3.3.4.5 STILBENOS	132
3.3.4.6 ELLAGITANINOS	132
3.3.5 ANÁLISE DE CLUSTER E COMPONENTES PRINCIPAIS	139
3.4 CONCLUSÃO	142
REFERÊNCIAS	143
4. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
5. APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL E GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO.....	153
APÊNDICES.....	155

RESUMO

Composição fenólica e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de frutas nativas brasileiras

O Brasil possui condições climáticas adequadas para o desenvolvimento de um grande número de frutas nativas e essa biodiversidade tem se tornado um caminho promissor para a descoberta de novos compostos bioativos capazes de ser utilizados na formulação de alimentos funcionais e medicamentos. Os compostos fenólicos apresentam ações específicas, podendo atuar como antioxidantes e anti-inflamatórios, assim prevenindo doenças crônicas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, anti-inflamatório e a composição fenólica de dez frutas nativas brasileiras ainda pouco conhecidas: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuití-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*), murici guassú (*Byrsonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci (*Campomanesia phaea*), jaracatiá-mamão (*Jacaratia spinosa*), juquiobioba (*Solanum altherno-pinatum*), fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*) e cajá (*Spondias mombin* L.). Os extratos etanólicos (80% v/v) das polpas foram analisados inicialmente quanto à capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e ROO[•]. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vivo* por meio do modelo de migração de neutrófilos induzida por carragenina, enquanto que a composição fenólica foi realizada por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD e CG-EM). As 5 frutas com as maiores atividades biológicas foram ainda analisadas quanto à capacidade de sequestro de O₂^{•-}, HOCl e NO[•], atividade anti-inflamatória por meio do ensaio de ativação do fator nuclear-κB (NF-κB) e composição fenólica por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS). Em relação ao sequestro do radical ABTS^{•+} o cambuití-cipó apresentou a maior atividade (749,88 μmol TE.g⁻¹) e para o ROO[•] o murici vermelho apresentou a maior atividade antioxidante (559,09 μmol TE.g⁻¹). Os animais tratados com araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, cajá e morango silvestre apresentaram reduções no influxo de neutrófilos comparados ao grupo carragenina (p < 0,05). Por meio das técnicas de CLAE-DAD e CG-EM foi possível identificar compostos fenólicos pertencentes a classe dos flavonoides (catequina, epicatequina, rutina, quercetina glicosilada, kaempferol glicosilado, quercetina, procianidina B1 e procianidina B2), sub-classe do ácido hidroxibenzóico (ácido gálico) e sub-classe dos ácidos hidrocinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico e caféico). O araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá foram as cinco frutas que apresentaram as maiores atividades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias, cujo perfil fenólico por LC-ESI-QTOF-MS indicou a presença de 18 compostos no araçá-boi, 32 no cambuití-cipó, 26 no murici vermelho e 20 e 11 compostos no morango silvestre e cajá, respectivamente. Vários dos compostos fenólicos identificados foram encontrados pela primeira vez nessas espécies. O cambuití-cipó e murici vermelho se destacaram em relação ao sequestro de HOCl (EC₅₀ 4,99 e 4,41 μg mL⁻¹, respectivamente) e o cambuití-cipó foi o mais ativo para desativar o radical O₂^{•-} (EC₅₀ 68,33 μg mL⁻¹) e NO[•] (EC₅₀ 0,78 μg mL⁻¹). Já os extratos de murici-vermelho, cambuití-cipó e morango silvestre inibiram significativamente a ativação do NF-κB. Portanto, as frutas nativas brasileiras são fontes de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como de uma grande diversidade de compostos fenólicos, os quais podem propiciar importantes benefícios para a saúde humana.

Palavras-chave: Frutas nativas; ERO; ERN; Migração de neutrófilos; NF- κB; LC-ESI-QTOF-MS

ABSTRACT

Phenolic composition and biological activity *in vitro* and *in vivo* of Brazilian native fruits

Brazil has favorable climatic conditions for the development of a large number of native fruits and this biodiversity has become a promising path towards the discovery of new bioactive compounds capable of being used in the formulation of functional foods and medicines. Phenolic compounds show specific action mechanisms, being able to act as antioxidants and anti-inflammatories, thus preventing chronic diseases. However, few Brazilian native fruits are well known and consumed by the population, undermining the investigation of chemical composition as well as the identification/quantification of bioactive compounds. In light of this, the objective of this work was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory potentials as well as the phenolic composition of ten underexploited Brazilian native fruits, namely: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Bysonima arthropoda*), murici guassu (*Bysonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci (*Campomanesia phaea*), jaracatiá-mamão (*Jacaratia spinosa*), juquioba (*Solanum alaterno-pinatum*), fruto-do-sabiá (*Acnistus arborescens*) and cajá (*Spondias mombin* L.). Pulps ethanolic extracts (80%, v/v) were initially analyzed regarding scavenging capacity of the ABTS^{•+} and ROO[•] radicals. Anti-inflammatory activity was evaluated *in vivo* using the carrageenan-induced neutrophil migration model, while phenolic composition was determined by chromatographic techniques (HPLC-PAD and GC-MS). The five fruits with the highest biological activities were analyzed for O₂^{•-}, HOCl and NO[•] radicals scavenging capacities, for *in vitro* anti-inflammatory activity by nuclear factor-κB (NF-κB) activation, and for phenolic composition by High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS). In relation to ABTS^{•+} radical scavenging cambuí-cipó showed the highest activity (749.88 μmol TE.g⁻¹), while for ROO[•] scavenging, murici vermelho had the highest antioxidant activity (559.09 μmol TE.g⁻¹). The animals treated with araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, cajá and morango silvestre reported decreases in neutrophils influx compared to carrageenan group (p <0.05). It was possible to identify by HPLC-DAD and GC-MS techniques phenolic compounds belonging to the class of flavonoids (catechin, epicatechin, rutin, glycosylated quercetin, glycosylated kaempferol, quercetin, procyanidin B1 and procyanidin B2), subclass of hydroxybenzoic acid (gallic acid) and subclass of hydrocinnamic acids (coumaric, ferulic and caffeic acids). Araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, morango silvestre and cajá were the five fruits with the highest antioxidant and / or anti-inflammatory activities. The phenolic profile analysis by LC-ESI-QTOF-MS pointed the presence of 18 compounds in araçá-boi, 32 in cambuí-cipó, 26 in murici vermelho, 20 in morango silvestre and 11 in cajá. Several of the identified phenolic compounds were found for the first time in these fruit species. Cambuí-cipó and murici vermelho stood out in relation to HOCl scavenging (EC₅₀ 4.99 and 4.41 μg.mL⁻¹, respectively) and cambuí-cipó was the most active to deactivate both O₂^{•-} radical (EC₅₀ 68.33 μg.mL⁻¹) as NO[•] (EC 500.78 μg.mL⁻¹). Murici vermelho, cambuí-cipó and morango silvestre extracts significantly inhibited the activation of NF- κB. Therefore, Brazilian native fruits are sources of antioxidant and anti-inflammatory substances, as well as a great diversity of phenolic compounds, which can provide important benefits for human health.

Keywords: Native fruits; ERO; ERN; Migration of neutrophils; NF- κB; LC-ESI-QTOF-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado das rotas biossintéticas envolvidas na produção de compostos fenólicos.....	20
Figura 2. Estrutura química dos principais flavonoides encontrados em frutas.....	22
Figura 3. A cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e a formação de EROS nos complexos I e III (BHAT et al., 2015).....	26
Figura 4. Aspecto visual das frutas coletadas no Sítio Frutas Raras-SP e na Fazenda Gameleira-GO (Fotos com direitos autorais atribuídos à autora desse trabalho e tiradas com autorização do proprietário do Sítio Frutas Raras e da Fazenda Gameleira).....	50
Figura 5. Esquema da instrumentação para análise simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante <i>on-line</i> por CLAE-DAD-UV.....	55
Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos tratados com diferentes extratos de frutas nativas em diferentes concentrações. Macrófagos RAW 264.7 tratados com extratos de araçá-boi (A), cambuití-cipó (B), murici vermelho (C), murici guassú amarelo (D), morango silvestre (E), cajá (F), cambuci (G), jaracatiá-mamão (H), juquirioba (I) e fruta-do-sabiá (J) a 10, 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura (V) por 24h.....	64
Figura 7. Efeito das frutas nativas brasileiras na migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	65
Figura 8. Cromatogramas das frutas nativas detectadas por CLAE <i>on line</i> (ABTS ⁺) em 270 nm e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo) em 740 nm.....	82
Figura 9. Cromatogramas das três amostras de frutas nativas analisadas a 515nm pela técnica de CLAE/DAD	84
Figura 10. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, anti-inflamatória e composição fenólica por HPLC-DAD e CG-EM das 10 espécies de frutas nativas brasileiras	96
Figura 11. Dispersão gráfica em relação aos dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir da matriz gerada com teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, anti-inflamatória e composição fenólica por HPLC-DAD e CG-EM das 10 espécies de frutas nativas brasileiras.....	98
Figura 12. Mapa de componentes principais (CP) mostrando relação entre o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, anti-inflamatória e identificação de	

compostos fenólicos (HPLC-DAD e CG-EM) em dez frutas nativas brasileiras	100
Figura 13. Aspecto visual das frutas coletadas no Sítio Frutas Raras-SP e na Fazenda Gameleira-GO. (Fotos com direitos autorais atribuídos à proponente desta proposta e tiradas com autorização dos proprietários do Sítio Frutas Raras e da Fazenda Gameleira).....	114
Figura 14. Aspecto visual das polpas das frutas após o processo de liofilização.....	115
Figura 15. Atividade de frutas nativas brasileiras sobre a ativação do NF- κ B <i>in vitro</i>	124
Figura 16. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com atividade antioxidante e anti-inflamatória de 5 espécies de frutas nativas brasileiras	139
Figura 17. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir da atividade antioxidante e anti-inflamatória de frutas nativas brasileiras (araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá).....	141
Figura 18. Mapa de CP mostrando relação entre a atividade antioxidante e anti-inflamatória de frutas nativas brasileiras (araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá)	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais em mg EAG g ⁻¹ (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos extratos de dez espécies frutíferas em base seca.....	58
Tabela 2. Atividade antioxidante (médias $\pm$ DP, n=3) das frutas nativas pelos métodos do sequestro do radical ABTS (ABTS ^{•+}) e radical peroxila (ROO [•]).....	60
Tabela 3. Correlação (r) entre as respostas antioxidantes obtidas por diferentes métodos e o teor de compostos fenólicos totais.....	62
Tabela 4. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de compostos fenólicos por CLAE.....	67
Tabela 5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de compostos fenólicos por CLAE.....	68
Tabela 6. Compostos fenólicos (mg.g ⁻¹) e atividade antioxidante <i>on-line</i> (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV.....	69
Tabela 7. Compostos fenólicos (mg.g ⁻¹) e atividade antioxidante <i>on-line</i> (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV.....	71
Tabela 8. Antocianinas (mg.g ⁻¹) dos extratos de três espécies de frutas nativas brasileiras, por CLAE-DAD.....	84
Tabela 9. Compostos fenólicos identificados em araçá-boi por CG/EM.....	87
Tabela 10. Compostos fenólicos identificados em cambuí-cipó por CG/EM.....	88
Tabela 11. Compostos fenólicos identificados em murici vermelho por CG/EM.....	89
Tabela 12. Compostos fenólicos identificados em murici guassú por CG/EM.....	90
Tabela 13. Compostos fenólicos identificados em morango silvestre por CG/EM.....	91
Tabela 14. Compostos fenólicos identificados em cajá por CG/EM.	92
Tabela 15. Compostos fenólicos identificados em cambuci por CG/EM.	93
Tabela 16. Compostos fenólicos identificados em jaracatiá-mamão por CG/EM.	94
Tabela 17. Compostos fenólicos identificados em juquioba por CG/EM.....	94
Tabela 18. Compostos fenólicos identificados em fruta-do-sabiá por CG/EM.	95
Tabela 19. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada no teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e composição fenólica (HPLC-DAD e CG-EM) em frutas nativas brasileiras...	97
Tabela 20. Atividade antioxidante (médias $\pm$ DP, n=3) de frutas nativas brasileiras pelos métodos do sequestro do ânion superóxido (O ₂ ^{•-}), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico	

(NO•).....	120
Tabela 21. Correlação entre as respostas antioxidantes obtidas por diferentes métodos.....	123
Tabela 22. Compostos identificados no araçá-boi pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)	134
Tabela 23. Compostos identificados no cambuí-cipó pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).....	135
Tabela 24. Compostos identificados no murici guassú pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)	136
Tabela 25. Compostos identificados no morango silvestre pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)	137
Tabela 26. Compostos identificados no cajá pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).....	138
Tabela 27. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada com atividade antioxidante e anti-inflamatória em frutas nativas brasileiras.....	140

1 INTRODUÇÃO

As espécies frutíferas nativas representam um patrimônio genético de valor inestimável para a preservação ambiental e impulsionam os setores públicos e privados a buscar novas matérias-primas por serem fontes de antioxidantes naturais a serem exploradas nos âmbitos alimentício, farmacêutico e cosmético. Neste sentido a utilização da flora nativa, sobretudo as espécies frutíferas, representa um caminho interessante e promissor sob diferentes aspectos, os quais envolvem a valorização das frutas nativas, conservação ambiental e o desenvolvimento econômico (INFANTE et al., 2014).

Além da preservação das espécies e do patrimônio genético, ressalta-se a riqueza de nutrientes e compostos bioativos presentes nestas frutas, que conduzem o crescente interesse pelo seu consumo e de seus produtos. Estudos epidemiológicos indicam que a ingestão frequente de frutas pode reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo, induzido por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e, conseqüentemente, diminui o risco de doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (COSTA et al., 2013). Portanto uma dieta rica em frutas propicia uma boa saúde, uma vez que os compostos biologicamente ativos presentes podem melhorar ou prevenir certas condições fisiológicas (LI; HAGERMAN, 2013).

Estudos recentes demonstraram que algumas espécies de frutas nativas e seus subprodutos (cascas, polpas e sementes), apresentaram alta capacidade para inativar espécies reativas, sendo que os resultados obtidos se correlacionaram com a atividade anti-inflamatória (INFANTE et al., 2016; LAZARINI et al., 2016). Várias doenças crônicas degenerativas tem sua origem em processos inflamatórios subclínicos crônicos, causados principalmente por radicais livres, como artrite (autoimune), doenças cardiovasculares, tal como a arteriosclerose, Alzheimer, doença de Parkinson, obesidade mórbida, alguns tipos de câncer, etc. O consumo diário de alimentos com atividades antioxidante e anti-inflamatória poderia ajudar a combater esses processos subclínicos e evitar certos tipos de nosologias, cuja etiologia ainda é desconhecida (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Entre a grande diversidade de fotoquímicos do reino vegetal, os compostos fenólicos tais como os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminoides, cumarinas, lignanas e quinonas, entre outros, têm atraído grande interesse devido as suas bioatividades e prevenção de certas doenças crônicas degenerativas, conforme estudos epidemiológicos e clínicos (CABRERA; MACH, 2012). Os flavonoides, por exemplo, são encontrados em frutas e em vegetais, sendo também conhecidos por apresentarem atividades anti-inflamatória,

antimicrobiana, anticâncer, antialérgica, antidiabético, antidiarreica e antioxidante (YANG et al., 2014).

Portanto, diante dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* e a composição fenólica de 10 frutas nativas brasileiras pouco conhecidas: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuití ou cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*), murici guassú (*Byrsonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci (*Campomanesia phaea*), cajá ou taperebá (*Spondias mombin* L.), jaracatiá-mamão (*Jacaratia dodecaphylla*), juquirioba (*Solanum alternopinatum*) e fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*).

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1. A importância do conhecimento da diversidade das frutas nativas brasileiras

O Brasil possui condições climáticas adequadas para o desenvolvimento de um grande número de frutas nativas, várias ainda desconhecidas, o que representa um grande potencial agroindustrial e uma fonte de renda para os produtores locais. Dessa forma, a biodiversidade é importante para o conhecimento de novos compostos bioativos, desenvolvimento do setor agroindustrial, alimentício, bem como da descoberta de novos fármacos. É também relevante a busca de substâncias bioativas inéditas provenientes de produtos naturais comestíveis e/ou a procura por novos alimentos funcionais que melhorem a qualidade de vida. Estima-se que só a região amazônica possua cerca de 220 espécies de frutas comestíveis, representando 44% da diversidade de frutas nativas no Brasil. Essas frutas representam uma importante fonte de nutrientes e substâncias bioativas na alimentação daquelas comunidades locais (INFANTE et al., 2016; LAZARINI et al., 2016; MARIKO et al., 2017; ORQUEDA et al., 2017).

Do ponto de vista agroindustrial, observa-se o crescimento na produção de algumas frutas nativas consolidadas como, por exemplo, o açaí que aumentou sua produção em 8,3%, passando de 1,0 para 1,1 milhão de tonelada entre 2015 e 2016 (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2016). Atualmente o açaí é vinculado à imagem de alimento saudável, devido a sua alta capacidade antioxidante e riqueza de substâncias bioativas. No entanto, ainda existe uma subutilização de frutas nativas o que tem ocasionado baixa popularidade no território brasileiro, cuja população frequentemente desconhece as frutas nativas brasileiras (ROSSO, 2013; DONADO-PESTANA et al., 2015).

O pouco conhecimento sobre essas frutas associado à ampla biodiversidade brasileira prejudica a investigação da composição química e também a identificação e quantificação de substâncias bioativas em frutas nativas. Por outro lado, a identificação desses compostos bioativos poderiam exercer impacto positivo na valorização dos produtos naturais nacionais (PAZ et al., 2015). Portanto, é imprescindível o estudo do potencial nutricional e bioativo das frutas nativas, de forma a se consolidarem no mercado e, assim, alcançarem cada vez mais consumidores de alimentos saudáveis e funcionais (PAZ et al., 2015).

Além da subutilização das plantas nativas, a exploração não sustentável, como a especulação imobiliária, turismo predatório, pressão demográfica, atividade madeireira, ciclos econômicos relacionados às *commodities*, marcaram mais de 500 anos de exploração desenfreada. Essas atividades têm ameaçado a extinção de quase 1.200 espécies vegetais, das quais 265 se encontram em estado crítico de perigo, embora somente à uma pequena fração destas espécies tenha sido atribuída a algum uso (CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFLORA, 2013). É de se esperar que esta fração sofra aumento à medida que novas pesquisas sejam desenvolvidas, podendo proporcionar melhor aproveitamento das espécies nativas, por exemplo, como fonte de substâncias para o desenvolvimento de novas drogas e de alimentos funcionais, o que favoreceria também a sua conservação.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 1,7 milhão de mortes por ano em todo o mundo (2,8%) estão ligadas ao baixo consumo de frutas e vegetais. Assim, o aumento do consumo de frutas e vegetais tem sido encorajado por órgãos governamentais e não-governamentais, envolvendo inclusive quantias significantes de recursos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013, REKHY; MCCONCHIE, 2014). O consumo de frutas é benéfico para a saúde humana, pois está associado à prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas, câncer e úlcera gástrica, inflamação e distúrbios relacionados ao envelhecimento, sendo que estes benefícios têm sido atribuídos principalmente aos compostos fitoquímicos, como os compostos fenólicos com atividade antioxidante e anti-inflamatória (SLAVIN; LLOYD, 2012, KIM et al., 2013, RIBEIRO et al., 2014; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015; INFANTE et al., 2016; OLDONI et al., 2016; RODRIGUEZ-CASADO, 2016).

No entanto, a maior parte dos estudos realizados a respeito da capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e atividade anti-inflamatória de frutas foram feitas para espécies exóticas, e portanto, poucos são os trabalhos sobre o potencial bioativo de frutas nativas e genuinamente brasileiras (NUNOMURA; LIMA et al., 2007; GENOVESE et

al., 2008; GONÇALVES; FARIA et al, 2008; REYNERTSON et al., 2008; LAJOLO; GENOVESE, 2010; PEREIRA et al., 2013; DENARDIN et al., 2015; INFANTE et al., 2016).

Neste sentido, novas espécies frutíferas representam um caminho interessante e promissor sob diferentes aspectos, pois envolvem a valorização das frutas nativas, conservação ambiental, desenvolvimento econômico e inspiração para a descoberta de novos compostos bioativos para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

1.1.2 Frutas nativas pouco conhecidas

Dentre as frutas mais consumidas pela população brasileira como, abacate, goiaba, banana, caqui, coco-da-baía, figo, laranja, maracujá, limão, abacaxi, mamão, manga, melancia, pêra, pêssego, tangerina e uva, apenas três são nativas: goiaba, maracujá e abacaxi. A grande maioria das frutas nativas ainda são pouco conhecidas e, dentre essas, podemos citar o araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuití ou cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*), murici guassú (*Byrsonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci (*Campomanesia phaea*), cajá (*Spondias mombin* L.), jaracatiá-mamão (*Jacaratia dodecaphylla*), juquirioba (*Solanum alternopinatum*) e fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*).

O araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp.), da família das Myrtaceae, é uma árvore frutífera nativa da Amazônia ocidental, rica em terpenos voláteis, fibras e principalmente vitamina C. Estudos preliminares mostraram que essa fruta possui alto teor de compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante, porém com variações significantes entre os diferentes genótipos (MEDINA et al., 2011). A quercetina glicosilada foi encontrada em araçá-boi e o valor ORAC encontrado para essa espécie foi de 371,98 $\mu\text{mol trolox } 100 \text{ g}^{-1}$ (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; CARVALHO-SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; NERI-NUMA, et al., 2013).

O cambuití-cipó (*Sagerectia elegans*) pertence à família das Rhamnaceae. É uma espécie trepadeira, descoberta no ano de 2009, e muito semelhante à Gurrupíá (*Celtis iguanea*) e ao Salta martim (*Strychnus brasiliensis*). A planta frutifica de janeiro a março, os frutos são pequenos e ricos em antioxidantes e podem ser consumidos *in natura*, pois o sabor é agradável (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011).

O gênero *Byrsonima* (*Malpighiaceae*) possui cerca de 150 espécies, e dentre elas está o murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*) e o murici guassú (*Byrsonima lancifolia*). Várias espécies deste gênero são amplamente utilizadas no tratamento de complicações

gastrointestinais. Estudos ainda relatam várias atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, incluindo ação contra bactérias, fungos e protozoários, além de atividade anti-inflamatória tópica e sistêmica. Fitoquimicamente, este gênero caracteriza-se pela presença de flavonoides e triterpenoides (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

Em relação ao gênero *Rubus*, Oliveira et al. (2016) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante em morango silvestre (*Rubus rosaefolius*) e encontraram 5,902 mg equivalente de ácido gálico L⁻¹, sugerindo que o seu consumo seria benéfico para a saúde.

O cajá ou taperebá (*Spondias mombim* L.) é muito apreciado devido ao seu sabor exótico, além de seus altos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação a outras frutas consumidas (TIBURSKI et al., 2011). Há relatos também sobre a capacidade antioxidante, pelo método DPPH, de cambuci (*Campomanesia phaea*) (9,0 µmol de Trolox g⁻¹) e jaracatiá (*Jaracatia spinosa*) (4,4 µmol de Trolox g⁻¹) (GENOVESE et al., 2008).

O gênero *Solanum* possui várias espécies que são comumente usadas por várias comunidades ribeirinhas para o tratamento de doenças da garganta (*Solanum alternatopinnatum*), além de ser diurético (*Solanum cernuum* Vell.) (BRANDÃO et al., 2012), antiviral (contra o vírus da hepatite C) (*Solanum rantonnetii*) (RASHED et al., 2014), antioxidante (*Solanum tuberosum* L.) (LÓPEZ-COBO et al., 2014) e anti-inflamatório (*Solanum lycocarpum* A. St. Hil) (DA COSTA et al., 2015).

A fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*), da família Solanaceae, possui vários alcaloides e taninos. De fato, algumas espécies de solanáceas são conhecidas pela produção de alcaloides bioativos de importância para a saúde humana (JERZYKIEWICZ, 2007).

Portanto, frutas nativas brasileiras são fontes promissoras de novos compostos bioativos para consumo *in natura* e/ou elaboração de alimentos funcionais com atividades antioxidante e anti-inflamatória.

1.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos que apresentam ação biológica, metabólica ou fisiológica específicas são denominados de compostos bioativos. Como exemplo dessas substâncias, têm-se os compostos fenólicos, carotenoides, ácidos graxos, aminoácidos essenciais e fibras (ALMEIDA et al., 2011; COSTA; JORGE, 2011).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e sintetizados a partir do ácido chiquímico e do ácido malônico, o qual tem origem da fenilalanina e em menor intensidade da tirosina (via ácido chiquímico) (Figura 1) (SHAHIDI; NACZK, 2003; DEY et al., 2016).

Figura 1. Esquema simplificado das rotas biossintéticas envolvidas na produção de compostos fenólicos. Fonte: Adaptado de Crozier (2003).

Quimicamente os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que apresentam um anel aromático (C6) ligado a um ou mais grupos hidroxila (-OH). Possuem papel importante na pigmentação, no crescimento e reprodução das plantas, assim como na resistência contra patógenos (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011). Já o consumo desses compostos na alimentação humana está relacionado com a ação antioxidante e anti-inflamatória, devido a capacidade de transferência de elétrons e/ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, bem como a capacidade de se ligar a íons metálicos potencialmente pró-oxidantes (CRAFT et al., 2012). Eles também estão associados a uma redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares, dermatite atópica, diabetes e doença de Alzheimer (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2010; KOLNIAK-OSTEK, et al., 2015).

No final do século XX, o interesse nos fenólicos de alimentos aumentou grandemente, principalmente pelas suas propriedades sequestrantes de radicais livres

(AHMED et al., 2015), ação anti-inflamatória, atividades antimicrobiana e antiproliferativa (VELDERRAIN RODRÍGUEZ et al., 2014). Os polifenóis também podem exercer um efeito antioxidante indireto, ou seja, protegendo as enzimas antioxidantes endógenas (PRADEEP; SREERAMA, 2015; ZHANG et al., 2015a, 2015b).

Os compostos fenólicos podem ser segmentados em dois grupos: os não flavonoides e os flavonoides. O grupo dos não flavonoides contém os compostos que possuem estrutura química C6-C1 (ácido gálico, por exemplo), C6-C3 (ácido cumárico, por exemplo) ou C6-C2-C6 (resveratrol, por exemplo) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HUBER; HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009; MARTINS et al., 2011). Os ácidos fenólicos são derivados hidroxilados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Esses ácidos têm recebido atenção considerável, pois possuem ação protetora contra o câncer e doenças cardíacas, além da sua ubiquidade nos alimentos de origem vegetal comumente consumidos (BASKARAN et al., 2016). Já os estilbenos são caracterizados por apresentar em sua estrutura a presença de um núcleo 1,2-difeniletileno, os quais podem ser divididos em estilbenos monoméricos e oligoméricos (SHEN; WANG; LOU, 2009). Nas plantas, os estilbenos apresentam ação protetora contra os estresses bióticos (KISELEV et al., 2016). O estilbeno mais importante é o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), comumente encontrado em uvas, *berries*, amendoim e vinho (PAUL et al., 2010; MELO et al., 2016; LINGUA et al., 2016; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015).

No grupo dos flavonoides estão os compostos que apresentam estrutura química descrita como C6-C3-C6, e constituem o maior grupo, com mais de 4000 compostos já identificados. Os flavonoides são conhecidos como os principais responsáveis pela capacidade antioxidante em frutas, devido ao elevado potencial de oxidação e redução de sua estrutura química, o que os permite atuarem como agentes redutores e quelantes de metais (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; KAMILOGLU, et al., 2016). Os flavonoides são classificados em flavonas (apigenina, luteolina), flavonois (quercetina, miricetina), catequinas ou flavanois (epicatequina, galocatequina), flavanonas (naringenina, hesperitina), antocianinas (cianidina e pelargonidina), isoflavonas (genisteína, daidzeína) e chalconas (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química dos principais flavonoides encontrados em frutas.

Fonte: Adaptado de Ignat, Volf e Popa (2011).

As antocianidinas quando ligadas a uma ou mais unidades glicosídicas são chamadas antocianinas. Estão presentes na casca da uva e são responsáveis pela cor vermelha das uvas e dos vinhos (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015; MELO et al., 2016). Elas também possuem ação antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena, além de efeito protetor no sistema cardiovascular. São importantes para a caracterização das variedades de uva e representam um recurso importante para a indústria de corantes naturais (DE ROSSO et al., 2012). As antocianinas estão ligadas a uma ou mais unidades glicosídicas, sendo polihidroxiglicosiladas e polimetoxiderivadas de sais de 2-fenilbenzopirilium (flavilium). As unidades glicosídicas podem ser ligadas à antocianina por ligação α ou β , e sempre na posição 3 da porção aglicona. Quando açúcares adicionais estão presentes na molécula da antocianina, elas estão ligadas às posições 5 e 7, e menos frequentemente nas posições 3' e 5'. Os açúcares encontrados em antocianinas podem ser hexoses (glicose e galactose) e pentoses (xilose, arabinose) (OSORIO et al., 2012; OROIAN; ESCRICHE, 2015).

Flavan-3-ols (algumas vezes referidos como flavanois) são derivados de flavanos e possuem a estrutura 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromeno-3-ol. Estes compostos incluem a catequina, o galato de epicatequina, a epigallocatequina, o galato de epigallocatequina, as proantocianidinas, as teaflavinas e as tearrubiginas (VOGIATZOGLOU et al., 2014). As proantocianidinas consistem em subunidades de catequina e epicatequina (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015). São encontradas principalmente no chá verde, chá preto e no vinho tinto (NIJVELDT et al., 2001).

Os flavonóis são identificados pela localização do grupo álcool no anel C. Em geral, as porções de açúcar frequentes nos flavonóis são a glicose, ramnose, galactose e arabinose (RAHMAN, 2012). Os principais flavonóis são a quercetina, miricetina, rutina, isorhamnetina

e kaempferol, sendo a quercetina um dos flavonóis mais conhecidos (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

As flavanonas são principalmente encontradas em frutas cítricas e ameixas (KHAN; DANGLES, 2014). A naringenina é encontrada predominantemente em citrus, como laranjas (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

As flavonas diferem dos outros flavonoides, pois possuem uma ligação dupla entre C2 e C3 no esqueleto dos flavonoides, não havendo substituição na posição C3, além de serem oxidadas na posição C4. Os flavonóis são pigmentos primários em flores brancas e de cor creme e também atuam como copigmentos com antocianinas em flores azuis. Flavonas e outros flavonoides também podem atuar como protetores UVB e pesticidas naturais em plantas. Tal como acontece com outros flavonoides, as flavonas estão tipicamente presentes em plantas na forma glicosilada. Entretanto, estes compostos podem ser modificados por enzimas endógenas, tais como as malonas esterases (HOSTETLER; RALSTON; SCHWARTZ, 2017).

As isoflavonas são um grupo heterociclo de compostos que possuem oxigênio, sendo as mais comuns a daidzeína, genisteína e glicetina de ocorrência em leguminosas, especialmente na soja (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013; KASSEM, 2015).

Os taninos com uma massa molecular de até 30.000 Da são produzidos por plantas como metabolitos secundários e podem ser amplamente divididos em duas classes de macromoléculas, denominadas taninos hidrolizáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolizáveis têm uma massa molecular variando entre 500 e 5000 Da, além de caráter adstringente. Os taninos condensados ou as proantocianidinas são polímeros de alto peso molecular com uma massa molecular de até 30000 Da (OSORIO et al., 2012). Já as ligninas são um grupo de compostos fenólicos com uma estrutura complexa, constituída de álcoois fenilpropanóides que podem estar associados com celulosas e proteínas, e que ocorrem em altas concentrações na linhaça e em outras sementes (LANDETE, 2012).

