

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de
frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e
vitamina C

ANY ELISA DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora: Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE

São Paulo

Março / 2008

ANY ELISA DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES

*Dedico este trabalho aos meus pais, César e Maria,
E aos meus irmãos Talita e Gustavo, por estarem sempre
ao meu lado, em todos os momentos.
Meu amor por vocês é eterno!*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídas na natureza
- Figura 2** - Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbila como composto intermediário
- Quadro 1** - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico
- Quadro 2** - Construção da curva padrão através do cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína
- Figura 3A** - Área de decaimento da amostra em relação ao controle
- Figura 3B** - Perda de fluorescência da fluoresceína na presença do antioxidante Trolox nas concentrações de 0,4 a 4,8 μM
- Figura 3C** - Curva padrão de Trolox
- Figura 4** - Frutas analisadas neste estudo

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Identificação botânica e teores de umidade (%) das frutas e polpas comerciais nativas
- Tabela 2 -** Conteúdo de ácido ascórbico total presente nas frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.)
- Tabela 3 -** Capacidade antioxidante das frutas e polpas de frutas nativas comerciais através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/g amostra b.s.), DPPH (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.), ORAC (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.) e β -caroteno (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.)
- Tabela 4 -** Coeficientes de correlação (r) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante
- Tabela 5 -** Composição e teor de flavonóides e ácidos hidróxicinâmicos presentes nas frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.)
- Tabela 6 -** Teores de ácido elágico livre e total das frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.).
- Tabela 7 -** Atividade inibitória de α -amilase de extratos purificados em poliamida obtidos a partir das frutas e polpas de frutas nativas
- Tabela 8 -** Atividade inibitória de α -glicosidase de extratos metanólico e purificado em poliamida obtidos a partir das frutas e polpas de frutas nativas
- Tabela 9 -** Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase de compostos puros

LISTA DE ANEXOS

- Figura A-1** Cromatograma dos flavonóides extraídos de camu-camu e monitorados a 270 nm.
- Figura A-2** Cromatograma dos flavonóides extraídos de cambuci e monitorados a 270 nm.
- Figura A-3** Cromatograma dos flavonóides extraídos de cagaita e monitorados a 270 nm.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

- 1.1. Compostos bioativos de alimentos
 - 1.1.1. Flavonóides e ácido elágico
 - 1.1.2. Ácido Ascórbico (Vitamina C)
- 1.2. Radicais livres e antioxidantes
- 1.3. Métodos de determinação da capacidade antioxidante
- 1.4. Frutas do Cerrado e da Amazônia
- 1.5. Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase

2. OBJETIVOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- 3.1. Materiais
- 3.2. Métodos
 - 3.2.1. Determinação de Umidade
 - 3.2.2. Extração e determinação de flavonóides e ácido elágico livre
 - 3.2.3. Extração e determinação de ácido elágico total
 - 3.2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
 - 3.2.4. Determinação do teor de ácido ascórbico (VitaminaC)
 - 3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*
 - 3.2.5.1. Extração
 - 3.2.5.2. Descoramento pelo Sistema β -caroteno/ácido linoléico
 - 3.2.5.3. Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)
 - 3.2.5.4. Seqüestro de radicais livres (DPPH)
 - 3.2.5.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)
 - 3.2.6. Determinação da atividade inibitória de α -glicosidase
 - 3.2.6.1. Extração
 - 3.2.6.2. Inibição de α -glicosidase
 - 3.2.7. Determinação da atividade inibitória de α -amilase
 - 3.2.7.1. Extração

3.2.7.2. Inibição de α -amilase

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 5.1. Caracterização botânica das frutas e polpas comerciais de frutas exóticas
- 5.2. Determinação do teor de ácido ascórbico (vitamina C)
- 5.3. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*
- 5.4. Determinação de flavonóides
- 5.5. **Determinação de ácido elágico livre e total**
- 5.6. Determinação da capacidade inibitória de α -glicosidase e α -amilase *in vitro*
 - 5.6.1. Atividade inibitória de α -amilase
 - 5.6.2. Atividade inibitória de α -glicosidase

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. ANEXOS

RESUMO

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, mas também compostos bioativos com propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e anticarcinogênica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonóides. De maneira geral, a capacidade antioxidante de frutos e hortaliças está relacionada aos teores destes compostos, que impedem a ação dos radicais livres e são o foco de interesse deste trabalho. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar fontes potenciais de compostos bioativos através da determinação dos teores de flavonóides, ácido elágico, vitamina C, capacidade antioxidante e inibição de α -glicosidase e α -amilase de frutas e polpas de frutas nativas. Foram analisadas 16 frutas e 6 polpas congeladas de frutas nativas, e destas, camu-camu, cupuaçu, coquinho azedo e cagaita mostraram-se excelentes fontes de vitamina C. Camu-camu, cambuci, uxi e tucumã e as polpas de cambuci, cagaita, coquinho azedo e araçá foram as amostras que apresentaram melhor capacidade antioxidante. Os flavonóides de maior incidência entre as amostras foram quercetina e caempferol. O ácido elágico foi detectado apenas em umbu, camu-camu, cagaita, araçá e cambuci e o teor variou de 218 a 512 mg/100 g de amostra seca. Cambuci e cagaita foram as amostras mais eficientes em inibir α -glicosidase e α -amilase. Em suma, este trabalho mostrou que as frutas nativas brasileiras também podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos.

Palavras-chave: flavonóides, vitamina C, frutas nativas, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

GONÇALVES, A.E.S.S Antioxidant Capacity evaluation of native fruits and Commercial Frozen Pulps and determination of flavonoids and vitamin C content. Dissertação (mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Foods provide not only essential nutrients for life, but also bioactive compounds with health-promoting properties such as antioxidant, anti-inflammatory and hypocholesterolemic activities, which have been related with vitamins A, C and E and phenolics compounds such as flavonoids. In general, antioxidant capacity of fruits and vegetables is linked to the amount of these compounds, which are effective against free radicals. Therefore, the aim of this work was to identify potential sources of bioactive compounds through determination of flavonoids, ellagic acid and vitamin C contents, antioxidant capacity and α -glucosidase and α -amylase inhibition by native fruits and commercial frozen pulps. In this study, 16 native fruits and 6 commercial frozen pulps were analyzed, and camu-camu, cupuaçu, coquinho azedo and cagaita showed themselves as excellent vitamin C sources. Camu-camu, cambuci, uxi and tucumã and commercial frozen pulps of cambuci, cagaita, coquinho azedo and araçá were the samples that presented the highest antioxidant capacity. Quercetin and kaempferol derivatives were the main flavonoids present in most of the samples. Ellagic acid was detected only in umbu, camu-camu, cagaita, araçá and cambuci and the content ranged from 218 to 512 mg/100 g (DW). Cambuci and cagaita showed the highest α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity. According to our results, native Brazilian fruits can also be considered as good sources of bioactive compounds.

Key-words: flavonoids, vitamin C, native fruits, antioxidant capacity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos bioativos de alimentos

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, mas também compostos bioativos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis. Esse efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonóides. Entre estes podemos citar as catequinas do chá verde e do vinho, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis das folhas e as isoflavonas da soja (SEIFRIED *et al.*, 2007; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Além dos compostos fenólicos e das vitaminas, os carotenóides, presentes de forma abundante na natureza, também têm demonstrado importante papel como antioxidantes. Precusores da vitamina A, o β -caroteno e seus derivados possuem um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, e este sistema é responsável pela eficácia destes compostos antioxidantes (GERMAN e DILLARD, 1998).

Devido à incompleta eficiência de nosso sistema endógeno de defesa, a influência de fatores externos como fumo, poluição, radiação UV e alimentação bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos (envelhecimento, obesidade, inflamação e isquemia), está bem estabelecida a importância de compostos bioativos provenientes da dieta que podem ajudar a suprir esta deficiência e também promover proteção, prevenção ou redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo (HUONG *et al.*, 2005; PIETTA, 2000).

Visto que os radicais livres causam danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo levar a um grande número de patologias incluindo o câncer e a aterosclerose, presume-se que a ingestão de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na prevenção destas doenças (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

De maneira geral, a capacidade antioxidante de frutos e hortaliças está relacionada aos teores de compostos hidrossolúveis como os compostos fenólicos e a vitamina C, que impedem a ação dos radicais livres e são o foco de interesse deste trabalho. No entanto, para espécies ricas em carotenóides, como por exemplo, manga e mamão, a contribuição da fração lipossolúvel na capacidade antioxidante não pode ser negligenciada.

1.1.1. Flavonóides e ácido elágico

Os compostos fenólicos representam a principal classe de metabólitos secundários presentes nas plantas e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Eles são derivados das vias do ácido chiquímico e fenilpropanoídica e podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonóides, os ácidos fenólicos e os polifenóis (taninos) (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$) com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A, B e C, e ocorrem naturalmente nos alimentos vegetais, sendo, portanto, componentes usuais da dieta humana (KARAKAYA, 2004; HERTOOG *et al.*, 1992). A sua estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), dihidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas (**Figura 1**). As diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da variação no número e no arranjo dos grupos

hidroxilas, assim como a natureza e a quantidade de alquilações e/ou glicosilações destes grupos. Muitos deles se apresentam na forma glicosilada, sendo o sítio mais comum de glicosilação a posição 3, e o menos freqüente, a posição 7. Os carboidratos mais encontrados ligados a estes compostos são D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose (SCALBERT *et al.*, 2005; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Os flavonóides estão associados com o comportamento ecológico de algumas plantas. Por exemplo, devido às cores vibrantes apresentadas por alguns flavonóides (flavonas e antocianinas), estes podem agir como atrativos para insetos polinizadores; além disso, a característica adstringente das catequinas e outros flavanóis representam um sistema de defesa contra alguns insetos. Os flavonóides também podem agir como protetores de células vegetais por seqüestrar espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela radiação UV necessária à fotossíntese (PIETTA, 2000).

A atividade antioxidante dos flavonóides é devida a sua habilidade de seqüestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar metais, reduzindo o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (GONZALO e ALONSO, 2002; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Uma diversidade de estudos *in vitro* tem mostrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas, envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação, e resposta inflamatória e imune do organismo humano (SEINFRIED *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2004).

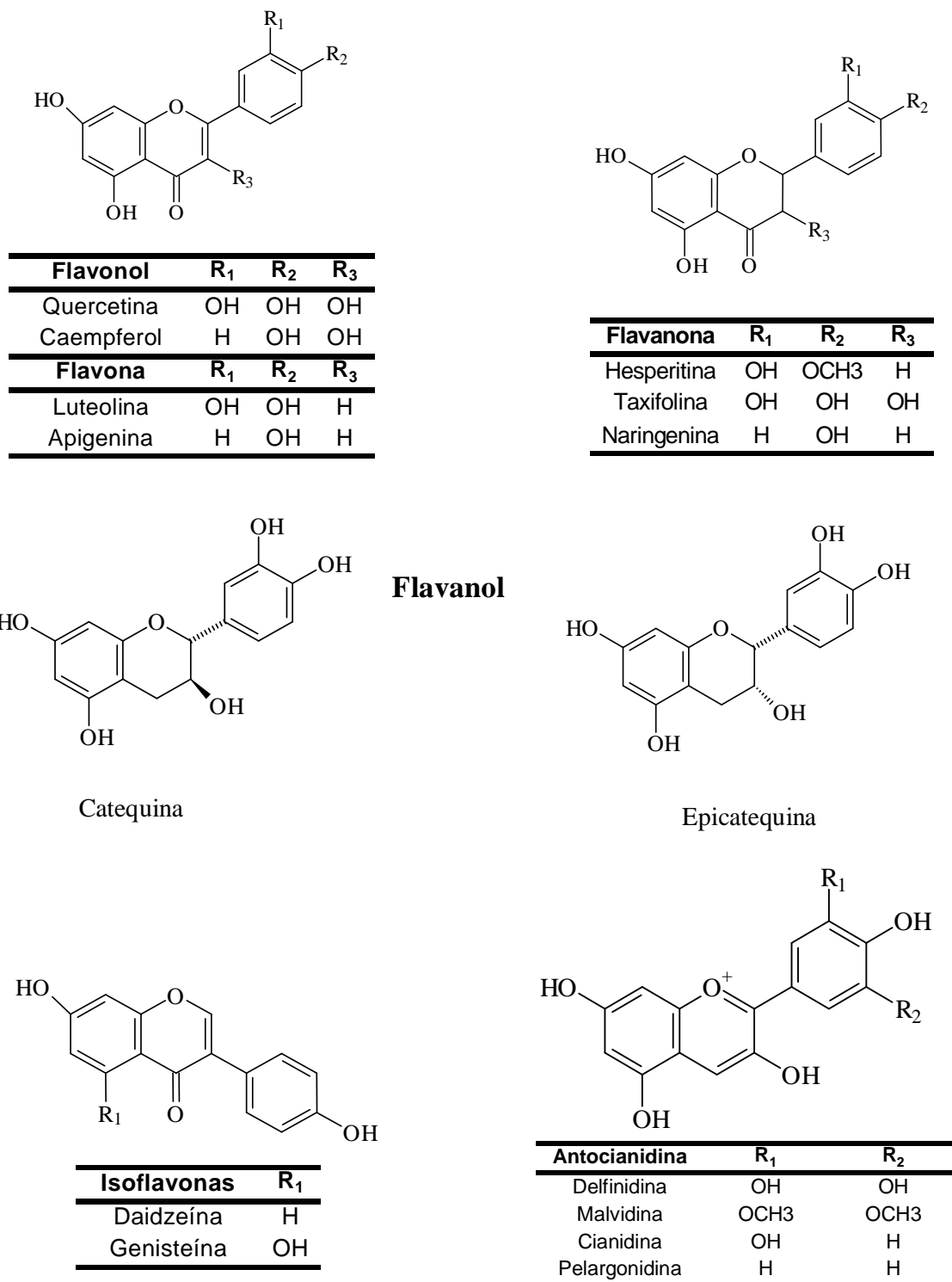


Figura 1: Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídas na natureza.