Nas plantas os compostos fenólicos, como os flavonoides, atuam como atrativo para o polinizador, como protetores contra radiação UV, para a fertilidade do pólen, para o estabelecimento de simbioses microbianas e defesa de patógenos, além de participarem da formação da cor e sabor dos frutos (KOLNIAK-OSTEK, et al., 2015).

De uma forma geral, a ação antioxidante dos flavonoides se deve ao grupo fenólico hidroxil unido ao anel fenólico, o que lhes permite que atuem como redutores, doadores de hidrogênio, sequestrantes de oxigênio singlet e ânion superóxido e quelante de metais. Os flavonoides também ativam enzimas antioxidantes, inibem as oxidases, diminuem o estresse

nitrosativo e aumentam os níveis de ácido úrico e moléculas de baixo peso molecular importantes (PRASAD et al., 2004).

Assim, os flavonoides podem interferir de diferentes formas na produção de radicais livres. Uma das formas é a eliminação direta desses radicais. Os flavonoides são oxidados por espécies reativas de oxigênio, resultando em um radical menos reativo. Devido à alta reatividade do grupo hidroxil dos flavonoides, os radicais livres são inativados de acordo com a seguinte equação (1).

Sendo que $\text{R}\bullet$ é um radical livre e $\text{O}\bullet$ é uma espécie reativa de oxigênio.

Alguns flavonoides podem regular a baixa produção de superóxidos, enquanto que outros podem eliminar o peroxinitrito. Epicatequina e rutina são exemplos de flavonoides de grande poder para a eliminação de radicais livres (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994).

Os flavonoides também podem atuar como antioxidantes por meio da inibição de enzimas pró-oxidantes. O exemplo mais relevante é a inibição da xantina oxidase, a qual pode, em determinadas situações, produzir o radical superóxido. O significado patológico da produção de superóxido pela xantina oxidase ainda é motivo de discussão, porém é sabido que pode ser muito importante em patologias como aterosclerose. A capacidade antioxidante da rutina *in vivo* pode ser devido a atividade inibitória da enzima xantina oxidase. Ao remover os radicais livres, os flavonoides podem inibir a oxidação de LDL. Esta ação protege as partículas de LDL e, teoricamente, os flavonoides podem ter ação preventiva contra a aterosclerose (NIJVELDT et al., 2001; PISOSCHI; POP, 2015).

Outra forma dos flavonoides prevenir a formação de radicais livres é pela quelação de metais de transição. Alguns metais de transição, como o ferro, podem cataliticamente formar radicais livres muito reativos. Muitas estruturas de flavonoides possuem as propriedades químicas de quelar os metais em um estado no qual a produção de radicais é inibida. Além desta ação, metais e flavonoides podem, em algumas circunstâncias, formar complexos que eliminam os radicais (NIJVELDT et al., 2001).

1.1.4. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

Os radicais livres são produzidos naturalmente como subprodutos da respiração aeróbica e do metabolismo ou, então, por alguma disfunção biológica (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Esses radicais livres são definidos como átomos, moléculas ou íons que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que os tornam altamente instáveis e reativos e, portanto, tendem a se ligar a outros elétrons de moléculas próximas (REIS et al., 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2013). No entanto, o termo radical livre não é o mais apropriado para denominar os agentes reativos que causam doenças, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Durante o metabolismo mitocondrial, o oxigênio é reduzido até a formação de água, porém uma parte desse oxigênio não é reduzido à água, resultando em derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, sendo então denominadas como espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERS).

A produção de ERO é um processo que ocorre na membrana interna da mitocôndria, nos complexos I, II, III e IV, os quais catalisam a transferência de elétrons para a fosforilação de ADP para ATP, portanto, a produção de ERO intracelular é oriunda das mitocôndrias. Em condições normais, 1 a 5% do oxigênio da respiração são convertidos em ERO. A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre principalmente em dois pontos na cadeia de transporte de elétrons, especificamente no complexo I (NADH) e complexo III (ubiquinona-citocromo-redutase). Sob condições metabólicas normais, o complexo III é o principal local de produção de ERO, de modo que o ataque de radicais livres geralmente ocorre no complexo mitocondrial da cadeia respiratória. Complexos I e III também são considerados locais de produção de outras espécies reativas de oxigênio (BHAT et al., 2015) (Figura 3).

Figura 3. A cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e a formação de ERO nos complexos I e III (BHAT et al., 2015).

Em condições normais as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio servem como mensageiras redox importante na regulação de várias vias de sinalização (VASCONCELOS et al., 2007). Por exemplo, o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) é um radical que atua como um importante sinal biológico em diversos processos fisiológicos, como neurotransmissão, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso, regulação da pressão arterial e regulação imune (BHAT et al., 2015). No entanto, em níveis elevados de ERO e ERN podem causar danos biológicos, os quais são denominados de estresse oxidativo e estresse nitrosativo, respectivamente (FALOWO; FAYEMI; MUCHENJE, 2014).

Os organismos utilizam defesas antioxidantes endógenas e exógenas para proteger as células contra os danos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estas defesas incluem a atividade antioxidante do sistema enzimático endógeno, tais como a catalase, glutathione-peroxidase e superóxido dismutase, e sistema não enzimático, como a redução de íons (VERMA et al., 2013).

Em relação aos antioxidantes enzimáticos, eles são divididos em defesas enzimáticas primárias e secundárias. A defesa primária é composta de três enzimas importantes que impedem a formação ou neutralização de radicais livres: a) glutathione peroxidase, que doa dois elétrons para reduzir peróxidos e também elimina peróxidos como substrato para a reação de Fenton; b) catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e c) superóxido dismutase que converte o superóxido em peróxido de hidrogênio, substrato para catalase (RAHMAN, 2007). A defesa enzimática secundária inclui glutathione redutase e a glicose-6-fosfato desidrogenase. A glutathione redutase reduz a glutathione oxidada para a sua forma reduzida, enquanto que a glicose-6-fosfato desidrogenase regenera o NADPH necessário para o processo de redução da glutathione oxidada (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Os antioxidantes endógenos não enzimáticos são vitaminas, cofatores enzimáticos (Q10), compostos de nitrogênio (ácido úrico) e peptídeos (glutathione). A vitamina A ou retinol possui atividade antioxidante pela capacidade de se combinar com radicais peróxilas, impedindo assim a peroxidação lipídica. A coenzima Q10 atua prevenindo a formação de radicais peróxil de lipídeos, embora tenha sido relatado que esta coenzima também pode neutralizar esses radicais mesmo após sua formação. Outra função importante é a capacidade de regenerar a vitamina E. Alguns autores descrevem que de fato esse processo é o caminho mais provável para a regeneração da vitamina E, por meio do ascorbato (vitamina C). O ácido úrico, produto final do metabolismo de nucleotídeos da purina em humanos, é conhecido por evitar a superprodução de oxidantes oxo-heme que resultam da reação da hemoglobina com peróxidos. Por outro lado, também previne a lise de eritrócitos por peroxidação e é um potente sequestrador de oxigênio singlete e radicais hidroxil. A glutathione é um tripeptídeo endógeno que protege as células contra radicais livres, quer doando um átomo de hidrogênio ou um elétron, sendo também muito importante na regeneração de outros antioxidantes como o ascorbato (ALMEIDA et al., 2011; COSTA; JORGE, 2011; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O estresse oxidativo pode ocorrer em qualquer tecido do corpo humano (DEFERME et al., 2015), uma vez que envolve a produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias específicas (HUSAIN et al, 1987). Existem algumas razões para que isso ocorra: aumento do nível de compostos endógenos e exógenos que entram em auto-oxidação; redução das reservas de antioxidantes de baixo peso molecular; inativação de enzimas antioxidantes e a queda na produção dessas enzimas e dos antioxidantes de baixo peso molecular, além da combinação de dois ou mais dos fatores citados (LUSHCHAK, 2014). As consequências do aumento de espécies reativas de oxigênio variam de acordo com o nível e local de geração desses compostos, além da eficiência dos sistemas antioxidantes, disponibilidade energética e alvos celulares (LUSHCHAK, 2014).

O estresse oxidativo é induzido por radicais de oxigênio (radical superóxido - $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila - $HO^{\bullet}$) como derivados não radicalares (peróxido de hidrogênio H_2O_2 , por exemplo). Já as ERN incluem radicais como o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$), assim como grupos não radicalares como o peroxinitrito ($ONOO^-$). A superprodução de espécies reativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo. O estresse nitroso causa reações de nitrosilação que podem comprometer a estrutura de proteínas (CALAS-BLANCHARD; CATANANTE; NOGUER, 2014).

O oxigênio molecular tem uma configuração eletrônica única e a adição de um elétron para o O_2 forma o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O ânion superóxido é decorrente de

processos metabólicos ou a ativação do oxigênio por irradiação. É considerada uma ERO primária e pode interagir com outras moléculas, por meio de processos enzimáticos ou catalisados por metal, para gerar ERO secundárias (VASCONCELOS et al., 2007).

O peróxido de hidrogênio pode ser gerado por qualquer sistema que produza o radical superóxido, uma vez que o ânion superóxido é um nucleófilo ativo capaz de atacar centros carregados positivamente. Como um agente oxidante reage com doadores de hidrogênio (por exemplo, ascorbato e tocoferol), podendo dismutar e produzir oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Equação 2).

A presença de oxidases (urato oxidase, glicose oxidase e D-aminoácido oxidase) pode resultar na síntese direta de peróxido de hidrogênio, por transferência de dois elétrons para o oxigênio molecular. O H_2O_2 é capaz de produzir radicais altamente reativos quando da sua interação com íons metálicos, liberando assim ânion hidroxila e o radical hidroxil, de acordo com a reação de Fenton (Equação 3). A ação direta do H_2O_2 envolve o ataque a proteínas heme com liberação de ferro e inativação enzimática, além da oxidação de DNA, lipídios, grupos -SH e cetoácidos. O H_2O_2 pode ser eliminado pela catalase, por sua conversão em água e oxigênio molecular (PISOSCHI; POP, 2015).

O radical hidroxil é altamente reativo e pode ser formado: a) quando o peróxido de hidrogênio reage com íons de Cu e Fe recebe mais um elétron e forma um radical hidroxil-reação de Fenton (Equação 3); b) quando ocorre reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido, catalisada por metais-reação de Haber-Weiss (Equação 4) e c) quando o radical superóxido reage com óxido nítrico gerando peroxinitrito, que pode levar a formação do radical hidroxil (Equação 5) (VASCONCELOS et al., 2007).

O radical hidroxil pode afetar diferentes macromoléculas dentro das mitocôndrias como proteínas, DNA e lipídios (VAN HOUTEN; WOSHNER; SANTOS, 2006), sendo que esses

danos podem resultar na formação de superóxidos (ALEXEYEV, 2009; VOETS et al., 2012; CASTRO et al., 2012). O aumento da concentração de radicais superóxido contribui para o estresse oxidativo metabólico, lesão celular e instabilidade genômica. Uma vez que o DNA mitocondrial é modificado, se torna alvo de dano oxidativo e pode amplificar o estresse oxidativo, diminuindo assim a expressão de proteínas que são importantes para o transporte de elétrons. Isto por sua vez cria um círculo vicioso de produção de ERO e danos a organelas que eventualmente leva à apoptose (HOLLENSWORTH et al., 2000).

O ácido hipocloroso (HOCl) surge devido à presença da mieloperoxidase em macrófagos e neutrófilos, e possui propriedades oxidativas. A mieloperoxidase é responsável pela geração de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio na presença do ânion cloreto. O HOCl induz a cloração oxidativa em biomoléculas como lipídios, proteoglicanos, aminoácidos e outros compostos de membrana. O aumento no estado patológico de espécies ativas de oxigênio está correlacionado à citotoxicidade (PISOSCHI; POP, 2015).

A cadeia respiratória também é sensível ao dano mediado pelo NO• e ONOO⁻. Nitração pode modificar as proteínas mitocondriais e, como tal, resultar em distúrbios na função de muitas enzimas metabólicas da cadeia de transporte de elétrons, como a citocromo c oxidase (ANDREAZZA, et al., 2010).

Exposição aguda a ERO leva ao mau funcionamento dos complexos da cadeia de transporte I, II e III e do ciclo de Krebs, resultando em inativação da produção de energia mitocondrial (GHEZZI; ZEVIANI, 2012).

Muitas evidências sugerem que o aumento do estresse oxidativo e a apoptose são os responsáveis pelas patogêneses de várias doenças neurodegenerativas relacionadas à idade. Devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e fatores ambientais, as mutações ocorrem no DNA mitocondrial (mtDNA), que por sua vez leva a falha de energia e doenças neurodegenerativas. Nos distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade, as mitocôndrias podem ter um papel importante em doenças como a doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (HD), esclerose lateral amiotrófica (ALS) e doença de Parkinson (PD). Nas diferentes doenças neurodegenerativas a disfunção mitocondrial tem sido considerada a principal causa dessas patogêneses (FEDERICO et al., 2012).

Assim, o organismo pode necessitar da ajuda de antioxidantes exógenos que são obtidos a partir da dieta, tais como compostos fenólicos, vitaminas, minerais e carotenoides. Se não houver a ingestão desses antioxidantes exógenos, o aumento dos níveis destas espécies reativas irá exercer efeitos deletérios, causando danos oxidativos em macromoléculas e interrompendo o equilíbrio do balanço redox celular (DOWLING; SIMMONS, 2009).

Portanto, o desequilíbrio nos níveis de ERO/ERN é geralmente considerado um fator de risco para o início e progressão de doenças como aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (LAVECCHIA et al., 2013; SITI et al., 2015).

Estudos apontam que o estresse oxidativo possui relevância no processo do envelhecimento, pois ativa a via de sinalização do fator nuclear kappa beta (NF-kB) e este, por sua vez, ativa genes que inibem a morte celular provocando imunossenescência, atrofia e inflamação (SALMINEN; KAARNIRANTA, 2009). Assim, os danos mais graves provocados pelos radicais livres são no DNA e RNA, sendo que o acúmulo de bases danificadas e a mutação são processos que podem levar ao câncer. A peroxidação das membranas celulares leva ao acúmulo de lipídeos nas artérias e veias, podendo levar a trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS et al., 2006).

Portanto, o interesse no consumo de frutas tem aumentado devido a presença de antioxidantes exógenos que podem prevenir o estresse oxidativo celular (OUDE GRIEP et al., 2010; XIE et al., 2011; ABOUL-ENEIN; BERCZYNSKI; KRUK, 2013). Embora compostos fenólicos e carotenoides possam exibir outros tipos de mecanismos antioxidantes, eles são mais conhecidos por serem eficientes desativadores de ERO e ERN (KHAN; SIDDIQUE, 2012). Assim, frutas que contêm altas concentrações desses compostos contribuem para o equilíbrio entre os sistemas dos antioxidantes e pró-oxidantes, o que é essencial para uma vida saudável (VALKO et al., 2007).

As propriedades biológicas das frutas são atribuídas em grande parte aos altos níveis de compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e flavonoides (GARZÓN et al., 2010; HOGAN et al., 2010; RUFINO et al., 2010). Esses compostos podem assim proteger o corpo humano contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), prevenindo doenças crônicas degenerativas, doenças cardiovasculares, envelhecimento prematuro, diabetes e doenças neurodegenerativas (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; SCHULZ et al., 2015).

1.1.5. Atividade anti-inflamatória versus espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A inflamação é uma resposta biológica inerente ao organismo, a qual visa a homeostase tecidual e pode ser causada por um agente biológico, mecânico ou por uma resposta autoimune (ILIC et al., 2014). O estilo de vida e/ou fatores ambientais, nomeadamente fatores dietéticos, desempenham papéis reguladores no desenvolvimento de

muitas doenças degenerativas, como o câncer, cuja incidência poderia ser regulada por uma modificação estratégica na dieta (ROLEIRA et al., 2015).

Em condições normais ERO e ERN servem como importantes mensageiros na regulação de várias vias de sinalização. Em contrapartida o excesso dessas espécies causam danos irreversíveis aos diferentes componentes celulares e, como tal, promove a morte celular pela via intrínseca da apoptose. Durante o envelhecimento, a acumulação de mutações no DNA mitocondrial leva ao mau funcionamento da fosforilação oxidativa e, dessa forma, ocorre um desequilíbrio na expressão de enzimas (WANG et al., 2013).

As ERO e ERN estão associadas a doenças neurológicas, sendo que as mais comuns são a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington e esclerose múltipla (JAMES et al., 2014; MALEC-LITWINOWICZ et al., 2014; YANG et al., 2015). Com o envelhecimento da população, a prevalência destas doenças relacionadas tende a aumentar. As causas destas enfermidades não são totalmente compreendidas, exceto para a doença de Parkinson, e não há tratamento que modifique significativamente a progressão de qualquer uma delas (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV, 2012). Dos poucos fatores de risco que foram identificados para estas doenças, o aumento da idade é o único que é comum à doença de Alzheimer e à doença de Parkinson. Para a doença de Alzheimer, além do possível envolvimento do envelhecimento, estão envolvidos também a disfunção mitocondrial e os danos oxidativos, sendo que estes podem desempenhar papéis importantes na lenta e progressiva morte neuronal, que é característica de diversas doenças neurodegenerativas. O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio, sendo vulnerável a danos oxidativos. O estresse oxidativo pode causar danos celulares e os radicais livres podem oxidar componentes celulares, como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, induzindo a apoptose e a necrose. De acordo com a literatura, existe relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a indução de apoptose (ou necrose) com distúrbios neurodegenerativos (GIACOPPO et al., 2015).

Todas essas doenças crônicas são caracterizadas por níveis elevados de marcadores inflamatórios, tais como citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12), marcadores de estresse oxidativo, como, por exemplo, prostaglandinas E2, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferons, proteína C-reativa e aumento de células imunológicas associadas com respostas inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013). Estes fatores podem resultar em danos nos tecidos sadios e eventualmente agravar a doença. Assim, tem sido feita a recomendação do consumo regular de frutas e vegetais, uma vez que evidências clínicas mostram que elas diminuem a

incidência de algumas doenças crônicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, aterosclerose e vários tipos de câncer (RICCIONI et al., 2010).

Diante do exposto, existe a necessidade de se buscar alimentos com potencial bioativo que possam inibir ou amenizar danos oxidativos relacionados a processos inflamatórios, limitando a progressão de doenças de origem metabólica e degenerativas prevalentes na população.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, H.Y.; BERCZYNSKI, P.; KRUK, I. Phenolic compounds: the role of redox regulation in neurodegenerative disease and cancer. Mini reviews in medicinal chemistry, **Boca Raton**, v. 13, n. 3, p. 385-398, 2013.
- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L.(Sumac) fruits. **Food chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015.
- AHMED, I. A. et al. Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. **Food Chemistry**, v. 172, p. 778–787, 2015
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n.2, p. 143-152, 2013
- ALEXEYEV, M. F. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5768-5787, 2009.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The international journal of biochemistry & cell biology, Amsterdam**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, 2010.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.
- ÁVAREZ-FERNADEZ, M. A. et al. Composition of Nonanthocyanin polyphenols in alcoholicfermented strawberry products using LC –MS (QTRAP), high-resolution MS (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 2041–2051, 2015

- ANDREAZZA, A. C. et al. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 360-368, 2010.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006
- BALISTEIRO, D. M.; ROMBALDI, C. V.; GENOVESE, M. I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. **Food Research International**, v. 51, n.1, p. 8–14, 2013
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R.. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, v. 82, p. 121-127, 2016.
- BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.
- BRANDÃO, M. G. et al. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.488-500, 2012.
- CABRERA, A.; MACH, N. Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. **Revista Española de Nutrición Humana y Dietética**, v. 16, n. 4, p. 143-153, 2012.
- CALAS-BLANCHARD, C.; CATANANTE, G.; NOGUER, T. Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1277–1286, 2014.
- CARNEIRO, T.B.; CARNEIRO, J.G.M. Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): Aspectos físicos, Químicos e Tecnológicos. **Revista Verde**, v.6, n.2, p.105 111, 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**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARVALHO-SILVA, L. B. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activity of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v.48, p.180–186, 2012.

- CASTRO, M. d. R. et al. Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 1, p. 29-37, 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**, v.44, p.1658–1670, 2011.
- CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA. Livro vermelho da flora brasileira. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/plataforma2/book/>. Acesso em: 05 abr 2017.
- CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DADMS/ MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884–5892, 2012.
- COSTA, A. G. V.; GARCÍA-DÍAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539–549, 2013.
- COSTA, T.; JORGE, N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes Beneficial Bioactive Compounds Present in Nuts and Walnuts. **Ciência Biológica e da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 2011.
- CRAFT, B. D. et al. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148–173, 2012.
- CROZIER, A. Classification and biosynthesis of plants and secondary products: na overview. In: GOLDBERG, G. (Ed). **Plants: diet and health**. Iowa: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003, cap. 2, p. 27-48.
- DA COSTA, G. A. F. et al. Antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and anti-inflammatory potential of the leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil.(Solanaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.
- DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.
- DEFERME, L. et al. Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: A toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. **Toxicology in vitro**, v. 29, p. 845-855, 2015.
- DEY, T.B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN. K.K.; SHARMA, A.; KUHAD, R.C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 53, p. 60-74, 2016.

- DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 6, p. 337-347, 2012.
- DONADO-PESTANA, C. M. et al. Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 69, p. 170-178, 2015.
- DE ROSSO, M. et al. Study of anthocyanic profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 120-129, 2012.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009.
- EDMANDS, W.M. et al. Polyphenol metabolome in human urine and its association with intake of polyphenol-rich foods across European countries. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n.4, p. 905–913, 2015
- ERENO, D. Pesquisadores externos contribuem com inovação da Natura. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 183, p. 67-71, 2011.
- FALOWO, A. B.; FAYEMI, P. O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, 64, 171–181, 2014
- FARIA, J.P. et al. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 827-829, 2008.
- FEDERICO, A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the neurological sciences**, v. 322, n. 1, p. 254-262, 2012.
- FUNDAÇÃO ISNTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2016/default.shtm> Acesso em: 01 dez. 2017.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 31, p. 6697–6703, 2011.
- GHEZZI, D.; ZEVIANI, M. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. In: **Mitochondrial Oxidative Phosphorylation**, p. 65-106, 2012

- GARZÓN, G. A. et al. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 980-986, 2010.
- GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, p.207-214, 2008.
- GIACOPPO, S. et al. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. **Fitoterapia**, 2015.
- GONÇALVES, A. E. S. S., LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidante/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4666–4674, 2010.
- GUEDES, F. B.; SEEHUSEN, S. E. **Pagamentos por Serviços Ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios**. Ministério do Meio Ambiente-MMA, 2011.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n. 6, p. 845-850, 1994.
- HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.
- HOLLENSWORTH, S. B. et al. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1161-1174, 2000.
- HOSTETLER, G. L.; RALSTON, R. A.; SCHWARTZ, S. J. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 3, p. 423-435, 2017.
- HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1278–1282, 2009.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489–2497, 1987
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.
- ILIC, N. M. et al. Anti-inflammatory activity of Grains of paradise (*Aframomum melegueta* Schum) extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 43, p. 10452-10457, 2014.

- INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored brazilian native fruits. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 2016.
- INFANTE, J.; MASSARIOLI, A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. Protective effects of Brazilian native fruits against reactive oxygen species. **Planta Medica**, v. 80, n. 10, 2014.
- JAMES, B. D. et al. Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. **Neurology**, v. 82, n. 12, p. 1045-1050, 2014
- Jerzykiewicz, J., 2007. Alkaloids of Solanaceae (Nightshade Plants) 53, 280–286
- KAMILOGLU, S. et al. A review on the effect of drying on antioxidant potential of fruits and vegetables. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. sup1, p. S110-S129, 2016.
- KASSEM, A. **Effect of row spacing on seed isoflavone contents in soybean** [Glycine max (L.) Merr.]. Plant and Animal Genome XXIII Conference. Plant and Animal Genome, 2015.
- KHAN, M. K.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.33, n.1, p. 85–104, 2014.
- KHAN, M. R.; SIDDIQUE, F. Antioxidant effects of Citharexylum spinosum in CCl₄ induced nephrotoxicity in rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.64, p. 349–355, 2012.
- KIM, K. H. et al. Polyphenols from the bark of Rhus verniciflua and their biological evaluation on antitumor and antiinflammatory activities. **Phytochemistry**, v.92, p. 113–121, 2013.
- KISELEV, K.V.; GRICORCHUK, V.P.; OGNEVA, Z.V.; SUPRUN, A.R.; DUBROVINA, A.S. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis*. **Phytochemistry**, v. 131, p. 57-67, 2016
- KOLNIAK-OSTEK, J.; OSZMIANŃSKI, Jan. Characterization of phenolic compounds in different anatomical pear (*Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS). **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p. 154-163, 2015.
- KRISHNAIAH, D.; SARBAT, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.
- LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936-948, 2012.

LAVECCHIA, T.; REA, G.; ANTONACCI, A.; GIARDI, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 53, p. 198-213, 2013.

LAZARINI, J. G. et al. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 249-257, 2016.

LI, M.; HAGERMAN, A. E. Interactions between plasma proteins and naturally occurring polyphenols. **Current drug metabolism**, v. 14, n. 4, p. 432-445, 2013.

LIMA, A.de et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa de na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LINGUA, M. S. et al. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p.332–345, 2016.

LÓPEZ-COBO, A. et al. Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.36, n.1, p.1-11, 2014.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MALEC-LITWINOWICZ, M. et al. Cognitive impairment in carriers of glucocerebrosidase gene mutation in Parkinson disease patients. **Neurologia I neurochirurgia polska**, v. 48, n. 4, p. 258-261, 2014.

MARIKO, N.; HASSIMOTTO, A.; LAJOLO, F. M.. Brazilian Native Fruits as a Source of Phenolic Compounds. **In: Global Food Security and Wellness**. Springer New York, 2017. p. 105-124.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **A review. Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, 128, 916–922, 2011.

MELO, P. S. et al. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açaí seed extracts and grape rachis extracts. *Food chemistry*, v. 213, p. 440-449, 2016.

- NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh—Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food research international**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.
- NUNOMURA, S. M.; FERNANDES, A. L. C. Avaliação da atividade antioxidante dos frutos de camu-camu, Myrciaria dúbia (myrtaceae). In: **29ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.
- OLIVEIRA, B. D. Á. et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v.84, p.59-66, 2016.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, 48, 170–179, 2012.
- OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. Information Sheet. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/> Acessado: 15 abril 2017.
- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.
- ORQUEDA, M. E. et al. Chemical and functional characterization of seed, pulp and skin powder from chilito (*Solanum betaceum*), an Argentine native fruit. Phenolic fractions affect key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 216, p. 70-79, 2017.
- OSORIO, C. et al. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1915–1921, 2012.
- OUDE GRIEP, L. M. et al. Raw and processed fruit and vegetable consumption and 10-year coronary heart disease incidence in a population-based cohort study in the Netherlands. **Plos One**, v. 5, n. 10, p. 1-6, 2010.
- PAUL, S. et al. *In vitro* and *in vivo* studies on stilbene analogs as potential treatment agents for colon cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3702-3708, 2010.
- PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.
- PEREIRA, M. C. et al. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 19-24, 2013.

- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PRADEEP, P. M.; SREERAMA, Y. N. Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. **Food Chemistry**, v.169, p. 455–463, 2015.
- PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n.3, p. 837-44, 2007.
- RAHMAN, A. U. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**, Vol. 36, Elsevier, 2012
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Interv. Aging** v. 2, p. 219–236, 2007.
- RASHED, K. et al. Potent antiviral activity of *Solanum rantonnetii* and the isolated compounds against hepatitis C virus in vitro. **Journal of Functional Foods**, v.p.11, 185-191, 2014.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.109, n.4, p.883–890, 2008.
- REIS, J.S. et al. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008
- RIBEIRO, A.B. et al. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140–148, 2014.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** n. 20, p. 933–956, 1996.
- RICCIONI, R. et al. The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 45, n. 1, p. 86-92, 2010.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- RODRIGUEZ-CASADO, A. The health potential of fruits and vegetables phytochemicals: notable examples. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 1097-1107, 2016.

- ROLEIRA, F. M. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235-258, 2015.
- ROSSO, V. V. Bioactivities of Brazilian fruits and the antioxidant potential of tropical biomes. **Food and Public Health**, v. 3, p. 37–51, 2013.
- RUFINO, M. do S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.121, p.996–1002, 2010.
- SALMINEN, A. et al. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. **Progress in neurobiology**, v. 87, n. 3, p. 181-194, 2009.
- SASOT, G. et al. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. **Food Research International**, 2017.
- SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. 2. ed. Boca Raton: CRC press, 2003. 576 p
- SHEN, T.; WANG, X.N.; LOU, H.X. Natural stilbenes: an overview. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 7, p. 916-935, 2009.
- SLAVIN, J.L.; LLOYD B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 506-516, 2012.
- SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015.
- SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LOIR, A.; REES, J.F.; ROGEZ, H.; LANRONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 331-339, 2008.
- SONG, B. J.; MANGANAIS, C.; FERRUZZI, M. G. Thermal degradation of green tea flavan-3-ols and formation of hetero- and homocatechin dimers in model dairy beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 305–312, 2015.
- TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v.44, p.2326-2331, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44–84, 2007.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI/MS- Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, v.181, p.146–151, 2015.

VAN HOUTEN, B.; WOSHNER, V.; SANTOS, J. H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. **DNA repair**, v. 5, n. 2, p. 145-152, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: Their journey after intake. **Food & Function**, v. 5, n.2, p. 189–197, 2014.

VERMA, N. et al. Differential Utilization of TATA Box-binding Protein (TBP) and TBP-related Factor 1 (TRF1) at Different Classes of RNA Polymerase III Promoters. **Journal Biology Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27564-27570, 2013.

VOETS, A. M. et al. Transcriptional changes in OXPHOS complex I deficiency are related to anti-oxidant pathways and could explain the disturbed calcium homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 7, p. 1161-1168, 2012.

VOGIATZOGLU, A. et al. Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 8, p. 1463-1473, 2014.

WANG, C. H.; WU, S. B.; WU, Y. T.; WEI, Y. H.. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 5, p. 450-460, 2013.

WATTANASIRITHAM, L. et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, , v. 192, p. 156-162, 2016.

XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M. E.; SCHAUSS, A. G.; NAGARAJAN, S.; WU, X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-333, 2011.

YANG, Z. F. et al. Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis. **Fitoterapia**, v. 93, p. 47-53, 2014.

YANG, Y. et al. The emerging role of adiponectin in cerebrovascular and neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 9, p. 1887-1894, 2015.

ZHANG, B. et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, 172, 862–872, 2015a.

ZHANG, C. et al. Glucose supply improves petal coloration and anthocyanin biosynthesis in *Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ cut flowers. **Postharvest Biology and Technology**, 101, 73–81, 2015b.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M. Update on etiopathogenesis of systemic sclerosis. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 53, n. 6, p. 516-524, 2013.

2. FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS: ESTUDO EXPLORATÓRIO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES E DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO

RESUMO

As frutas tem despertado o interesse de pesquisadores e consumidores por serem fontes de substâncias bioativas que podem promover benefícios para a saúde humana. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, anti-inflamatório e a composição fenólica de dez frutas nativas brasileiras ainda pouco conhecidas, sendo estas: araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cajá, cambuci, jaracatiá-mamão, juquioba e fruta-do-sabiá. Extratos etanólicos (etanol:água, 80:20 v/v) das polpas foram preparados e utilizados para a avaliação do teor de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante por meio do sequestro do radical ABTS^{•+} e sequestro do radical peroxila (ROO[•]), além do potencial anti-inflamatório *in vivo* por meio do modelo de migração de neutrófilos induzido por carragenina. Já a composição química foi avaliada por meio das técnicas de CLAE-DAD e CG-EM. Quanto aos teores de CFT os mesmos puderam ser classificados de intermediários a altos (0,92 a 55,75 mg EAG g⁻¹). Para o sequestro do radical sintético ABTS^{•+} a atividade variou de 20,34 a 749,88 µmol TE g⁻¹, sendo o cambuití-cipó a amostra com a maior capacidade, enquanto que o murici vermelho foi a fruta que apresentou a maior atividade para desativação do radical peroxila antioxidante (559,09 µmol TE g⁻¹). Os animais tratados com araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, cajá e morango silvestre apresentaram reduções no influxo de neutrófilos quando comparados ao grupo carragenina (*p* < 0,05). Assim, cinco extratos reduziram o influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos atuando como anti-inflamatório, sendo que os extratos de araçá-boi, morango silvestre e fruta-do-sabiá apresentaram citotoxicidade na maior concentração testada (1.000 µg mL⁻¹). Foi possível identificar nas dez frutas a presença de flavonoides como catequina, epicatequina, rutina quercetina glicosilada, kaempferol glicosilado, quercetina, procianidina B1, procianidina B2, além de ácidos fenólicos como o gálico (ácido hidroxibenzoico) e cumárico, ferúlico e caféico (ácidos hidrocínânicos). Nas frutas cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre também foi possível a identificação e quantificação da presença de antocianinas, sendo que no cambuití-cipó foi identificada a kuromanina (8,39 mg g⁻¹) e a mirtilina (13,61 mg g⁻¹). Já para o murici vermelho e o morango silvestre, somente a kuromanina foi encontrada (12,22 mg g⁻¹; 1,43 mg g⁻¹, respectivamente). Esta é a primeira vez que se relata a presença destas antocianinas no cambuití-cipó e murici vermelho. Portanto, as frutas nativas estudadas apresentam compostos bioativos com atividades antioxidante e anti-inflamatória e, quando consumidas regularmente como alimentos funcionais, poderiam ajudar na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; Compostos fenólicos; Atividade anti-inflamatória; CLAE-DAD; CG-EM

ABSTRACT

Fruits have aroused the interest of researchers and consumers once they are sources of bioactive compounds which can promote benefits to human health. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory potentials as well as the phenolic composition of ten Brazilian native fruits still unknown, namely: araçá-boi,

cambuití-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cajá, cambuci, jaracatiá-mamão, juquioba and fruto-do-sabiá. Ethanolic extracts (ethanol: water, 80:20 v/v) were obtained from the fruit pulps and evaluated regarding total phenolic compounds (TPC), antioxidant activity by ABTS^{•+} and peroxy (ROO[•]) radicals scavenging, and *in vivo* anti-inflammatory potential by the carrageenan-induced neutrophil migration model. The chemical composition was evaluated by HPLC-PAD and GC-MS techniques. Regarding TPC content, the fruits were classified as intermediate to high activity (0.92 to 55.75 mg EAG g⁻¹). For the scavenging capacity of the synthetic radical ABTS^{•+} the activity ranging from 20.34 to 749.88 μmol TE g⁻¹, being cambuití-cipó the sample with the highest scavenging capacity for this radical, while murici vermelho was the one with the highest activity (559.09 μmol TE g⁻¹) against peroxy radical. The animals treated with araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, cajá and morango silvestre showed decreases in the influx of neutrophils when compared to carrageenan group (p <0.05). Thus, five extracts reduced the neutrophils influx in the peritoneal cavity of mice acting as anti-inflammatory, with araçá-boi, morango silvestre and fruta-do-sabiá extracts showing cytotoxicity in the highest concentration evaluated (1.000 μg mL⁻¹). It was possible to identify the presence of flavonoids in all the fruits, such as catechin, epicatechin, rutin quercetin glycosylated, glycosylated kaempferol, quercetin, procyanidin B1, procyanidin B2, phenolic acids such as gallic acid (hydroxybenzoic acid) and coumaric, ferulic and caffeic acids (hydrocinnamic acids). In cambuití-cipó, murici vermelho and morango silvestre fruits, it was also possible to identify and quantify the presence of anthocyanins. In cambuiti-cipó it was identified kuromanine (8.39 mg g⁻¹) and mirtiline (13.61 mg g⁻¹), while in murici vermelho and morango silvestre only kuromanine was detected (12.22 mg g⁻¹, 1.43 mg g⁻¹, respectively). This is the first time the presence of these anthocyanins in cambuití-cipó and murici vermelho is reported. Thus, it can be concluded that the native fruits studied present bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory activities and, when consumed regularly as functional foods, could support the prevention of chronic non-communicable diseases (CNCD).

Keywords: Reactive oxygen and nitrogen species; Phenolic compounds; Anti-inflammatory activity; HPLC-PAD; GC-MS

2.1 INTRODUÇÃO

A relação entre a nutrição e a saúde se tornou um tema de grande interesse, pois há evidências substanciais dos efeitos benéficos de dietas que são ricas em frutas e vegetais, as quais são fontes de compostos fenólicos, por exemplo. O Brasil possui grande diversidade vegetal que pode ser explorada para a produção de alimentos e a extração de compostos com propriedades terapêuticas para o controle e/ou prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (OLIVEIRA et al., 2012; DE ROSSO, 2013; ANDRADE, 2014; DENARDIN et al., 2015). Desta forma, o estudo de frutas nativas ainda pouco exploradas se torna uma fonte importante para a busca de novos antioxidantes naturais e/ou agentes anti-inflamatórios de importância para a saúde humana e/ou mesmo para aplicação industrial (ZOU et al., 2016).

Os compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais, tais como os ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, estilbenos e ligninas possuem atividade antioxidante e, portanto, podem atuar como importantes protetores da estrutura celular por meio da eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) advindas do estresse oxidativo (CAI et al., 2004; KE et al., 2015).

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre o sistema antioxidante endógeno (sistema enzimático) e a produção de oxidantes, incluindo as ERO. Em condições normais, as ERO servem como importantes mensageiros na regulação de várias vias de sinalização (VASCONCELOS et al., 2007). Por outro lado, quando ocorre a produção em excesso de ERO e ERN, e o sistema endógeno não possui capacidade suficiente para neutralizá-los, esse acúmulo pode acarretar o surgimento de várias doenças multifatoriais, doenças cardiovasculares e distúrbios inflamatórios (BHAT et al., 2015). A inflamação crônica é amplamente reconhecida como uma das principais causas subjacentes de várias doenças degenerativas. Os efeitos cumulativos da destruição dos tecidos causados por ERO, juntamente com danos induzidos por metaloproteinases, levam a condições patológicas sérias (ZHAO; ZHANG; YANG, 2014). Dessa forma, uma dieta rica em antioxidantes naturais, como o consumo de frutas ricas em compostos bioativos, é muito importante para o sistema imunológico, pois ajuda a combater as ERO produzidas em excesso e, conseqüentemente, a diminuição do risco de desenvolvimento das DCNT (LAVECCHIA et al., 2013; SITI et al., 2015).

Informações sobre a capacidade de desativação de radicais estáveis não produzidos em condições fisiológicas, como ABTS⁺, estão disponíveis na literatura para várias frutas, inclusive nativas (SILVA et al., 2007; CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008, RUFINO, et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011). No entanto, dados relacionados com a capacidade de sequestro de ERO são muito escassos (CHISTÉ et al., 2011; INFANTE et al., 2016).

Portanto, o conhecimento das propriedades biológicas e composição química de frutas nativas ainda pouco conhecidas contribui para a descoberta de novos agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. Este trabalho teve como objetivo avaliar de forma exploratória o potencial antioxidante e anti-inflamatório, bem como a composição fenólica, de dez frutas nativas brasileiras ainda pouco conhecidas, sendo estas: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Bysonima arthropoda*), murici guassú (*Byrsonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci

(*Campomanesia phaea*), jaracatiá-mamão (*Jacaratia spinosa*), juquirioba (*Solanum alaterno-pinatum*), fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*) e cajá (*Spondias mombin* L.).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta das amostras

As frutas nativas araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuití ou cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*), murici guassú (*Byrsonima lancifolia*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), cambuci (*Campomanesia phaea*), jaracatiá-mamão (*Jacaratia spinosa*), juquirioba (*Solanum alaterno-pinatum*) e fruta-do-sabiá (*Acnistus arborescens*) foram coletadas no Sítio Frutas Raras (23°35'31" S e 48°38'38" W), localizado na cidade de Campina do Monte Alegre - SP. O cajá (*Spondias mombin* L.) foi coletado na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás - GO (16°06'20" S – 51°17'11" W, altitude de 592 m). Todas as frutas foram colhidas no estágio de maturação prontos para o consumo (Figura 4).

Araçá-boi
(*Eugenia stipitata*)

Cambuití ou Cambuí-cipó
(*Sagerectia elegans*)

Murici vermelho
(*Byrsonima arthropoda*)

Figura 4. Aspecto visual das frutas coletadas no Sítio Frutas Raras-SP e na Fazenda Gameleira-GO (Fotos com direitos autorais atribuídos à autora desse trabalho e tiradas com autorização do proprietário do Sítio Frutas Raras e da Fazenda Gameleira).

2.2.2 Tratamento das amostras

Imediatamente após a colheita, as frutas foram transportadas em caixas térmicas até ao Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ/USP. As frutas araçá-boi, murici guassú, cambuci, jaracatiá-mamão e juquiarioba foram higienizadas, despolpadas manualmente e descartadas as sementes e as cascas, sendo em seguida congeladas a -22 °C. Já o cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e fruta-do-sabiá foram higienizadas e submetidas diretamente ao congelamento a -22 °C, sem a necessidade de despolpamento, pois as mesmas apresentavam sementes muito pequenas. O cajá foi despolpado no Laboratório de

Frutas e Hortaliças – IF Goiano-Campus Rio Verde-GO, com auxílio de uma despoldadeira elétrica (Itametal, 025 DF A8, Itabuna, Brasil), sendo em seguida a polpa congelada. Todas as polpas congeladas foram liofilizadas, moídas em moinho de alta velocidade (IKA A11 basic, Werke GmbH & Co. KG) e, então, armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

2.2.3 Preparo dos extratos

As amostras liofilizadas e moídas, obtidas de acordo com o item 2.2.2, foram utilizadas para preparo dos extratos. Os extratos foram preparados em triplicata, conforme descrito por Bloor (2001), com a adição de 10 mL de etanol 80% (v/v) a 1,0 g do material liofilizado. A extração foi conduzida em aparelho ultrassom (180 W) por 30 minutos, sob vibração constante e temperatura de 25 °C. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 5.000 x g, durante 15 minutos, com posterior filtração. O sobrenadante recuperado foi liofilizado e denominado de extrato bruto, o qual foi utilizado nas análises subsequentes.

2.2.4 Teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Al-Duais et al. (2009), adaptado para micro volumes. Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 µL do extrato bruto das frutas nativas. Em seguida, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em água foi adicionado e, após 5 minutos, 75 µL da solução de carbonato de potássio 7,5% foram acrescentados. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), a 740 nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em equivalente ao ácido gálico (EAG), calculado utilizando uma curva de calibração de 20 a 120 µg mL⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.2.5. Atividade antioxidante

2.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS foi feita de acordo com o descrito por Al-Duais et al. (2009). Em cada poço da microplaca foram

adicionados 220 μL da solução ABTS⁺⁺ e 20 μL de Trolox ou de extrato bruto. Na sequência, a placa foi agitada e mantida ao abrigo da luz durante 6 minutos. A absorção foi medida em uma leitora de microplacas Spectra-Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) a 734 nm. Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos em μmol Trolox (TE) por grama de amostra liofilizada.

2.2.5.2 Sequestro do radical peroxila (ROO•)

Para análise do sequestro do radical peroxila, foi realizada de acordo com a metodologia adotada por Chisté et al. (2011) e Melo et al. (2015). Foi realizado monitorado o efeito dos extratos no decaimento da fluorescência, provocado pela oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxil. O radical foi formado pela termo decomposição do AAPH (2,2'-azobis amidinopropano). Assim, 30 μL de padrão, controle ou extrato foram adicionados em uma microplaca de 96 poços, contendo 60 μL de fluoresceína (152,5 nM) e 110 μL de AAPH (41,8 mM). O decaimento da fluorescência foi monitorado a cada minuto, durante 2 horas, nos comprimentos de emissão e excitação de 528 e 485, respectivamente, em uma leitora de microplacas. O Trolox foi utilizado como padrão e os resultados expressos como valor ORAC (μmol Trolox mg^{-1} extrato). As análises foram realizadas em triplicata em uma leitora de microplacas Spectra-Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA).

2.2.6. Atividade anti-inflamatória

2.2.6.1 Cultura celular e ensaio de viabilidade celular

Macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram cultivados em meio de cultura RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL), streptomycin e L-glutamina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As garrafas de cultura contendo as células foram inseridas em estufas a 37 °C e 5% de CO_2 onde permaneceram até o momento de seu uso. Macrófagos (5×10^5 cels/mL) foram aderidos em placas de 96 poços e incubados por 24 h para aderência dos mesmos. Após esse tempo, as células foram tratadas com extratos de araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cambuci, jaracatiá-mamão, juquiarioba, fruta-do-sabiá e cajá em 10, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24h. No dia seguinte, o sobrenadante foi retirado e substituído por uma solução de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)) (0,3 mg mL^{-1}). As células foram

incubadas por 3h sob as condições descritas anteriormente. Após remoção do sobrenadante, 100 µL de DMSO foi adicionado para lise das células. A absorbância foi medida em 470 nm usando leitora de microplaca (MOSMANN, 1983).

2.2.6.2 Animais

Camundongos machos C57BL/6JUnib, SPF (specific-pathogen free), pesando 20-25 g foram adquiridos do CEMIB (Centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório, SP, Brasil). Os camundongos foram mantidos sob controle de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (40-60%), em ciclo claro/escuro com livre acesso de água e ração. Todos os ensaios foram conduzidos em acordo com o guia de boas práticas de cuidado e uso de animais de pesquisa e aprovados pelo comitê de ética no uso de animais de pesquisa (CEUA/UNICAMP, protocolo no. 4371-1).

2.2.6.2.1 Avaliação da migração de neutrófilos *in vivo*

Os camundongos foram pré-tratados oralmente com extratos de araquá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cajá, cambucí, jaracatiá-mamão, juquiarioba e fruta-do-sabiá em dose única de 500 mg kg⁻¹ e o controle positivo com dexametasona (2 mg/kg), 60 minutos antes de receber o desafio carragenina (500 µg cavidade⁻¹) pela via intraperitoneal (i.p.). Com relação aos grupos controles negativo, um grupo recebeu apenas o estímulo inflamatório (carragenina 500 µg cavidade⁻¹) e outro grupo não recebeu estímulo. Após 4 horas de indução, os animais foram sacrificados e suas cavidades peritoneais expostas e lavadas com 3 mL de tampão fosfato e EDTA (1mM) para obtenção da suspensão de células. Foram recuperados volumes similares de aproximadamente 95% do volume injetado em todos os grupos experimentais. O número total de leucócitos foi contado em câmara de Neubauer e o diferencial por meio de esfregaço em citocentrífuga (Cytospin 3; Shandon Lipshaw) usando microscópio ótico (1000x). Os resultados foram expressos por números de neutrófilos por cavidade (DAL SECCO et al., 2006).

2.2.7. Avaliação da composição fenólica

2.2.7.1. Remoção de açúcares e interferentes

Antes das análises das amostras pelas técnicas de avaliação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por CLAE-DAD-UV, determinação de antocianinas por CLAE-DAD e perfil de compostos fenólicos pela técnica de CG/EM, foi realizada a purificação dos extratos pela técnica de extração em fase sólida (SPE), para a remoção de açúcares e outros interferentes. Cartuchos de SPE LC-18 (2g, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foram condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Subsequentemente, 500 mg do extrato etanólico bruto de cada fruta foi novamente redissolvido em água até o volume original (5 mL) e, então, centrifugado a 5.000 x g, durante 15 minutos. Após a filtração, o pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 5M. Na sequência, alíquotas de 5 mL foram adicionadas aos respectivos cartuchos já condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Após a eluição do extrato pela coluna, a mesma foi lavada com água ácida suficiente para remover os açúcares e interferentes. Os compostos de interesse foram eluídos com metanol e coletados em tubo de falcon de 15 mL. Em seguida os mesmos foram evaporados a baixa pressão, para retirada do metanol, obtendo assim o extrato sem açúcares e interferentes. Na sequência foram acondicionados em frascos de vidro, secos com N₂ e, então, liofilizados.

2.2.7.2. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por CLAE-DAD-UV

O ensaio para a determinação simultânea de compostos fenólicos por CLAE, associado à atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+}, foi realizado utilizando o método desenvolvido por Koleva; Niederländer; Van Beek, (2001), com algumas modificações (Figura 5). Uma solução estoque contendo persulfato de potássio 140 mM e ABTS^{•+} 7mM foi preparada e mantida a 25 °C no escuro, durante 16 horas, para a produção e estabilização do radical. Na sequência o radical foi diluído a uma absorbância de 0,700 ± 0,020 a 730 nm.

Os analitos foram primeiramente separados por CLAE, utilizando um cromatógrafo Shimadzu equipado com uma coluna ODS-A (C18, tamanho da coluna 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5 µm) mantida a 30 °C, detector de fotodiodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co, Kyoto, Japão) e detector UV-Vis (SPD-20AV, Shimadzu). Uma alíquota de 20

μL de cada extrato (0,3%) foi injetada na coluna. A fase foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido fórmico 0,25% e (B) acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,25% e água 19,75%. A vazão da fase móvel foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o gradiente foi iniciado com 10% do solvente B, passando a 20% de B em 10 minutos, 30% de B aos 20 minutos, 50% de B aos 30 minutos, retomando novamente a 10% de B aos 38 minutos, e finalizando a corrida aos 48 minutos. Os compostos separados foram detectados primeiro em um detector de arranjo de diodos (DAD).

Imediatamente após a detecção dos compostos pelo DAD, foi feita uma reação pós coluna em linha com o radical livre ABTS^{•+}, por aproximadamente 1 min. A vazão do radical ABTS^{•+} foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e a intensidade de cor foi detectada por meio de picos negativos a 734 nm, em um detector de UV. A atividade antioxidante de cada composto foi expressa em equivalentes de Trolox (TEAC). A identificação foi feita pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Foram utilizados os seguintes padrões (Sigma, St. Louis, MO, USA): ácido caféico, ácido sinápico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido ferúlico, *trans*-resveratrol, ácido *p*-cumárico, ácido-3-hidroxinâmico, ácido-2-hidroxinâmico, procianidina A2, procianidina B1, procianindina B2, catequina, epicatequina, epicatequina galato, rutina hidratada, quercetina-3- β -D- glicosilada, kampferol-3-glucosideo, miricetina, quercetina desidratada, quercetina, apigenina, kampferol. A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando o método da padronização externa. Os cromatogramas foram processados utilizando “software” específico. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) também foram determinados (DE ARAGÃO; VELOSO; DE ANDRADE, 2009). As análises foram realizadas em duplicata.

Figura 5. Esquema da instrumentação para análise simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por CLAE-DAD-UV.

2.2.7.3. Determinação de antocianinas por CLAE-DAD

Os analitos foram primeiramente separados por CLAE em um cromatógrafo Shimadzu equipado com uma coluna ODS-A (C-18, tamanho da coluna 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5 μm), detector de fotodiodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co, Kyoto, Japão) e detector UV-Vis (SPD-20AV, Shimadzu). Para a identificação e quantificação das antocianinas foram injetados vinte microlitros de cada extrato a 0,3%, utilizando como fase móvel água/ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL min^{-1} . O gradiente iniciou com 5% do solvente B, alterando para 60% de B em 20 minutos, 100% de B em 25 minutos, 5% de B em 38 minutos, sendo finalizada a corrida aos 48 minutos. A coluna foi mantida a 28°C e os cromatogramas foram processados utilizando “software” específico. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região

ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação dos tempos de retenção e cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões de antocianinas (Sigma, St. Louis, MO, USA): mirtilina, kuromanina, oenina, petunidina e peonidina. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.7.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

2.2.7.4.1 Derivatização da amostra – formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

O processo de derivatização, como etapa anterior a análise pela técnica de cromatografia gasosa, torna-se imprescindível quando se considera não volátil a natureza do material. Quando a amostra não volátil é constituída por compostos de alta massa molar e/ou grupos funcionais polares, há a necessidade da etapa de derivatização que transforma as substâncias de interesse em derivados com características apolares.

Dessa forma, após o processo de remoção dos açúcares dos extratos (item 2.2.7.1.), os mesmos foram acondicionados em *vials* silanizados, livres de umidade. No processo de derivatização foram adicionados 100 μL do reagente N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) aos extratos purificados. Após homogeneização, a reação foi conduzida em estufa a 70°C durante 10 minutos, e em seguida o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio. O produto da derivatização (derivados do trimetilsilil –TMS) foi rediluído em hexano (600 a 800 μL). O sobrenadante foi então transferido para outro *vial* de vidro e injetado no CG-EM.

2.2.7.4.2 Injeção e análise da composição fenólica por CG-EM

As amostras derivatizadas foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu QP2010 Plus). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com vazão de 1 ml min^{-1} , enquanto a fase estacionária foi uma coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O detector (espectrômetro de massas) operou no modo *scanning* (m/z 40-800). A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,3 μL , no modo *splitless*. A programação da temperatura iniciou em 80 °C durante 1 minuto. A taxa de aquecimento inicial foi de 5 °C.min⁻¹ atingindo 200 °C (1 minuto), passando a 250 °C (8 minutos) a taxa de 5 °C.min⁻¹, a 300 °C (5 minutos) a taxa de 10°C.min⁻¹

¹, a 320 °C (10 minutos) a taxa de 10 °C min⁻¹, totalizando assim 66 minutos de análise. As temperaturas da fonte de ionização e interface foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente.

A integração das áreas dos picos foi realizada por meio do software Lab Solutions-GCMS, enquanto que a identificação dos compostos foi feita por meio da comparação dos dados obtidos no CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) com padrões de compostos fenólicos contidos na biblioteca Wiley® silanizados e com os seguintes padrões (Sigma, St. Louis, MO, USA) silanizados e eluídos nas mesmas condições das amostras: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido *m*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, (-)-epicatequina, resveratrol, kaempferol, luteolina, miricetina e quercetina (OLDONI, et al. 2011).

2.2.8 Análise estatística

Os resultados das análises foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação das médias foi aplicado o teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. Para as metodologias de atividade antioxidante e teor de fenólicos totais foi também feita a Correlação de Pearson.

Para a análise de agrupamentos foram adotados métodos hierárquicos (Método do grupo de pares não ponderados com a média aritmética (UPGMA) e métodos não-hierárquicos (componente principal, CP). Os CPs foram estimados por meio da transformação de dados originais em um conjunto com dimensão equivalente de dados não correlacionados. As pontuações correspondentes aos CPs foram calculadas a partir da matriz de correlação. Os dois primeiros pontos dos CP foram utilizados para agrupar as frutas em gráficos de dispersão. A análise de cluster foi realizada usando o software Statistica, versão 7.0.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Teor de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos das frutas nativas, expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), encontram-se na Tabela 1. A concentração de compostos fenólicos totais para as dez frutas estudadas variou de 0,92 a 55,75 mg EAG g⁻¹, em base seca. A maior concentração de compostos fenólicos foi para o murici vermelho, o qual apresentou teor médio de 55,75 mg EAG g⁻¹ e diferiu das demais frutas ($p < 0,05$). Apesar

do murici guassú e o murici vermelho pertencerem ao gênero *Byrsonima*, o murici guassú apresentou uma concentração de compostos fenólicos dez vezes menor (5,48 mg EAG g⁻¹).

Neves et al. (2015b) avaliaram uma outra espécie de murici (*Byrsonima coccolobifolia* Kunth) quanto as características físicas, químicas e bioquímicas durante o período de amadurecimento do fruto. Os autores encontraram o teor de compostos fenólicos totais de 18,13 mg GAE g⁻¹, o que é 3,3 vezes superior ao encontrado para murici guassú e 3,1 vezes inferior ao murici vermelho.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais em mg EAG g⁻¹ (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos extratos de dez espécies frutíferas em base seca.

Espécies frutíferas	Compostos fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹) *
Araçá-boi	2,03 $\pm$ 0,22 ^d
Cambuití-cipó	27,39 $\pm$ 5,72 ^b
Murici vermelho	55,75 $\pm$ 1,94 ^a
Murici guassú	5,48 $\pm$ 0,51 ^d
Morango silvestre	5,60 $\pm$ 0,38 ^d
Cajá	2,83 $\pm$ 0,21 ^d
Cambuci	12,11 $\pm$ 2,01 ^c
Jaracatiá-mamão	2,57 $\pm$ 0,26 ^d
Juquirioba	1,19 $\pm$ 0,05 ^d
Fruta-do-sabiá	0,92 $\pm$ 0,19 ^d

EAG = equivalente de ácido gálico; DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas. *As letras iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais entre si (p>0,05) pelo teste de Tukey; dados em base seca.

Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008) avaliaram o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu em 17 frutas do Equador e propuseram uma classificação em 3 grupos. O primeiro grupo mostrou valores inferiores de 100 mg EAG 100 g⁻¹. O segundo grupo apresentou valores intermediários de 200 a 500 mg EAG 100g⁻¹ e um terceiro grupo mostrou valores superiores a 1.000 mg EAG 100 g⁻¹. Comparando os dados com os do presente estudo, pode-se constatar que o cambuití-cipó e o murici vermelho possuem teores superiores a 1000 mg EAG 100g⁻¹, assim podendo estas frutas serem classificadas no terceiro grupo. Já as demais frutas poderiam ser classificadas no segundo grupo, com concentrações intermediárias e, somente a fruta-do-sabia (92 mg EAG 100 g⁻¹) seria qualificada no primeiro grupo.

O araçá-boi, murici guassú, morango silvestre, cajá, jaracatiá-mamão, juquirioba e fruta-do-sabiá foram as frutas que apresentaram os menores teores de compostos fenólicos totais (2,03; 5,48; 5,60; 2,83; 2,57, 1,19 e 0,92 mg EAG g⁻¹, respectivamente) e não diferiram entre si ($p>0,05$). Neves et al. (2015a) encontraram durante o período de armazenamento de 12 dias, no tempo zero, nas polpas das frutas açai, araçá-boi, cajá, cajú, camu-camu, inajá, murici e uxi o teor de compostos fenólicos totais que variou de 1,21 a 98,89 mg EAG g⁻¹ (base seca). Comparando com as 10 frutas nativas analisadas no presente trabalho (Tabela 1), a fruta-do-sabiá que apresentou a menor concentração de polifenóis (0,92 mg EAG g⁻¹) foi semelhante a fruta uxi (1,21 mg EAG g⁻¹) e inferior para as demais frutas (açai, araçá-boi, cajá, cajú, camu-camu, inajá e murici). Comparando o araçá-boi e cajá (durante o período de armazenamento de 12 dias no tempo zero) o teor de compostos fenólicos totais na polpa foi de 287,7 e 400,6 mg EAG 100g⁻¹ de fruta seca, respectivamente, resultados esses semelhantes para o araçá-boi (203 mg EAG 100g⁻¹) e inferiores ao cajá (283 mg EAG 100g⁻¹) referente ao presente estudo (Tabela 1). Já Rufino et al. (2010) também avaliaram o teor de compostos fenólicos totais em 18 frutas nativas do Brasil e obtiveram para o cajá o teor de 579 mg EAG 100g⁻¹ de fruta seca, o que é 55,1% superior ao encontrado neste trabalho.

Contreras-Calderón et al. (2011) também avaliaram o teor de compostos fenólicos totais do araçá-boi e encontraram $111,00 \pm 3,64$ mg EAG 100g⁻¹ de fruta fresca, valor este 45,3% inferior ao encontrado no presente trabalho. Entretanto há que se considerar que no presente estudo os resultados foram expressos em base seca (Tabela 1). Já Oliveira et al. (2016) avaliaram o teor de CFT em *R. rosaefolius* (morango silvestre) e encontram 177,26 mg EAG 100g⁻¹, o que é 68,4% inferior ao encontrado neste estudo (Tabela 1).

Comparando as frutas nativas deste estudo com o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*, L.), fruta conhecida pelo seu alto teor de compostos bioativos, Aaby, Grimmer e Holtung (2013) encontraram teor de 564 mg GAE 100g⁻¹, o que é semelhante ao encontrado para o morango silvestre (560 mg GAE 100g⁻¹), porém muito inferior ao encontrado para o cambuití-cipó e murici vermelho (2.739 e 5.575 mg GAE 100g⁻¹, respectivamente) (Tabela 1). Portanto as frutas nativas brasileiras avaliadas neste estudo podem ser consideradas como boas fontes de poder redutor, o que é função principalmente do alto teor de compostos fenólicos

A diferença dos teores de compostos fenólicos em espécies frutíferas pode, em parte, ser explicada pela existência de compostos de diversas naturezas químicas, que variam desde substâncias simples a altamente polimerizadas, incluindo diferentes proporções de ácidos fenólicos, antocianinas, taninos, entre outros. Podem ainda ser encontradas em estado de

complexo com carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos e outros componentes das plantas, formando assim, compostos fenólicos de alto peso molecular (CÔTÉ et al., 2010).

2.3.2. Atividade antioxidante

As frutas nativas avaliadas apresentaram capacidade para o sequestro do radical sintético ABTS^{•+} que variou de 20,34 a 749,88 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (Tabela 2). O cambuití-cipó foi a amostra que apresentou a maior capacidade sequestrante do radical livre ABTS^{•+} (749,88 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), a qual foi seguida pelo murici vermelho (697,19 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Em contrapartida, o murici guassú, cajá, jaracatiá-mamão, juquirioba e fruta-do-sabiá foram as frutas que apresentaram as menores atividades frente a este radical e não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antioxidante (médias $\pm$ DP, n=3) das frutas nativas pelos métodos do sequestro do radical ABTS (ABTS^{•+}) e radical peroxila (ROO•).

Espécies frutíferas	ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	ROO• ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)
Araçá-boi	110,09 $\pm$ 11,81 ^d	32,73 $\pm$ 1,50 ^{ef}
Cambuití-cipó	749,88 $\pm$ 14,09 ^a	200,11 $\pm$ 15,04 ^b
Murici vermelho	697,19 $\pm$ 7,8 ^b	559,09 $\pm$ 21,30 ^a
Murici guassú	60,11 $\pm$ 1,29 ^e	37,22 $\pm$ 5,17 ^{de}
Morango silvestre	152,98 $\pm$ 9,35 ^c	58,68 $\pm$ 2,34 ^{cd}
Cajá	35,51 $\pm$ 1,62 ^e	20,03 $\pm$ 1,00 ^{ef}
Cambuci	142,63 $\pm$ 14,99 ^{cd}	68,94 $\pm$ 1,50 ^c
Jaracatiá-mamão	27,29 $\pm$ 2,42 ^e	36,36 $\pm$ 2,25 ^{de}
Juquirioba	33,99 $\pm$ 2,98 ^e	32,96 $\pm$ 2,30 ^{ef}
Fruta-do-sabiá	20,34 $\pm$ 1,37 ^e	11,35 $\pm$ 2,07 ^f

TE = equivalente de trolox; DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas, n.d= não determinado. *As letras iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.; dados em base seca.