A capacidade antioxidante demonstrada pelos flavonóides é uma das diversas atividades biológicas, que mais têm sido associadas com a prevenção de enfermidades emergentes de países desenvolvidos, como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MARTÍNEZ-VALVERDE *et al.*, 2000). No entanto, os mecanismos pelos quais estes compostos exerceriam sua atividade anticarcinogênica e preventiva sobre certas doenças ainda não estão definitivamente estabelecidos na maioria dos casos.

Existe uma série de características que determinam a efetividade dos flavonóides como antioxidantes. O modo específico de inibição da oxidação de cada composto ainda não está totalmente esclarecido, mas é possível notar algumas propriedades peculiares: (1) quelar metais através da estrutura orto-dihidróxifenólica, (2) seqüestrar radicais peróxilas e alquilas atuando como doadores de hidrogênio, (3) regenerar α -tocoferol através da redução do radical α -tocoferoxila. (GONZALO e ALONSO, 2002; RICE-EVANS *et al.*, 1996). A eficácia dos antioxidantes fenólicos está relacionada com a estabilidade relativa de seus radicais intermediários devido à ressonância e à falta de posições adequadas na estrutura para ataque pelo oxigênio molecular (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; PANNALA *et al.*, 2001).

Como antioxidantes, os flavonóis são mais potentes do que as respectivas flavonas devido à presença da hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A. A quercetina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona, um dos flavonóides mais comumente encontrados em alimentos, é considerada excelente antioxidante devido a presença de grupamentos hidroxilas no anel B e da dupla ligação no anel C (HOLLMAN e KATAN, 1997). Entretanto, existe uma redução da atividade antioxidante dos grupos hidroxilas deste composto quando os mesmos se encontram ligados a uma molécula de açúcar (WILLIAMS *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-VALVERDE *et al.*, 2000).

O ácido elágico é um composto fenólico presente em algumas frutas e castanhas. Dentre os principais produtos estão morango (*Fragaria ananassa*), framboesa (*Rubus*

fruticosus), romã (*Punica granatum*) e algumas sementes como nozes (*Juglans regia*) e avelã (*Coryllus avellana*) (DANIEL *et al.*, 1989; CLIFFORD e SCALBERT, 2000). Estruturalmente, o ácido elágico corresponde a uma dilactona de ácido gálico, representado pela fórmula $C_{14}H_6O_8$ com peso molecular de 302,20 (BUDAVARI, 1996) e pode ser encontrado nas formas livre, glicosilada e na forma de elagitaninos.

A proporção de ácido elágico livre é altamente variável podendo chegar a até 50% do valor total, comparando-se valores antes e após a hidrólise (CLIFFORD e SCALBERT, 2000), porém, esta proporção depende principalmente do tipo de alimento (*in natura* ou processado) analisado.

Alguns estudos indicam diversas atividades biológicas do ácido elágico, tais como atividade antiproliferativa e indução de apoptose em cultura de células carcinogênicas do epitélio cervical (NARAYANAN *et al.*, 1999), prevenção de câncer do trato gastrointestinal atribuída ao acúmulo seletivo de ácido elágico em células epiteliais de rato (WHITLEY *et al.*, 2003) e atividade antimicrobiana seletiva em microrganismos patogênicos para o homem (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2005).

1.1.2. Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel que pode ser sintetizado a partir da D-glicose ou D-galactose por plantas e muitas espécies de animais com exceção dos primatas e de certas aves, e por isso, ela deve ser adquirida a partir da dieta. Esta molécula pode ser oxidada reversivelmente ao ácido desidroascórbico pela retirada de dois átomos de hidrogênio, na presença de íons metálicos, calor, luz ou em condições levemente alcalinas (pH acima de 6,0) com perda parcial da atividade vitamínica. (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

A denominação de ácido ascórbico foi atribuída para referir-se à sua função na prevenção do escorbuto. O termo vitamina C deve ser utilizado como descrição genérica para todos os compostos que exibem atividade biológica qualitativa de ácido ascórbico (MARCUS e COULSTON, 1991).

A reação de oxidação do ácido ascórbico (**Figura 2**) forma o radical ascorbila (RA) como composto intermediário, sendo este essencial para a atividade antioxidante da vitamina C (BUETTNER e SCHAFER, 1997). *In vivo*, a maior parte de ácido ascórbico está mantida em estado reduzido por redutores endógenos, e somente uma pequena quantidade está presente como ácido desidroascórbico ou outro produto oxidativo como o monoânion ascorbato (BUETTNER e SCHAFER, 2004; SHAHIDI e NACZK, 2004).

Por apresentar atividade antioxidante, a vitamina C é a primeira linha de defesa contra radicais derivados do oxigênio em meio aquoso. Essa vitamina reage diretamente com superóxidos, radicais hidroxilas e oxigênio singlete. Tem grande importância fisiológica devido a sua participação em diversos eventos no organismo, como formação de tecido conjuntivo, produção de hormônios e anticorpos, biossíntese de aminoácidos e prevenção de escorbuto. É considerado um antioxidante fisiológico versátil, pois pode exercer ação nos compartimentos intra e extracelulares (BENDICH e LANGSETH, 1995).

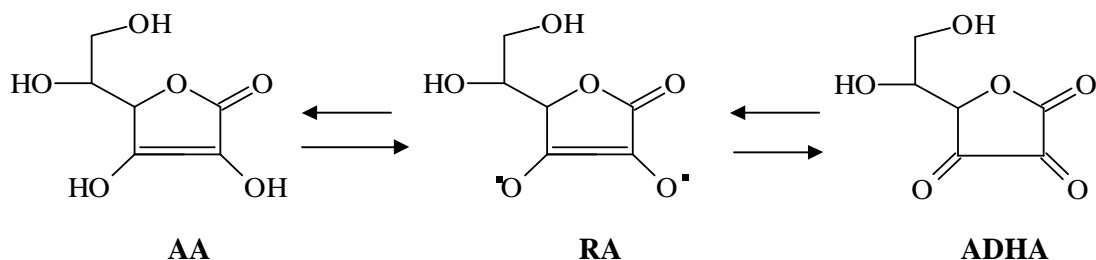


Figura 2. Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbila como composto intermediário (BUETTNER e SCHAFER, 1997).

Ela atua na prevenção da formação de hidroperóxidos lipídicos em lipoproteínas plasmáticas, como LDL, e por restaurar propriedades antioxidantes de outros antioxidantes, como o α -tocoferol (Vitamina E), nas membranas biológicas. É por isso que ela tem função importante na prevenção da aterosclerose plaquetária (MCGREGOR e BIESALSKI, 2006; NORDBERG e ARNER, 2001).

A vitamina C é transportada no plasma sob a forma de um ânion livre, sendo transferida por difusão simples para interior dos leucócitos e dos eritrócitos. No ser humano adulto sadio, a reserva de ácido ascórbico é de aproximadamente 1.500 mg com uma ingestão média diária de 45 a 75 mg. Quando não ocorre a ingestão desta vitamina, aproximadamente 3% das reservas são diminuídas diariamente e os sintomas clínicos do escorbuto aparecem em 30 a 45 dias, quando a reserva orgânica cai abaixo de 300 mg (GUILLAND e LEQUEU, 1995).

1.2. Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos capazes de possuir existência independente contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. São altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativos, podendo causar danos por reagir com praticamente qualquer molécula que entra em contato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998).

O termo coletivo Espécie Reativa de Oxigênio/Nitrogênio é usado para identificar radicais e alguns não-radicaís que se apresentam como agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (HALLIWELL, 1996). O **Quadro 1** mostra alguns dos principais radicais livres de interesse biológico provenientes do metabolismo celular.

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo de redução do oxigênio, utilizado para converter em

energia os nutrientes absorvidos dos alimentos. Os organismos aeróbicos, durante a evolução, não apenas se adaptaram à existência de radicais livres, mas também desenvolveram mecanismos que permitiam o uso vantajoso destes radicais em vários processos fisiológicos nas células (VALKO *et al.*, 2007).

Deve-se enfatizar que tanto espécies reativas de oxigênio (ERO) quanto espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação (redox) em tecidos saudáveis (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004). Estes radicais, em baixas concentrações, podem atuar de maneira benéfica em defesa contra agentes infecciosos, formação de ATP através de ADP na mitocôndria, regulação do crescimento celular e produção de oxigenases (lipooxigenase e ciclooxigenase) para formação de prostaglandinas e leucotrienos.

A produção descontrolada de radicais e ERO ou a deficiência de mecanismos de defesa devido à desnutrição podem ser prejudiciais e, conseqüentemente, induzir a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, prejudicando o equilíbrio e gerando o estresse oxidativo ou danos oxidativos (VALKO *et al.*, 2007; PIETTA, 2000; LANGSETH, 2000; HALLIWELL, 1994). O dano causado a esses componentes celulares se acumula, com o passar dos anos, e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade, destacando-se câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata. (SCALBERT *et al.*, 2005; LANGSETH, 2000). Por isso, em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos antioxidantes de defesa, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Quadro 1: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico.

Espécies Reativas	Símbolo	Meia-vida (em seg)	Reatividade
Espécies reativas de oxigênio:			
Superóxido	O ₂ ^{•-}	10 ⁻⁶ s	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	•OH	10 ⁻⁹ s	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	Estável	Formado em nosso corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como •OH.
Radical peroxila	ROO•	Segundos	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, açúcares etc., durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	ROOH	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas
Oxigênio singlete	¹ O ₂	10 ⁻⁵ s	Altamente reativo formado por fotossensibilização e reações químicas.
Ozônio	O ₃	Segundos	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas, produzindo ¹ O ₂ .
Espécies reativas de nitrogênio:			
Óxido nítrico	NO•	Segundos	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea, pode gerar potentes oxidantes durante estados patológicos.
Peróxinitrito	ONOO ⁻	10 ⁻³ s	Formado a partir do NO ⁻ e superóxido, é altamente reativo.
Ácido peróxinitroso	ONOOH	Ligeiramente estável	Forma protonada do ONOO ⁻ .
Dióxido de nitrogênio	NO ₂	Segundos	Formado pela poluição do ar.

Fonte: DEVASAGAYAM *et al.*, 2004.

Um antioxidante é uma substância sintética ou natural adicionada em produtos para prevenir ou retardar a deterioração dos mesmos pela ação do oxigênio presente no ar. Em bioquímica e medicina, os antioxidantes são enzimas ou outras substâncias orgânicas, como a vitamina E ou o β -caroteno, capazes de agir contra danos da oxidação em tecido animal (HUONG *et al.*, 2005).

De acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (1998), os mecanismos de ação antioxidante incluem (a) suprimir a formação de espécies reativas tanto pela inibição enzimática ou por quelar elementos-traço envolvidos na produção de radicais livres, (b) eliminar espécies reativas de oxigênio e, (c) manter o mecanismo antioxidante de defesa regulado e protegido.

Os antioxidantes podem ser classificados em: *antioxidantes primários*, aqueles que interrompem a cadeia de reações envolvidas na oxidação lipídica através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres convertendo-os em produtos mais estáveis termodinamicamente, e *antioxidantes secundários*, aqueles compostos que reduzem ou retardam a taxa de iniciação da oxidação por decompor hidroperóxidos (SHAHIDI e NACZK, 2004). A presença destas moléculas não está relacionada diretamente com o dano, mas a sua formação indica que a oxidação já ocorreu e que sua decomposição por metais pode dar origem a espécies reativas como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ou radical alkoxila ($\text{RO}\bullet$).

Os antioxidantes naturais ou sintéticos interferem na participação do oxigênio singlete e atuam, principalmente, como inibidores da reação, fazendo o papel ou de doadores de hidrogênio ou de receptores de radicais livres dos ácidos graxos. Os receptores de radicais livres (AH) reagem primeiramente com $\text{RO}_2\bullet$ e não com radicais $\text{R}\bullet$, favorecendo uma competição entre os antioxidantes e a propagação da reação em cadeia, na presença do ácido graxo (RH). Com isso, eles intervêm na fase de iniciação da

reação, produzindo compostos estáveis que retardam o processo de oxidação (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

O mecanismo antioxidante de defesa contra radicais livres, desenvolvido pelos seres humanos, inclui a produção de alguns antioxidantes no corpo (endógenos) e outros obtidos da dieta (exógenos). Dentre os antioxidantes endógenos, destacam-se enzimas como a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), que metabolizam superóxidos, peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídios, prevenindo, deste modo, a formação de $\bullet\text{OH}$. Destacam-se também os antioxidantes não-enzimáticos, provenientes da dieta, como os inibidores de enzimas oxidativas (ciclooxigenase), alguns cofatores enzimáticos, sequestrantes de ERO/ERN e os quelantes de metais de transição (HUONG *et al.*, 2005; PIETTA, 2000; LANGSETH, 2000). Além disso, a capacidade antioxidante no interior de uma célula está atribuída principalmente ao sistema enzimático, enquanto que no plasma a capacidade antioxidante está relacionada com moléculas de baixo peso molecular, algumas provenientes da dieta, como as vitaminas e os compostos bioativos, e outras consideradas produtos de vias metabólicas, como urato e glutathione (GHISELLI *et al.*, 2000; FREI, *et al.* 1989).