Rufino et al. (2010) encontraram para algumas espécies de frutas nativas brasileiras a seguinte ordem crescente para o sequestro do radical ABTS^{•+}: carnauba < bacuri < mombin < açaí < mangaba < umbu < castanha de caju < jambolão < gurguri < puçá-coroa-de-frade < murta < uvaia < jaboticaba < puçá-preto < murici < juçara < acerola < camu-camu. A atividade antioxidante para essas frutas variou de 1,237 a 16,4 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (base seca), valores estes

inferiores aos encontrados no presente trabalho, cujas atividades foram de 20,34 a 749,88 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (Tabela 2).

Zhang et al. (2014) avaliaram o teor de fenólicos e a atividade antioxidante de frutas chinesas (*Citrus reticulata* Blanco) pelo método ABTS^{•+} sendo que para a atividade antioxidante os valores variaram de 65,62 a 108,60 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (base seca). Estes resultados são semelhantes ao murici guassú (60,10 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), araçá-boi (110,09 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) e cajá (142,63 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), porém inferiores ao cambuí-cipó (749,88 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) e murici vermelho (697,19 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

Já para o método ORAC, que mensura a capacidade de sequestro do radical peroxila, o murici vermelho foi o que apresentou a maior atividade antioxidante (559,09 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), o qual foi seguido pelo cambuí-cipó (200,11 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Quando comparado com outras frutas, o murici vermelho (559,09 $\pm$ 21,30 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), cambuí-cipó (200,11 $\pm$ 15,04 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), cambuci (68,94 $\pm$ 1,50) e morango silvestre (58,68 $\pm$ 2,34 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) apresentaram atividades para desativação do radical ROO[•] superiores à do mirtilo (44,4 $\pm$ 2.14 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) (YOU et al.,2011). Frutas comumente consumidas como goiaba, uva, cereja e morango apresentaram valores de ORAC de 86,97; 64,28; 169,75; 401,91 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, respectivamente (WU et al., 2004; PATTHAMAKANOKPORN et al., 2008), mostrando portanto que as frutas nativas estudadas neste trabalho possuem elevada capacidade para desativação do radical peroxila (Tabela 2).

As frutas murici vermelho e cambuí-cipó se destacaram quanto as capacidades de sequestro do radical ABTS^{•+} e sequestro do radical peroxila (ROO[•]) em relação as demais frutas nativas avaliadas neste trabalho e também as frutas comumente consumidas no Brasil (goiaba, uva, cereja e morango). Dessa forma, conclui-se que as frutas nativas podem ser consideradas fontes de antioxidantes tanto para o uso pela indústria de alimentos quanto para o consumo *in natura*, no intuito de prevenir doenças associadas a estas espécies reativas (SITI et al., 2015; LAVECCHIA et al., 2013).

2.3.3 Correlação entre as respostas antioxidantes e o teor de compostos fenólicos totais

Com o intuito de verificar a existência de correlação entre as metodologias utilizadas no presente trabalho, aplicou-se o teste de Pearson (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação (r) entre as respostas antioxidantes obtidas por diferentes métodos e o teor de compostos fenólicos totais.

Métodos	ABTS^{•+}	ROO[•]
Compostos fenólicos totais (CFT)	0,90	0,99
ROO [•]	0,84	

De acordo com o coeficiente de Pearson, classificam-se como fortemente correlacionadas as respostas obtidas pelos métodos nos quais $0,8 \leq r \leq 1$; moderadamente para $0,5 \leq r \leq 0,8$ e, fracamente correlacionadas para $0,1 \leq r \leq 0,5$. Dessa forma, observa-se que em todos os casos se obteve forte correlação entre as atividades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos totais.

Rodrigues et al. (2014) avaliaram a capacidade antioxidante de cafés e observaram correlação alta e positiva para o teor de compostos fenólicos e o radical ROO[•] ($r = 0,78$, $p = 0,01$), mesma tendência do encontrado nesse trabalho ($r = 0,99$) (Tabela 3).

A correlação entre os valores ROO[•] e o teor de compostos fenólicos totais por meio do método Folin Ciocalteu também foi verificada por Wu et al. (2004). Nesse trabalho os autores usaram a razão entre os valores do radical ROO[•] e a CFT (ROO[•]/CFT) para classificar os alimentos em quatro grupos (0-5, 5-10, 10-15 e > 15). Observaram que a maioria dos alimentos apresentou uma razão de 10, indicando uma correlação linear forte entre CFT e a desativação do radical ROO[•]. O arará-boi, murici vermelho, morango silvestre, jaracatiá, juquirioba e fruta-do-sabiá apresentaram uma razão ROO[•]/ CFT de 16,1; 10,0; 10,5; 14,1 e 27,6 e 12,4 respectivamente, sugerindo que a desativação do radical ROO[•] nestas frutas se deve principalmente a compostos fenólicos de alto poder redutor.

Contreras-Calderón et al. (2011) também observaram uma correlação forte e significativa entre o conteúdo fenólico total de frutas nativas da Colômbia com a atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} ($r = 0,954$) e, de certa forma, semelhante ao encontrado neste trabalho (Tabela 3).

2.3.4 Atividade anti-inflamatória

2.3.4.1. Avaliação da viabilidade celular

No intuito de avaliar se os extratos apresentam efeitos citotóxicos em macrófagos, foi conduzido um ensaio de viabilidade celular por 24 h, utilizando diferentes concentrações. Como apresentado na Figura 6, nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os extratos de cambuití-cipó, murici vermelho, murici guassú, cajá, cambuci, juquirioba e jaracatiá-mamão não apresentaram redução na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas quando comparado somente com o controle veículo ($p < 0,05$). Entretanto, os extratos de araçá-boi, morango silvestre e fruta-do-sabiá na concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram redução da viabilidade celular (morte das células acima de 20%) quando comparado ao controle veículo ($p < 0,05$).

O método do MTT avalia a viabilidade celular, por meio de análise colorimétrica resultantes da precipitação do azul de formazana, componente final da reação dos sais tetrazólicos (MTT) com a enzima succinato desidrogenase. A formação do azul ocorre apenas em células vivas e a coloração é proporcional ao número de células vivas (DENIZOT et al., 1986). Os extratos de araçá-boi, fruta do sabiá e morango silvestre diminuíram a viabilidade celular na mais alta concentração, fato que pode ser explicado, em parte, devido a diferença do perfil químico e dos compostos presentes nessas espécies serem mais citotóxicos comparados às outras espécies. Entretanto, o ensaio do MTT avalia a condição de citotoxicidade em um contexto *in vitro* de aplicação única e que pode não mimetizar o que acontece *in vivo*.

Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos tratados com os extratos de frutas nativas em diferentes concentrações. Macrófagos RAW 264.7 tratados com extratos de araçá-boi (A), cambuití-cipó (B), murici vermelho (C), murici guassú amarelo (D), morango silvestre (E), cajá (F), cambuci (G), jaracatiá-mamão (H), juquiobioba (I) e fruta-do-sabiá (J) a 10, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura (V) por 24h. A viabilidade celular das células tratadas foi determinada pelo método do MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP, com $n = 4$ por grupo. Os dados do grupo veículo foram normalizados para 100%. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey).

2.3.4.2 Avaliação da migração de neutrófilos *in vivo*

A fim de verificar se as frutas nativas atuam como anti-inflamatórios, foi realizado o ensaio de migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos. No presente estudo (Figura 7), os animais que receberam por via oral os extratos etanólicos de araquá-boi (Figura 7 A), cambuití-cipó (Figura 7 A), murici vermelho (Figura 7 B), cajá (Figura 7 C) e morango silvestre (Figura 7 D) apresentaram reduções do influxo de neutrófilos em 55%, 43%, 46%, 55% e 42%, respectivamente, em comparação com o grupo desafiado apenas com a carragenina ($p < 0,05$). Entretanto, os animais que receberam extratos de cambuci, juquiurioba e fruta-do-sabiá (Figura 7 B), murici guassú e jaracatiá-mamão (Figura 7 C) não apresentaram reduções no influxo de neutrófilos quando comparado ao grupo controle negativo (carragenina) ($p > 0,05$). A dexametasona, controle positivo, também reduziu a migração de neutrófilos em 86%, 57%, 53% e 54%, Figura 7 A, B, C e D, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 7. Efeito das frutas nativas brasileiras na migração de neutrófilos *in vivo*. Camundongos tratados via oral com solução salina 0,9 % (C), dexametasona 2 mg Kg⁻¹ (D); (A) extratos de araquá-boi (AB) e cambuití-cipó (CC); (B) murici vermelho (MV), cambuci (CA), juquiurioba (JQ), fruta-do-sabiá (FS); (C) murici guassú amarelo (MG), cajá (CJ), jaracatiá-mamão (JM) e morango silvestre (MS) a 500 mg/kg, seguido de administração i.p. de carragenina (-) (Cg, 500 µg cavidade⁻¹). Os resultados estão expressos como média ± DP, n = 6. Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística. O símbolo % indica a diminuição dos neutrófilos. ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

A inflamação é um processo de defesa do organismo frente a agentes agressores podendo ser desencadeado de diversas maneiras. Esse processo deve ser sempre resolutivo e envolvem diversos tipos de células. Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) são as células do sistema imune responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo e representam mais de 50% do total das células da imunidade inata. Esses leucócitos apresentam um arsenal de enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio que visam destruir o agente agressor (NEMETH; MOCSAI, 2012). Além dos neutrófilos, macrófagos residentes também participam do processo inflamatório liberando citocinas como TNF- α , CXCL2/MIP-2 e que vão culminar no aumento do influxo de neutrófilos no foco inflamatório.

A presença de neutrófilos em quantidades excessivas e constantes, como em uma resposta inflamatória exacerbada, faz com que os tecidos estejam sempre sob o ataque dessas células, que geram efeitos deletérios e indesejáveis podendo ocasionar a perda da função tecidual (KAWAGUCHI; MATSUMOTO; KUMAZAWA, 2011; NEMETH; MOCSAI 2012). Estudos apontam que a expressão de certos receptores na superfície dos neutrófilos e a sinalização intracelular desempenham um papel importante na patogênese de doenças como aterosclerose, hipertensão, doença periodontal, obesidade, artrite reumatoide, lúpus eritematoso, dentre outras (NEMETH; MOCSAI, 2012). Entretanto, substâncias como os compostos fenólicos atuam neutralizando espécies reativas de oxigênio, diminuindo/prevenindo a oxidação lipídica e, conseqüentemente podem prevenir o surgimento dessas doenças (NAKAO et al., 2011).

No presente estudo foi avaliada a capacidade dos extratos de frutas nativas reduzirem o influxo de neutrófilos para o foco inflamatório. Os extratos de araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, cajá e morango silvestre apresentaram redução na migração neutrofílica. Esse efeito pode ser devido à presença de compostos fenólicos na composição dos extratos estudados. Um composto amplamente encontrado na composição das frutas é o ácido gálico. No estudo realizado por Henriques et al.(2016), esse ácido fenólico foi apontado como o responsável pela redução do influxo de neutrófilo na articulação no modelo de artrite induzida em roedores.

Em outro estudo, verificou-se que a epicatequina, possui a capacidade de reduzir o estresse oxidativo culminando na inibição da ativação do fator nuclear- κ B, conseqüentemente reduzindo a inflamação (BETTAIEB et al., 2016). Também foi verificado que a quercetina reduziu a migração neutrofílica no peritônio de animais desafiados com carragenina (DENNY et al., 2013). Em um estudo avaliando o metabólito da rutina, o 3,4-diidroxitolueno, foi verificado que este composto foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico (NO•) e a

enzima COX-2 sem causar toxicidade e células (SU et al., 2014). A rutina encontrada no extrato do cambuití-cipó (Tabela 6) pode estar relacionada com a atividade anti-inflamatória, inibição do influxo de neutrófilos, uma vez que este flavonoide pode atuar como antioxidante na redução de espécies reativas de nitrogênio, como a produção de óxido nítrico, uma importante via para o processo inflamatório. O ácido p-cumárico, também encontrado no extrato do morango silvestre (Tabela 13), foi o responsável pela atividade anti-inflamatória, redução da ativação do NF- κ B e produção do óxido nítrico em células, nas raízes de *Etlíngera pavieana*. Nesse mesmo estudo foi verificado que o extrato e fração dessas raízes não apresentaram citotoxicidade (SRISOOK et al., 2017). De uma maneira geral a atividade anti-inflamatória apresentada pelas frutas nativas pode também estar relacionada com o sinergismo entre os compostos fitoquímicos identificados

2.3.5. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* pela técnica de CLAE-DAD-UV

A linearidade do método para quantificação dos compostos fenólicos usado na CLAE pode ser visualizada na Tabela 4, a qual foi obtida por meio de curvas analíticas específicas. A faixa de concentração utilizada foi de 1,25 a 500 ppm para a catequina (n=6 pontos), de 0,625 a 30 ppm para a rutina (n=5 pontos), de 0,6 a 275 ppm para a quercetina glicosilada (n=6 pontos), de 0,5 a 20 ppm para kaempferol glicosilado (n=6 pontos), de 0,3 a 5 ppm para a quercetina (n=5 pontos), de 5 a 60 ppm para a procianidina B1 (n=5 pontos), de 5 a 75 ppm para a procianidina B2 (n=5 pontos), de 7,8 a 251,5 ppm para a epicatequina (n=7 pontos), de 5 a 0,3 ppm para o ácido ferúlico (n=5 pontos) e de 0,3 a 75 ppm para o Trolox (n= 7 pontos).

Tabela 4. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de compostos fenólicos por CLAE.

Padrões	Curva analítica	R ²
Catequina	$y=10356x+13376$	1
Rutina	$y=21128x+8640,3$	0,9965
Quercetina glicosilada	$y=21547x-1983,1$	0,9997
Kaempferol glicosilado	$y=36449x-1324,3$	0,9999
Quercetina	$y=53632x-7073$	0,9997
Procianidina B1	$y=9896x-3054,3$	0,9993
Procianidina B2	$y=11058x-10265$	0,9982
Epicatequina	$y=10683x-30229$	0,9987
Ácido ferúlico	$y=116275x+4633,9$	0,9999
Trolox	$y=63309x+49212$	0,9893

R² = coeficiente de determinação

O parâmetro linearidade apresentou valores acima de 0,98. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) podem ser visualizados na Tabela 5. Os resultados mostraram boa detectabilidade para a quantificação dos compostos fenólicos das amostras em estudo.

Tabela 5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de compostos fenólicos por CLAE.

Padrões	LD (µg)	LQ (µg)
Catequina	0,010	0,030
Rutina hidratada	0,011	0,034
Quercetina glicosilada	0,009	0,026
Kaempferol glicosilado	0,001	0,003
Quercetina desidratada	0,001	0,003
Procianidina B1	0,016	0,047
Procianidina B2	0,096	0,291
Epicatequina	0,003	0,010
Ácido ferúlico	0,108	0,327
Trolox	0,004	0,012

Foi possível identificar e quantificar vários flavonoides, como procianidina B1, procianidina B2, catequina, epicatequina (flavanois), rutina, quercetina, quercetina glicosilada e kaempferol (flavonois), além de um ácido hidroxicinâmico, o ácido ferúlico. Nas Tabelas 6 e 7 e Figura 8, estão apresentadas as quantificações e os valores da atividade antioxidante *on-line* para os compostos encontrados nas dez espécies de frutas.

Os flavonoides têm um papel direto na eliminação de espécies reativas de oxigênio, o que pode contribuir para melhorar a atividade enzimática antioxidante do corpo e também reduzir a formação de peróxidos, diminuindo/prevenindo assim a oxidação lipídica (NAKAO et al., 2011). O ácido ferúlico é um ácido fenólico, derivado do ácido hidroxicinâmico, presente em vários alimentos, como grãos, ervas, frutas cítricas e outros. Além de ser um antioxidante, possui ação anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica e anti-hipertensiva, previne doenças cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca (LIAO et al., 2017).

Tabela 6. Compostos fenólicos (mg.g⁻¹) e atividade antioxidante *on-line* (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV.

Frutas Nativas														
Araçá-boi			Cambuí-cipó			Murici vermelho			Murici guassú			Morango silvestre		
Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC
1	nd	3,25±1,9	1	nd	2,35±2,71	1 (Procianidina B ₁)	71,95±12,58	57,02±10,47	1	nd	3,22±0,12	1	nd	4,15±0,62
2	nd	9,11±2,37	2	nd	55,66±1,27	2	nd	7,29±1,77	2	nd	0,39±0,17	2	nd	7,55±0,87
3	nd	0,18±0,17	3	nd	11,00±1,51	3	nd	5,76±1,69	3	nd	0,35±0,30	3 (Procianidina B ₁)	11,39±0,87	nd
4	nd	4,98±0,75	4	nd	3,70±1,46	4(Catequina)	99,87±0,71	58,03±10,17	4	nd	5,03±1,98	4	nd	10,48±0,98
5 (Catequina)	25,899 ± 5,39	18,37±0,33	5	nd	2,16±0,76	5(Procianidina B ₂)	19,07±12,28	3,66±0,07	5	nd	1,42±0,04	5	nd	3,28±0,46
6	nd	55,38±6,78	6(Rutina)	11,94±0,07	5,15±0,25	6	nd	18,17±4,48	6	nd	0,08±0,04	6 (Catequina)	20,00±26,08	2,81±0,04
7	nd	4,02±2,82	7(quercetina glicosilada)	64,81±2,16	15,21±2,39	7 (Epicatequina)	52,50±10,9	43,69±10,93	7	nd	1,55±0,07	7	nd	3,19±0,55
8	nd	8,53±1,72	8(kaempferol glicosilado)	4,73±0,06	Nd	8	nd	4,94±1,27	8	nd	6,54±0,02	8	nd	4,50±0,40
9	nd	52,27±9,31	9(Quercetina)	0,58±0,03	Nd	9	nd	6,76±4,60	9(Catequina)	1,23±0,01	0,22±0,53	9	nd	0,37±0,01
10	nd	9,30±0,37				10	nd	2,27±1,01	10	nd	4,89±0,36	10	nd	6,05±0,39
11	nd	0,54±0,39				11	nd	0,82±0,31	11	nd	8,46±2,11	11	nd	0,74±0,01
12	nd	11,25±1,69				12	nd	5,03±0,80	12 (Epicatequina)	3,13±0,18	11,55±1,46	12	nd	166,36±2,53
						13(quercetina glicosilada)	7,57±0,27	nd	13	nd	2,35±0,21	13	nd	111,29±3,00

Tabela 6 (continuação). Compostos fenólicos (mg.g⁻¹) e atividade antioxidante *on-line* (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV..

Frutas Nativas														
Araçá-boi			Cambuití-cipó			Murici vermelho			Murici guassú			Morango silvestre		
Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC
						14 (Kaempferol glicosilado)	0,43±0,0	nd	14	nd	2,54±0,8 4	14(quercetina glicosilada)	1,00±0,11	nd
									15	nd	4,21±0,7 4	15(Kaempferol glicosilado)	3,76±0,93	nd
									16	nd	2,07±0,4 6			
									17	nd	0,44±0,1 9			
									18	nd	5,79±0,9 9			
									19	nd	1,58±0,2 4			
									20	nd	4,68±0,9 3			
									21(Quercetina glicosilada)	1,58±0,02	nd			
									22	nd	0,06±0,0 3			

Legenda:

nd= não identificado

Compostos fenólicos expressos em mg de composto.g⁻¹ de extrato liofilizado

TEAC: capacidade antioxidante em equivalentes ao Trolox

Valores: são médias de duplicatas ± DP, n=2; n= número de repetições

AB= Araçá-boi; CC= Cambuití-Cipó; MV= Murici Vermelho; MG = Murici Guassú; MS=Morango Silvestre.

Tabela 7. Compostos fenólicos (mg.g⁻¹) e atividade antioxidante *on-line* (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV.

Frutas Nativas														
Cajá			Cambuci			Jaracatiá-mamão			Juquiarioba			Fruta-do-sabiá		
Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC
1	nd	4,75±0,30	1	nd	0,93±0,19	1	nd	0,88±0,28	1	nd	1,25±0,2 1	1	nd	0,94±0,0 7
2	nd	0,55±0,05	2	nd	0,22±0,23	2	nd	0,46±0,05	2	nd	0,17±0,2 2	2	nd	2,76±0,0 8
3	nd	1,49±0,0	3	nd	6,43±1,39	3	nd	1,52±0,15	3	nd	0,23±0,2 4	3	nd	0,27±0,1 3
4	nd	3,27±0,21	4	nd	15,31±0,12	4	nd	1,08±0,06	4	nd	2,92±0,0 5	4	nd	3,56±0,3 2
5	nd	2,09±0,33	5	nd	23,86±5,60	5	nd	0,25±0,08	5	nd	0,08±0,0 1	5	nd	0,22±0,4 4
6	nd	2,45±0,57	6	nd	15,09±3,57	6	nd	1,59±0,64	6	nd	0,08±0,1 6	6	nd	2,63±0,2 5
7	nd	3,52±0,07	7	nd	51,30±5,03	7	nd	0,96±0,30	7	nd	0,66±0,5 8	7	nd	0,13±0,1 0
8	nd	9,95±0,15	8	nd	15,13±0,57	8	nd	0,05±0,48	8	nd	2,09±0,6 2	8	nd	0,22±0,0 4
9	nd	1,95±0,25	9	nd	12,53±1,59	9	nd	0,02±0,06	9	nd	0,91±0,1 9	9(ácido ferúlico)	0,39±0,10	nd
10	nd	0,52±0,04	10	nd	13,55±1,52	10	nd	4,26±0,15	10	nd	0,34±0,0 0	10	nd	0,21±0,1 5
11	nd	1,94±0,68	11	nd	25,86±0,88	11	nd	0,59±0,16				11	nd	16,80±0,82
12	nd	11,01±0,22	12	nd	15,45±1,07	12 (Rutina)	0,62,00± 0,10	nd				12	nd	0,64±0,3 2
13	nd	1,43±1,86	13	nd	16,66±2,06	13	nd	0,10±0,01				13	nd	0,05±0,0 1

Tabela 7 (continuação). Compostos fenólicos (mg.g⁻¹) e atividade antioxidante *on-line* (TEAC) dos extratos de frutas nativas, determinados por CLAE-DAD-UV.

Frutas Nativas														
Cajá			Cambuci			Jaracatiá-mamão			Juquiarioba			Fruta-do-sabiá		
Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC
14	nd	1,34±0,09	14	nd	28,33±0,43	14	nd	0,25±0,18				14	nd	0,12±0,05
15(Quercetina glicosilada)	1,13±0,01	Nd	15	nd	50,75±2,73							15	nd	0,77±0,06
16	nd	1,27±0,22	16	nd	4,35±0,14									
17	nd	0,26±0,32	17	nd	2,86±0,33									
18 (Quercetina)	0,22±0,00	Nd												

Legenda:

nd= não identificado

Compostos fenólicos expressos em mg de composto.g⁻¹ de extrato liofilizado

TEAC: capacidade antioxidante em equivalentes ao Trolox

Valores: são médias de duplicatas ± DP, n=2; n= número de repetições

AB= Araçá-boi; CC= Cambuí-Cipó; MV= Murici Vermelho; MG = Murici Guassú; MS=Morango Silvest

Os teores de rutina, quercetina, quercetina glicosilada e kaempferol glicosilado variaram de 0,62 a 11,94; 0,22 a 0,58; 1,00 a 64,81; 0,43 a 4,73 mg g⁻¹ de extrato liofilizado, respectivamente. Já para a catequina, epicatequina e procianidina B1 os valores foram de 0,38 a 99,87; 3,13 a 52,50; 11,39 a 71,95 mg g⁻¹ de extrato liofilizado, respectivamente. Para o ácido ferúlico, identificado somente na amostra fruta-do-sabiá, foi encontrado um teor de 0,39 mg g⁻¹ de extrato liofilizado, enquanto que para procianidina B2 presente no murici vermelho, o teor foi de 19,07 mg g⁻¹ de extrato liofilizado.

O murici vermelho foi a fruta que apresentou os maiores teores de catequina, epicatequina e procianidina B1, sendo que somente nessa amostra foi possível a identificação da procianidina B2. Já a amostra de cambuí-cipó apresentou os maiores teores de rutina, quercetina, quercetina glicosilada e kaempferol glicosilado. No entanto, para as amostras cajá e juquioba não foi possível a identificação de nenhum composto fenólico.

Apesar da quercetina, kaempferol glicosilado e o ácido ferúlico estarem em quantidades significativas nas amostras, estes não apresentaram atividade antioxidante quantificável por meio da reação com o radical ABTS^{•+} (Tabelas 6 e 7). Da mesma forma, a quercetina glicosilada presente no cambuí-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá, apresentou capacidade sequestrante do radical ABTS^{•+} somente no cambuí-cipó (15,21 mg TE g⁻¹ de extrato), porque a concentração deste flavonoide foi inferior (Tabela 6 e 7) para as demais frutas e consequentemente não foi possível detectar sua atividade antioxidante. A procianidina B1, presente nas amostras murici vermelho e morango silvestre, apresentou atividade de 57,02 mg TE g⁻¹ de extrato para o murici vermelho, enquanto que a rutina, presente nas amostras cambuí-cipó e jaracatiá-mamão foi quantificada sua atividade somente na amostra cambuí-cipó (5,15 mg TE g⁻¹ de extrato). Isso ocorreu porque as concentrações de quercetina glicosilada presente nas amostras murici vermelho, morango silvestre e cajá, procianidina B1 no murici vermelho e rutina no cambuí-cipó foram inferiores ao limite para reação com o radical ABTS^{•+}.

Quando se verifica a atividade antioxidante total (TEAC) apresentada pelas amostras foram encontrados os valores de 180,19; 95,22; 213,43; 67,44; 320,78; 47,49; 298,64; 12,01; 8,74 e 29,09 mg de Trolox g⁻¹ de extrato liofilizado para as amostras de araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cajá, cambuci, jaracatiá-mamão, juquioba e fruta-do-sabiá, respectivamente (Tabelas 4 e 5). Assim, o morango silvestre (320,78 mg de Trolox g⁻¹) foi a fruta que apresentou maior capacidade para sequestrar o radical ABTS de forma *on-line* (Tabela 6), enquanto que a juquioba (8,74 mg de Trolox g⁻¹) foi a que apresentou a menor capacidade (Tabela 7).

Métodos que determinam a atividade antioxidante *on-line* por CLAE-ABTS, podem detectar a atividade antioxidante de um único componente e sua contribuição para a atividade global de misturas complexas simultaneamente (HE et al., 2010). A atividade antioxidante de um único componente pode ser então comparada com outros na matriz complexa (ESIN ÇELİK et al., 2014). Portanto, a purificação de cada composto para ensaios *on-line* não são mais necessários, levando a redução significativa de tempo e custo para a obtenção de resultados (ZOU et al, 2016).

Ribeiro et al. (2014) estudaram o perfil fenólico de *Psidium cattleianum* S., fruta comumente conhecida como morango guava ou araçá vermelho. Na polpa verificaram a presença de 21 compostos fenólicos, entre eles, a quercetina glicosilada ($11,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato) e a quercetina ($32 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato), valores estes que foram inferiores ao encontrado para a quercetina glicosilada ($1,00\text{-}64,81 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato) e quercetina ($0,22$ a $0,58 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato) nas frutas nativas aqui estudadas (Tabela 6). Bataglioni et al. (2015) identificaram e quantificaram vários compostos fenólicos em abacaxi, araçá-do-amazonas, acerola, cajá, caju e camu-camu. A quercetina foi encontrada em abundância nas polpas de cajá ($0,119 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato), porém com concentração 45,9% inferior a encontrada no presente trabalho ($0,22 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato) para a mesma fruta. Já o ácido ferúlico apresentou concentração de $3,22 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato; $5,16 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato e $14,74 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato para as frutas abacaxi, araçá-do-amazonas e acerola, respectivamente, sendo 96,22 a 99,17% inferior ao encontrado para a fruta-do-sabiá ($390 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato) do presente estudo (Tabela 7). Em nenhuma das frutas analisadas pelos autores foi identificada a catequina, a qual foi encontrada no presente no araçá-boi, murici vermelho, murici guassú e morango silvestre, e epicatequina, encontrada no murici vermelho e murici guassú.

Pode-se constatar que por terem sido utilizados solventes orgânicos como fase móvel, os flavonóis agliconas somente eluíram no final do gradiente (exemplo: quercetina), enquanto que os flavonóis glicosilados saíram mais cedo (exemplo: rutina, quercetina glicosilada) (Figura 8).

Figura 8. Cromatogramas das frutas nativas detectadas por CLAE *on-line* (ABTS•⁺) em 270 nm e 350 nm e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo) em 740 nm.

2.3.5.1 Determinação de antocianinas pela técnica de CLAE-DAD

As antocianinas foram avaliadas somente nas amostras de cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre. Este critério foi adotado pelo fato de somente nestas frutas ter sido observada na CLAE compostos com absorção acima de 500 nm, comprimento de onda característico de antocianinas, além do fato de serem frutas de cores avermelhadas. As antocianinas identificadas, bem como os respectivos limites de detecção e quantificação podem ser encontradas na Tabela 8. Foi possível verificar a presença de duas antocianinas: kuromanina (cianidina-3-*O*-glucosídeo) e mirtilina (delfinidina-3-*O*-glucosídeo) (Figura 9).

No cambuití-cipó foi encontrada a kuromanina ($8,39 \pm 0,12 \text{ mg g}^{-1}$) e a mirtilina ($13,61 \pm 0,30 \text{ mg g}^{-1}$). Já para o murici vermelho e o morango silvestre, somente a kuromanina foi identificada ($12,22 \pm 0,18 \text{ mg g}^{-1}$; $1,43 \pm 0,0 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente). Esta é a primeira vez que se relata a presença de antocianinas nas espécies de cambuití-cipó e murici vermelho, pois no morango silvestre (*Rubus rosaefolius*) já há relatos da presença da kuromanina (cianidina-3-*O*-glucosídeo, $17 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ de fruta fresca) (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010).

Fraige et al. (2014) relataram a presença de antocianinas em uvas brasileiras, sendo encontrados 20 tipos desses compostos. Já Li et al. (2016) encontraram em amoras chinesas 13 antocianinas distintas, dentre as quais estavam presentes a kuromanina (cianidina-3-*O*-glucosídeo) e a mirtilina (delfinidina-3-*O*-glucosídeo).

Os compostos fenólicos presentes nos vegetais têm sido cada vez mais alvo de pesquisas, devido principalmente ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório. Muitos alimentos funcionais são ricos em flavonoides, como as antocianinas. As antocianinas são compostos fenólicos responsáveis pela cor vermelha, e azul de várias frutas e flores. Muitos estudos relatam que as antocianinas são, de fato, responsáveis pela capacidade antioxidante em frutas (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014). Há alguns autores, inclusive, que atribuem maior capacidade antioxidante para as antocianinas em relação à vitamina C (CHOI et al., 2010). Portanto, a identificação de antocianinas é também importante para o entendimento das atividades biológicas apresentadas pelas frutas nativas estudadas.

Tabela 8. Antocianinas (mg.g^{-1}) dos extratos de três espécies de frutas nativas brasileiras, por CLAE-DAD.