1.3. Métodos de determinação da capacidade antioxidante

A medida de capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em um extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados. A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, suprimindo informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (GHISELLI *et al.*, 2000).

Contudo, é necessário enfatizar que os ensaios realizados *in vitro* são limitados e não existe nenhuma similaridade com sistemas biológicos reais. Os ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* são importantes para verificar se há ou não correlação entre antioxidantes potentes e os níveis de estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2005).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2005).

Baseado nas reações químicas envolvidas, a maior parte dos métodos usados para avaliar a capacidade antioxidante pode ser dividida em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de elétrons, representados pelo método de Folin-Ciocalteu e seqüestro de radicais livres, tais como o DPPH e (2) baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio, representado pelo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e sistema β -caroteno/ácido linoléico (HUONG *et al.*, 2005).

A determinação de fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu é muito bem aceita, além de ser simples e reprodutiva. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico e quando reage com os compostos fenólicos, em condições alcalinas, ocorre dissociação de um próton fenólico levando à formação do ânion fenolato. Esse ânion é capaz de reduzir o reagente, formando o complexo azul de molibdênio (HUONG *et al.*, 2005; GENOVESE *et al.*, 2003). Atualmente, este é um dos métodos preconizados para avaliar a capacidade antioxidante através do poder redutor de extratos de amostras vegetais (PRIOR *et al.*, 2005). Como ele não é específico para compostos fenólicos, existe a possibilidade de ser reduzido por outros compostos, como o

ácido ascórbico levando, portanto, a uma superestimação dos resultados (HUONG *et al.*, 2005; GENOVESE *et al.*, 2003).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico, método desenvolvido por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971), avalia a capacidade do antioxidante em inibir o descoloramento do β -caroteno pela reação do mesmo com radicais livres formados durante a oxidação do ácido linoléico na emulsão lipídica. Neste sistema, amostras ricas em ácido ascórbico apresentam maior dificuldade de serem analisadas. Isso se deve ao fato de que, apesar da capacidade antioxidante conhecida do ácido ascórbico, neste método ele possui atividade pró-oxidante, proporcional a sua concentração, pois após doar os dois hidrogênios redutores, origina-se o radical ascorbila, que é um agente oxidante (BORS e BUETTNER, 1997; HASSIMOTO *et al.*, 2005).

O método de capacidade de absorção do radical oxigênio, ou ORAC, verifica a capacidade seqüestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37°C. Neste ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada ao branco, que não apresenta antioxidantes. Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a β -ficoeritrina. Mas foi observado que a β -ficoeritrina interagiu com os compostos fenólicos levando a erros neste método. Considerando esta desvantagem, OU *et al.* (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando a fluoresceína como composto fluorescente, que perde a fluorescência indicando reação com o radical peroxila. Além disso, a fluoresceína mostrou excelente fotoestabilidade, redução dos custos deste experimento e não interage com antioxidantes (OU *et al.*, 2001).

Outro método bastante utilizado na avaliação da capacidade antioxidante envolve o seqüestro de radicais livres. Ele se fundamenta na habilidade de antioxidantes, presentes na amostra, se ligarem com DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um radical orgânico estável. É um método tecnicamente rápido e não detecta agentes pró-oxidantes, sendo que determina apenas o poder redutor dos compostos analisados (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

1.4. Frutas do Cerrado e da Amazônia

As frutas constituem uma das mais ricas fontes de elementos nutritivos para a alimentação humana. Uma revisão realizada por STEINMETZ e POTTER (1996), envolvendo dados de 206 estudos epidemiológicos, mostrou que o consumo elevado de frutas e hortaliças estava relacionado com uma menor incidência de determinado tipos de cânceres e efeitos benéficos sobre doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e catarata.

O Brasil se destaca pelas condições climáticas e por apresentar grande diversidade de espécies frutíferas tropicais nativas, como o camu-camu, que cresce próximo aos rios e lagos na região Amazônica, e o buriti, uma fruta típica do cerrado (SOUZA FILHO *et al.*, 2002; FRANCO e SHIBAMOTO, 2000).

O bioma Cerrado, também conhecido como a savana brasileira, recobre cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central e representa cerca de 23 % de superfície terrestre do país. Em termos de área, só é excedido por somente um tipo de vegetação no Brasil, a Floresta Amazônica, que recobre cerca de 3,5 milhões de km². Além de abrigar o conjunto de savanas com maior biodiversidade do planeta, o bioma Cerrado é um mosaico composto por formações vegetais que vão de campos limpos a diversos tipos de florestas. Existem cerca de 800 espécies de árvores e arbustos no Cerrado. As famílias mais

importantes em termos de espécies são *Leguminosae*, *Malpighiaceae*, *Myrtaceae*, *Melastomataceae* e *Rubiaceae* (RATTER *et al.*, 1997).

O camu-camu é considerado uma fruta exótica da Amazônia sendo cultivado tanto no Brasil quanto no Peru, e apresenta alto potencial como fonte de vitamina C. Apesar disso, seu consumo no Brasil é restrito, com exceção da região Norte, onde há comercialização de polpa da fruta e suco (RODRIGUES *et al.*, 2001).

O bacuri e o tucumã são comercializados sobretudo em centrais de abastecimento e feiras livres de Belém (PA), São Luís (MA) e Teresina (PI) e sua produção não tem sido suficiente para atender à demanda crescente do mercado consumidor destas capitais. Seus frutos podem ser utilizados tanto *in natura* quanto na forma de polpa congelada (MUNIZ *et al.*, 2006).

O buriti e a cagaita são frutas típicas do Cerrado brasileiro e são muito usados na fabricação de doces, geléias, sucos e sorvetes. Uma utilidade peculiar do buriti é a produção de uma bebida fermentada conhecida por "vinho de buriti", muito consumida na região norte do país. A cagaita é consumida *in natura* por ser suculenta e apresentar sabor agradável, levemente ácido. Quando ingerida em excesso pode provocar fermentação e distúrbio gastrointestinais (ANDERSEN e ANDERSEN, 1988).

O araçá e o araçá boi são frutas nativas da Amazônia. O araçá, por ter acidez pronunciada, não é muito consumido ao natural, mas sim em forma de refresco, sorvete, doces e licores. É encontrado em abundância nas feiras de Belém, em épocas de colheita. O araçá-boi é pouco conhecido fora da Amazônia, mas é cultivado em escalas domésticas pelas populações caboclas e indígenas, no estado do Amazonas. O araçá-boi tem potencial econômico para conquistar um lugar de destaque no mercado nacional e internacional, por crescer facilmente em qualquer tipo de solo, apresentar fruto com elevada porcentagem de polpa, de sabor e aroma agradável, podendo ainda ser comercializado como polpa congelada ou suco engarrafado (CAVALCANTI, 1991).

Embora sejam consumidas regionalmente, estas frutas apresentam boas perspectivas para utilização agroindustrial, como o açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.), que atualmente é reconhecido mundialmente mostrando-se excelente produto de exportação, trazendo benefícios para inúmeras famílias que dependem do seu cultivo.

Além disso, pelo fato de não serem comuns e acessíveis para a maioria da população, como a laranja e a maçã, até o momento são frutas pouco exploradas e pouco se conhece sobre sua composição química e, portanto, sua potencialidade como fontes de compostos bioativos.

A produção de polpas de frutas congeladas se tornou um meio favorável para o aproveitamento integral das frutas na época da safra evitando os problemas ligados à sazonalidade (BARRET *et al.*, 1994).

Atualmente, com a tecnologia disponível, o mercado de polpas de frutas congeladas tem tido um crescimento razoável e apresenta grande potencial mercadológico em função da variedade de frutas com sabores peculiares bastante agradáveis (BUENO *et al.*, 2002).

1.5. Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase

Um relatório fornecido pela Organização Mundial de Saúde, em 2002, apontou a pressão arterial elevada, os elevados níveis de colesterol, a falta de atividade física e a baixa ou nenhuma ingestão de frutas e hortaliças como os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, dentre elas o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão e obesidade. O número de mortes pela baixa ingestão de frutas e hortaliças é estimado em 2,7 milhões, sendo que 19% está relacionado a câncer gastrointestinal, cerca de 31% por isquemia e 11% por infartos.

A Diabetes mellitus é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e

lipídios, resultado de deficiências na secreção de insulina, insensibilidade do receptor à produção endógena deste hormônio ou ambos (WHO, 1999). Em 2000, esta doença afetava uma prevalência estimada de 171 milhões da população adulta em todo mundo, e já se calcula que este valor se elevará para, no mínimo, 366 milhões em 2030 (WILD *et al.*, 2004).

A maior fonte de glicose presente no sangue é proveniente de dietas ricas em carboidratos, como o amido, que são hidrolisados pelas duas principais enzimas digestivas, α -glicosidase e α -amilase. A α -glicosidase está situada na membrana ciliada do intestino delgado e promove a quebra do amido e da sacarose (clivagem de ligação α 1,4 e α 1,6) liberando moléculas de glicose para serem absorvidas. A α -amilase está presente na saliva e suco pancreático e é responsável por clivar ligações glicosídicas α 1,4 de amilose liberando dextrina, maltose e maltotriose (BISCHOFF, 1994; MCCARTER E WITHERS, 1994).

Uma estratégia terapêutica efetiva para o tratamento da Diabetes mellitus tipo 2 é diminuir a hiperglicemia pós-prandial retardando a absorção de glicose através da inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase no trato digestivo, que hidrolisam o amido liberando glicose. A inibição destas enzimas retarda e prolonga o tempo de digestão de carboidratos reduzindo, assim, a proporção de glicose absorvida e, conseqüentemente, o aumento brusco de glicose pós-prandial no plasma (TOELLER, 1994).

Complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia, desenvolvidas por pacientes diabéticos, são resultantes do estresse oxidativo gerado por breves episódios de hiperglicemia, acarretando em dano celular, seguido de peroxidação lipídica e inativação de proteínas (AL-AZZAWIE e ALHAMDANI, 2006; ROLO e PALMEIRA, 2006).

Apesar de mecanismos não esclarecidos e poucos estudos relatados, as hipóteses salientam que a alta capacidade antioxidante de compostos fenólicos, principalmente dos

flavonóides, também pode ser efetiva na redução do estresse oxidativo e progressão da diabetes mellitus (SONG *et al.*, 2005; MATSUI *et al.*, 2001).

MCDOUGALL e STEWART (2005) realizaram uma revisão sobre o efeito dos compostos fenólicos sobre as enzimas digestivas. Nesta revisão, ainda relatam a eficácia das antocianinas como bons inibidores de α -glicosidase e destacam a importância dos polifenóis do chá verde como potentes inibidores de enzimas proteolíticas envolvidas no desenvolvimento de tumores.

De modo similar, estudos mais recentes têm demonstrado que os compostos fenólicos, além de apresentar alta capacidade antioxidante, possuem propriedades terapêuticas, sendo estas antidiabética e antihipertensiva (KWON *et al.*, 2006; APOSTOLIDIS *et al.* 2006).

Recentemente, BRYANS e colaboradores (2007) relataram que o chá preto mostrou-se eficiente na redução da glicose sanguínea pós-prandial e relacionaram tal efeito à presença de compostos fenólicos comumente encontrados em chás, como epigallocatequina (EGC), epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina (EC) e epicatequina galato (EPG).

Portanto, dada a importância dos compostos bioativos presentes em vegetais e da ação antioxidante destes compostos, decidiu-se avaliar a capacidade antioxidante total de frutas e polpas de frutas nativas através dos métodos mais preconizados pela literatura científica, adaptando o ORAC para uso em fluorímetro de cubeta, além de identificar e quantificar compostos fenólicos e vitamina C responsáveis por esta ação.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Identificação de fontes potenciais de compostos bioativos através da determinação dos teores de flavonóides e ácido elágico de frutas e de polpas de frutas nativas;
- Determinação do teor de ácido ascórbico das mesmas;
- Avaliação da sua capacidade antioxidante por diferentes métodos: Reagente de Folin-Ciocalteu, Descoramento do β -caroteno (sistema β -caroteno/ácido linoleico), Seqüestro de radicais livres (ensaio com DPPH•) e Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), adaptado para uso manual com leitura em espectrofotômetro de fluorescência simples;
- Determinação da atividade inibitória das enzimas α -glicosidase e α -amilase por compostos bioativos, presentes nas frutas e polpas de frutas nativas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As amostras de frutas *in natura* e polpas de frutas congeladas foram fornecidas pelos produtores “Sítio do Bello – Produtor de polpas de frutas nativas” e Luma Comércio e Distribuição de frutas exóticas. Algumas frutas foram amostradas e enviadas diretamente da região Amazônica através de fornecedor particular, de acordo com a época de colheita de cada uma. As amostras foram cortadas em pedaços, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em graal com pistilo. Em seguida, foram liofilizadas, homogeneizadas em moinho analítico (modelo A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC) sob refrigeração e posteriormente armazenadas a -20 °C (freezer) até o momento da análise.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi feita pesando-se cerca de 3 gramas de amostra, em liofilizador à vácuo (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems ®) durante 96 horas (AOAC, 1995). A determinação foi realizada em triplicata.

3.2.2. Extração e determinação de flavonóides e ácido elágico livre

As amostras foram extraídas com metanol 70% (armazenado em freezer) na proporção de 1:200 (m/v), com Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. As amostras com antocianinas em sua composição foram extraídas com uma mistura de metanol/água/ácido acético

(70:30:5, v/v) seguindo o procedimento citado acima. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~20 mL). As amostras concentradas, livres de metanol, tiveram então seu volume ajustado com água para balão volumétrico de 25 mL e uma alíquota de 10 mL (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 40 mL de metanol seguido de 40 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonóides foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3. Extração e determinação de ácido elágico total

A determinação de ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por PINTO *et al.* (2008). Amostras previamente pulverizadas (0,5 g) foram extraídas com 50 mL de acetona 80%, utilizando-se Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern, Sweden), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n. 6. O resíduo foi re-extraído com mais duas porções de 25 mL de acetona 80%. Alíquotas de 2 mL do extrato obtido foram transferidas para vial, evaporadas até secagem completa em

evaporador analítico (Organomation, Berlin, MA) e hidrolisadas com 2 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 2N a 120°C por 90 min. Após a hidrólise, foram adicionados 2 mL de álcool butílico terciário e os vials foram novamente evaporados. Após a secagem, foram ressuspendidos com 1 mL de metanol e filtrados em filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação de ácido elágico total foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A separação dos flavonóides foi realizada em coluna Prodigy 5µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido), de acordo com ARABBI *et al.* (2004). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por: **(A)** Água : Tetrahydrofurano : Ácido trifluoroacético (98 : 2: 0,1) e **(B)** Acetonitrila. A proporção do solvente B foi crescente e nas seguintes proporções, 17% por 2 minutos, 25% por 5 minutos, 35% por 8 minutos e 50% por 5 minutos, em fluxo de 1 mL/ minuto a 25 °C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90 % e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. O cromatógrafo líquido utilizado foi o Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros das agliconas. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra, em base seca.

3.2.4. Determinação do teor de ácido ascórbico (VitaminaC)

As análises do Ácido ascórbico (AA) e do Desidroascórbico (ADHA) foram realizadas segundo PASTERNAK *et al* (2005). As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram homogeneizadas com solução de ácido metafosfórico a 6%

(m/v), em proporção 1:2 ou 1:5 dependendo do fruto. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm, e diluído 1 vez com ácido metafosfórico para a análise do AA e com ditioneitol (DTT) 0,5 M para análise da vitamina C total. O conteúdo de ADHA foi obtido pela diferença entre o conteúdo de vitamina C total e de AA. As amostras foram analisadas em CLAE utilizando coluna 150 mm x 3.6 mm i.d., HP®, NucleoSil 100C18, fase móvel composta por tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico, fluxo de 0,8 mL/minuto. A curva padrão foi feita com padrões de AA de concentrações entre 10 e 100 µg/mL. A detecção foi realizada por UV a 254 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 de amostra, em base seca.

3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

3.2.5.1. Extração

A extração foi realizada em triplicata homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra liofilizada em 20 mL de metanol/água na proporção de 70:30, utilizando-se Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern), por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

3.2.5.2. Descoramento pelo Sistema β-caroteno/ácido linoléico.

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método desenvolvido por MARCO (1968), com pequenas modificações (HASSIMOTTO *et al.*, 2005), através da co-oxidação entre o ácido linoléico e o β-caroteno. Para o preparo da solução reativa, alíquotas de 20 µL de uma solução de β-caroteno (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em clorofórmio

(20 mg/mL) foram misturadas com 0,4 mL de ácido linoléico (Sigma Chemical Co.), 1 mL de clorofórmio e 0,4 mL de Tween 40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado até secagem completa, sob nitrogênio. Após evaporação do clorofórmio, foram adicionados aproximadamente 20 mL de água destilada tratada previamente com oxigênio durante 30 minutos. A solução deve estar límpida e apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7. Para a reação de oxidação, uma alíquota (100 µL) do extrato foi adicionada a 2900 µL da mistura reativa em cubetas de plástico. As amostras foram então submetidas à autooxidação a 50 °C por 2 h. A absorbância da solução a 470 nm foi medida a partir do tempo zero e em intervalos de 15 min utilizando-se Espectrofotômetro Hewlett Packard 8453. Foi utilizado metanol como controle negativo e o antioxidante Trolox (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) como controle positivo. Foram realizadas análises em triplicata para cada extrato. A atividade antioxidante foi calculada pelo desaparecimento relativo do β-caroteno no sistema correlacionando-se com o controle negativo (sem antioxidante), estabelecendo desta maneira a porcentagem de inibição da oxidação, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{470(Ci)} - A_{470(Cf)}) - (A_{470(Ai)} - A_{470(Af)})}{(A_{470(Ci)} - A_{470(Cf)})} \times 100$$

onde $A_{470(Ci)}$ e $A_{470(Cf)}$ referem-se à absorbância inicial e final do controle, e $A_{470(Ai)}$ e $A_{470(Af)}$ referem-se à absorbância inicial e final da amostra. Foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de Trolox e suas respectivas porcentagens de inibição. Os resultados foram expressos como µmoles equivalentes de Trolox/g de amostra, em base seca.

3.2.5.3. Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)

Este ensaio foi realizado de acordo com SINGLETON *et al.* (1999), utilizando-se 0,25 mL dos extratos obtidos em 3.2.3.1 adicionados a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37°C durante 30 min para desenvolvimento de cor. A absorvância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) e o conteúdo de fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de catequina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como mg equivalente de catequina / grama de amostra, em base seca.

3.2.5.4. Seqüestro de radicais livres (DPPH)

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorvância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. Foram efetuadas leituras de absorvância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 25°C.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH} = \frac{A_{517(C)} - A_{517(A)}}{A_{517(C)}} \times 100$$

onde, $A_{517(C)}$ refere-se à absorvância do controle a 517 nm e $A_{517(A)}$ refere-se à absorvância da amostra a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações e suas respectivas porcentagens de descoramento. Os resultados foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/g amostra, em base seca.

3.2.5.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Utilizou-se a metodologia descrita por DÁVALOS e colaboradores (2004), adaptada para leitura em cubetas individuais. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 2 mL. Neste ensaio, 200 μL de amostra foram misturados a 1200 μL de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 70 nM e incubados a uma temperatura constante de 37°C por 15 minutos antes da adição de 600 μL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) a 24 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm_{ex} / 525 nm_{em}) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos em cubeta de quartzo. O tampão fosfato também foi usado para zerar o equipamento. Como controle da reação, adicionou-se 200 μL de metanol à solução de fluoresceína (HUANG *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2001).

O cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área sob a curva (ASC), foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$ASC = 1 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{80}/f_0$$

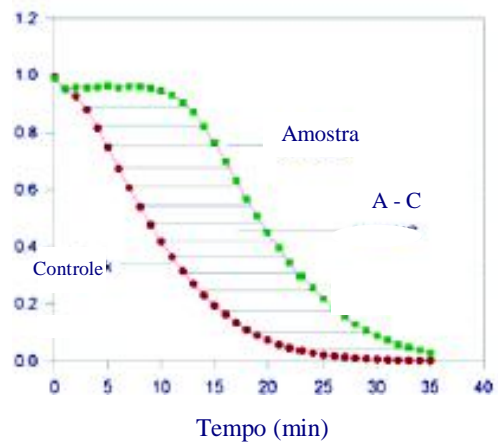
onde f_0 é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos (**Quadro 2**).

Quadro 2. Construção da curva padrão através do cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína.

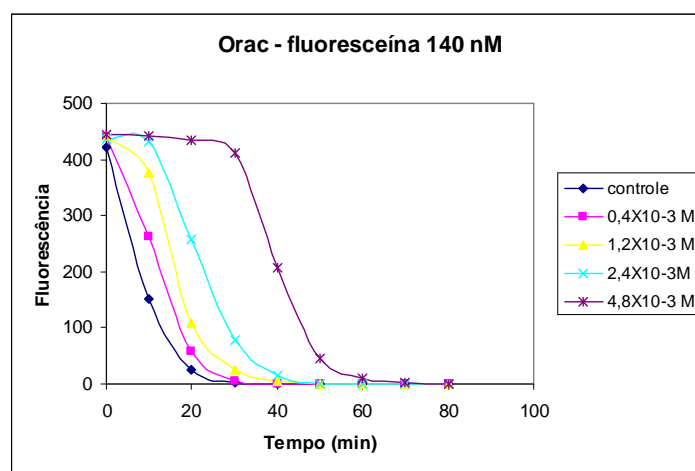
Tempo	Controle	0,4 μM	1,2 μM	2,4 μM	4,8 μM
0	567,4	569,7	574	571,3	579,5
10	470,9	528,3	561,5	588	586,9
20	350,2	443,6	487,3	531,8	582,5
30	208,7	272,9	369,1	400,5	528,7
40	110,1	183,9	231,7	293	432,8
50	56,83	153,8	163,9	203,4	308
60	23,38	78,7	100,7	135,1	201,5
70	8,971	37,38	54,95	88,34	127,8
80	2,975	20,46	37,66	58,06	80,05
ASC	3,1714	4,0174	4,4962	5,0228	5,9150
A - C		0,8460	1,3248	1,8513	2,7436

A - C: A representa a área sob a curva para diferentes concentrações de antioxidante; C representa a área sob a curva para o controle (sem antioxidante).

3A

F
l
u
o
r
e
s
c
ê
n
c
i
a

3B



3C

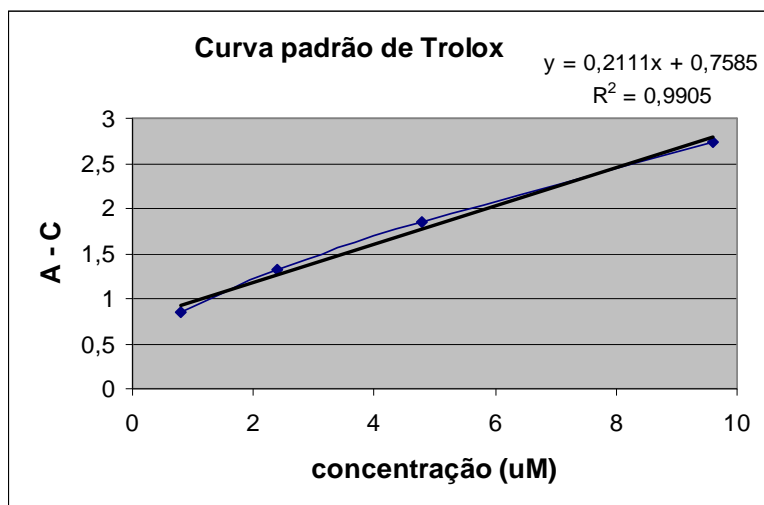


Figura 3. Área de decaimento da amostra em relação ao controle (3A); Perda de fluorescência da fluoresceína na presença do antioxidante Trolox, nas concentrações de 0,4 a 4,8 μM (3B); Curva padrão de Trolox (3C).

Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de trolox, utilizando-se curva padrão de trolox, realizada a cada ensaio, nas concentrações de 0,4 a 4,8 μ M. A área da perda de fluorescência de uma amostra foi calculada subtraindo-se a área correspondente à do controle, representada na **Figura 3**. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de fluorescência, marca HITACHI (Tóquio, Japão) modelo F-3010.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g de amostra, em base seca.

3.2.6. Determinação da atividade inibitória de α -glicosidase

3.2.6.1. Extração

Para a determinação de inibidores de α -glicosidase, utilizou-se dois extratos: o extrato obtido em 3.2.5.1 e a fração de flavonóides do mesmo. Para obtenção da fração de flavonóides, os extratos obtidos conforme o item 3.2.5.1 foram rotaevaporados (Rotaevaporador RE 120 – Büchi) até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuspendido em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa e ressuspendida em 10 mL de metanol.

3.2.6.2. Inibição de α -glicosidase

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por WATANABE *et al.* (1997), com algumas modificações realizadas por KIM *et al.* (2000), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose, liberada na quebra do substrato pela enzima. A enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20, tipo I, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) - 0.7 U / 10 μ g/mL - isolada de fungo, foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo 2 g/L de albumina bovina sérica (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 0,2 g/L de azida sódica (NaN_3). O substrato utilizado na reação foi o p-nitrofenil- α -D-glicosídeo, também dissolvido em tampão fosfato pH 7,0. Para o ensaio, a 100 μ L da solução enzimática foram adicionados 20 μ L de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), e incubados por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 μ L de substrato e, novamente, incubou-se por mais 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorvância a 405 nm no tempo zero e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 37 °C. Os extratos foram diluídos em várias proporções (1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40), em cada análise realizada, de modo a obter linearidade em relação à porcentagem de inibição da amostra.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{405(C)} - A_{405(A)}}{A_{405(C)}} \times 100$$

onde, $A_{405(C)}$ refere-se à absorvância do controle a 405 nm e $A_{405(A)}$ refere-se à absorvância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos tanto em μg de amostra em base seca / mL do meio de reação como em μg equivalentes de catequina / mL do meio de reação necessários para inibir 50 % da produção de glicose, ou IC 50.