Espécies frutíferas	Antocianinas	
	Mirtilina	Kuromanina
Cambuití-cipó	13,61 $\pm$ 0,30	8,39 $\pm$ 0,12
Murici vermelho	nd	12,22 $\pm$ 0,18
Morango silvestre	nd	1,43 $\pm$ 0,0
Parâmetros de validação		
LD (μg)	0,040	0,030
LQ (μg)	0,120	0,092
R ²	0,9996	0,9997

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ); nd= não detectado; Valores são médias de duplicatas $\pm$ DP; DP= desvio padrão. Valores de antocianinas expressos em mg de composto. g^{-1} de extrato liofilizado.

Figura 9. Cromatogramas das três amostras de frutas nativas analisadas a 515nm pela técnica de CLAE/DAD. CC= cambuití-cipó, MV=murici vermelho e MS=morango silvestre.

2.3.6 Determinação de compostos fenólicos pela técnica de CG-EM

A cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa (CG-EM) pode ser utilizada para a análise de produtos naturais, alimentos, óleos essenciais (TOMI et al., 2011) e compostos voláteis (ACEVEDO et al., 2017). Os compostos identificados pela técnica de CG-EM para as dez frutas nativas estão mostrados nas Tabelas 9-18. Vários flavonoides puderam ser identificados, como o kaempferol, quercetina e epicatequina. Também foi possível verificar a presença de um ácido hidroxibenzóico (ácido gálico), ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico), além de ácidos orgânicos, como o ácido ascórbico no cambuití-cipó (6,06%), murici guassú (10,56%) e jaracatiá-mamão (16,50%).

O kaempferol foi identificado somente no cambuití-cipó (0,89%). Já a quercetina foi encontrada no cambuití-cipó (10,87%), murici vermelho (0,63%) e cambuci (44,20%). A epicatequina foi identificada no araçá-boi (2,35%), cambuití-cipó (6,00%), murici vermelho (69,87%), murici guassú (8,92%), morango silvestre (15,82%) e jaracatiá-mamão (9,92%).

Em relação aos ácidos hidroxibenzóicos, o ácido gálico foi identificado nas amostras araçá-boi, murici vermelho, morango silvestre, cajá e cambuci nas seguintes concentrações: 19,73; 0,96; 7,93; 24,01 e 22,13%, respectivamente. No que diz respeito aos ácidos hidroxicinâmicos, foram identificados o ácido cumárico nas amostras morango silvestre (8,51%), cajá (2,70%), cambuci (0,30%) e jaracatiá-mamão (1,34%), o ácido ferúlico no morango silvestre (2,29%), jaracatiá-mamão (2,45%), fruta-do-sabiá (2,34%) e juquiarioba (6,44%) e o ácido caféico no morango silvestre (1,81%) e na juquiarioba (10,22%).

Zuo, Wang e Zhan (2002) também encontraram o ácido benzóico e os ácidos caféico, ferúlico, cumárico, sináptico e cinâmico pela técnica CG-MS em cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Infante et al. (2016) identificaram e quantificaram o ácido gálico e a (-)-epicatequina nas folhas, sementes e polpas de frutas do gênero *Eugenia*. Na polpa destas frutas foi encontrada concentração de ácido gálico que variou de 6,68 a 51,31% de ácido gálico, sendo superior ao teor encontrado para as frutas avaliadas neste estudo (0,96 a 24%).

Os ácidos caféico e ferúlico são ácidos fenólicos de grande interesse, pois apresentam fortes atividades antioxidantes, são inibidores do colesterol, possuem ação anticâncer e antienvhecimento, além de possuírem efeitos bacteriostáticos (WANG et al., 2016). Já os compostos fenólicos com estruturas com massas moleculares mais altas, como catequinas/epicatequinas e outros flavonoides, são potentes agentes antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (TOMÁS-BARBERÁN; ANDRÉS-LACUEVA, 2012). Assim,

a caracterização química de frutas nativas brasileiras é um importante passo para a sua valorização, já que a composição bioativa de muitas destas espécies ainda é desconhecida.

Tabela 9. Compostos fenólicos identificado no araçá-boi pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
ETHYL SUCCINATE 1TMS	11,917	1260,88	1,97	0,08	75 (100); 73 (98);44 (64); 175(36);55 (29)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	16,825	1457,37	2,07	0,14	73(100); 147 (78); 44(33);77(22);45(16)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	17,200	1468,22	12,08	0,64	73(100); 147 (78); 44(33);77(22);45(16)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,258	1528,58	16,94	2,71	73(100); 147 (78); 44(33);77(22);45(16)
HEXANEDIOIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,467	1534,81	1,15	0,24	73 (100); 44 (87); 75 (52); 117(38); 111(34)
2-PROPENOIC ACID, 3-PHENYL-, TRIMETHYLSILYL ESTER	19,38	1562,12	4,32	1,14	205 (100); 131 (92); 161 (87); 103 (72); 75 (50)
GALLIC ACID	28,84	2016,12	19,73	2,03	281 (100); 73 (84); 458 (52); 147 (26); 282 (25)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,275	2063,16	8,88	0,37	117 (100); 73 (79); 313 (67); 75 (61); 129 (42)
n.i	33,390	2238,07	1,75	0,61	73(100); 44 (87); 190 (72); 134 (65);75 (52)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,500	2241,98	6,07	0,47	73 (100); 75 (93); 67 (67); 81 (66); 95 (48)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,592	2245,25	11,60	1,94	117 (100); 73 (98); 75 (89); 129 (71); 339 (59)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER-	34,042	2261,25	8,73	0,60	117 (100); 73 (75); 641 (69); 75 (57); 129 (44)
1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIISOCTYL ESTER	39,95	2604,54	2,41	0,91	149 (100); 44 (60); 167 (36); 57 (28); 71 (26)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,233	2936,01	2,35	0,56	73 (100); 368 (98); 355 (55); 44 (38); 369 (36)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 10. Compostos fenólicos identificados no cambuí-cipó pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
n.i	16,670	1452,892	3,37	1,27	73 (100); 228 (51); 75 (26); 147 (24); 110 (22)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,283	1529,329	0,855	0,08	73 (100); 147 (34); 75 (13); 55 (11); 45 (11)
HEXANEDIOIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,500	1535,797	0,35	0,08	73 (100); 75(79); 111 (55); 55 (49); 44 (33)
N, N, N-TRIS(2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] ETHYL) AMINE	21,460	1655,638	4,43	0,38	262(100); 73(74); 263 (23); 117 (220); 130 (13)
AZELAIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	25,000	1830,717	0,935	0,18	73 (100); 75 (75); 55 (40); 44 (23); 129 (220)
ASCORBIC ACID-TMS	28,82	1483,25	6,06	0,47	73 (100); 147 (47); 332 (33); 117 (24); 333 (11)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,317	2064,544	15,65	1,36	117 (100); 73 (85); 75 (69); 129 (41); 313 (39)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,517	2242,588	7,89	0,95	73 (100); 75 (99); 81 (71); 67 (71); 55 (56)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,608	2245,823	18,415	0,54	73 (100); 75 (96); 117 (93); 129 (69); 55 (63)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,733	2250,267	5,585	1,05	73 (100); 75 (96); 117 (93); 129 (69); 55 (63)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	34,07	2262,14	16,005	1,04	117(100); 73 (80); 75 (62); 341 (52); 129 (42)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	35,14	2337,113	1,19	0,24	73 (100); 75 (99); 81 (71); 67 (71); 55 (56)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,580	2950,288	6,005	1,17	73 (100); 368 (95); 355(37); 369 (33); 280 (19)
KAEMPFEROL	49,261	3020,911	0,895	0,08	73(100); 560 (43); 44 (38); 559 (30); 471 (22)
QUERCETIN	52,967	3259,689	10,875	1,35	647 (100); 648 (50); 73 (39); 649 (33); 559(14)
n.i	53,14	3305,007	1,49	0,45	589 (100); 73 (90); 590 (58); 44 (54); 591 (29)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 11. Compostos fenólicos em murici vermelho por CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	16,820	1457,23	0,19	0,01	73 (100); 147 (75); 44 (42); 163 (29); 75 (27)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	17,170	1467,351	0,325	0,05	73 (100); 147 (43); 44 (26); 163 (25); 75 (24)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,250	1528,346	2,56	0,27	73 (100); 147 (55); 233 (17); 133 (11); 75 (10)
1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIETHYL ESTER	20,450	1624,522	2,405	1,59	149(100); 177 (21); 176(14); 150 (12); 65 (12)
TETRITOLOL-1-D1, 2-DESOXY-2-HYDROXYMETHYL-TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)-	23,070	1737,249	0,595	0,09	73 (100); 129 (88); 147 (23); 44 (21); 103 (21)
AZELAIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	25,000	1830,717	0,345	0,08	73 (100); 75 (73); 44 (48); 149 (42); 55 (42)
GALLIC ACID	28,850	2016,382	0,965	0,15	281 (100); 73 (61); 458 (28); 282 (23); 44 (17)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,27	2063,001	3,57	0,92	117 (100); 73 (78); 75 (62); 313 (62); 129 (42)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z,Z)-, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,48	2241,273	2,53	0,35	75 (100); 73 (99); 81 (72); 67 (71); 95 (50)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,580	2244,828	5,26	1,39	117 (100); 73 (99); 75 (94); 129 (73); 339 (59)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,708	2249,378	1,465	0,56	73 (100); 117 (93); 75 (93); 129 (73); 44 (52)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	34,040	2261,18	3,945	0,54	117 (100); 73 (72); 341 (67); 75 (55); 129 (42)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	35,120	2336,377	0,475	0,12	44 (100); 73 (77); 75 (63); 67 (50); 81 (41)
n.i	46,400	2833,447	3,395	0,15	280 (100); 73 (67); 355 (49); 281 (26); 179 (17)
n.i	47,29	2863,698	0,705	0,09	280 (100); 73 (67); 355 (41); 281 (31); 44 (26)
n.i	48,099	2930,494	0,77	0,01	73 (100); 395 (57); 355 (23); 648 (22); 44 (21)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,23	2935,885	30,98	0,66	368 (100); 355 (44); 73 (41); 369 (35); 370 (17)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,63	2952,346	38,89	0,51	368 (100); 355 (44); 73 (41); 369 (35); 370 (17)
QUERCETIN	52,917	3257,743	0,63	0,24	647(100); 648 (58); 73 (59); 207 (36); 649 (35)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 12. Compostos fenólicos em murici guassú por CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
HEXANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	7,510	1105,28	5,87	6,69	75 (100); 73 (86); 173 (43); 117 (34); 44 (22)
ACETAMIDE, 2,2,2-TRIFLUORO-N-METHYL-N-(TRIMETHYLSILYL)-	11,064	1236,838	1,865	0,49	73 (100); 228 (60); 110 (34); 134 (34); 184 (24)
OCTANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	12,311	1300,17	3,17	3,32	73 (100); 75 (87); 117 (54); 201(43); 44 (32)
2-OCTENOIC ACID 1TMS	13,649	1338,009	0,72	0,66	199 (100); 75 (96); 129 (78); 73 (68); 143 (42)
TRIMETHYLSILYL 3-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] OCTANOATE	17,783	1514,426	6,365	4,49	73 (100); 147 (67); 173 (26); 233 (23); 75 (19)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,258	1528,584	2,475	2,47	73 (100); 147 (50); 44(27); 99 (18); 55 (15)
ASCORBIC ACID – TMS	28,827	2015,627	10,565	7,71	73 (100); 147 (53); 281 (42); 332 (36); 117 (19)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,28	2063,329	12,965	7,42	117 (100); 73 (75); 313 (70); 75 (57); 129 (40)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,490	2241,628	7,855	3,26	73 (100); 75 (98); 81 (74); 67 (70); 95 (51)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,590	2245,183	15,295	5,56	117 (100); 73 (88); 75 (79); 129 (67); 339 (63)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,710	2249,449	5,97	3,89	117 (100); 73 (88); 75 (79); 129 (67); 339 (63)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	34,050	2261,536	13,695	7,22	117 (100); 73 (69); 341 (66); 75 (51); 129 (39)
HEXADECANOIC ACID, 1-(HYDROXYMETHYL)-1,2-ETHANEDIYL ESTER	34,98	2331,222	0,99	0,83	57 (100); 55 (75); 98 (74); 43 (69); 129 (61)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z,Z)-, TRIMETHYLSILYL ESTER	35,13	2336,745	2	1,48	73 (100); 75 (87); 67 (76); 81 (65); 95 (48)
OCTADECANOIC ACID, 2,3-BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY] PROPYL ESTER	46,52	2837,525	1,275	0,52	73 (100); 44 (68); 399 (51); 242 (51); 147 (37)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,23	2935,885	5,81	3,00	368 (100); 73 (77); 355 (51); 369 (35); 370 (17)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,58	2950,288	3,115	1,65	368 (100); 73 (77); 355 (51); 369 (35); 370 (17)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 13. Compostos fenólicos em morango silvestre por CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	17,350	1501,52	2,03	0,71	73(100); 147 (38); 45(15); 75(14); 44(12)
BUTANOIC ACID, 3-METHYL-2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER	19,120	1554,28	6,82	0,24	73(100); 149 (62); 75(46); 147 (41); 43 (39)
BENZOIC ACID, 4-[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER	20,380	1622,37	0,69	0,04	73 (100); 44(50); 223(46); 149(42); 267(41)
PROPANEDIOIC ACID, DIMETHYL-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	21,970	1702,23	0,80	0,13	147(100); 73(94); 44(55); 75(39); 57(33)
<i>p</i> -COUMARIC / <i>m</i> -COUMARIC CID	23,960	1765,58	4,21	0,11	73(100); 219(43); 293(39); 249(33); 75(25)
AZELAIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	24,080	1801,25	0,26	0,10	73(100); 75(73); 44(62); 55(32); 149(32)
1,2,3-PROPANETRICARBOXYLIC ACID, 2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -, TRIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	24,930	1828,48	43,06	6,40	73(100); 273(55); 147(44); 217(18); 347(15)
FERULIC ACID	26,860	1921,86	0,35	0,07	73(100); 44(67); 75(39); 323(32); 308(29)
<i>p</i> -COUMARIC ACID/ <i>m</i> -COUMÁRIC ACID	27,17	1931,59	4,30	0,51	73(100); 293(62); 219(55); 249(47); 308(29)
GALLIC ACID	27,86	1953,23	7,93	0,41	73(100); 281(90); 458(36); 282(22); 45(18)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	29,3	2031,16	3,16	1,63	117(100); 73(98); 75(75); 313(51); 129(43)
FERULIC ACID	30,39	2066,94	1,94	0,54	73(100); 338(60); 323(58); 44(55); 308(49)
CAFFEIC ACID	31,35	2132,61	1,81	0,30	73(100); 219(93); 396(33); 44(30); 45(23)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,11	2228,12	4,01	2,23	117(100); 73(94); 75(68); 341(44); 129(44)
9-OCTADECENOIC ACID, 2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -1- [[(TRIMETHYLSILYL)OXY] METHYL] ETHYL ESTER	36,34	2417,66	2,84	0,67	73(100); 129(51); 69(51); 44(43); 81(37)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	47,73	2915,31	15,82	2,82	73(100); 368(98); 355(56); 369(15); 370(16)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 14. Compostos fenólicos identificados no cajá pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
TRIMETHYLSILYL 3-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] HEXANOATE	13,560	1335,492	33,48	1,13	73 (100); 147 (59); 145 (33); 75 (20); 219 (150)
1,2,3-PROPANETRICARBOXYLIC ACID, 2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -, TRIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	16,630	1578,9	6,10	0,62	73 (100); 273 (32); 183 (30); 75 (19); 147 (15)
HEXANEDIOIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,440	1614,1	3,34	0,01	73 (100); 75 (52); 111 (41); 147 (30); 55 (29)
PENTARIC ACID, 2,3-DIDEOXY-4-O-(TRIMETHYLSILYL)-3- [[[(TRIMETHYLSILYL)OXY] CARBONYL] -, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	25,930	1988,9	17,35	0,18	73 (100); 147 (42); 289 (24); 45 (17); 273 (15)
<i>P</i> -COUMARIC ACID	28,160	2099,7	2,70	0,00	73 (100); 293 (54); 219 (51); 308 (27); 75 (24)
GALLIC ACID	28,82	2046,9	24,01	0,25	281 (100); 73 (87); 458 (38); 282 (24); 443 (17)
SUCCINIC ACID, 2,3-BIS(TRIMETHYLSILOXY)-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	29,000	2064,9	13,04	2,18	73 (100); 147 (41); 292 (23); 115 (17); 361 (12)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; dp = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 15. Compostos fenólicos identificados no cambuci pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	17,150	1466,77	1,71	0,99	73 (100); 147 (36); 75 (23); 233 (18); 101 (17)
BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	18,220	1527,45	1,44	0,81	73 (100); 147 (43); 233 (13); 45 (12); 75 (12)
1,2,3-PROPANETRICARBOXYLIC ACID, 2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -, TRIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	25,030	1831,68	13,96	6,01	73 (100); 229 (45); 147 (42); 273 (42); 75 (23)
1,2,3-PROPANETRICARBOXYLIC ACID, 2-[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -, TRIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	25,030	1599,65	11,98	5,85	73 (100); 229 (45); 147 (42); 273 (42); 75 (23)
<i>P</i> -COUMÁRIC ACID	28,180	1963,27	0,30	0,30	73 (100); 293 (55); 219 (49); 249 (42); 44 (37)
GALLIC ACID	28,81	2015,07	22,13	7,77	281,20 (100); 73 (81); 458 (48); 282 (25); 443 (21)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,23	2061,69	1,80	0,59	117 (100); 73 (92); 313 (48); 129 (41); 132 (30)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,540	1607,56	1,07	0,13	73 (100); 75 (94); 117 (82); 129 (59); 55 (55)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,99	2259,40	1,44	0,35	117 (100); 73 (92); 313 (48); 129 (41); 132 (30)
QUERCETIN	57,64	3605,35	26,49	10,06	648 (100); 649 (54); 73 (50); 559 (44); 650 (32)
QUERCETIN	58,42	3636,24	14,65	1,20	648 (100); 649 (54); 73 (50); 559 (44); 650 (32)
QUERCETIN	58,78	2650,50	3,07	3,54	648 (100); 649 (54); 73 (50); 559 (44); 650 (32)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado

Tabela 16. Compostos fenólicos identificados no jaracatiá-mamão pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
n.i	15,05	1406,044	16,45	0,70	111 (100); 73 (64); 229 (43); 43(38);75 (19)
2-PENTENEDIOIC ACID, 3-METHYL-, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	16,650	1452,313	7,19	0,13	73(100); 273 (29); 183 (28); 75 (19);45 (15)
AZELAIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	24,950	1829,116	5,83	0,71	73(100); 75 (68); 55 (38); 149 (27); 117 (22)
<i>P</i> -COUMARIC ACID	28,150	1962,327	1,34	0,05	73(100); 293(42);219 (39); 44 (36);249 (35)
ASCORBIC ACID-TMS	28,770	2013,756	16,50	2,09	73(100); 147 (50); 332 (36); 117 (22); 205 (12)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,230	2061,687	14,34	1,67	117(100); 73 (92); 75 (70); 313 (53); 129 (39)
FERÚLIC ACID	31,34	2132,272	2,45	1,63	73 (100); 338 (55); 323 (52); 308(43); 249 (43)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,55	2243,761	26,00	3,58	73 (100); 75 (67); 129 (60); 117 (57); 55 (40)
(-) -EPICATECHIN (SILANIZED)	48,190	2934,239	9,92	1,84	73(100); 368 (49); 355(24); 369 (17); 217(13)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 17. Compostos fenólicos identificados na juquiarioba pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,22	2061,359	31,53	0,21	73(100); 117(93); 75(67); 129(44);313(38)
FERULIC ÁCID	31,330	2131,93	6,44	0,48	73(100);338(53);323(50);249(450); 308 (42)
CAFFÉIC ACID	32,250	1788,047	10,22	0,52	73(100); 219(93); 396(34); 45(21);44(18)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,550	2243,761	14,74	0,76	73(100); 75(82);117(71);129(51);55(51)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	34,000	2259,758	37,08	1,38	117 (100); 73 (77); 341 (60); 75 (58); 129 (38)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; DP = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

Tabela 18. Compostos fenólicos identificados na fruta-do-sabiá pela técnica de CG/EM.

Composto	TR	IR	ÁREA (%)	DP	Íon (m/z, abundância em parêntese)
AZELAIC ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	24,980	1830,08	4,17	2,38	73 (100); 75 (70); 55 (44); 149 (30); 117 (26)
HEXADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	30,230	2061,69	23,47	3,01	117 (100); 73 (79); 75 (60); 313 (58); 129 (37)
FERÚLIC ACID	31,330	2131,93	2,34	0,19	73 (100); 338 (81); 323 (70); 308 (64); 249 (55)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,450	2140,21	6,39	0,84	73 (100); 75 (95); 81 (70); 67 (67); 55 (53)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,510	2242,34	21,55	3,32	73 (100); 75 (82); 117(81); 129 (55); 55 (51)
OLEIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	33,67	2248,03	5,85	4,50	73 (100); 75 (82); 117(81); 129 (55); 55 (51)
OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	34	2259,76	25,06	8,97	117 (100); 73 (77); 341 (60); 75 (58); 129 (38)
9,12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) -, TRIMETHYLSILYL ESTER	35,086	2235,13	1,99	0,48	73 (100); 75 (81); 67 (64); 81 (57); 44 (41)
BENZENEACETIC ACID, 2-METHOXY-.ALPHA.-(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER	47,85	2920,25	2,38	0,24	209 (100); 73 (87); 217 (27); 44 (26); 75 (18)
3, 8-DIOXA-2,9-DISILADECANE, 2,2,9,9-TETRAMETHYL-5,6-BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY] -, (R*, S*) -	48,31	2098,37	5,01	0,11	73 (100); 205 (48); 103 (22); 44 (21)217 (21)
BENZENEACETIC ACID, 2-METHOXY-.ALPHA.-(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER	48,61	2951,52	1,81	0,34	209 (100); 73 (99); 44 (25); 217(22); 75 (19)

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção linear; dp = desvio padrão (n=2); n.i = não identificado.

2.3.7 Análise de cluster e componentes principais

Com o intuito de se agrupar as frutas com características semelhantes, tendo por base o conjunto de dados obtidos a partir do teor de compostos fenólicos totais (Tabela 1), atividade antioxidante (Tabela 2), atividade anti-inflamatória (citotoxicidade e peritonite) (Figuras 6 e 7), composição fenólica por HPLC-DAD (Tabelas 6 e 7) e CG-EM (Tabelas 9-18) das dez frutas nativas estudadas, foi realizado uma análise de agrupamento pelos métodos hierárquicos (agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas, UPGMA) e métodos não hierárquicos (componentes principais, CP).

Na figura 10 pode-se observar o agrupamento das 10 frutas nativas utilizando a análise de clusters - UPGMA. Foram formados três grupos que apresentaram a seguinte distribuição: grupo 1 – formado pelas espécies araçá-boi, morango silvestre, murici guassú, cajá, jaracatiá, juquirioba, fruta-do-sabiá e cambucí; grupo 2 – formado pela espécie cambuití-cipó e grupo 3- composto pelo murici vermelho.

Figura 10. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com o teor de compostos fenólicos totais, atividades antioxidantes, anti-inflamatória e composição fenólica por HPLC-DAD e CG-EM das 10 espécies de frutas nativas brasileiras.

Para a análise de componentes principais (CP), foi verificado que a soma dos dois primeiros CP explicaram aproximadamente 79,62% da variância total (VI1 = 60,21%; VI2 = 19,41%) (Tabela 19). De acordo com Regazzi (2000) a soma dos dois primeiros CP deve acumular 70% ou mais de proporção da variância total, indicando assim adequação no método. A maior parte da variabilidade pode ser resumida nestes dois componentes e a classificação das espécies frutíferas nativas pode ser plotada no Nível 2D, conforme observado pela dispersão gráfica na Figura 11.

Tabela 19. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada no teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e composição fenólica (HPLC-DAD e CG-EM) em frutas nativas brasileiras.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	16,26	60,21	60,21
2	5,24	19,41	79,62
3	2,25	8,34	87,97
4	1,30	4,81	92,78
5	0,93	3,44	96,23
6	0,60	2,21	98,44
7	0,25	0,93	99,37
8	0,12	0,45	99,83
9	0,05	0,17	100,00

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada.

Figura 11. Dispersão gráfica em relação aos dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir da matriz gerada com teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, anti-inflamatória e composição fenólica por HPLC-DAD e CG-EM das 10 espécies de frutas nativas brasileiras

Com base no gráfico de dispersão (Figura 11) foram formados quatro grupos, que apresentam a seguinte composição: grupo 1 – formado por cambucí, morango silvestre e araçá-boi; grupo 2 – formado por murici guassú, cajá, jaracatiá, juquioba e fruta-do-sabiá; o grupo 3 composto pelo murici vermelho e grupo 4 formado pelo cambuití-cipó. Com base no gráfico de dispersão, a classificação das espécies frutíferas foi mais seletiva do que a observada na Figura 10, já que separou o grupo 1 obtido na Figura 10 em dois novos grupos (Figura 11). Apesar da diferença apresentada nos métodos adotados, as análises de agrupamento foram bem sucedidas para classificar as espécies frutíferas estudadas.

O ácido gálico, a quercetina e o ácido cumárico (identificados pelo CG-EM) mostraram poder de discriminação baixo para as frutas nativas, pois as variáveis apresentam aproximação da origem do eixo. As variáveis que exibiram maior distância do eixo de origem apresentaram alto poder de discriminação, como a citotoxicidade, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e identificação de compostos por HPLC-DAD (Figura 12).

Pode-se observar que as frutas do grupo 1 (Figura 11), araçá-boi, cambuci e morango silvestre correlacionaram-se com o ácido gálico e quercetina (identificadas no CG-EM). O araçá-boi, morango silvestre e cambuci foram as frutas que apresentaram os maiores teores de ácido gálico e quercetina (Tabelas 9, 13 e 15, respectivamente). Apesar que a fruta cajá também apresentou alto teor de ácido gálico (24,01%) identificado pelo CG-EM (Tabela 14), no entanto essa variável teve baixa discriminação para esta fruta, agrupando-a no grupo 2.

Já as frutas do grupo 2 (Figura 11) cajá, murici guassú, jaracatiá-mamão, juquiarioba e fruta-do-sabiá se correlacionaram com a citotoxicidade (Figura 12). Os extratos de murici guassú, cajá, juquiarioba e jaracatiá-mamão não apresentaram redução na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas quando comparado somente com o controle veículo ($p < 0,05$). Entretanto, os extratos de araçá-boi, morango silvestre e fruta-do-sabiá na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram redução da viabilidade celular (morte das células acima de 20%) quando comparado ao controle veículo ($p < 0,05$). Porém, o araçá-boi e o morango silvestre foram agrupados no grupo 1, pois foram outras variáveis (ácido gálico e quercetina) que discriminaram essas frutas, como citado anteriormente.

Figura 12. Mapa de componentes principais (CP) mostrando relação entre o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, anti-inflamatória e identificação de compostos fenólicos (CLAE-DAD e CG-EM) em dez frutas nativas brasileiras. Legenda: Tox= toxicidade, Ac. Gálico = ácido gálico, Quer= quercetina, Cat.= catequina, P.B1= procianidina B1, Epi= epicatequina, CFT = compostos fenólicos totais, P.B2= procianidina B2, Kurom. = kuromanina, Mirt.= mirtilina, Quer. G= quercetina glicosilada, Kaemp.G.=kaempferol glicosilado, Quer= quercetina, Ac.cumárico= ácido cumárico, Ac.ferúlico = ácido ferúlico e Ac. caféico= ácido caféico.

O murici vermelho, grupo 3 (Figura 11) se correlacionou com as variáveis: atividade antioxidante (ABTS⁺ e ROO•), teor de compostos fenólicos totais (CFT), procianidina B1, catequina e epicatequina (Tabela 6), sendo essa fruta com os maiores teores para essas variáveis. O teor de compostos fenólicos foi 55,74 mg GAE g⁻¹ (Tabela 1), 559,01 µmol TE g⁻¹ para a atividade antioxidante pelo sequestro do radical peroxila (Tabela 2), 71,95; 99,87 e 52,40 mg g⁻¹ de extrato liofilizado para a procianidina B1, catequina e epicatequina, respectivamente, pelo método HPLC-DAD (Tabela 6) e 69,87% para epicatequina pelo

método CG-EM (Tabela 11). No entanto, somente a atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} o cambuití-cipó apresentou maior valor (749,88 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) (Tabela 2). A fruta cambuití-cipó não se agrupou a fruta murici vermelho, pois essa fruta está relacionada com outras variáveis (procianidina B2, kuromanina, mirtalina, kaemperol glicosilado, quercetina glicosilada, quercetina, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido caféico) (Figura 12). Melo et al. (2015) observaram correlação entre a procianidina B1 com a atividade antioxidante para o sequestro do radical ABTS^{•+}. Esses resultados pode explicar a alta atividade antioxidante do murici vermelho, pois o mesmo apresentou o maior conteúdo de procianidina B1 (71,95 mg g^{-1}) (Tabela 6).

A catequina e seu isômero epicatequina exibem diferenciação na capacidade antioxidante contra radicais livres sintéticos e ERO devido à disposição tridimensional do grupo hidroxil funcional, bem como as posições das ligações duplas nos anéis benzenóico de suas moléculas. A possibilidade de sinergismo entre estes dois compostos, positiva ou negativa, também deve ser levada em consideração, porque eles podem apresentar diferentes atividades quando analisados separadamente (MELO et al., 2015).

A correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante pelo sequestro do radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) pode estar correlacionada com os mecanismos de transferência de elétrons. Os compostos fenólicos podem sequestrar $\text{ROO}^\bullet$ por três mecanismos: transferência de hidrogênio, transferência de elétrons e adição de dupla ligação. Apesar do fato dos mecanismos que pode ocorrer, a eliminação de $\text{ROO}^\bullet$ pelos compostos fenólicos ocorre principalmente pela transferência de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxil fenólico para o $\text{ROO}^\bullet$, que origina um radical de composto fenólico estabilizado por ressonância e um hidroperóxido (OU et al., 2001).

Já o cambuití-cipó - grupo 4 (Figura 11) se correlacionou com os demais compostos fenólicos identificados (procianidina B2, kuromanina, mirtalina, kaempferol, kaemperol glicosilado, quercetina glicosilada, rutina, quercetina, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido caféico) e peritonite. A amostra de cambuití-cipó apresentou os maiores teores de rutina, quercetina, quercetina glicosilada, kaempferol glicosilado e mirtalina, como pode ser observado na Tabela 6 e também para kaempferol por CG-EM (Tabela 10). Em relação a peritonite os extratos de cajá, murici vermelho, araçá-boi, cambuití-cipó e morango silvestre reduziram o influxo de neutrófilos em 55%, 46%, 55%, 43% e 42%, respectivamente (Figura 7), com destaque para a fruta cajá e cambuití-cipó (55%). No entanto, a peritonite não foi a variável que discriminou a fruta cajá neste grupo, mas sim outras variáveis.

Muitos estudos relatam que frutas e seus subprodutos (cascas, polpas e sementes) possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante, e, atualmente um número crescente de pesquisadores têm buscado identificar essas propriedades, bem como os respectivos compostos bioativos (MUELLER et al., 2013; HASNAOUI; WATHELET; JIMENEZ-ARAUJO, 2014; INFANTE et al., 2016; LAZARINI et al. 2016).