3.2.7. Determinação da atividade inibitória de α -amilase

3.2.7.1. Extração

Para a determinação da atividade inibitória de α -amilase, os extratos obtidos conforme o item 3.2.3.1 foram rotaevaporados (Rotaevaporador RE 120 – Büchi) até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuscitado em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa e ressuscitada em 10 mL de metanol.

3.2.7.2. Inibição de α -amilase

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por ALI *et al.* (2006), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α -amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5 % (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M após breve aquecimento. Neste ensaio, 40 μL do extrato, 160 μL de água destilada e 400 μL da

solução de amido 0,5 % foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25 °C por 3 minutos. A reação foi iniciada com adição de 200 µL de solução enzimática em intervalos de tempos diferentes (0, 1, 2 e 3 minutos). Uma alíquota de 200 µL da solução obtida foi retirada e adicionada em outro tubo de ensaio, contendo 100 µL de solução de DNS (96 mM – ácido 3,5-dinitrosalicílico) e levada diretamente para banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 µL de água destilada. A atividade de α -amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O controle positivo da reação representava 100% de atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, usando 40 µL de metanol ao invés de extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada e o procedimento foi realizado da mesma forma como descrito acima. No tempo 0, as amostras foram adicionadas à solução de DNS imediatamente após a adição de enzima.

A produção de maltose foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540} \text{ extrato ou controle} - A_{540} \text{ branco}$$

onde A_{540} representa a absorvância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorvância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose (m/v) gerada pela equação da reta obtida na curva padrão de glicose (0 – 1 mg/mL).

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(\% \text{ maltose produzida pelo extrato no tempo 3 minutos} / \% \text{ maltose produzida pelo controle no tempo 3 minutos}) \times 100]$$

Os resultados obtidos foram expressos tanto em μg de amostra em base seca / mL do meio de reação como em μg equivalentes de catequina / mL do meio de reação necessários para inibir 50 % a formação de maltose.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por ANOVA ($p < 0,05$) e LSD (least significant difference).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização botânica das frutas e polpas comerciais de frutas nativas.

As frutas nativas analisadas neste trabalho são provenientes principalmente de regiões como Amazônia e Cerrado, e foram obtidas na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). As polpas congeladas comerciais de frutas nativas foram obtidas diretamente do produtor. A identificação botânica das frutas estudadas foi realizada seguindo a classificação proposta pelo Sistema APG II (2003) publicado pelo Angiosperm Phylogeny Group (Grupo de Filogenia das Angiospermas) e está apresentada na **Tabela 1**. As famílias mais representadas foram Myrtaceae (quatro frutas e três polpas), Arecaceae (três frutas) e Passifloraceae (duas frutas).

Tanto as frutas quanto as polpas congeladas foram obtidas na mesma época e devidamente amostradas para a realização das análises de caracterização quanto a conteúdo total de fenólicos e determinação da capacidade antioxidante através dos métodos mais citados na literatura científica (DPPH, ORAC, descolorimento do β -caroteno e redução do reagente de Folin-Ciocalteu).

A **Tabela 1** apresenta os valores obtidos para os teores de umidade para as frutas e polpas de frutas nativas. O teor de umidade variou de 38 a 91% para as frutas e de 84 a 91% para as polpas comerciais. Camu-camu e carambola foram as frutas que apresentaram os maiores valores de umidade, e tucumã o menor. Entre as polpas comerciais, cagaita e umbu se destacaram pelos maiores teores, 90 e 91% de umidade respectivamente, e panã e maracujá doce, os menores (cerca de 84%). A **Figura 4** mostra algumas das frutas que foram objeto deste estudo, como buriti, uxi, bacuri, camu-camu, cambuci, araçá-boi, cagaita, graviola, cupuaçu, maracujá doce, maracujá roxo (granadilla), maná-cubiu, tamarindo, entre outras.

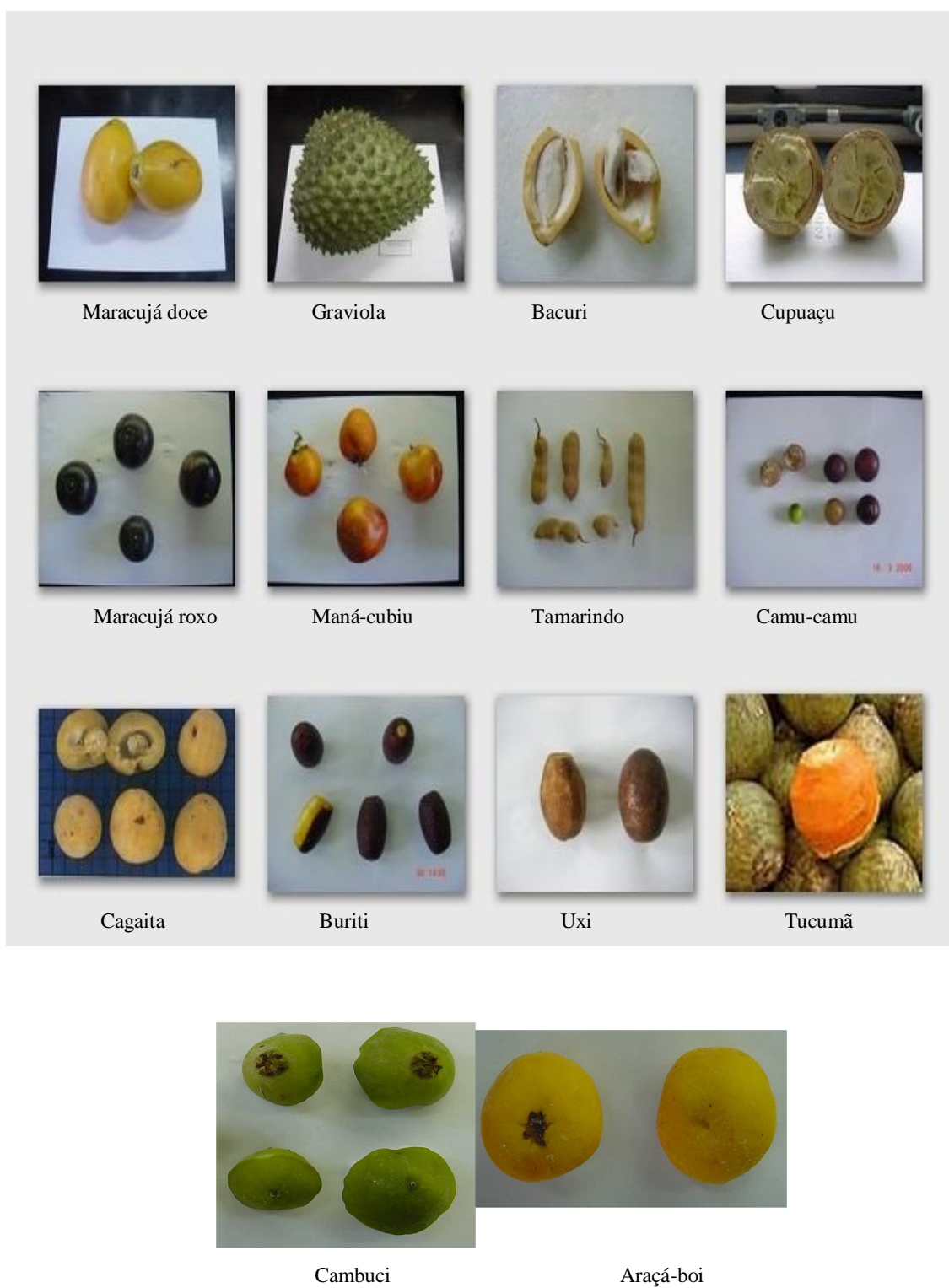


Figura 4. Frutas analisadas neste estudo.

Tabela 1. Identificação botânica e teores de umidade (%) das frutas e polpas comerciais nativas.

	Origem	Família	Nome Científico	Umidade (%)*
Frutas				
Cambuci	Mata atlântica	Myrtaceae	<i>Campomanesia phaea</i> Berg.	87,1 ± 0,4
Araçá-boi	Amazônia	Myrtaceae	<i>Eugenia stipitata</i> Mc. Vaugh	87,9 ± 0,1
Camu-camu	Amazônia	Myrtaceae	<i>Myrciaria dubia</i> Mc. Vaugh	90,2 ± 0,3
Araçá	Mata Atlântica e Amazônia	Myrtaceae	<i>Psidium guineensis</i> Sw.	75,8 ± 0,4
Bacuri	Amazônia	Arecaceae	<i>Scheelea phalerata</i>	83,3 ± 0,3
Buriti	Cerrado	Arecaceae	<i>Mauritia flexuosa</i>	64,2 ± 0,6
Carambola	Ásia	Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i>	91,4 ± 0,8
Cupuaçu	Amazônia	Sterculiaceae	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng) Schum	54,9 ± 0,2
Graviola	América Central e Amazônia	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.	80,5 ± 0,4
Maná-cubiu	Amazônia	Solanaceae	<i>Solanum sessiliflorum</i>	72,1 ± 1,5
Tucumã	Amazônia	Arecaceae	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	37,7 ± 0,4
Uxi	Amazônia	Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i>	49,8 ± 0,7
Abiu	Amazônia	Sapotaceae	<i>Pouteria caimito</i> (Ruiz et Pavon) Radlk.	66 ± 2
Granadilla	América Central	Passifloraceae	<i>Passiflora ligularis</i> Juss	42,9 ± 1,5
Tamarindo	África	Leguminosae	<i>Tamarindus indica</i> L.	38 ± 1
Maracujá doce	América Central e Mata Atlântica	Passifloraceae	<i>Passiflora alata</i> Curtis	71,4 ± 1,0
Polpas comerciais				
Araçá	Mata Atlântica e Amazônia	Myrtaceae	<i>Psidium guineensis</i> Sw.	89 ± 2
Cambuci	Mata Atlântica	Myrtaceae	<i>Campomanesia phaea</i> Berg.	89,6 ± 0,5
Umbu	Cerrado	Anacardiaceae	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	89,8 ± 0,4
Coquinho azedo	Cerrado	Palmaceae	<i>Butia capitata</i> Becc.	87,4 ± 0,3
Panã	Cerrado	Annonaceae	<i>Annona crassifolia</i> Mart.	83,9 ± 0,4
Cagaita	Cerrado	Myrtaceae	<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	91,1 ± 0,1

* Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

5.2. Determinação do teor de ácido ascórbico (Vitamina C)

A identificação de novas fontes de vitamina C na dieta é de grande interesse para a área de ciências da saúde, visto que é um componente essencial às funções fisiológicas do corpo. O teor de ácido ascórbico das frutas e polpas de frutas nativas estudadas encontra-se na **Tabela 2**.

Foi observada uma variação muito ampla no conteúdo de ácido ascórbico, desde níveis não detectáveis como em cambuci, tamarindo e uxi a quantidades extremamente elevadas como em camu-camu.

Muitos estudos têm relatado que as principais fontes de vitamina C da dieta são provenientes de frutas e hortaliças, principalmente de frutas cítricas, kiwi, cereja e melão, cujo conteúdo de ácido ascórbico pode exceder 100 mg/100 g de amostra fresca (DIPLOCK *et al.*, 1998). O conteúdo de ácido ascórbico do camu-camu analisado neste estudo foi cerca de 4 vezes esse valor em base úmida (397 mg/100 g), e deste modo pode ser considerado uma excelente fonte de vitamina C na dieta. Outros estudos reportaram teores ainda maiores de ácido ascórbico em camu-camu, variando desde 1,4 g/100 g a 6,1 g/100 g de fruta fresca (MAEDA *et al.*, 2006; YUYAMA *et al.*, 2002).

As frutas cupuaçu, graviola e araçá-boi também apresentaram teores de ácido ascórbico elevados. SACRAMENTO *et al.* (2003) estudaram três variedades de graviola e encontraram um teor médio de vitamina C de $37,2 \pm 1,5$ mg/100 g de amostra (base seca), menor do que o encontrado neste trabalho.

Dentre as polpas comerciais, coquinho azedo foi a que apresentou maior conteúdo de vitamina C, com valor similar ao de frutas tidas como boas fontes de vitamina C mais comumente consumidas, como laranja, uva, carambola e goiaba vermelha (HASSIMOTTO *et al.*, 2005; AKINWALE, 2000). A polpa de fruta cagaita apresentou

conteúdo de ácido ascórbico similar ao do cupuaçu e mais elevado do que o das outras frutas analisadas neste trabalho.

Tabela 2. Conteúdo de ácido ascórbico total presente nas frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.).