Os compostos fenólicos, e principalmente os flavonoides, possuem atividade antioxidante significativa, contribuindo desta forma na redução do estresse oxidativo celular por meio da desativação de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em excesso (BATAGLION et al., 2014). De acordo com a literatura, os flavonoides também possuem atividade antiproliferativa contra vários tipos de células cancerígenas. Por exemplo, (+) -catequina e (-) epicatequina demonstraram possuir ação protetora no desenvolvimento do câncer em células hepáticas, quando o dano ao DNA foi induzido pelas substâncias N-nitrosodimetilamina, N-nitrosopirrolidina e benzo(a)pireno (DELGADO et al., 2008). A (-) -catequina e a (-) -epicatequina isoladas das cascas de maçã também apresentaram atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama e fígado (HE; LIU 2008). Em outro estudo, foi verificado que a (-) -epicatequina, (-) -epigallocatequina, (-) -epicatequina galato e (-) -epigallocatequina galato atuaram como potentes inibidores de dano do DNA induzido pelo ácido hipocloroso (KAWAI et al., 2008). Alshatwi (2010) também verificou que a catequina possui forte efeito antiproliferativo contra células de carcinogênicas de mama.

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários das plantas e também estão relacionados com a atividade antioxidante e anti-inflamatória em produtos naturais. Dentre estes pode-se citar o ácido *p*-cumárico, que possui a capacidade de diminuir o risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, como o câncer de estômago (ŞERBETCI; GULÇIN, 2010) e o ácido caféico que possui atividade contra células cancerosas do cólon (HASHIM et al., 2008). Estudos já relataram que o ácido gálico atua como inibidor competitivo de COX-1 e COX-2, porém com maior afinidade para a COX-2. Estas ciclooxigenases tem papel importante na inflamação, porque são enzimas chave na síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Durante o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer como o de cólon, estômago, esôfago, pâncreas e mama, a COX-2 é regulada positivamente. Sobre expressão da COX-2 induz a tumorigênese e torna as células cancerígenas resistentes a estímulos apoptóticos (REDDY et al., 2010). Desta forma, se faz muito importante a identificação e a quantificação dessa classe de compostos fenólicos em frutas nativas ainda pouco conhecidas.

A cianidina-3-glucosídeo, pelargonidina, pelargonidina-3-glucosídeo, pelargonidina-3-rutinosídeo, isoladas de extratos de morango mostraram atividades antiproliferativas em células cervicais, de cólon, da próstata e da cavidade oral (ZHANG et al., 2008). Já a cianidina-3-glucosídeo e a delphinidina-3-glucosídeo, isoladas de casa de uva, inibiram o crescimento de células tumorais de mama (FERNANDES et al., 2010). Portanto, a identificação e a quantificação de compostos bioativos em frutas nativas é muito importante, de forma a se identificar entre outras coisas, novas superfrutas.

2.4. CONCLUSÃO

Dentre as dez frutas nativas estudadas, o murici vermelho e o cambuí-cipó se destacaram por apresentarem as maiores capacidades sequestrantes para o radical ABTS^{•+} e radical peroxila (ROO[•]).

Cinco frutas (araçá-boi, cambuí-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá) reduziram o influxo de neutrófilos *in vivo*, demonstrando assim bom potencial anti-inflamatório, que juntamente com a atividade antioxidante, poderiam ser classificadas como alimentos funcionais.

Em relação à composição fenólica, foi possível identificar compostos das classes dos flavonoides, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, dentre eles: a quercetina, kaemperol, quercetina glicosilada, kaempeferol glicosilado, procianidina B1, procianidina B2, catequina, epicatequina, rutina, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido caféico.

No cambuí-cipó, murici vermelho e morango silvestre foram encontradas várias antocianinas. No cambuí-cipó foi identificada a kuromanina (8,39 mg g⁻¹) e a mirtilina (13,61 mg g⁻¹), enquanto que no murici vermelho e morango silvestre somente a kuromanina (12,22 mg g⁻¹; 1,43 mg g⁻¹, respectivamente). Esta é a primeira vez que se relata a presença de antocianinas nas espécies cambuí-cipó e murici vermelho.

Dessa forma pode-se concluir que as frutas estudadas são fontes de compostos bioativos, as quais poderiam ser incluídas na dieta, na forma *in natura* ou como alimentos funcionais, como uma forma de contribuir na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

REFERÊNCIAS

- AABY, K.; GRIMMER, S.; HOLTUNG, L. Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 257-264, 2013.
- ACEVEDO, F. et al. Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. **Food Research International**, v. 94, p. 20-28, 2017.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, p.2155–2159, 2011.
- ANDRADE, M.C., JR.; ANDRADE, J.S. Amazonian Fruits: an overview of nutrients, calories and use in metabolic disorders. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p.1692–1703, 2014.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- ALSHATWI, A. A. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 167, 2010.
- BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.
- BETTAIEB, A. et al. Anti-inflammatory actions of (–)-epicatechin in the adipose tissue of obese mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.81, p. 383–392, 2016.
- BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.
- BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 25, p. 3-14, 2001.
- BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of food composition and analysis**, v. 23, n. 6, p. 554-560, 2010.
- CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n.17, p.2157–2184, 2004.

- CARDARELLI, C. R.; DE TOLEDO BENASSI, M.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1689-1693, 2008.
- CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v.127, p.419–426, 2011.
- CHOI, J. Y. et al. Analysis and tentative structure elucidation of new anthocyanins in fruit peel of *Vitis coignetiae* Pulliat (meoru) using LC–MS/MS: Contribution to the overall antioxidant activity. **Journal of Separation Science**, v.33, p.1192–1197, 2010.
- CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.
- CÔTÉ, J. et al. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 7, p. 666-679, 2010.
- CUEVAS-GLORY, L.F.; PINO, J.A.; SANTIAGO, L.S.; SAURI-DUCH, E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1032-1043, 2007.
- DAL SECCO, D. et al. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2006..
- DELGADO, M. E. et al. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n.8, p. 479–490, 2008.
- DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Jurnal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.
- DENNY, C. et al. Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. *BMC Complementary and Alternaty Medicine*, v.13, P.235, 2013.
- DE ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. D. C.; DE ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise- Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida DE alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476–2481, 2009.
- DE ROSSO, V.V. Bioactivities of Brazilian fruits and the antioxidant potential of tropical biomes. **Food and Public Health**, v.3, p. 37–51, 2013.
- DE SOUZA, M. P. et al. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC–MS/MS and HS-SPME/GC–MS. **Food Research International**, v. 83, p. 87-94, 2016.

- DE SOUZA, V.R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362-368, 2014.
- ESIN ÇELİK, S. et al. Identification and anti-oxidant capacity determination of phenolics and their glycosides in elderflower by on-line HPLC–CUPRAC method. **Phytochemical Analysis**, v.25, n.2, p. 147–154, 2014.
- FERNANDES, I. et al. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3785–3792, 2010.
- FRAIGE, K.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395-403, 2014.
- HASNAOUI, N.; WATHELET, B.; JIMENEZ-ARAUJO, A. V. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. **Food Chemistry**, v. 160, p. 196–203, 2014.
- HEMALATHA, R. et al. Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1189-1198, 2016
- HENRIQUES, B. O. et al. In Vitro TNF-Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2016, 2016.
- HASHIM, Y. Z. H. Y. et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. **International Journal of Cancer**, v. 122, n.3, p. 495–500, 2008.
- HE, X.; LIU, R. H. Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their anti-proliferative and antioxidant activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n.21, p. 9905–9910, 2008
- INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored brazilian native fruits. **PLoS ONE** , v. 11, n. 4, p. e0152974, 2016.
- KARAÇELİK, A. A. et al. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. **Food Chemistry**, v. 175, p. 106-114, 2015.

- KAWAGUCHI, K.; MATSUMOTO, T.; KUMAZAWA, Y. Effects of antioxidant polyphenols on TNF-alpha-related diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, p. 1767-79, 2011.
- KAWAI, Y. et al. Galloylated catechins as potent inhibitors of hypochlorous acid-induced DNA damage. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n.7, p.1407–1414, 2008.
- KE, Z. L et al.Citrus flavonoids and human cancers. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.3, n.5, p.341–351, 2015
- KOLEVA, I. I.; NIEDERLÄNDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.
- LAVECCHIA, T.; REA, G.; ANTONACCI, A.; GIARDI, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 198-213, 2013.
- LAZARINI, J. G. et al. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 249–257, 2016.
- LIAO, Z.; HE, H.; ZENG, G.; LIU, D.; TANG, L.; YIN, D.; CHEN, D. Delayed protection of Ferulic acid in isolated hearts and cardiomyocytes: Upregulation of heat-shock protein 70 via NO-ERK1/2 pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 18-27, 2017.
- LI, D.; MENG, X.; LI, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 1-7, 2016.
- MELO, P.S.et al. Winery by-products: extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v.181, p.60–169, 2015.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunologic Methods**, v.16, p.55-63, 1983.
- MUELLER, D. et al. Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD). **Food Chemistry**, v. 139, p. 339–346, 2013.
- NAKAO, K. et al. Anti-hyperuricemia effects of extracts of immature Citrus unshiu fruit. **Journal of Traditional Medicines**, v. 28, n. 1, p. 10-15, 2011.

- NÉMETH, T., MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v.143, n.1, p.9-19, 2012.
- NEVES, L. C. et al. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p. 188-196, 2015a.
- NEVES, L. C. et al. Study to determine the optimum harvest date of Murici (*Byrsonima coccolobifolia* Kunth.) from quality and functional attributes. **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 49-56, 2015b.
- OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.
- OLIVEIRA, B. D.'Á. et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59-66, 2016.
- OLIVEIRA, V.B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, p.170–179, 2012.
- OU, B. et al. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.
- PATTHAMAKANOKPORN, O. et al. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 3, p. 241-248, 2008.
- REDDY, T.C. et al. Kinetics and docking studies of a COX-2 inhibitor isolated from *Terminalia bellerica* fruits. **Protein and Peptide Letters**, v. 17, p. 1251-1257, 2010.
- REGAZZI, A.J. **Análise multivariada, notas de aula INF 766**. Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.
- RIBEIRO, A.B. et al. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 165, 140–148, 2014.
- RODRIGUES, N. P.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. **Food Research International**, v. 61, p. 228-235, 2014.
- RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 121, 996–1002, 2010.

- ŞERBETCI, T.; H.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **Internacional Journal of Food Properties**, v. 13, p. 657-671, 2010.
- SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101, 1012–1018, 2007
- SRISOOK, E. et al. Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Pharmacognosy Magazine**, v.13, p. 230–235, 2017.
- SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015.
- SU, K.Y. et al. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF-κB signaling. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.21, 2014.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ANDRÉS-LACUEVA, C. Polyphenols and health: Current state and progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.36, p.8773–8775, 2012.
- TOMI, P. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 533-536, 2011.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- WANG, Q. et al. Effect of the structure of gallic acid and its derivatives on their interaction with plant ferritin. **Food Chemistry**, v.123, p. 260-267, 2016.
- WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.52, p.4026-4037, 2004
- YOU, Q. et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 201-208, 2011.
- ZHAO, H. X.; ZHANG, H. S.; YANG, S. F. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. **Food Science and Human Wellness**, v.3, n.3, p.183-190, 2014.

ZHANG, Y. et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**, v. 145, p. 674-680, 2014.

ZHANG, Y. J. et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n.3, p. 670–675, 2008.

ZOU, Z. et al. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885-896, 2016.

ZUO, Y.; WANG, C.; ZHAN, J.. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC– MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3789-3794, 2002.

3. CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA DE FRUTAS NATIVAS COM ALTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA POR LC-ESI-QTOF-MS

RESUMO

As frutas nativas brasileiras possuem um valor inestimável não só pela preservação ambiental, mas também por serem ricas em substâncias bioativas que podem promover benefícios para a saúde. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de compostos fenólicos de cinco frutas com alta capacidade sequestrante de radicais livres e expressiva atividade anti-inflamatória por espectrometria de massas de alta resolução. As frutas nativas avaliadas foram o araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Bysonima arthropoda*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*) e cajá (*Spondias mombin* L.). Os extratos etanólicos (80% v/v) das polpas foram analisados quanto à desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e atividade anti-inflamatória *in vitro* por meio do ensaio de ativação do fator nuclear – κ B (NF- κ B). O perfil fenólico foi determinado por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS). O cambuí-cipó foi a fruta mais ativa para desativar os radicais $O_2^{\bullet-}$ (EC_{50} 68,33 μ g mL⁻¹) e o $NO^{\bullet}$ (EC_{50} 0,78 μ g mL⁻¹). No que se diz respeito à desativação do HOCl, o cambuí-cipó e o murici vermelho foram os mais bioativos (EC_{50} 4,99 e 4,41 μ g mL⁻¹, respectivamente). Os extratos de murici-vermelho, cambuí-cipó e morango silvestre inibiram significativamente a ativação do NF- κ B. As frutas nativas estudadas apresentaram um perfil fenólico diversificado, sendo identificados compostos das classes dos ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, antocianinas, estilbenos e elagitânicos. Foram identificados 18 compostos fenólicos no araçá-boi, 32 no cambuí-cipó, 26 no murici vermelho e 20 e 11 compostos no morango silvestre e cajá, respectivamente. A análise de massas de alta resolução também revelou a presença de compostos fenólicos nunca antes relatados nessas espécies. Os resultados da atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória analisados pelos métodos UPGMA e componentes principais (CP) possibilitaram agrupar as frutas em quatro grupos. As frutas nativas estudadas apresentaram elevada capacidade em desativar espécies reativas e significativa atividade anti-inflamatória, bem como uma grande diversidade de compostos bioativos, as quais podem propiciar benefícios importantes para a saúde humana.

Palavras-chave: Frutas nativas; Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; Atividade anti-inflamatória; Compostos fenólicos; LC-ESI-QTOF-MS

ABSTRACT

Brazilian native fruits are invaluable not only for environmental preservation, but also for being rich in bioactive compounds that can promote health benefits. Thus, the objective of this paper was to characterize by high resolution mass spectrometry the phenolic profile of five fruits with high free radicals scavenging capacity and expressive anti-inflammatory activity. The native fruits evaluated were araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Bysonima arthropoda*), morango silvestre (*Rubus rosaefolius*) and cajá (*Spondias mombin* L.). The ethanolic extracts (80% v/v) of the pulps were analyzed by scavenging of reactive oxygen and nitrogen species and *in vitro* anti-inflammatory activity through the nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation assay. The phenolic profile was determined by using the high resolution mass spectrometry (LC-ESI-

QTOF-MS) technique. Cambuití-cipó was the most active on deactivating the radicals $O_2^{\bullet-}$ (EC_{50} 68.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and $NO^{\bullet}$ (EC_{50} 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Concerning HOCl scavenging, cambuití-cipó and murici vermelho expressed the highest activities (EC_{50} 4.99 and 4.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). Murici vermelho, cambuití-cipó and morango silvestre extracts significantly inhibited NF- κ B activation. The native fruits studied showed a diversified phenolic profile, being identified compounds of the classes of hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonoids, anthocyanins, stilbenes and elagitannins. By mass spectrometry analysis, 18 phenolic compounds were identified araçá-boi, as well as 32 in cambuití-cipó, 26 in murici vermelho, 20 in morango silvestre and 11 in cajá. High resolution mass analysis also pointed the presence of phenolic compounds not previously reported in these fruit species. The results of antioxidant and anti-inflammatory activities were analyzed by UPGMA and principal components (PC) methods, where it was possible to separate the fruits into four groups. The native fruits studied presented high antioxidant capacity and significant anti-inflammatory activity, as well as a great diversity of bioactive compounds which can promote important benefits for human health.

Keywords: Native fruits; Reactive oxygen and nitrogen; Anti-inflammatory activity; Phenolic compounds; LC-ESI-QTOF-MS

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, o que em parte é devido a sua vasta extensão territorial. Esta condição também propiciou grande diversidade de frutas nativas, sendo uma fonte inspiradora para a procura de novos alimentos com atividades antioxidante e anti-inflamatória, principalmente porque na atualidade a relação entre nutrição e saúde se tornou um tema de grande interesse mundial (DENARDIN et al., 2015). No entanto, muitas plantas nativas permanecem ainda desconhecidas e raramente são incluídas em dietas, especialmente nas áreas urbanas (MASSARIOLI et al., 2013; DENNY et al., 2014; MELO et al., 2015). O estudo de espécies frutíferas nativas, no que diz respeito à identificação da composição bioativa e atividades biológicas, são desafios a serem superados de forma a se tornarem culturas importantes na cadeia do agronegócio, assim como é o açaí.

Durante o envelhecimento a acumulação de mutações no DNA mitocondrial leva ao mau funcionamento da fosforilação oxidativa, ocorrendo assim desequilíbrio na expressão de enzimas antioxidantes endógenas, o que resulta na superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (WANG et al., 2013). Outro importante mecanismo responsável pela formação de radicais livres é o rolamento e a adesão de leucócitos na parede endotelial. Em condições normais, os leucócitos se movem livremente ao longo da parede endotelial. No entanto, durante a isquemia e inflamação vários tipos de mediadores do endotélio e fatores de complemento podem causar adesão dos leucócitos na parede endotelial, imobilizando e estimulando assim a degranulação do neutrófilo. Como resultado, os oxidantes

e os mediadores inflamatórios são liberados, resultando em ferimento para os tecidos. Tem sido demonstrado que a administração oral de compostos fenólicos pode diminuir o número de leucócitos imobilizados durante a reperusão (NIJVELDT et al., 2001).

De acordo com a literatura os compostos bioativos encontrados em plantas, como compostos fenólicos e carotenoides, podem desativar ERO e ERN, contribuindo assim para a redução do estresse oxidativo nos mais diferentes níveis (CHISTÉ et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Além disso, a ingestão destes compostos está associada à melhoria do sistema imunológico e a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, degenerativas e vários tipos de câncer (LAVECCHIA et al., 2013; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). Dessa forma, é muito importante para o organismo a ingestão contínua de antioxidantes a partir de vegetais e frutas, pois são fontes de compostos fenólicos, vitaminas, minerais e carotenoides.

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de compostos fenólicos por LC--ESI-QTOF-MS de cinco frutas nativas com alta capacidade desativadora de ERO e ERN e expressiva atividade anti-inflamatória, de forma a valorizar estas espécies e estimular estudos futuros nas mais diversas áreas do conhecimento.

3.2.MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras

As frutas nativas araçá-boi (*Eugenia stipitata*), cambuití ou cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*) e morango silvestre (*Rubus rosaefolius*) foram coletadas no Sítio Frutas Raras, localizado na cidade de Campina do Monte Alegre - SP (23° 35'31" S e 48°38'38" W). O cajá (*Spondias mombin* L.) foi coletado na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás - GO (16°06'20" S – 51°17'11" W, altitude de 592 m). Todas as frutas foram coletadas no estágio de maturação pronto para o consumo (Figura 13).

Araçá-boi
(*Eugenia stipitata*)

Cambuití ou Cambuí-cipó
(*Sagerectia elegans*)

Murici vermelho
(*Byrsonima arthropoda*)

Morango Silvestre
(*Rubus rosaefolius*)

Cajá ou Taperebá
(*Spondias mombin* L)

Figura 13. Aspecto visual das frutas coletadas no Sítio Frutas Raras-SP e na Fazenda Gameleira-GO. (Fotos com direitos autorais atribuídos à proponente desta proposta e tiradas com autorização dos proprietários do Sítio Frutas Raras e da Fazenda Gameleira).

3.2.2 Tratamento das amostras

As frutas coletadas no Sítio de Frutas Raras foram transportadas em caixas térmicas até o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ/USP. Na sequência, as amostras do araçá-boi foram higienizadas, despulpadas manualmente e descartadas as sementes e cascas, sendo em seguida congelada a -22 °C. As polpas do cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre foram higienizadas e submetidas diretamente ao congelamento a -22°C, sem a necessidade de despulpamento, pois as mesmas apresentavam sementes muito pequenas. As frutas do cajá, colhidas em Goiás, foram despulpadas no Laboratório de Frutas e Hortaliças – IFGoiano-Campus Rio Verde-GO, com auxílio de uma despulpadeira elétrica (Itametal, 025 DF A8, Itabuna, Brasil) e, então polpa foi congelada. Após o congelamentos, todas as polpas foram liofilizadas, moídas em moinho de alta velocidade (IKA A11 basic, Werke Gmbh & Co. KG) (Figura 14) e, na sequência, armazenadas a -80 °C.

Araçá-boi
(*Eugenia stipitata*)

Cambuití ou Cambuí-cipó
(*Sagerectia elegans*)

Murici vermelho
(*Byrsonima arthropoda*)

Morango Silvestre
(*Rubus rosaefolius*)

Cajá ou Taperebá
(*Spondias mombin* L)

Figura 14. Aspecto visual das polpas das frutas após o processo de liofilização.

3.2.3 Preparo dos extratos

As polpas liofilizadas e moídas, obtidas de acordo com o item 3.2.2, foram utilizadas para o preparo dos extratos. Os extratos foram preparados em triplicata, conforme descrito por Bloor (2001). Para isso, foram adicionados 10 mL de etanol 80% (v/v) a 1,0 g do material liofilizado. A extração foi conduzida em banho de ultrassom (180 W), por 30 minutos, sob vibração constante e temperatura de 25 °C. Em seguida foi realizada a centrifugação a 5.000 x g, durante 15 minutos, com posterior filtração. O sobrenadante recuperado foi liofilizado e denominado de extrato bruto, o qual utilizado nas análises subsequentes.

3.2.4 Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As análises das ERO e ERN foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Chisté et al. (2011) e Melo et al. (2015), utilizando uma leitora de microplacas Spectra-Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4.1 Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical foi gerado pelo sistema NADH/PMS (metassulfato de fenazina) e a capacidade do sequestro do $O_2^{\bullet-}$ foi determinada monitorando-se o efeito dos extratos na redução do NBT (tetrazólio nitroazul) para diformazana. O monitoramento foi realizado a 560 nm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio reacional foi formado por NADH (166 μ M), NBT (43 μ M), extratos e PMS (2,7 μ M), sendo o volume final de 300 μ L. As soluções de NADH, NBT e PMS foram preparadas utilizando tampão fosfato 19 mM, pH 7,4. Os resultados foram expressos em EC_{50} .

3.2.4.2. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do HOCl foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos sobre a oxidação do DHR (dihidrorodamina 123) para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso foi preparado por meio do ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% pH 6,2, com adição da solução de H_2SO_4 10%. O meio reacional continha tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, extratos, DHR (5 μ M) e HOCl (5 μ M), num volume final de 300 μ L. O ensaio foi conduzido a 37 °C em uma leitora de microplacas, sendo a fluorescência medida no comprimento de emissão de 528 ± 20 nm e de excitação de 485 ± 20 nm. Os resultados foram expressos em EC_{50} .

3.2.4.3 Sequestro do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)

A capacidade de sequestro do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) pelos extratos foi determinada utilizando a diaminofluoresceína-2 (DAF-2) como sonda fluorescente. O método utilizado foi o descrito por Czerwińska, Kiss e Naruszewicz (2012), com algumas modificações. Na presença de oxigênio, a DAF-2 pode capturar o $NO^{\bullet}$ gerado pelo nitroprussiato de sódio

diidratado (SNP), resultando em sua forma triazólica (DAF-2T). Para preparo dos reagentes e diluições das amostras foi utilizado o tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). O meio reacional foi formado pela adição de 50 μ L dos extratos em diferentes concentrações, 50 μ L de SNP (10 mM), 50 μ L de DAF-2 (12,5 μ M) e 50 μ L de tampão fosfato de potássio. O monitoramento da fluorescência foi realizado espectrofotometricamente a cada 5 minutos, durante 2 horas, nos comprimentos de excitação de 495 nm e emissão de 515 nm. Os resultados foram expressos como EC₅₀.

3.2.5. Atividade anti-inflamatória

3.2.5.1 Cultura celular

Macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram cultivados em meio de cultura RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U mL⁻¹), estreptomicina e L-glutamina (100 μ g mL⁻¹). As garrafas de cultura contendo as células foram inseridas em estufas a 37 °C e 5% de CO₂, onde permaneceram até o momento de seu uso.

3.2.5.2 Avaliação da ativação de NF-kappa B (NF- κ B).

Macrófagos RAW 264.7 transfectados com gene NF- κ BpLUC foram semeados (3 $\times$ 10⁵ cel/poço) por 24 h em placas de 24 poços e incubadas *overnight* (37 °C, 5% CO₂). As células receberam extratos de cajá, murici-vermelho, arará-boi, cambuiti cipó e morango silvestre nas concentrações de 20 e 200 μ g mL⁻¹ por 30 minutos, antes da estimulação com LPS (lipoproteínas) (100 ng mL⁻¹) por 4 h. O grupo controle negativo recebeu solução salina 0,9 % (veículo). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado, e as células lisadas com tampão de lise (TNT) e alíquotas da suspensão (10 μ L) foram adicionadas a 25 μ L do reagente para o ensaio da luciferase contendo luciferina (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A quantificação da luminescência foi realizada usando leitora de microplaca para luminescência (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) (COOPER et al., 2010).

3.2.6. Caracterização da composição fenólica das frutas nativas por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)

3.2.6.1 Purificação das amostras

Previamente a injeção das amostras no espectrômetro de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS), os extratos foram purificados pela técnica de extração em fase sólida (SPE) para a remoção de açúcares e interferentes. Esta técnica tem sido muito utilizada, porque é rápida, eficiente, e requer pequenos volumes de amostras e solventes. Cartuchos de SPE LC-18 (2 g, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foram condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Subsequentemente, 500 mg de extrato etanólico de cada fruta foi novamente redissolvido em água até o volume original (5 mL), e então centrifugado a 5.000 x g durante 15 minutos. Na sequência foi feita a filtração e o pH ajustado para 2,0 com uma solução de HCl 5M. Em seguida, alíquotas de 5 mL foram adicionados aos respectivos cartuchos já condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Após a eluição da amostra pela coluna foi feita a lavagem com água ácida suficiente para remover os açúcares e outros interferentes. Os compostos de interesse foram eluídos com metanol, e coletados em tubo de falcon de 15 mL. Em seguida foi feita a evaporação sob pressão reduzida, obtendo assim um extrato sem açúcares e interferentes. Estes extratos foram secos com N₂, acondicionados em *vials* e armazenados a -22 °C até o momento das análises.

3.2.6.2 Injeção e análise dos compostos fenólicos

A análise por cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Co., Tokyo) equipado com uma bomba quaternária LC-30AD, detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-20 A e um auto-injetor SIL-30AC. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Phenomenex Luna C18 (4.6 x 250 mm x 5 µm).

O espectrômetro de massas de alta resolução MAXIS 3G – Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) estava equipado com uma fonte de ionização por eletro nebulização (ESI), operando em modo negativo para as cinco espécies frutíferas e em modo positivo para as espécies cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre (para melhor identificação de antocianinas), com uma resolução de 30.000 a 400 m/z. As condições de operação foram: Nebulizador: 2 Bar, Dry gas: 8 L/min, Temp: 200 °C, HV: 4500 V.

Para o modo negativo a fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido fórmico 0,25% e (B) acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,25% e água 19,75%. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹ e o gradiente foi iniciado em 10% do solvente B, passando a 20% de B em 10 minutos, 30% de B aos 20 minutos, 50% de B aos 30 minutos, 50% de B aos 32 min, 90% de B aos 38 min, retomando novamente a 10% de B aos 45 minutos e finalizando a corrida aos 55 minutos.

Para o modo positivo foi utilizado como fase móvel água/ácido fórmico (0,2%, v/v) (A) e metanol (100%) (B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do B, passando a 60% de B em 20 minutos, 100% de B em 25 minutos, 5% de B em 38 minutos, permanecendo nesta concentração de B até 48 minutos.

Antes das análises foi realizada uma calibração externa para verificar a precisão das massas acuradas. A análise dos dados foi realizada utilizando o software MAXIS 3G – Bruker Daltonics 4.3. A identificação dos compostos foi feita por comparação das massas exatas, espectro de massas MS/MS e fórmulas moleculares encontradas com as disponíveis na literatura.

3.2.7. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação das médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os resultados da atividade antioxidante foi ainda feita a Correlação de Pearson.

Os dados obtidos da atividade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos das cinco frutas foram também submetidos a análise de multivariada. Para a análise de agrupamentos foram adotados métodos hierárquicos (Método do grupo de pares não ponderados com a média aritmética, UPGMA) e métodos não hierárquicos (componente principal, CP). Para análise de UPGMA, as médias das atividades antioxidantes (ânion superóxido, ânion hipocloroso e óxido nítrico) e as médias da atividade anti-inflamatória para peritonite e NF- κ B (20 e 200 μ g mL⁻¹) foram utilizadas para obtenção de uma matriz de dissimilaridade, por meio da distância euclidiana média.

Os CPs foram estimados por meio da transformação de dados originais em um conjunto com dimensão equivalente de dados não correlacionados. As pontuações correspondentes aos CPs foram calculadas a partir da matriz de correlação. Os dois primeiros

pontos do CP foram utilizados para agrupar as espécies frutíferas em gráficos de dispersão. As análises de clusters foram realizadas no software Statistica, versão 7.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A atividade antioxidante para o sequestro do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) está apresentada na Tabela 20.

Tabela 20. Atividade antioxidante (médias + DP, n=3) de frutas nativas brasileiras pelos métodos do sequestro do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$).

Espécies frutíferas	$O_2^{\bullet-}$	HOCl	$NO^{\bullet}$
	EC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Araçá-boi	758,13±18,3 ^b	14,64±3,07 ^b	6,95±0,81 ^c
Cambuití-cipó	68,33±7,06 ^e	4,99±0,63 ^c	0,78±0,13 ^d
Murici vermelho	161,40±17,31 ^d	4,41±0,08 ^c	4,80±0,70 ^c
Morango silvestre	257,70±1,08 ^c	31,11±0,9 ^a	10,89±0,42 ^b
Cajá	1.447,94±37,06 ^a	13,68±0,63 ^b	32,21±2,21 ^a

TE= equivalente de trolox; EC₅₀ = quantidade de amostra necessária para desativar 50% da espécie reativa; Letras iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Em relação ao sequestro do ânion superóxido o EC₅₀ (quantidade de amostra necessária para desativar 50% da espécie reativa), esta variou de 68,33 a 1.447,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O cambuití-cipó apresentou a maior capacidade de desativação do ânion superóxido, diferindo das demais frutas nativas avaliadas (p<0,05) (Tabela 20). Em ordem decrescente de sequestro do radical superóxido, as frutas estudadas apresentaram a seguinte classificação: cambuití-cipó>murici vermelho>morango silvestre>araçá-boi>cajá. De fato, o cajá apresentou 21 vezes menor atividade antioxidante em relação ao cambuití-cipó.