AMOSTRAS	Ácido Ascórbico total
FRUTAS	
Bacuri	19 ± 2
Tucumã	58 ± 4
Cupuaçu	110 ± 7
Graviola	82 ± 3
Buriti	23 ± 1
Uxi	n.d.
Cambuci	n.d.
Araçá	18 ± 2
Tamarindo	n.d.
Maracujá doce	67 ± 5
Granadilla	46 ± 5
Carambola	36 ± 1
Camu-camu	4015 ± 165
Maná-cubiu	36 ± 2
Abiu	60 ± 5
Araçá-boi	78 ± 7
POLPAS	
Panã	32 ± 3
Umbu	24 ± 2
Cagaita	110 ± 2
Coquinho azedo	341 ± 18
Araçá	n.d.
Cambuci	n.d.

n.d. não detectado

A ausência de vitamina C na polpa de fruta araçá pode estar relacionada ao procedimento utilizado na preparação e produção da polpa. Neste estudo, também não foi detectado ácido ascórbico na fruta cambuci, entretanto VALLILO *et al.* (2005) encontraram teor de 33 mg/100 g de amostra fresca. Sabe-se que as variações no conteúdo de ácido ascórbico são decorrentes de diversos fatores ou estresses ambientais durante o plantio, colheita e armazenamento. Dentre eles estão luz, temperatura, sal e estresse hídrico, presença de poluentes, metais e herbicidas (DAVEY *et al.*, 2000). O ácido ascórbico é um composto muito instável e pode ser degradado durante o processamento de frutas por altas temperaturas, íons metálicos e por enzimas naturalmente presentes nas cascas de frutas, na presença de oxigênio. Dessa forma, a quantidade de vitamina C encontrada em frutas frescas pode ser maior do que nas respectivas polpas congeladas comerciais.

5.3. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante das frutas nativas e polpas de frutas comerciais congeladas foi avaliada através de quatro métodos diferentes: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, seqüestro de radicais livres do DPPH, capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e descoramento do β -caroteno. Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**. De modo geral, observa-se que o camu-camu apresentou a maior capacidade antioxidante entre todas as amostras. Além disso, todas as polpas congeladas, com exceção da de umbu, apresentaram alta capacidade antioxidante. Entre as frutas, além do camu-camu também apresentaram boa atividade antioxidante tucumã, uxi e cambuci.

Em relação à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu a do camu-camu foi a maior, cerca de 10 vezes superior à de cambuci, tucumã e uxi, que se destacaram em relação às

demais. As polpas congeladas apresentaram valores de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu similares entre elas, exceto a de umbu que apresentou valor muito baixo.

A capacidade de seqüestro do radical DPPH também foi maior para o camu-camu. As polpas de frutas coquinho azedo, cagaita e araçá apresentaram valores similares e não apresentaram diferenças significativas entre elas.

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2005).

O método de Folin-Ciocalteu não fornece valores exatos do teor de fenólicos, já que outros compostos redutores, como o ácido ascórbico, também reagem com o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico formando o complexo azul de molibdênio (HUONG *et al.*, 2005). Esse fato foi também observado em outro estudo realizado por GENOVESE *et al.* (2003), que verificaram que concentrações de ácido ascórbico acima de 5 μM em extratos vegetais interferem na quantificação de fenólicos totais.

O método do DPPH (2,2-difenil-1, picrilhidrazil) foi primeiramente descrito por BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER e BERSET (1995). Baseia-se na habilidade redutora dos antioxidantes, presentes na amostra, sobre o DPPH•, um radical orgânico estável, através de uma reação de transferência de elétrons, a qual é medida através do decréscimo da absorvância a 517 nm.

Tabela 3. Capacidade antioxidante das frutas e polpas de frutas nativas comerciais através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/g amostra b.s.), DPPH (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.), ORAC (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.) e β -caroteno (μ moles equivalentes de trolox/g amostra b.s.).

AMOSTRAS	Folin Ciocalteu	DPPH	ORAC	β -caroteno
FRUTAS				
Bacuri	8,1 \pm 0,2 ^a	15 \pm 1 ^a	119 \pm 10 ^a	1,66 \pm 0,03 ^a
Tucumã	22 \pm 1 ^b	131 \pm 9 ^b	215 \pm 10 ^b	1,9 \pm 0,1 ^b
Cupuaçu	5,1 \pm 0,2 ^{ac}	19 \pm 1 ^a	110 \pm 3 ^{ac}	0,93 \pm 0,03 ^c
Graviola	8,2 \pm 0,3 ^a	26 \pm 1 ^a	156 \pm 7 ^d	1,21 \pm 0,03 ^d
Buriti	4,8 \pm 0,5 ^a	19 \pm 1 ^a	82 \pm 9 ^e	0,14 \pm 0,01 ^e
Uxi	23 \pm 4 ^b	141 \pm 5 ^b	137 \pm 10 ^{ad}	1,03 \pm 0,02 ^f
Cambuci	29 \pm 3 ^d	139 \pm 6 ^b	103 \pm 7 ^{ae}	8,5 \pm 0,3 ^g
Araçá	10,8 \pm 0,1 ^{ac}	16 \pm 1 ^a	159 \pm 12 ^d	2,62 \pm 0,05 ^h
Tamarindo	7,1 \pm 0,4 ^a	21 \pm 2 ^a	114 \pm 10 ^{ae}	1,07 \pm 0,02 ^f
Maracujá doce	6,2 \pm 0,5 ^a	21 \pm 2 ^a	172 \pm 6 ^d	1,61 \pm 0,06 ^a
Granadilla	4,8 \pm 0,3 ^a	14 \pm 1 ^a	218 \pm 16 ^b	1,04 \pm 0,03 ^f
Carambola	9,6 \pm 0,6 ^a	53 \pm 5 ^c	173 \pm 12 ^d	1,53 \pm 0,07 ⁱ
Camu-camu	288 \pm 9 ^e	1.439 \pm 25 ^d	790 \pm 45 ^f	3,1 \pm 0,2 ^j
Maná-cubiu	8,5 \pm 0,3 ^a	54 \pm 5 ^c	320 \pm 14 ^g	0,43 \pm 0,01 ^k
Abiu	9 \pm 1 ^a	69 \pm 2 ^c	136 \pm 11 ^{ad}	1,41 \pm 0,02 ^l
Araçá-boi	18 \pm 1 ^b	47 \pm 4 ^c	180 \pm 1 ^d	2,68 \pm 0,05 ^h
POLPAS				
Panã	20 \pm 1 ^a	124 \pm 3 ^a	282 \pm 14 ^a	3,2 \pm 0,1 ^a
Umbu	4,0 \pm 0,2 ^b	21 \pm 1 ^b	42 \pm 2 ^b	1,21 \pm 0,04 ^b
Cagaita	24 \pm 2 ^a	151 \pm 3 ^c	455 \pm 31 ^c	2,9 \pm 0,1 ^c
Coquinho azedo	26 \pm 3 ^{ac}	156 \pm 5 ^c	457 \pm 21 ^c	2,5 \pm 0,2 ^c
Araçá	30 \pm 3 ^c	139 \pm 3 ^{ac}	209 \pm 13 ^d	2,5 \pm 0,2 ^c
Cambuci	26 \pm 2 ^{ac}	202 \pm 6 ^d	182 \pm 8 ^d	13,4 \pm 0,2 ^d

n.d. não determinado. Resultados expressos como média \pm desvio-padrão (triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Já o método do β -caroteno determina a capacidade de um antioxidante de proteger um substrato lipídico (no caso, o β -caroteno) da oxidação. Diferentemente do obtido através dos outros três métodos, o camu-camu mostrou uma capacidade antioxidante relativamente baixa através do método de descolorimento do β -caroteno. Isto é devido ao seu elevado conteúdo de ácido ascórbico. Apesar da conhecida capacidade antioxidante do ácido ascórbico, neste método ele possui atividade pró-oxidante, proporcional a sua concentração, pois após doar os dois hidrogênios redutores, origina-se o radical ascorbila, que é um agente oxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; HASSIMOTO *et al.*, 2005). Cambuci, tanto fruta como polpa, destacou-se por apresentar uma capacidade de inibição do descolorimento do β -caroteno significativamente maior que a de todas as outras amostras. Araçá e araçá-boi, que não se mostraram muito eficientes através dos outros métodos, apresentaram valores acima da média.

Ainda na **Tabela 3** estão apresentados os valores de capacidade antioxidante obtidos pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio ou ORAC. Este método foi desenvolvido primeiramente por GLAZER (1988) e modificado por CAO, ALESSIO e CUTLER (1993). Em 1995, o método de ORAC foi semiautomatizado utilizando o sistema COBAS FARA II por CAO e colaboradores (1995). É um método muito sensível e verifica a capacidade seqüestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37°C. Neste ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada com o controle, que não apresenta antioxidante (**Figura 3B**).

O método do ORAC, no entanto, foi recentemente automatizado e requer para tanto um sistema multicanal para a dispensação de reagentes acoplado a um leitor de

fluorescência de microplaca com 96 cavidades, o que torna a análise extremamente cara e possível em apenas poucos laboratórios. Neste estudo, o método foi adaptado para uso manual com leitura em espectrofotômetro de fluorescência simples, e comprovou ser extremamente sensível e passível de ser utilizado em pequenos laboratórios de pesquisa.

Camu-camu e maná-cubiu foram as frutas que apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante através do método de ORAC. Através do teste de correlação, obteve-se um $r = 0,93$, podendo-se afirmar que houve uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante determinada através do método de ORAC e os teores de fenólicos totais. Entre as polpas, coquinho azedo e cagaita se mostraram mais eficientes neste método, entretanto houve baixa correlação entre o método de ORAC e os teores de compostos fenólicos totais para as amostras de polpas de frutas congeladas (**Tabela 4**).

Tabela 4. Coeficientes de correlação (r) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante.

Coeficiente de Correlação (r)	Apenas as frutas	Apenas as polpas	Todas as amostras
Folin Ciocalteu X DPPH	1,00	0,87	0,99
Folin Ciocalteu X ORAC	0,93	0,36	0,79
Folin Ciocalteu X β -caroteno	0,24	0,36	0,12
DPPH X ORAC	0,93	0,53	0,82
DPPH X β -caroteno	0,21	0,11	0,14
ORAC X β -caroteno	0,10	0,05	0,08

De modo geral, houve uma correlação significativa entre os valores de capacidade antioxidante determinados pelos métodos de Folin Ciocalteu, DPPH e ORAC. A alta correlação entre Folin-Ciocalteu e DPPH se deve principalmente ao fato dos dois estarem baseados em mecanismos de ação semelhantes, ou seja, na transferência de elétrons. Já o método de ORAC se baseia na transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante para

o radical AAPH (PRIOR *et al.*, 2005). Entretanto, os resultados obtidos através do método de descoloramento do β -caroteno não mostraram correlação significativa com os obtidos por estes três métodos. Apesar deste método também estar baseado na transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante para os radicais livres formados, esta reação ocorre em meio lipofílico, e isto pode afetar significativamente a atuação dos antioxidantes presentes nas amostras.

WANG, CAO e PRIOR (1996) determinaram a capacidade antioxidante através do método do ORAC de 12 diferentes frutos e encontraram elevada correlação entre os valores de capacidade antioxidante e os teores dos compostos fenólicos. Estes ainda relataram que a contribuição da vitamina C na capacidade antioxidante total de frutas, determinada através do ORAC, era menor que 15%. WANG e LIN (2000) também encontraram correlação positiva entre os valores de capacidade antioxidante determinados pelo método do ORAC e o teor total de fenólicos para amora-preta, framboesa e morango. Isto porque frutas ricas em antocianinas se destacam por apresentar valores elevados de capacidade antioxidante (HASSIMOTTO *et al.*, 2005).

PINTO *et al.* (2008) avaliaram a capacidade antioxidante de sete cultivares de morango cultivados no Brasil, conhecidos por sua alta eficiência devido ao elevado conteúdo de antocianinas. Quando comparados às frutas estudadas neste trabalho, verificam-se valores similares de seqüestro de DPPH e redução do Folin-Ciocalteu para uxi, tucumã, cambuci, e para as polpas cambuci, coquinho azedo e cagaita. Estes resultados mostram, portanto, o alto potencial das frutas nativas como fontes de compostos antioxidantes.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007) publicou como parte do Programa Nacional de Análise de Alimentos e Nutrientes (National Food and Nutrient Analysis Program – NFNAP) valores de ORAC de frutas, castanhas e vegetais. Os valores de ORAC obtidos para maçã, suco de romã, pêssego, figo, goiaba e tangerina foram muito próximos aos valores de ORAC obtidos para as frutas analisadas neste

trabalho. Os valores de ORAC para as polpas de frutas coquinho azedo e cagaita foram semelhantes às frutas framboesa, morango e cereja. Camu-camu, a fruta que obteve o maior valor de ORAC, apresentou atividade antioxidante neste método semelhante às frutas limão, ameixa, *cranberry* (*Vaccinium* subgênero *Cyanococcus*) e *blueberry* (*Vaccinium* subgênero *Oxycoccus*).

5.4. Determinação de flavonóides

A composição e o teor de flavonóides presentes nas frutas e polpas de frutas nativas foram determinados por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (**Tabela 5**). Os flavonóides são normalmente encontrados como derivados glicosilados. Neste estudo, os teores foram expressos em concentração equivalente das respectivas agliconas, por serem os compostos que realmente teriam significado biológico. Observou-se que os teores de flavonóides variaram significativamente, principalmente entre as frutas. Dentre os flavanóis, catequina e epicatequina foram detectados em apenas três frutas, tucumã, graviola e carambola, sendo que os teores de catequina variaram entre 16 e 79 mg/100 g de amostra (b.s.).