Berto et al. (2015) avaliaram a capacidade de sequestro de espécies reativas em polpas, cascas e sementes de *Quararibea cordata*, fruta nativa da região amazônica. Para o sequestro do ânion superóxido foi encontrado um valor de EC₅₀ para a polpa de 18,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando assim maior atividade antioxidante do que o extrato da polpa de cambuití-cipó (68,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, o cambuití-cipó apresentou maior atividade em relação a cascas

de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum*) ($84 \mu\text{g mL}^{-1}$) (RIBEIRO et al., 2014). Já para polpas de frutas do gênero *Eugenia*, mesmo gênero que o araçá-boi, Infante et al. (2016) encontraram valores que variaram de $2.150\text{-}2.670 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a *Eugenia involucrata* não apresentou atividade. Portanto várias das frutas nativas analisadas, com destaque para o cambuití-cipó e o murici vermelho, mostraram elevada capacidade para desativar o ânion superóxido

Quando comparado as frutas com padrões, o cambuití-cipó ($\text{EC}_{50} 68,33 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou capacidade antioxidante para o sequestro do ânion superóxido maior à exibida para o Trolox ($\text{EC}_{50} 134 \mu\text{g mL}^{-1}$) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013), o qual é um análogo sintético da vitamina E. Chisté et al. (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos com solventes de diferentes polaridades para a extração de compostos bioativos de piquiá (*Caryocar villosum*), fruta nativa da região da Amazônia, e não encontraram atividade para sequestro do $\text{O}_2^{\bullet-}$, entretanto os padrões de ácido gálico, ácido elágico e quercetina, apresentaram EC_{50} de 13, 19 e $14 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Portanto em comparação com os padrões citados anteriormente, as frutas nativas analisadas neste trabalho apresentaram menor atividade antioxidante (Tabela 20). De qualquer forma, quando a comparação é feita com padrões, deve-se considerar que são substâncias puras, diferente dos extratos brutos.

Outra ERO importante a ser considerada nas implicações do estresse oxidativo é o HOCl, o qual está associado a uma série de patologias como a aterosclerose, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, esclerose e vários tipos de câncer (MALLE et al., 2006; HO et al., 2013). Em relação à desativação dessa ERO, pode-se observar que as frutas cambuití-cipó e murici vermelho apresentaram as maiores atividades, ou seja, os menores valores de EC_{50} ($4,99$ e $4,41 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). A fruta com a menor capacidade de desativação do HOCl foi o morango silvestre, apresentando um EC_{50} de $31,11 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que é sete vezes menor sua capacidade de sequestro frente ao HOCl em relação ao murici vermelho (Tabela 20).

O cambuití-cipó e o murici vermelho foram mais ativos em desativar o HOCl do que os extratos da fruta *Pedilanthus tithymaloides* ($\text{EC}_{50} 113 \mu\text{g mL}^{-1}$) (ABREU et al., 2006), polpa de *C. villosum* ($\text{EC}_{50} 199 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CHISTÉ et al., 2012), *Cytisus scoparius* ($\text{EC}_{50} 58 \mu\text{g mL}^{-1}$) (GONZÁLEZ et al., 2013), casca de *P. cattleianum* (aráçá vermelho) ($\text{EC}_{50} 32 \mu\text{g mL}^{-1}$) (RIBEIRO et al., 2014), polpa da fruta amazônica *Quararibea Cordata* ($\text{EC}_{50} 4,88 \mu\text{g mL}^{-1}$) (BERTO et al. 2015), sendo este último semelhante ao cambuití-cipó ($\text{EC}_{50} 4,99 \mu\text{g mL}^{-1}$). Já em relação a padrões o cambuití-cipó e o murici vermelho também foram mais

ativos em desativar o HOCl em relação ao 5-ácido cafeoilquínico (EC_{50} 56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Trolox (EC_{50} 134 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RODRIGUES et al., 2013). No entanto, os extratos das frutas analisadas neste trabalho foram menos eficazes em desativar essa ERO quando comparado com o extrato de urucum (*Bixa orellana* L) (EC_{50} 0,3-1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (CHISTÉ et al., 2011).

A reatividade das ERN podem ter efeitos profundos na atividade biológica de várias moléculas. Quando presente em baixas concentrações, o óxido nítrico é essencial para muitos processos fisiológicos. No entanto, taxas elevadas podem desencadear efeitos nocivos, como condições inflamatórias graves e citotoxicidade (BERTO et al., 2015). No que diz respeito ao sequestro da espécie reativa de nitrogênio ($\text{NO}\bullet$), o cambuití-cipó foi o mais eficaz em desativar esse radical (EC_{50} 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Tabela 20). De acordo com a literatura, extratos de polpa e demais partes de frutas nativas têm mostrado capacidade para a desativação do $\text{NO}\bullet$. Por exemplo, polpa e casca de *Quararibea cordata* apresentaram valores de EC_{50} de 369 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 230 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (BERTO et al. 2015), sementes de *Sesamun indicum* de 98-238 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (VISAVADIYA; SONI E DALWADI; 2009), polpa de *C. villosum* de 82-142 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CHISTÉ et al., 2012) e *Vismia cauliflora* de 3,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RIBEIRO et al., 2015), sendo todas essas frutas nativas citadas acima forma menos eficazes que as frutas analisadas neste trabalho, exceto a *Vismia cauliflora* foi semelhante ao encontrado para o murici vermelho (EC_{50} 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 20).

Outros resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho, podemos citar o arará-boi (6,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o murici vermelho (4,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram capacidades de desativação do $\text{NO}\bullet$ semelhante a do *Psidium cattleianum* (2,2-6,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RIBEIRO et al., 2014), café (3,07-5,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ácido *p*-cumárico (4,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ácido 5-cafeoilquínico (7,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RODRIGUES; BENASSI.; BRAGAGNO, 2014), enquanto que a atividade do cambuití-cipó (EC_{50} 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi similar à do ácido caféico (0,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RODRIGUES; BENASSI.; BRAGAGNO, 2014), quercetina (0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (BERTO et al., 2015) e ácido gálico (0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RIBEIRO et al., 2015).

A fruta que apresentou a maior capacidade de sequestro para os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{NO}\bullet$ foi o cambuití-cipó e para o sequestro de HOCl foi o cambuití-cipó e murici vermelho (não diferiram estatisticamente). Dessa forma, comprova a importância de se avaliar extratos de produtos naturais por diferentes métodos, uma vez que os compostos bioativos podem variar quali/quantitativamente e, portanto, possuírem ações diferentes frente à desativação dos diferentes radicais livres.

Assim, as frutas nativas estudadas possuem grande capacidade para a desativação de ERO e ERN, e portanto, podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos tanto para o consumo *in natura* quanto para o uso pelas indústrias de alimentos e farmacêutica.

3.3.2 Correlação entre as respostas antioxidantes

Com o intuito de verificar a existência de correlação entre os métodos de avaliação da atividade utilizados no presente trabalho, foi aplicado o teste de Pearson (Tabela 21).

Tabela 21. Correlação entre as respostas antioxidantes obtidas por diferentes métodos.

Métodos	NO•	HOCl
O ₂ ^{•-}	0,90	0,12
HOCl	0,26	

De acordo com o coeficiente de Pearson, o ânion superóxido x óxido nítrico (NO•) apresentou forte correlação, ou seja, próximas de 1. As demais correlações foram fracas, ou seja, $0,1 \leq r \leq 0,5$. A baixa correlação entre HOCl x NO• também foi observada por Rodrigues et al. (2014) ($r = -0,01$), mesmo comportamento observado no presente trabalho ($r = 0,26$).

Esta correlação diversificada entre as espécies reativas provavelmente está relacionado as diferentes propriedades químicas das espécies reativas. Esses resultados reforçam a ideia de que a capacidade antioxidante de uma matriz específica deve ser avaliado contra diferentes ROS e RNS, permitindo o conhecimento do perfil completo da capacidade antioxidante.

3.3.3. Atividade anti-inflamatória

3.3.3.1. Avaliação da ativação do fator NF-κB.

De acordo com o capítulo 2, foi possível identificar que a administração oral dos extratos de cajá, murici vermelho, araçá-boi, cambuití-cipó e morango silvestre reduziram o influxo de neutrófilos em 55%, 46%, 55%, 43% e 42%, respectivamente (Figura 7). Assim, foi investigada a ação dos extratos das frutas nativas sobre a ativação do fator de transcrição

NF- κ B (Figura 15). De acordo com os resultados foi verificado que os extratos de murici vermelho (B), cambuití-cipó (D) e morango silvestre (E) na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, reduziram em 27%, 23% e 39%, respectivamente, a ativação de NF- κ B, comparado ao grupo desafiado somente com LPS ($p < 0,05$). Na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, somente o extrato de morango silvestre reduziu (24%) a ativação do NF- κ B. Os extratos de cajá e araçá-boi não mostraram atividade sobre o NF- κ B.

Figura 15. Atividade de frutas nativas brasileiras sobre a ativação do NF- κ B *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 transfectados foram tratadas com extratos de Cajá (CJ) (A), Murici vermelho (MV) (B), Araçá-Boi (AB) (C), Cambuití-cipó (CC) (D) e Morango Silvestre (MS) (E) a 20 e 200 $\mu\text{g / mL}$ ou meio de cultura (M), 30 min antes da estimulação com LPS (-) na concentração de 100 ng mL^{-1} . A ativação de NF- κ B foi quantificada após 4 h de desafio com LPS. Os dados são expressos como a média $\pm$ DP, com $n = 4$ por grupo. Símbolos diferentes ou ausentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

O processo inflamatório pode ser iniciado por injúrias físicas, químicas e/ou microbiológicas, bem como pelo contato por bactérias, fungos, vírus, entre outros. Durante a inflamação diversas células como os neutrófilos e macrófagos, estão envolvidos a fim de combater a injúria (PARIHAR; EUBANK; DOSEFF, 2010). Macrófagos residentes teciduais, uma vez ativados, liberam proteínas chamadas de citocinas que sinalizam para células endoteliais expressarem moléculas de rolamento (selectinas) e adesão (integrinas), com o

objetivo de recrutar os neutrófilos circulantes. Uma vez recrutados, os neutrófilos caminham (diapedese) ao foco inflamatório, onde liberam ERO como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) e radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) (MARTIN; SHEATS; JONES, 2017). No presente estudo foi verificado que os animais que receberam os extratos das cinco frutas nativas apresentaram reduções do influxo de neutrófilos para o foco inflamatório, atuando assim como anti-inflamatório. A redução do recrutamento de neutrófilos pode estar relacionada com diversas vias de sinalização intracelulares, o que inclui o fator de transcrição nuclear- κB .

Os macrófagos são importantes células do sistema imune, e ao fagocitarem os agentes agressores também liberam ERO aumentando, portanto, a oferta de espécies reativas no interior e exterior da célula (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007). No interior do macrófago, as ERO podem estimular uma importante via de sinalização intracelular que é o NF- κB . A ativação desse fator, que é sensível à ERO, é o gatilho para o aumento da expressão de genes relacionados com a inflamação, acarretando ao final, aumento da produção de proteínas pró-inflamatórias (THULASINGAM et al., 2011). Neste estudo foi observado que as células que foram tratadas com os extratos de murici-vermelho, cambuiti-cipó e morango silvestre apresentaram reduções significativas da ativação do fator NF- κB para $20 \mu g mL^{-1}$, somente para o morango as reduções foram significativas da ativação do fator NF- κB para 20 e $200 \mu g mL^{-1}$ (Figura 15).

Em estudo recente foi verificado que o araçá-piranga (*Eugenia leitonii*) apresentou forte atividade anti-inflamatória, sendo o seu mecanismo de ação relacionado com a inibição do NF- κB . Nesse mesmo estudo foram identificadas no extrato a delfinidina e a quercetina, sugerindo, portanto, uma relação destas substâncias fenólicas com a atividade anti-inflamatória do extrato de araçá-piranga (LAZARINI et al., 2016). Em outro estudo com goiaba (*Psidium guajava*) também foi verificado inibição da migração de neutrófilos em camundongos, sendo a sua atividade relacionada com a presença dos flavonoides quercetina e epicatequina (DENNY et al., 2013). A apigenina, um dos compostos identificado nos extratos de cambuiti-cipó e morango silvestre, demonstrou em estudos da literatura atividade na diminuição da ativação do NF- κB e redução do influxo de neutrófilos no lavado pulmonar em modelo *in vivo* (SHUKLA et al., 2015; CARDENAS et al., 2016).

3.3.4. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)

As frutas nativas foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução no modo negativo, para a identificação dos compostos fenólicos e, no modo positivo, para a identificação das antocianinas.

As Tabelas 22-26 apresentam os compostos identificados, com os respectivos espectros de massa, nos extratos das 5 frutas nativas. Na amostra do araçá-boi foram identificados 18 compostos, no cambuití-cipó 32, no murici vermelho 26 compostos e no morango silvestre e cajá, 20 e 11 compostos, respectivamente. Desse total, alguns compostos apresentaram isômeros, aparecendo desta forma mais de uma vez no cromatograma.

Os compostos foram identificados de forma tentativa, ou seja, por meio das massas exatas, espectros MS/MS e fórmula molecular por comparação com a literatura (MA et al., 2014; ABU-REIDAH et al., 2015; BASKARAN; PULLENCHERI; SOMASUNDARAM, 2016; HERAS et al., 2016; KELEBEK et al., 2016; MELO et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; YASIR et al., 2016). Foram identificados compostos das classes dos ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, antocianinas, estilbenos e elagitaninos.

3.3.4.1. Ácidos hidroxibenzóicos e derivados

Apenas um ácido hidroxibenzóico foi identificado nas amostras analisadas, encontrando-se no extrato de cambuití-cipó. O metil galato (m/z 184,0370) foi confirmado pela perda do grupo de metil $[M-H-15]^-$ e perda subsequente de CO_2 (Tabela 23). Essa é a primeira vez que é identificado metil galato no cambuití-cipó.

3.3.4.2. Ácidos hidroxicinâmicos e derivados

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura C6-C3 com uma ligação dupla na cadeia lateral em configuração *cis* ou *trans* (HERAS et al., 2016). Dezesesseis ácidos hidroxicinâmicos foram identificados nas amostras de araçá-boi, murici vermelho, morango silvestre e cajá. No araçá-boi foi identificado o ácido cafeico hexosídeo e seu derivado, além do ácido sinápico hexosídeo (Tabela 22). Já no murici vermelho foram identificados dois isômeros do ácido cumárico (Tabela 24). No morango silvestre foi encontrado o ácido cafeico

hexosídeo e seu derivado, o ácido cumárico e seu derivado e dois isômeros do ácido cumárico hexosídeo e seus derivados (Tabela 25). No cajá foi verificado a presença de dois isômeros do ácido cafeico, o ácido cafeico hexosídeo e o ácido cumárico hexosídeo (Tabela 26).

A análise dos espectros de massas possibilitou a identificação do ácido cafeico (m/z 179,0560 $[M-H]^-$) e ácido cumárico (m/z 165,0558 $[M-H]^+$) devido à perda característica do íon $[M-H-44]^-$ (HERAS et al., 2016). Foi encontrado também o ácido cafeico hexosídeo (m/z 341,1095) e seu derivado (m/z 387,1115 [m/z 341,1095 + 46]), além dos fragmentos MS^2 de m/z 179, que corresponde ao ácido cafeico. Da mesma forma, o ácido cumárico hexosídeo (m/z 325,0938) e seus derivados (m/z 371,0992 $[M-H]^-$ [m/z 325,0938+46]) e (m/z 344,1348 $[2M-H]^+ +14$) apresentaram fragmentos MS^2 de m/z 163, o que corresponde ao ácido cumárico. Além disso, foi identificado o ácido sinápico hexosídeo (m/z 385,1868), o qual apresentou a perda de 162 unidades, indicando assim se tratar de uma molécula de açúcar $[M-H-162]^-$.

Todos os ácidos hidroxicinâmicos identificados neste trabalho foram relatados pela primeira vez no araçá-boi (*Eugenia stipitata*), murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*) e cajá (*Spondias mombin*), exceto no morango silvestre (*Rubus rosaefolius*), onde já havia sido identificado o ácido cumárico e o ácido cafeico (CAMPBELL et al., 2017). No que se diz respeito ao gênero dessas frutas, o ácido cafeico, ácido cumárico e o ácido sinápico já foram identificados em frutas do gênero *Eugenia* (INFANTE et al., 2016, SILVA et al., 2014), ácido sinápico e ácido cumárico no gênero *Spondias* (DUTRA et al., 2017; SATPATHY et al., 2011; BATAGLION et al., 2015) e o ácido cumárico no gênero *Byrsonima* (SAMPAIO et al., 2015).

Porém esta é a primeira vez que se relata a presença do ácido sinápico hexosídeo e o derivado do ácido caféico (m/z 387,1115) no gênero *Eugenia*; ácido caféico, ácido caféico hexosídeo e ácido cumárico hexosídeo no gênero *Spondias* e ácido caféico hexosídeo e derivado, ácido cumárico hexosídeo e derivado no gênero *Rubus*. Entretanto, todos os ácidos hidroxicinâmicos aqui encontrados já foram identificados em caqui (HERAS et al., 2016) e fruta do conde (DE SOUZA et al., 2016).

3.3.4.3. Flavonoides

Os flavonoides são uma grande família de compostos com uma estrutura química de um esqueleto de 15 carbonos, que consiste em dois anéis fenóis (A e B) e um anel heterocíclico (C). Esta estrutura de carbono pode ser abreviada como C6-C3-C6. Os flavonoides podem ser classificados em antocianidinas, chalconas, flavanois, flavanonas,

flavonas, flavonóis e isoflavonas. Muitos efeitos biológicos e benefícios para a saúde têm sido associados ao consumo de flavonoides como, por exemplo, menor risco de câncer (GROSSO et al., 2016), menor prevalência de diabetes tipo 2 (WEDICK et al., 2012) e efeitos vasodilatadores, entre outros (PEREZ et al., 2014).

3.3.4.3.1 Flavanois e derivados

Vinte e três flavanois foram identificados por meio da análise dos espectros de massas. Dentre esses flavanois, nove são proantocianidinas e um dímero de prodelfinidina (m/z 591,1374). Em relação as proantocianidinas, nenhuma foi encontrada no morango silvestre, araçá-boi e cajá. No entanto seis dímeros de procianidinas foram identificados, sendo uma no cambuí-cipó (m/z 577,1480) e as demais no murici vermelho (577,1353; 577,1339 $[M-H]^-$; 579,1480; 579,1190; 579,1540 $[M-H]^+$), além de uma trimérica (865,1978), uma tetrâmica (1153,2587) e um dímero monogalato (m/z 729,1440) (Tabelas 23-24). Todas essas proantocianidinas compartilham a perda do íon $C_{15}H_{12}O_6^{2-}$ $[M-H-289]^-$ que corresponde a uma molécula de catequina (BASKARAN; PULLENCHERI; SOMASUNDARAM, 2016), característica da classe das proantocianidinas, as quais consistem em subunidades de catequina e epicatequina (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015).

Os espectros de MS^2 resultantes do íon m/z 577 mostraram fragmentos m/z 451, 425, 407 e 289, representando diferentes formas isoméricas de variação no posicionamento das unidades flavan-3-ol monoméricas após a fissão de retro-Diels-Alder (SASOT et al., 2017). O fragmento em m/z 451 ($M-H-126$) pode ser devido a clivagens entre C4-C5 e O-C2 de um anel de pirano, o que leva a perda do anel 'A'. O fragmento m/z a 289 ($M-H-289$) foi formado a partir da quebra da ligação C-C entre duas unidades de catequina.

Também foram identificadas a catequina (m/z 289,0927) e a epicatequina (m/z 289,0725), isômeros que são caracterizados por apresentar o íon molecular $[M-H-289]^-$ ou $[M-H-291]^+$, nas frutas araçá-boi, murici vermelho e morango silvestre. Esses compostos são estereoisômeros, pois possuem os mesmos fragmentos, sendo que a espectrometria de massa não pode distinguir estereoisômeros. Os fragmentos de MS^2 correspondentes a m/z 245, m/z 205 e m/z 179 também indicam que o composto identificado é uma catequina/epicatequina (MELO et al., 2016; REGUEIRO et al., 2014). Derivados de catequina e epicatequina (579,1511 $[2M-H]^-$; 581,1632 $[2M-H]^+$) também foram identificados na amostra murici vermelho.

O íon m/z 245 pode ser devido à perda do grupo de CO_2 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$, que corresponde a decarboxilação ou a perda do grupo CH_2CHOH^- (BASKARAN; PULLENCHERI; SOMASUNDARAM, 2016).

Outro flavanol identificado no araçá-boi e murici vermelho foi a epicatequina-3-*O*-galato (m/z 441,0815), justamente por apresentar os fragmentos MS/MS de 169 e 289, característico de um ácido gálico e a quebra de uma ligação éster, respectivamente (SASOT et al., 2017).

A prodelfinidina identificada no morango silvestre é pela primeira vez relatada nessa espécie e no seu gênero (*Rubus*). Já as procianidinas identificadas no cambuí-cipó (*Sagerectia elegans*) e murici vermelho (*Byrsonima arthropoda*) são pela primeira vez encontradas no gênero *Sagerectia*, exceto para o gênero *Byrsonima*, onde já haviam sido identificadas (SANNOMIYA et al., 2005). Também é a primeira vez que se relata a catequina na espécie araçá-boi, catequina e epicatequina e seus derivados no murici vermelho (SAMPAIO et al., 2015) e no morango silvestre (HASSIMOTTO et al., 2008; JAKOBEK et al., 2009; CAMPBELL et al., 2017). A epicatequina-3-*O*-gallato foi identificada pela primeira vez no araçá-boi, e no seu gênero *Eugenia*, além do murici vermelho.

3.3.4.3.2. Flavonóis e derivados

O exame dos espectros de massa dos cromatogramas permitiu verificar vinte e sete flavonóis, sendo um no araçá-boi, quinze no cambuí-cipó, três no murici vermelho, quatro no morango silvestre e quatro no cajá (Tabelas 22-26).

Foi identificada a quercetina ($\text{M}-\text{H}^-$ 301,0358/ $\text{M}-\text{H}^+$ 303,0506), por apresentar os fragmentos MS/MS de 179 $[\text{M}-\text{H}-151]^-$ / $[\text{M}-\text{H}^+153]^+$, o que corresponde a uma retrociclicização da fração do anel, seguida de uma perda de monóxido de carbono (-28 Da) (DE SOUZA et al., 2016). Também foi encontrada a quercetina-rutosídeo, rutina, (m/z 609,1482), com MS/MS 301, além do íon $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9^{2-}$ $[\text{M}-\text{H}-308]^-$, que correspondente ao rutinosídeo. Já a quercetina-glucuronídeo (m/z 477,0325) foi caracterizada pela perda do glucuronídeo $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6^{2-}$ $[\text{M}-\text{H}-176]^-$. A rutina hidratada (m/z 627,1585), (íon m/z 609 adicionado de uma molécula de água, 18 Da.), também foi identificada.

Ainda foram encontrados cinco compostos derivados do kaempferol, de acordo com o espectro de fragmentação e o fragmento aglicona característico do kaempferol (m/z 285). O kaempferol-3-*O*-rutosídeo (593,1523) apresentou fragmentos m/z 447, o que corresponde a perda da fração raminosídeo (146 Da.), além do fragmento corresponde ao kaempferol (m/z

285), formado pela perda de uma hexose (162 u.m.a.). Já o kaempferol-3-*O*-glucosídeo (m/z 447,0933) apresentou o fragmento m/z 285, consequência da perda de 162 Da (equivalente a uma molécula de hexose) (KELEBEK, 2016).

A quercetina-*O*-glicosilada (m/z 463,0881), a dihidroquercetina glucosídeo (m/z 465,1043) e a miricetina ramnohexosídeo (625,1420) apresentaram o fragmento m/z 301, íon característico após a perda da porção do açúcar [M-H-162]⁻ (LARRAURI et al., 2016). A miricetina ramnohexosídeo (m/z 625,1420) foi identificada pela massa exata e pelo espectro de MS/MS, íons m/z 271 e m/z 316/317, os quais mostraram se tratar de um derivado da miricetina (SILVA et al., 2005).

Todos os flavonóis identificados são relatados pela primeira vez nas espécies de cambuí-cipó, murici-vermelho e araçá-boi. Já no morango silvestre e cajá, exceto quanto a quercetina, os outros flavonóis já foram encontrados nessas espécies por Campbell et al. (2017) e Bataglioni et al. (2015), respectivamente.

Em relação à presença dos flavonóis identificados nos gêneros destas frutas, a dihidroquercetina glucosídeo é pela primeira vez relatada no gênero *Eugenia*, enquanto que a quercetina 3-*O*-rutinosídeo, miricetina ramnohexosídeo, quercetina-*O*-hexosídeo, kaempferol-3-*O*-glucosídeo nunca foram antes encontrados no gênero *Sageretia*. O kaempferol-glucosídeo é pela primeira vez relatado no gênero *Byrsonima*, enquanto que a quercetina-*O*-hexosídeo nunca havia sido antes descrita no gênero *Spondias*.

3.3.4.3.3 Flavanonas e derivados

Em relação aos flavanonas foi identificado o eriodictiol (m/z 287,0564), o qual apresentou os fragmentos m/z 151 e 135, correspondentes as quebras de ^{1,3}A⁻ e ^{1,3}B⁻ das flavanonas (FABRE et al., 2001; ABAD-GARCÍA et al., 2012) (Tabela 23).

Também foi possível a identificação das formas glicosiladas, ou seja, o eriodictiol glucosídeo (m/z 449,1488), caracterizado pela perda de 162 unidades de uma unidade de açúcar, e o eriodictiol-7-*O*-rutosídeo (m/z 595,1683) (Tabelas 22, 23 e 25).

Esta é a primeira vez que é identificado o eriodictiol glucosídeo na espécie de araçá-boi e seu gênero *Eugenia*. Da mesma forma, o eriodictiol, eriodictiol glucosídeo e eriodictiol-7-*O*-rutosídeo nunca haviam sido encontrados no cambuí-cipó e seu gênero *Sageretia*, bem como o eriodictiol glucosídeo no morango silvestre e seu gênero *Rubus*.

3.3.4.3.4 Flavonas

A apigenina glicosilada, apigenina-7-*O*-glicosídeo (m/z 431,0997/433,1136), foram identificadas no cambuití-cipó e morango silvestre (Tabelas 23 e 25). Outro derivado da apigenina, o *O*-deoxi-hexosil-apigenina (m/z 577,1581) também foi encontrado no cambuití-cipó, o qual foi confirmado por apresentar o fragmento MS² m/z 269, característico da apigenina (HERAS et al., 2016) (Tabela 25).

A apigenina-7-*O*-glicosídeo e *O*-deoxy-hexosil-apigenina foram identificadas pela primeira vez na espécie cambuití-cipó e seu gênero *Sagerectia*, assim como a apigenina-7-*O*-glicosídeo no morango silvestre e seu gênero *Rubus*.

3.3.4.3.5 Isoflavonas

Isoflavonas são substâncias denominadas de fitoestrógenos por apresentarem semelhança estrutural aos hormônios estrogênicos femininos, sendo encontrada principalmente na soja. Estruturalmente podem ser consideradas como derivadas da 3-fenilcromana (FRANCISCO; RESURRECCION, 2008; LOU et al., 2004; NEPOTE; GROSSO; UZMAN, 2002; SHIN et al., 2009).

A presença da calicosin-*O*-hexosídeo (m/z 445,1348) foi confirmada pelo espectro de MS², a qual apresentou um íon m/z 283 característico, o que corresponde a perda da fração hexose (162 Da). Este padrão de fragmentação está de acordo com o proposto para o calicosin (YE et al., 2012) (Tabela 29). Essa também é a primeira vez que é identificada essa isoflavona no cajá e seu gênero *Spondias*.

3.3.4.4 Antocianinas

Pelo modo positivo [M-H]⁺ foi possível a identificação no cambuití-cipó das seguintes antocianinas: uma delphinidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaril) glicosídeo (m/z 611,1609), uma cianidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaril) glicosídeos (m/z 595,1661), duas pelargonidina-3-rutinosídeo (m/z 579,1704; m/z 579,1717) e uma delphinidina 3-*O*-glucosídeo (m/z 465,1035). No murici vermelho foi encontrada uma cianidina-3-*O*-glucosídeo (m/z 449,1067), um delphinidina 3-*O*-glucosídeo (m/z 465,1061) e uma delphinidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaril) glicosídeo (m/z 611,1668), enquanto que no morango silvestre não foi identificada nenhuma antocianina, apesar da pigmentação vermelha desta fruta (Tabelas 23, 24 e 25).

As duas delfinidinas monoglicosídeos (m/z 465,1035/465,1061) com MS^2 de 303, e uma cianidina glicosídea (m/z 449,1067) com MS^2 de 287, foram caracterizadas pela perda de uma fração de glicose ($[M + H]^+ - 162$) (LI et al., 2016). Já as antocianinas (*p*-cumaril) glicosídea foram caracterizadas pela perda de 308 unidades de massa, o que corresponde justamente à perda de um grupo *p*-cumaril glucosídeo (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014). A pelargonidina-3-rutinosídeo apresentou o fragmento característico MS^2 de 271, além da perda do íon $C_{12}H_{20}O_9^{2-}$ $[M-H-308]^-$, correspondente ao rutinosídeo.

Essa é a primeira vez que se caracteriza o perfil de antocianinas no cambuití-cipó e murici vermelho. Antocianinas como a kuromanina (cianidina-3-*O*-glucosídeo) e mirtilina (delfinidina-3-*O*-glucosídeo) já foram identificadas em uvas (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014) e em amoras (LI; MENG; LI, 2016), porém nunca haviam sido relatadas nessas espécies de frutas nativas.

As antocianinas são compostos fenólicos de grande importância pela cor vermelha e azul de várias frutas e flores. Muitos estudos também relatam que são responsáveis pela alta capacidade antioxidante em frutas (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014), além de possuírem importantes benefícios para a saúde (WANG et al 2013). Para alguns autores (CHOI et al., 2010), esses compostos possuem maior capacidade antioxidante do que a vitamina C.

Portanto a identificação de antocianinas contribui para elucidação da alta capacidade bioativa presente nessas frutas nativas.

3.3.4.5 Estilbenos

Pela primeira vez é relatada no araçá-boi, bem como no gênero *Eugenia*, a presença de resveratrol (m/z 227,1289) (Tabela 25), cujo espectro de MS^2 apresentou fragmentos de m/z 209 $[M-H-18 (H_2O)]^-$, m/z 185 $[M-H-42(CHCOH)]^-$ e m/z 143 $[M-H-42(CHCOH) - 42 (C_2H_2O)]^-$ característicos desta molécula (BANSODE et al., 2014; MA et al., 2014).

3.3.4.6 Elagitaninos

Os elagitaninos são uma classe diversa de taninos hidrolisáveis. Possuem um ou dois resíduos de hexahidroxidifenoila-D-glicose (HHDP), os quais são produzidos por acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes.

Esses compostos também foram identificados em algumas das frutas nativas. O araçá-boi mostrou a presença de uma telimagrandina II/pterocarianina C (m/z 937,0934) e cinco isômeros de casuarinina/casuarictina (galoil-bis-HHDP-glicose) (m/z 935,0934/467,0368 $[M-2H]^{2-}$) (Tabela 22), as quais apresentaram fragmentos m/z 633 (M-HHDP) e m/z 301 (ácido elágico), característicos da classe destas substâncias (FRACASSETTI, et al., 2013; REGUEIRO et al., 2014). Já no morango silvestre foram identificados três isômeros de casuarinina (Tabela 25).