Quercetina e caempferol são os representantes mais comuns dos flavanóis, uma subclasse importante do grupo dos flavonóides. A quercetina e seus derivados glicosilados são encontrados em abundância em cebolas, maçãs, brócolis e bagas (AHERNE e O'BRIEN, 2002; HERTOOG *et al.*, 1993;). Neste estudo, quercetina e seus derivados foram detectados em todas as polpas de frutas e em algumas frutas. Os teores mais elevados foram encontrados em araçá e camu-camu, 40 e 42 mg/100 g de amostra (b.s.), respectivamente.

Diferentemente de seus frutos, as polpas de cambuci e araçá apresentaram baixos teores destes compostos. Segundo ARABBI *et al.* (2004), os teores de flavonóides em

frutas podem variar em até 100% entre um semestre e outro, sendo estes influenciados por fatores extrínsecos tais como as condições climáticas, época de plantio e colheita e grau de maturidade dos frutos. Além da variação do conteúdo da própria fruta, podem também ocorrer perdas durante o processamento das polpas, o que explicaria as diferenças encontradas.

Tabela 5. Composição e teor de flavonóides e ácidos hidróxicinâmicos presentes nas frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.).

	Flavanóis		Flavonóis		Antocianinas	Ácidos hidróxicinâmicos
	Catequina	Epicatequina	Quercetina	Caempferol	Cianidina	
Frutas						
Cambuci	n.d.	n.d.	21,6 ± 0,3 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	n.d.	n.d.
Araçá-boi	n.d.	n.d.	14,4 ± 0,2 ^b	2,5 ± 0,1 ^b	n.d.	n.d.
Camu-camu	n.d.	n.d.	42 ± 4 ^c	2,1 ± 0,1 ^b	306 ± 10	n.d.
Araçá	n.d.	n.d.	40 ± 2 ^c	0,7 ± 0,1 ^a	n.d.	n.d.
Maná-cubiu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	239 ± 11 ^a
Tucumã	79 ± 5 ^a	n.d.	2,96 ± 0,05 ^d	n.d.	n.d.	n.d.
Buriti	n.d.	n.d.	0,6 ± 0,1 ^e	n.d.	n.d.	9,0 ± 0,4 ^b
Abiu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19 ± 1 ^c
Carambola	22 ± 2 ^b	36 ± 2 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Graviola	15,9 ± 0,3 ^b	15 ± 1 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bacuri	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cupuaçu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Uxi	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tamarindo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Granadilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maracujá doce	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Polpas comerciais						
Araçá	n.d.	n.d.	4,3 ± 0,2 ^d	n.d.	n.d.	n.d.
Cambuci	n.d.	n.d.	4,0 ± 0,1 ^d	n.d.	n.d.	n.d.
Umbu	n.d.	n.d.	9,4 ± 0,5 ^e	n.d.	n.d.	0,2 ± 0,1 ^d
Coquinho	n.d.	n.d.	26 ± 2 ^a	n.d.	n.d.	1,9 ± 0,1 ^e
Panã	n.d.	n.d.	4,1 ± 0,2 ^d	4,4 ± 0,2 ^b	n.d.	n.d.
Cagaita	n.d.	n.d.	27 ± 1 ^f	0,9 ± 0,1 ^a	n.d.	n.d.

n.d. não detectado. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O caempferol foi detectado em baixas concentrações nas frutas cambuci, araçá-boi, camu-camu e araçá, variando de 0,2 a 2,5 mg/100 g de amostra (b.s.), e em apenas duas polpas de frutas, sendo que panã foi a que apresentou maior concentração, de 4,4 mg/100 g de amostra (b.s.).

ARABBI *et al.* (2004) quantificaram os flavonóides presentes em frutas e hortaliças comumente consumidas no Brasil. Eles observaram que as maiores fontes de flavonóides da dieta brasileira eram laranja, alface e tomate e foi estimada uma ingestão de 60 a 106 mg/pessoa/dia. Entretanto, não há informação disponível sobre a composição de flavonóides das frutas e polpas de frutas nativas estudadas neste trabalho, o que possibilitará a estimativa da ingestão de flavonóides para populações regionais.

Dentre todas as amostras analisadas, apenas em camu-camu foi detectado teor elevado de antocianinas (306 mg/100 g de amostra b.s.), como derivados de cianidina. Em seu estado maduro, esta fruta apresenta cor que varia do vermelho ao roxo, como resultado da presença de antocianinas em sua casca.

ZANATTA *et al.* (2005) determinaram os teores de antocianinas presentes no camu-camu de duas regiões diferentes do Brasil, e notaram uma variação de 337 a 606 mg/100 g b.s., sendo que as principais antocianinas identificadas, através de CLAE-PDA, CLAE-MS e RMN, foram derivados de cianidina.

O termo ácido clorogênico é usado para designar uma família de ésteres formados pelas diferentes conjugações entre alguns ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico o mais comumente encontrado. O ácido clorogênico é considerado o composto fenólico mais abundante na dieta humana e as principais fontes destes compostos são frutas, café, hortaliças, tubérculos, cereais e especiarias (CLIFFORD, 1999). Estudos biológicos mostraram elevada capacidade antioxidante e propriedades anticarcinogênicas *in vitro* do ácido clorogênico (CLIFFORD, 2004). Entre as frutas, maná-cubiu, a única representante da família Solanaceae, foi a que apresentou

maior teor de ácidos hidroxicinâmicos (239 mg/100 g b.s.), mas estes também foram detectados em buriti e abiu. Entre as polpas de frutas, apenas em umbu e coquinho azedo estes compostos foram detectados, em níveis muito baixos. Alguns estudos mostram que a família Solanaceae apresenta quantidade elevada de ácidos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico (BROWN, 2005; LEWIS *et al.*, 1998; MALMBERG e THEANDER, 1985).

5.5. Determinação de ácido elágico livre e total

Os teores de ácido elágico livre e total das frutas e polpas de frutas nativas brasileiras, determinados por Cromatografia líquida de Alta eficiência, encontram-se na **Tabela 6**. Sabe-se que os teores de ácido elágico livre em frutas são significativamente baixos, entretanto quantidades mais elevadas destes compostos são detectadas após hidrólise ácida dos extratos, resultante da liberação a partir dos elagitaninos (BEATTIE *et al.*, 2005). A **Tabela 6** confirma que a maior parte do ácido elágico é proveniente dos elagitaninos, visto que o conteúdo de ácido elágico livre é relativamente pequeno quando comparado com o valor total após hidrólise. Este fato é de extrema importância dada a insolubilidade em água do composto livre, o que deve ser levado em conta na sua extração e quantificação.

Tabela 6. Teores de ácido elágico livre e total das frutas e polpas de frutas nativas (mg/100 g de amostra b.s.).

AMOSTRAS	Ácido elágico livre	Ácido elágico total	% total*
FRUTAS			
Bacuri	n.d.	n.d.	n.d.
Tucumã	n.d.	n.d.	n.d.
Cupuaçu	n.d.	n.d.	n.d.
Graviola	n.d.	n.d.	n.d.
Buriti	n.d.	n.d.	n.d.
Uxi	n.d.	n.d.	n.d.
Cambuci	2,5 ± 0,1 ^a	240 ± 15 ^a	1,0
Araçá	7,4 ± 0,4 ^b	262 ± 12 ^a	2,8
Tamarindo	n.d.	n.d.	n.d.
Maracujá doce	n.d.	n.d.	n.d.
Granadilla	n.d.	n.d.	n.d.
Carambola	n.d.	n.d.	n.d.
Camu-camu	16 ± 1 ^c	490 ± 20 ^b	3,3
Maná-cubiu	n.d.	n.d.	n.d.
Abiu	n.d.	n.d.	n.d.
Araçá-boi	n.d.	n.d.	n.d.
POLPAS			
Panã	n.d.	n.d.	n.d.
Umbu	0,9 ± 0,1 ^a	314 ± 20 ^a	0,3
Cagaita	5 ± 1 ^b	289 ± 24 ^{ab}	1,7
Coquinho azedo	n.d.	n.d.	n.d.
Araçá	7,1 ± 0,4 ^b	218 ± 18 ^b	3,2
Cambuci	12,8 ± 0,5 ^c	512 ± 35 ^c	2,5

n.d. não detectado. * % de ácido elágico livre em relação a quantidade total.

O ácido elágico foi detectado apenas em umbu, camu-camu, cagaita, araçá e cambuci. O conteúdo de ácido elágico livre variou de 0,9 a 16 mg/100 g de amostra seca, representando de 0,3 a 3% do total, respectivamente. A forma livre pode estar naturalmente presente com os elagitaninos no tecido vegetal, ou no caso dos alimentos industrializados como sucos e geléias, pode ser formada pela hidrólise dos elagitaninos durante o processamento (BEATTIE *et al.*, 2005).

Não foi encontrada correlação significativa entre os teores de ácido elágico e a capacidade antioxidante. Houve correlação positiva apenas entre os teores de ácido elágico e os teores de fenólicos totais ($r = 0,91$).

Na dieta brasileira, o morango e seus derivados tais como geléias e sucos representam as principais fontes de ácido elágico. PINTO *et al.* (2008) analisaram sete cultivares de morango consumidos no Brasil e relataram valores que variaram de 150 a 430 mg/100 g de amostra seca.

ABE *et al.* (2007) analisaram frutas nativas do Brasil e relataram teores de ácido elágico mais elevados do que os encontrados neste trabalho, principalmente entre os membros da família Myrtaceae. Jabuticaba, grumixama e cambuci foram as frutas que apresentaram os maiores teores de ácido elágico, comparáveis aos de frutas vermelhas, como framboesa e amora-preta, ricas neste composto.

DANIEL *et al.* (1989) analisaram diferentes frutas em relação ao teor de ácido elágico total e relataram valores que variaram de <10 mg/100 g de amostra seca para o kiwi (*Actinidia chinensis*) a 150 mg/100 g de amostra seca para framboesa (*Rubus idaeus*).

Grande parte dos estudos relacionados com biodisponibilidade e metabolismo de ácido elágico e elagitaninos são realizados com sucos de romã, frutas vermelhas e nozes, pois o consumo destes produtos é bastante comum nos países mediterrâneos e norte-

americanos. Os resultados obtidos aqui neste trabalho mostram que, assim como as frutas vermelhas, algumas frutas nativas também são boas fontes de ácido elágico na dieta.

5.6. Determinação da atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase *in vitro*

A exposição prolongada a níveis elevados de glicose após as refeições tem um impacto adverso sobre as células e tecidos. A hiperglicemia pós-prandial pode causar danos às células β , responsáveis pela produção e liberação de insulina, contribuindo para uma diminuição progressiva da secreção deste hormônio (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

A possibilidade de uso clínico dos inibidores de α -glicosidase para pacientes diabéticos ou obesos tem sido testada com uso efetivo de duas classes de antihiperglicemiantes orais: acarbose e miglitol. Ambos auxiliam na redução da hiperglicemia pós-prandial por retardar a degradação enzimática de carboidratos no intestino delgado, através da inibição da α -glicosidase, com conseqüente redução da absorção intestinal de glicose (WANNMACHER, 2005; KIM, *et al.*, 2000).

O principal objetivo na busca por drogas hipoglicemiantes é descobrir um agente eficiente que seja seguro e que não apresente efeitos colaterais. Uma grande parte dos estudos relatados na literatura mostra uma busca contínua de novas alternativas para o tratamento efetivo da diabete. Os compostos bioativos presentes nos alimentos podem influenciar em processos biológicos através de efeitos antioxidantes diretos ou indiretos, através das vias de sinalização, com o propósito de proteger a célula do dano oxidativo (PRIOR *et al.*, 2007). Muitas espécies de plantas e compostos purificados de plantas têm sido experimentalmente estudados e usados na redução dos níveis de glicose pós-prandial (GROVER *et al.*, 2002; MARLES e FARNSWORTH, 1994). Com a finalidade de avaliar o potencial das frutas nativas nesse sentido, procedeu-se à determinação da atividade

inibitória de α -glicosidase e α -amilase de extratos e frações semi-purificadas ricas em flavonóides.

5.6.1. Atividade inibitória de α -amilase

Entre os vegetais que já foram estudados, uvas vermelhas, pimentão verde, brócolis, gengibre e cenoura apresentaram alta inibição de α -amilase *in vitro* (MCCUE *et al.*, 2005). Entre as frutas cujo potencial hipoglicemiante foi estudado, morango e framboesa se mostraram boas inibidoras de α -amilase *in vitro* (MCDOUGALL *et al.*, 2005).

Poucos estudos relatam a atividade inibitória de α -amilase de frutas ou seus compostos bioativos. TADERA *et al.* (2006) mostraram que os flavonóides quercetina, miricetina, epigalocatequina galato e cianidina são bons inibidores de α -amilase. Outra classe de compostos estudada por ser potente inibidora de α -amilase são os taninos. Estes constituintes ativos estão presentes nos chás verde e preto, uvas, vinho, framboesa e morango. A remoção dos componentes inibitórios dos extratos por Sephadex LH-20 sugere que os inibidores de α -amilase são os taninos hidrolisáveis (MULLEN *et al.*, 2003; GAL *et al.*, 2001).