Tabela 22. Compostos identificados no araçá-boi pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

Compostos	Tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)
Caffeic acid hexoside	2,7	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,2980	341,1095	-1,300	89.0242, 119.0351, 59.0143, 71.0143, 179.35
Caffeic acid hexoside +46	2,7	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	388,3690	387,1151	-1,100	341.1093, 179.0560, 89.0245, 119.0351, 113.0240, 71.0137
Catechin	6,4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2710	289,0927	0,200	245, 205, 179
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	10,8	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	467,0361 [M – 2H] ²⁻	-2,700	633,0732; 300,9989
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	10,9	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	935,0782	1,600	633,0732; 300,9974
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	11,7	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	467,0368[M – 2H] ²⁻	1,500	391,0282; 300,9997
Sinapic acid hexoside	13	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	385,1920	385,1868	-3,2	125.0252, 205.0514, 276.9473, 179.0388, 387.1646, 208.1050
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	16,5	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	467,0365 [M – 2H] ²⁻	-0,300	300.9990, 391.0297, 275.0199
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	16,5	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	935,0790	1,400	300.9992, 633.0719, 275.0193, 229.0139
Dihydroquercetin glucoside	18	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	466,1121	465,1043	-1,400	125.0244, 285.0401, 437.1085, 300.9982, 465.1033, 303.0465
Tellimagrandin II/pterocaryanin C	18	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	938,1012	937,0934	1,700	300.9997, 937.0946, 465.1044, 229.0149
Epicatechin-O-gallate	20,2	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,3760	441,0826	0,300	169,0161
Eriodictyol glucoside	25	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,1160	449,1488	0,600	449.1487, 96.9601
Pinoresinol hexoside	25	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₁	520,1940	519,1866	1,200	357.1339, 122.0376, 449.1469
Abscisic acid I	28,4	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1360	263,1291	-0,500	204.1148, 153.0925, 136.0525, 219.1384
Abscisic acid II	28,6	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1360	263,1291	-0,800	204.1158, 153.0918, 219.1392, 109.0292
Abscisic acid III	28,8	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1360	527,2647 [2M-H] ⁻	0,100	153.0919, 219.1388, 263.1285, 204.1152, 109.0291
Resveratrol	34,4	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,0790	227,1289	0,200	227, 209, 185, 183, 143

Tabela 23. Compostos identificados no cambuití-cipó pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

Compostos	Tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	[M-H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)
Quercetin 3-O-rutinosideo I	3,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5175	609,1482	-	-3,000	300.0285, 271.0254, 609.1425, 301.0336, 483.1137, 343.0455, 315.0517
Rutin (hydrate form) I	3,1	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₇	628,164	593,0000	-	-2,800	175.0052, 475.1458, 301.0361, 627.1576
Quercetin 3-O-rutinosideo II	8,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5175	609,1480	-	-2,800	300.0284, 271.0252, 609.1474, 483.1158, 125.0238, 301.0362, 343.0466
Rutin (hydrate form) II	8,4	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₇	628,1640	627,1584	-	-2,500	475.1468, 301.0362, 175.0042, 627.1562
Rutin (hydrate form) III	9,1	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₇	628,1640	627,1578	-	-1,900	475.1468, 301.0362, 175.0042, 627.1563
B-type procyanidin dimer	9,1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1480	-	-2,500	269.0456, 289.0731, 407.0793, 577.1534
Kaempferol 3-O-rutinoside	9,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,5181	593,1523	-	-2,1	593.1518, 284.0328, 285.0402, 255.0299, 239.0339, 227.0356, 211.0394
Apigenin-7-O-glucoside I	10,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,3810	431,0997	-	-2,800	269.0458, 268.0371, 211.0401, 239.0354
Eriodictyol-7-O-glucoside I	10,8	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,3960	449,1099	-	-2,300	193.0150, 269.0464, 149.0248, 287.0570, 355.0703
O-Deoxyhexose-hexosyl apigenin	11,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	-	577,1581	-	-3,000	269.0462, 239.0352, 167.0465, 283.0615, 281.0460
Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-rutinoside) I	11,4	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596,1740	595,1683	-	-2,600	269.0460, 287.0566, 501.1258, 475.1448, 149.0246, 193.0146, 93.0349
Eriodictyol-7-O-glucoside II	12,7	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,3960	449,1103	-	-2,500	259.0613, 287.0568, 125.0255, 421.1128
Eriodictyol I	12,7	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,2550	287,0564	-	-1,500	257.5208, 154.8541, 212.8633, 552.4001, 38.2185, 134.0361, 64.2575, 151.0052
Delphinidin 3-O-(6-O-p-coumaryl) glucoside	12,8	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	610,1317	-	611,1609	-0,800	303.0510, 229.0501, 1+257.0449, 201.0551, 153.0188, 121.0287, 68.9973
Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl) glucoside	13,9	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594,1327	-	595,1661	-0,700	287.0559, 595.1658
Pelargonidin-3-rutinoside I	14,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,1632	-	579,1704	-2,400	271.0603, 579.1693
Apigenin-7-O-glucoside II	14,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,3810	-	433,1136	-1,100	271.0606, 121.0286, 141.0202, 197.0601
Eriodictyol-7-O-glucoside III	14,5	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,3960	449,1102	-	-2,700	259.0617, 269.0476, 287.0571, 449.1095
Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-rutinoside) II	14,5	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596,1740	595,1678	-	-1,800	269.0459, 287.0567, 501.1266, 595.1667
Pelargonidin-3-rutinoside II	14,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,1632	-	579,1717	-1,200	271.0618, 433.1133, 379.1707
Myricetin rhamno- hexoside	16,5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	-	625,1420	-	-1,500	271.0250, 214.0272, 316.0219, 317.0260, 301.0345
Eriodictyol II	16,5	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,2550	287,0566	-	-1,400	135, 107, 83, 65, 151, 125
Quercetin 3-O-rutinosideo III	19,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5175	609,1475	-	-2,000	271.0253, 300.0276, 301.0362, 255.0290, 243.0276, 151.0033
Quercetin-O-hexoside I	20,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,0895	-	4,600	300.0281, 301.0338, 271.0250, 255.0290
Quercetin-O-hexoside II	20,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	927,1837 [2M-H] ⁻	-	-2,900	463.0885, 300.0281, 301.0338, 271.0250, 255.0290
Quercetin-O-hexoside III	20,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,0892	-	4,600	300.0280, 301.0338, 463.0882, 271.0253
Quercetin-O-hexoside VI	20,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	927,1836 [2M-H] ⁻	-	-2,900	463.0889, 300.0278, 301.0338, 271.0250, 178.9986
Quercetin I	20,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	302,0430	-	303,0506	-1,600	303.0500, 257.0437, 153.0157, 71.0859
Delphinidin 3-O-glucoside	20,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0952	-	465,1035	-1,000	303.0503, 153.0185, 85.0285, 1+229.0496, 1+201.0548, 1+69.0338
Kaempferol-3-O-glucoside	23,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,3769	447,0936	-	-1,200	284.0329, 285.0394, 227.0352, 255.0302, 447.0936
Methyl gallate	25,3	C ₈ H ₈ O ₅	184,0370	-	185,0976	-3,500	185.0974, 163.1146, 123.0805, 61.0111
Quercetin II	30,3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	302,2380	301,0358	-	-1,4	151.0038, 178.9986, 301.0355, 273.0421, 121.0287

Tabela 24. Compostos identificados no murici guassú pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

Compostos	Tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	[M-H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)
B-type procyanidin dimer I	9,4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1353	-	-5,000	289.0717, 407.076, 125.02429, 425.0875
B-type procyanidin tetramer I	9,4	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1.154,269	1153,2587	-	-0,300	577.1348, 407.0773, 289.0717, 125.0244
B-type procyanidin trimer	9,8	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,2050	865,1978	867,2104	-2,200	125.0245, 287.560, 577.1344, 695.1348
B-type procyanidin dimer II	10,4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁	578,1424	-	579,1480	-3,500	127.0393, 191.0363, 247.0603, 287.0553, 409.0918
B-type procyanidin dimer III	10,7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁	578,1424	-	579,1199	-3,500	127.0396, 163.0397, 191.0346, 247.0607, 287.0562, 409.0926, 427.1036
Kaempferol-glucoside	9,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1011	447,0933	-	0,700	284.0328, 255.0288, 211.0406, 285.0370, 227.0316
Catechin I	11,4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290, 2681	289,0723	-	-1,600	109.0291, 203.0710, 245.0817, 289.0722, 179.0342
Catechin derivate	11,4	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	290, 2681	[2M-H] ⁻⁵⁷⁹	-	-4,300	289.0720, 245.0820, 203.0712, 290.0747, 205.0500, 179.0346, 123.0449, 109.0294
Catechin II	12,5	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290, 2681	-	291,0881	-2,5	139.0394, 207.0658
Coumaric acid I	12,5	C ₉ H ₈ O ₃	164,0470	-	165,0558	-4,3	165.0551, 147.0449, 84.9595
B-type procyanidin dimer IV	12,7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1351	579,1540	-4,7	289.0716, 407.0768, 125.0243, 425.0874, 451.1039
B-type procyanidin tetramer II	12,7	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1.154,269	1153,2587	-	-4,600	125.0245, 289.0712, 407.0768, 577.1337, 287.0547
Epicatechin I	12,9	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	289,0725	291,0880	0,800	139.0398, 207.0665, 291.0876
Cyanidin-3-O-glucoside	13,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449,1080	-	449,1067	4,700	287.0562, 137.0239, 213.0555
Epicatechin II	14	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	289,0725	-	0,800	109.0289, 203.0715, 245.0817, 289.0712, 205.0489, 179.0380
Epicatechin derivate I	14	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2682	[2M-H] ⁻⁵⁷⁹	-	-2,800	289.0717, 245.0819, 290.0751, 291.0740, 123.0452, 109.0290, 203.0717, 221.0822,
Epicatechin III	15	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	289,0725	291,0871	1,600	139.0399, 165.0551, 207.0659
Coumaric acid II	15	C ₉ H ₈ O ₃	164,0470	-	165,0544	-2,200	147.0443, 119.0490, 84.9604
Epicathecin derivate II	15	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2682	-	[2M-H] ⁺	-0,200	139.0395, 165.0551, 291.0872, 207.0659
B-type procyanidin dimer V	16,4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1339	-	1,600	289.0714, 125.0245, 407.0772, 425.0892
Procyanidin dimer type B monogalloylate I	16,4	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	-	729,1440	-	2,400	407.0775, 289.0725, 125.0242, 425.0844, 577.1333, 256.0360, 175.0387, 559.0877
Quercetin-O-hexoside I	20,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,0881	-	0,700	300.0273, 243.0300, 227.0334, 271.0291, 255.0293, 301.0339, 108.0206
Epicatechin-O-gallate	20,2	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,3760	441,0815	-	1,500	169.0142, 289.0702, 125.0246, 107.0148
Quercetin-O-hexoside II	20,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,0877	-	1,200	300.0273, 243.0300, 271.0291, 255.0293, 107.0128, 301.0339
Delphinidin 3-o-glucoside	20,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0952	-	465,1081	-0,900	303.0517, 229.0505, 153.0191, 85.0289
Delphinidin 3-o-(6-o-p-coumaryl) glucoside	20,7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	610,1317	-	611,1668	1,00	303.0509, 85.0288, 153.0189, 229.0502

Tabela 25. Compostos identificados no morango silvestre pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

Compostos	Tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	[M-H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)
Caffeic acid hexoside	3,1	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,2980	341,1103	-	-3,300	89.0255, 119.0351, 179.0575, 48.5577
Caffeic acid hexoside +46	3,1	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	388,3690	387,1154	-	-2,300	341.1099, 89.0246, 179.0567, 71.0238, 119.0360, 161.0463
Catechin	10,9	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	290,2681	289,093	-	-2,100	109.0291, 203.0710, 245.0817, 289.0722, 179.0342
Coumaric acid + 14	12,1	C ₉ H ₈ O ₃	164,0470	-	344,1348 [2M-H] ⁺	-2,000	1147.0447, 165.0553, 85.0288
Coumaric acid	12,1	C ₉ H ₈ O ₃	164,0470	-	165,0553	-4,100	147.0446, 165.0554, 119.0498
Coumaric acid-O-hexoside	14,6	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,2986	325,0938	-	-3,100	119.0504, 163.0400, 123.0467, 93.0347
Coumaric acid-O-hexoside +46	14,6	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	372,3696	371,0992	-	-2,5	119.0506, 163.0406, 120.0532, 93.0345
Apigenin-7-O- glucoside	14,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,3810	431,0990	433,115	-3,600	269.0459, 195.0460, 211.0408, 120.0205
Eriodictyol-O-hexoside	14,8	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,3960	449,1106	-	-3,200	193.0146, 269.0460, 287.0562, 149.0247, 355.0681
Epicatechin	15,8	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	289,0725	-	-2,600	289.0712, 203.0725, 123.0458, 205.0520, 161.0601, 382.9817
Coumaric acid-O-hexoside II	15,8	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,2986	325,0935	-	-2,100	145.0294, 117.0350, 163.0418, 127.0390, 101.0246, 71.0498, 119.0347
Quercetin-3-O-glucuronide	17	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	478,0750	477,0325	-	-2,500	300.9998, 477.0311, 302.0099
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	17	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,649	935,0767	-	-3,200	300.9997, 229.0143, 633.0728
Eriodictyol-O-hexoside II	17,3	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,396	449,1102	-	-2,600	269.0458, 287.0561, 449.1087, 125.0247
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	18	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,649	935,0767	-	-3,400	300.9999, 633.0742
Quercetin	25,3	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,2380	300,9988	-	-2,800	300.9995, 229.0164, 257.0106, 273.0059, 172.0163, 145.0293
Kaempferol-3-o-glucoside I	27,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1011	447,0947	-	-3,600	227.0358, 284.0337, 255.0306, 447.0948, 327.0531
Kaempferol-3-o-glucoside II	27,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	448,1011	895,1947 [2M-H] ⁻	-	-0,800	447.0945, 284.0339, 255.0306, 227.0359
Prodelphinidin A-type dimer [(E)C→A→(E)GC]	27,7	-	-	591,1374	-	2,400	255.0305, 285.0412, 227.0357
Di-HHDP-galloyl-glucose (casuarictin/potentillin)	29,4	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936,6490	467,2193 [M -2H] ²⁻	-	0,3	300.9992, 633.0719, 275.0193, 229.0139

Tabela 26. Compostos identificados no cajá pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

Compostos	Tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)
Caffeic acid I	2,7	C ₉ H ₈ O ₄	180,1590	179,056	0,300	179,35
Caffeic acid hexoside	2,7	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,2980	341,1087	-3,000	179,35
Calycosin-o-hexoside	10,5	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446,1210	445,1348	0,400	124.0163, 139.0402, 99.0446, 57.0344, 161.0451, 283.0815, 301.0917, 343.1000
Caffeic acid II	11,4	C ₉ H ₈ O ₄	180,1590	179,0558	1,600	179,35
Coumaric acid-O-hexoside	11,8	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,2986	325,0926	0,800	145.0290, 117.0340, 163.0392, 89.0395
Quercetin-O-hexoside I	19,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,2179	-4,100	321.1552, 465.1427, 303.1493, 331.1778, 71.0140
Quercetin I	20,1	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,2380	300,9988	0,5	300.9988, 229.0133
Quercetin-O-hexoside II	20,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3763	463,0879	0,500	300.0271, 271.0243, 463.0877, 243.0293, 301.0321
Abscisic acid I	28,6	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1360	263,1284	-2,400	204.1148, 153.0921, 219.1388, 122.0374
Abscisic acid II	28,6	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1360	527,2644 [2M-H] ¹⁻	-3,200	153.0922, 219.1286, 263.1286, 122.0367
Quercetin II	30,5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,2380	301,0353	0,600	301.0343, 178.9989, 151.0036, 121.0294, 65.0026

3.3.5 Análise de Clusters e Componentes Principais

Com base no conjunto de dados obtidos a partir das atividades antioxidantes (Tabela 20) e anti-inflamatória (NF-kB 20 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 15) do araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá, foi realizada uma análise de agrupamento pelos métodos hierárquicos (agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas, UPGMA) e métodos não hierárquicos (componentes principais, CP).

Na Figura 16 pode-se visualizar o agrupamento das frutas. Foram formados três grupos que apresentam a seguinte distribuição: grupo 1 – formado pelo araçá-boi; grupo 2- cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre e murici vermelho e grupo 3-formado pelo cajá. O agrupamento das frutas cambuití-cipó, murici vermelho e morango silvestre foram as espécies que mais se destacaram frente as demais frutas (araçá-boi e cajá) em relação as variáveis capacidade antioxidante e anti-inflamatória.

Figura 16. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com atividade antioxidante e anti-inflamatória de 5 espécies de frutas nativas brasileiras.

Na Tabela 27 estão apresentados os autovalores, a variação individual (%) e a variação acumulada associada aos CP, com base na atividade antioxidante (Tabela 20) e atividade anti-inflamatória (NF-kB 20 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá. Pode-se verificar que os dois primeiros CP explicaram aproximadamente 80,65% da variância total (VI1 = 93,68%; VI2 = 98,25%), indicando que a maior parte da variabilidade pode ser resumida nestes dois componentes e, assim, a classificação das espécies frutíferas nativas pode ser plotada no Nível 2D, conforme observado pela dispersão gráfica na Figura 17.

Tabela 27. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada com atividade antioxidante e anti-inflamatória de 5 espécies de frutas nativas brasileiras.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	4,68	93,68	93,68
2	0,23	4,57	98,25
3	0,08	1,61	99,86
4	0,01	0,14	100,00

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada

Com base no gráfico de dispersão (Figura 17), foram formados quatro grupos que apresentam a seguinte composição: grupo 1 – formado pelo murici vermelho; grupo 2 – cambuití-cipó; grupo 3 – morango silvestre, araçá-boi e cajá. Apesar da diferença apresentada nos métodos adotados, as análises de agrupamento com base nos dados de atividade antioxidante e anti-inflamatória foram bem sucedidas para agrupar as espécies frutíferas estudadas.

Figura 17. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir da atividade antioxidante e anti-inflamatória de frutas nativas brasileiras (aráçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajú).

Todas as variáveis estudadas apresentaram alto poder de discriminação, pois exibiram maior distância do eixo de origem (Figura 18). O NF- κ B (20 e 200 μ g mL⁻¹) mostrou distinção para o cambuití-cipó - grupo 2. Os extratos de cajú e araçá-boi não mostraram atividade sobre o NF- κ B e por isso não se agruparam no grupo 2. No entanto, o morango silvestre e murici vermelho também reduziram o NF- κ B, só que houve outras variáveis que contribuíram para distingui-las em outros grupos. O morango silvestre foi fortemente diferenciado pela atividade antioxidante sobre o sequestro do ânion superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico, assim como o araçá-boi e cajú, as quais foram agrupadas no mesmo grupo (Grupo 3) (Figura 17). Essas frutas apresentaram os maiores EC₅₀, ou seja, as menores atividades antioxidantes em relação ao cambuití-cipó que apresentou a maior capacidade de sequestro do ânion superóxido e óxido nítrico (EC₅₀ 68,33 μ g mL⁻¹; 0,78 μ g mL⁻¹, respectivamente). Para o sequestro do ácido hipocloroso o cambuití-cipó (EC₅₀ 4,99 μ g mL⁻¹) e o murici vermelho (EC₅₀ 4,41 μ g mL⁻¹) apresentaram as maiores atividades e diferiram do araçá-boi, morango silvestre e cajú (Tabela 20).

Figura 18. Mapa de CP mostrando relação entre a atividade antioxidante e anti-inflamatória de frutas nativas brasileiras (araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá).

3.4 CONCLUSÃO

As frutas nativas estudadas apresentaram alto poder de redução e elevada atividade antioxidante. No que se diz respeito à capacidade de desativação das ERO e ERN houve forte discriminação para esta propriedade, ou seja, as maiores atividades para o sequestro do $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ foram do murici vermelho, enquanto que para o HOCl foram as frutas cambuití-cipó e murici vermelho. Para a desativação do $\text{NO}^\bullet$ o cambuití-cipó foi a espécie com a maior atividade.

De modo geral, todos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória *in vivo*, sendo que o mecanismo de ação dos extratos de murici vermelho, cambuití cipó e morango silvestre estão relacionados com a redução da ativação do fator nuclear NF- κ B.

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução permitiu a identificação de um perfil fenólico diversificado, com compostos pertencentes às classes dos ácidos

hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, antocianinas, estilbenos e elagitaninos. Foram identificados 18 compostos fenólicos no araçá-boi, 32 no cambuí-cipó, 26 no murici vermelho, 20 no morango silvestre e 11 e no cajá, sendo vários desses compostos identificados pela primeira vez nessas espécies.

Os extratos das frutas avaliadas apresentaram forte discriminação para ERO e ERN, bem como para a atividade anti-inflamatória.

As frutas nativas estudadas se mostraram fontes importantes de compostos fenólicos e as atividades biológicas encontradas foram superiores as de frutas tradicionalmente consumidas e, portanto, o consumo regular deve propiciar benefícios à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B. et al. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 213-224, 2012.
- ABREU, P., et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. **Life Sciences**, v. 78, p.1578–1585, 2006.
- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L.(Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- BANSODE, R. R. et al. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function. **Food chemistry**, v. 148, p. 24-29, 2014
- BARROS, R.G. C. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International**, 2017.
- BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.
- BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.

- BERTO, A. et al. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. *Food Research International*, v. 77, p. 236-243, 2015.
- BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 25, p. 3-14, 2001.
- CAMPBELL, T. F. et al. *Rubus rosifolius* varieties as antioxidant and potential chemopreventive agents. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 49-57, 2017.
- CARDENAS H. et al. Dietary Apigenin Exerts Immune-Regulatory Activity in Vivo by Reducing NF- κ B Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function. Paliyath G, ed. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3. P.323, 2016.
- CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A.Z.; FERNANDES, E. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v.135, p.1740–1749, 2012.
- CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 127, 419–426, 2011.
- CHOI, J. Y. et al. Analysis and tentative structure elucidation of new anthocyanins in fruit peel of *Vitis coignetiae* Pulliat (meoru) using LC–MS/MS: Contribution to the overall antioxidant activity. **Journal of Separation Science**, v.33, p.1192–1197, 2010.
- COOPER, Z. A. et al. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS-stimulated macrophages by differentially modifying NF- κ B recruitment to cytokine gene promoters. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v.298, p. 171–181, 2010.
- CORRÊA-CAMACHO, C. R; DIAS-MELICIO, L. A; SOARES, A. M. V. C. Atherosclerose, uma resposta inflamatória. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 14, n.1, p. 41-18, 2007.
- CZERWIŃSKA, M.; KISS, A.K.; NARUSZEWICZ, M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. **Food Chemistry**, v. 131, p. 940-947, 2012.
- CÔTÉ, J. et al. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 7, p. 666-679, 2010.
- DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.
- DENNY, C. et al. Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, v.8, p.292–300, 2014.

- DENNY C. et al. Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. **BMC Complement Alternative Medicine**, v. 13, n.1, p. 233, 2013.
- DE SOUZA, M. P. et al. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC–MS/MS and HS-SPME/GC–MS. **Food Research International**, v. 83, p. 87-94, 2016.
- DUTRA, R. L. T. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650-657, 2017.
- FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707-715, 2001.
- FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 578-588, 2013.
- FRAIGE, K.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395-403, 2014.
- FRANCISCO, M. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Functional Components in Peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 715–746, 2008.
- GONZÁLEZ, N. et al. Potential use of *Cytisus scoparius* extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, p. 83–89, 2013.
- GROSSO, G. et al. Dietary polyphenols are inversely associated with metabolic syndrome in Polish adults of the HAPIEE study. **European Journal of Nutrition**, p. 1-12, 2016.
- HANHINEVA, K. et al. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, v. 69, n. 13, p. 2463-2481, 2008.
- HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 702-708, 2008.
- HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 16, n. 7, p. 655-662, 2002.

- HERAS, R. M. L. et al. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 370–377, 2016.
- HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, v. 1, p.483–491, 2013.
- INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored brazilian native fruits. **PLoS ONE** , v. 11, n. 4, p. e0152974, 2016.
- JAKOBEK, L. et al. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. **International journal of food science & technology**, v. 44, n. 4, p. 860-868, 2009.
- KELEBEK, H. LC-DAD–ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. **Food Chemistry**, v. 204, p. 227-238, 2016.
- LARRAURI, M. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 964–971, 2016.
- LAVECCHIA, T.; REA, G.; ANTONACCI, A.; GIARDI, M.T. Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 53, p. 198-213, 2013.
- LAZARINI, J. G. et al. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 249–257, 2016.
- LI, D.; MENG, X.; LI, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 1-7, 2016.
- LÓPEZ-CARBONELL, M.; JÁUREGUI, O. A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 407-411, 2005.
- LOU, H. et al. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2391-2399, 2004.
- JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

- MA, Y. et al. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanching peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 64-81, 2014.
- MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2011.
- MALLE, E. et al. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1761, 392–415, 2006.
- MARTIN, E.M. et al. Misoprostol Inhibits Equine Neutrophil Adhesion, Migration, and Respiratory Burst in an In Vitro Model of Inflammation. **Frontiers in Veterinary Science**, v.4, p. 159, 2017.
- MASSARIOLI, A.P. et al. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. **International Journal of Food Agriculture and Environment**, v.11, p.288–293, 2013.
- MELO, P. S. et al. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, v. 213, p. 440-449, 2016.
- MELO, P.S. et al. Winery by-products: extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, 2015; v.181, p.60–169, 2015.
- NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; GUZMAN, C. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 4, p. 391–395, 2002.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.
- PATTHAMAKANOKPORN, O. et al. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Compound Analysis**, v.21, p. 241–248, 2008.
- PARIHAR, A.; EUBANK, T. D.; DOSEFF, A. I. Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 3, p. 204–215, 2010.
- REGUEIRO, J. et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340-348, 2014.

- PEREZ, A. et al. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 11-18, 2014.
- RIBEIRO, A.B. et al. Psidium cattleianum fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 165, 140–148, 2014.
- RIBEIRO, A. B. et al. Bioactive compounds and scavenging capacity of extracts from different parts of Vismia cauliflora against reactive oxygen and nitrogen species. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 9, p. 1267-1276, 2015.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from Solanum sessiliflorum, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 3022–3029, 2013.
- RODRIGUES, N. P.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. **Food Research International**, v. 61, p. 228-235, 2014.
- RUFINO, M. do S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.121, p.996–1002, 2010.
- SAMPAIO, C. R. P., et al.. Antioxidant phytochemicals of *Byrsonima ligustrifolia* throughout fruit developmental stages. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 400-410, 2015.
- SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, 2005
- SASOT, G. et al. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. **Food Research International**, 2017.
- SATPATHY, G. et al. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw Spondias pinnata K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2076-2087, 2011.
- SHIN, E. C. et al. Commercial runner peanut cultivars in the united states: Tocopherol composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10289–10295, 2009.

- SHUKLA, S. et al. Suppression of NF- κ B and NF- κ B-Regulated Gene Expression by Apigenin through I κ B α and IKK Pathway in TRAMP Mice. Gautam S, ed. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.
- SILVA, N. A. da et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.
- SILVA, S. et al. Identification of flavanol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciencia e Tecnica Vitivinicola**, v. 20, p. 17–33, 2005.
- SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015.
- SPÍNOLA, V.; PINTO, J. CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.
- THULASINGAM S. et al. miR-27b*, an oxidative stress-responsive microRNA modulates nuclear factor- κ B pathway in RAW 264.7 cells. **Mol Cell Biochem**, v. 352, n. 1-2, p.181-188, 2011.
- VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI/MS- Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, v.181, p.146–151, 2015
- VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 877-883, 2011.
- VISAVADIYA, N.P.; SONI, B.; DALWADI, N. Free radical scavenging and antiatherogenic activities of Sesamum indicum seed extracts in chemical and biological model systems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2507–2515, 2009.
- VONGSAK, B. et al. In vitro inhibitory effects of Moringa oleifera leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 11, 1159-1161, 2013.
- WANG, H. et al. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e78484, 2013.
- WEDICK, N. M. et al. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. **The American journal of Clinical Nutrition**, 2012.

YASIR, M. et al. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC–ESIMS/MS identification of phenolic components. **Food Chemistry**, v. 199, p. 307-313, 2016.

YE, M. et al. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MS n. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2012.

4. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

As 10 frutas nativas estudadas neste trabalho (araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, murici guassú, morango silvestre, cajá, cambuci, jaracatiá-mamão, juquirioba e fruta-do-sabiá) apresentaram alta capacidade antioxidante, anti-inflamatória e variedade em compostos fenólicos. Por meio das técnicas de CLAE-DAD e CG-EM foi possível a identificação de compostos fenólicos pertencentes a classe dos flavonoides (catequina, epicatequina, rutina, quercetina glicosilada, kaempferol glicosilado, quercetina, procianidina B1 e procianidina B2), sub-classe do ácido hidroxibenzoico (ácido gálico) e sub-classe dos ácidos hidrocinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico e caféico).

No entanto, as 5 frutas nativas que se destacaram quanto a atividade biológica foram: araçá-boi, cambuití-cipó, murici vermelho, morango silvestre e cajá, pois apresentaram alta atividade antioxidante (sequestro do radical ABTS^{•+} e do radical peroxila) e foram capazes de reduzir o influxo de neutrófilos comparados ao grupo carragenina em ensaios de inflamação *in vivo*.

As cinco frutas de maior bioatividade também foram eficazes no sequestro de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (sequestro do radical superóxido (O₂^{•-}), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico (NO[•]) e foram capazes de reduzir a ativação do fator nuclear – κB (NF- κB), confirmando a alta atividade anti-inflamatória dessas frutas nativas.

A composição fenólica das cinco frutas mais bioativas pôde ser melhor investigada por meio do uso de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS), o que tornou possível identificar 18 compostos no araçá-boi, 32 no cambuití-cipó, 26 no murici vermelho e 20 e 11 compostos no morango silvestre e cajá, respectivamente. Vários dos compostos fenólicos identificados foram encontrados pela primeira vez nessas espécies e também em seus gêneros.

Portanto, as frutas nativas avaliadas podem ser consideradas como fontes de compostos fenólicos de alta atividade biológica, podendo proporcionar benefícios para a saúde humana.

5. APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL E GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO

Os ensaios e procedimentos realizados *in vivo*, foram realizados de acordo com as diretrizes para o cuidado e uso de animais e foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA / UNICAMP, protocolo nº 4371-1) (APÊNDICE A).

A destinação dos resíduos gerados neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) (APÊNDICE B).

Assim, todos os resíduos gerados nas análises químicas foram armazenados no entreposto do Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP e posteriormente, foram destinados a tratamento adequado no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Químicos (ESALQ/USP) e/ou enviados para incineração.

APÊNDICES

APÊNDICE A

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Bioprospecção da atividade anti-inflamatória de frutas nativas brasileiras inexploradas em camundongos, registrada com o nº 4371-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Josy Goldoni Lazarini, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP, em 23 de setembro de 2016.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2016-01/10/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/10/2016-01/10/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	252
Peso / idade:	04 semanas / 20g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 23 de setembro de 2016.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Altonio
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

APÊNDICE B **COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP****PARECER**

Projeto intitulado: “Composição química e atividade biológica in vitro e in vivo de frutas nativas brasileiras”, de responsabilidade do Prof. Severino Matias de Alencar, analisado pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa – ESALQ/USP, em sua 5ª Reunião Ordinária, realizada em 11 de julho de 2017, está de acordo com os princípios éticos ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei 6.894/80, Lei 7.803/89, Lei 9.985/00, Lei 9.974/00, Decreto 99.556/90, Decreto 4.340/02, Instrução Normativa 169/2008, ABNT/NBR 10004:2004, Resolução ANVISA RDC 306/2004, Resolução 358/05) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes.

Piracicaba, 11 de julho de 2017.

Prof. Dr. Fábio Tebaldi Siqueira Nogueira
Presidente da CEAP - ESALQ/USP

Este parecer exclui demais aspectos éticos que envolvam a utilização de animais de laboratório ou seres humanos, os quais são de competência das Comissões de Ética em Pesquisa com Animais e de Seres Humanos, respectivamente.