Na **Tabela 7** encontram-se os resultados referentes à atividade inibitória de α -amilase das frações concentradas em compostos flavonóides, obtidas através de extração em fase sólida em coluna de poliamida.

Tabela 7. Atividade inibitória de α -amilase de extratos purificados em poliamida obtidos a partir das frutas e polpas de frutas nativas.

AMOSTRAS	IC₅₀ (mg amostra b.s./mL reação)	IC₅₀ (mg EC*/mL reação)
FRUTAS		
Bacuri	n.d.	n.d.
Tucumã	2,9	0,6
Cupuaçu	1,1	0,3
Graviola	9,1	0,9
Buriti	4,6	1,8
Uxi	n.d.	n.d.
Cambuci	1,0	0,4
Araçá	6,8	0,5
Tamarindo	6,3	1,0
Maracujá doce	4,4	0,7
Granadilla	4,6	0,7
Carambola	2,4	0,4
Camu-camu	4,1	1,8
Maná-cubiu	n.d.	n.d.
Abiu	n.d.	n.d.
Araçá-boi	3,3	2,9
POLPAS		
Panã	1,3	0,7
Umbu	n.d.	n.d.
Cagaita	3,8	0,3
Coquinho azedo	7,2	3,8
Araçá	5,9	1,2
Cambuci	0,8	0,7

n.d. - não detectado. * mg equivalentes de catequina.

Não foi possível avaliar a atividade inibitória de α -amilase dos extratos metanólicos brutos, já que os açúcares redutores presentes, glicose e frutose, também reagem com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e desta forma interferem na determinação. Isto se deve ao fato de que, neste ensaio, a atividade da α -amilase é avaliada através da formação de maltose resultante da ação desta enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação α 1,4), reduz o DNS formando um produto de cor característica cuja absorvância máxima é determinada a 540 nm. Dessa forma, os açúcares, vitaminas e minerais eventualmente presentes nos extratos brutos foram eliminados e uma fração metanólica rica em flavonóides foi obtida através da passagem em coluna de poliamida.

Os resultados foram expressos tanto em massa de amostra como de equivalentes de catequina necessários para inibir 50% da α -amilase presente. Em relação às frutas, cambuci e cupuaçu se destacaram pela alta atividade inibitória de α -amilase, assim como as polpas de cambuci e panã. Por outro lado, nenhuma inibição foi observada para as frutas bacuri, uxi, maná-cubiu e abiu e para a polpa de umbu.

Em relação à eficiência dos compostos fenólicos em inibir α -amilase (IC_{50} expresso em mg equivalente de catequina), a ordem encontrada foi cupuaçu = polpa de cagaita > cambuci = carambola > araçá > tucumã > maracujá doce = granadilla = polpa de panã = polpa de cambuci. Estes resultados mostram que a atividade inibitória de α -amilase não depende apenas da presença de flavonóides, já que outros compostos fenólicos presentes em cupuaçu, maracujá doce e granadilla também apresentaram inibição significativa. Por outro lado, o alto teor de ácidos hidroxicinâmicos do maná-cubiu (239 mg/100 g b.s.) não inibiu a atividade da α -amilase. Já os elevados teores de flavanóis observados em tucumã, carambola e graviola parecem estar diretamente relacionados à capacidade inibitória de α -amilase, enquanto que o mesmo não ocorre para quercetina.

O camu-camu, por sua vez, apesar do elevado conteúdo de antocianinas e quercetina, não se mostrou eficiente, reforçando a hipótese de que o tipo de flavonóide presente exerce grande influência nesta propriedade.

5.6.2. Atividade inibitória de α -glicosidase

A **Tabela 8** mostra a atividade inibitória de α -glicosidase de extratos metanólicos e frações concentradas em flavonóides das frutas e polpas de frutas analisadas neste trabalho. Neste ensaio não houve interferência de açúcares presentes nas frutas e polpas de frutas, já que este se baseia na ação da α -glicosidase sobre um substrato sintético, *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo, que ao ser hidrolisado libera o cromóforo *p*-nitrofenil. Entretanto, com o objetivo de avaliar a eficiência dos flavonóides presentes nestas frutas, foi utilizado o mesmo extrato, purificado em poliamida, analisado no ensaio de atividade inibitória de α -amilase.

Ao contrário do observado para a α -amilase, os extratos purificados em poliamida (e também os brutos) obtidos a partir de bacuri e uxi inibiram significativamente a α -glicosidase.

Os extratos purificados em poliamida obtidos a partir das frutas cambuci e araçá foram os mais efetivos na inibição de α -glicosidase, e dentre as polpas de frutas ambos os extratos obtidos a partir de cagaita e cambuci foram os mais eficientes. Os compostos fenólicos destas frutas também foram os mais eficientes na inibição de α -glicosidase, como se pode observar pelos valores de IC_{50} expressos em equivalentes de catequina/mL de reação.

Tabela 8. Atividade inibitória de α -glicosidase de extratos metanólico e purificado em poliamida obtidos a partir das frutas e polpas de frutas nativas.

AMOSTRAS	Extrato metanólico		Extrato purificado em poliamida	
	IC ₅₀ (mg amostra b.s./mL reação)	IC ₅₀ (mg EC*/mL reação)	IC ₅₀ (mg amostra b.s./mL reação)	IC ₅₀ (mg EC*/mL reação)
FRUTAS				
Bacuri	0,5	1,6	6,2	2,6
Tucumã	1,2	5,9	1,7	1,3
Cupuaçu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Graviola	n.d.	n.d.	2,7	1,8
Buriti	1,9	1,8	2,7	1,1
Uxi	0,5	2,3	3,2	1,9
Cambuci	0,3	1,3	0,6	0,4
Araçá	1,0	2,4	0,6	0,2
Tamarindo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maracujá doce	3,5	5,1	n.d.	n.d.
Granadilla	2,1	2,2	n.d.	n.d.
Carambola	2,0	4,5	3,1	2,7
Camu-camu	1,3	73,1	3,3	2,9
Maná-cubiu	3,1	6,0	n.d.	n.d.
Abiu	n.d.	n.d.	2,5	0,9
Araçá-boi	0,6	2,4	2,4	1,4
POLPAS				
Panã	1,3	5,8	1,8	1,6
Umbu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cagaita	0,5	1,0	1,0	0,9
Coquinho azedo	1,2	5,9	3,4	5,0
Araçá	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cambuci	0,2	0,9	0,7	0,8

n.d. - não detectada; * mg equivalentes de catequina.

Conforme anteriormente apresentado, cambuci e araçá apresentaram alto conteúdo de quercetina, assim como araçá-boi e camu-camu, que, no entanto, não se destacaram na inibição de α -glicosidase.

Cupuaçu, que apresentou excelente atividade inibitória de α -amilase, não demonstrou a mesma eficácia na inibição de α -glicosidase.

Não foi detectada atividade inibitória de α -glicosidase para as frutas maracujá-doce, granadilla e maná-cubiu após a purificação do extrato em poliamida. A eficiência dos compostos fenólicos presentes nos extratos brutos foi em geral baixa, o que poderia estar associado à ausência de flavonóides. Os ácidos hidroxicinâmicos presentes no maná-cubiu não inibiram a α -glicosidase, similar ao observado para a α -amilase.

Tabela 9. Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase de compostos puros.

Composto puro	Atividade Inibitória de α -glicosidase	Atividade Inibitória de α -amilase
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Acarbose	5,9	n.d.
Rutina	1,3	1,2
Quercetina	0,1	0,9
Ácido clorogênico	7,6	3,9
Catequina	3,1	2,1
Ácido elágico	3,3	2,0
Ácido rosmarínico	n.d.	1,4

n.d. não detectado.

Além das frutas e polpas, foi testada também a atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase de alguns compostos puros (**Tabela 9**), como rutina, quercetina, ácido clorogênico e catequina, os quais estão presentes em algumas amostras. Dentre eles, quercetina foi o composto que apresentou maior atividade inibitória, tanto para α -

glicosidase quanto α -amilase. Outro composto testado foi a acarbose, um inibidor de α -glicosidase sintetizado a partir de fermentação fúngica, utilizado tradicionalmente no tratamento de pacientes diabéticos. Quando comparada aos compostos fenólicos, a acarbose só foi mais eficiente do que o ácido clorogênico na inibição de α -glicosidase. O ácido clorogênico, dentre todos os compostos testados, foi o menos eficiente em inibir α -glicosidase e α -amilase, explicando os resultados obtidos para frutas maná-cubiu e abiu, que apresentam altos teores deste composto em sua composição.

Dentre as polpas de frutas, cagaita e cambuci foram as que apresentaram maior atividade inibitória de α -glicosidase. Quercetina é o flavonóide presente nestas polpas e poderia estar relacionado com tal atividade. No entanto, a polpa de coquinho azedo, cujo conteúdo de quercetina foi 6 vezes maior que a de cambuci, foi a que apresentou menor atividade inibitória de α -glicosidase. Neste sentido, é importante observar que a rutina (quercetina-3-rutinosídeo) apresenta uma atividade inibitória dessas enzimas significativamente menor que a da aglicona (**Tabela 9**). Como nas frutas a quercetina está presente na forma de derivados glicosilados, provavelmente a inibição observada ocorre em função do tipo de açúcar e da posição da glicosilação.

TADERA *et al.* (2006) verificaram a atividade inibitória de α -glicosidase de fungos e α -amilase pancreática de alguns flavonóides, dentre eles, quercetina, caempferol, catequina e antocianina. Os compostos que foram mais eficazes na inibição de α -glicosidase foram miricetina, epigallocatequina galato (EGCG) e cianidina. Eles descreveram um aumento considerável na atividade inibitória desta enzima pelos flavonóides com o aumento do número de hidroxilas ligadas ao anel B.

APOSTOLIDIS *et al.* (2006) avaliaram a atividade inibitória de α -glicosidase de iogurtes a base de leite e soja enriquecidos com frutas e encontraram alta correlação desta com o conteúdo de fenólicos totais. Eles observaram que os iogurtes enriquecidos com

blueberries (*Vaccinium* subgênero *Cyanococcus*) foram os que apresentaram maior teor de fenólicos totais e foram os mais efetivos em inibir α -glicosidase.

Em outro estudo, MCCUE *et al.* (2005) verificaram que uva vermelha e canela também apresentaram elevado potencial antioxidante e alta atividade inibitória de α -glicosidase, devido ao alto conteúdo de fenólicos totais. Entretanto, este mesmo estudo mostrou que os extratos com a mais alta atividade antioxidante foram mais eficientes em inibir α -amilase do que α -glicosidase.

Poucos são os relatos encontrados sobre a atuação de flavonóides purificados sobre estas enzimas. KIM *et al.* (2000) avaliaram a eficácia de 21 compostos na inibição de α -glicosidase e α -amilase, dentre eles a quercetina, hesperidina, luteolina, rutina e um derivado glicosilado de caempferol. A luteolina aglicona foi o composto mais eficaz na inibição de α -glicosidase. O estudo relatou que alguns compostos glicosilados, como rutina, podem se ligar à α -glicosidase e aumentar a atividade desta enzima, sendo considerados, portanto, ineficazes na inibição da mesma. Entretanto, as flavonas luteolina e luteolina 7-O-glicosídeo e o derivado glicosilado de caempferol foram os mais eficazes em inibir a α -amilase.

Em resumo, embora os resultados indiquem que os compostos fenólicos presentes nas frutas são os responsáveis pela inibição destas enzimas, não foi possível estabelecer uma correlação com o tipo e a quantidade de flavonóides presentes. Deve-se considerar, ainda, que tanto a glicosilação como os possíveis efeitos sinérgicos e/ou antagonistas entre eles podem estar implicados nos resultados encontrados.

6. CONCLUSÕES

Entre as frutas e polpas de frutas analisadas, camu-camu, cupuaçu, coquinho azedo e cagaita mostraram-se excelentes fontes de vitamina C, com conteúdos similares ou maiores aos das frutas tradicionalmente conhecidas como fontes desse nutriente na dieta.

Camu-camu, cambuci, uxi e tucumã e as polpas de cambuci, cagaita, coquinho azedo e araçá foram as amostras que apresentaram melhor capacidade antioxidante com resultados semelhantes aos de frutas ricas em antocianinas com alto potencial antioxidante como o morango. Cambuci (fruta e polpa) foi a amostra que inibiu mais eficientemente o descoramento do β -caroteno. A polpa de umbu e as frutas cupuaçu, buriti, bacuri, graviola, tamarindo, maracujá-doce, granadilla, carambola e abiu não se destacaram por sua capacidade antioxidante.

Os principais flavonóides encontrados nestas frutas foram quercetina em camu-camu, araçá e cagaita, catequina em tucumã e catequina e epicatequina em carambola. As antocianinas foram detectadas apenas em camu-camu. Os derivados de ácidos hidroxicinâmicos também foram identificados, sendo em maná-cubiu o conteúdo mais elevado, porém estes compostos não apresentaram atividade inibitória de α -amilase ou glicosidase. Teores elevados de ácido elágico foram detectados em cambuci e camu-camu. Os extratos capazes de inibir a α -amilase não necessariamente inibiram a α -glicosidase e vice-versa.

Em suma, este trabalho mostrou que as frutas nativas brasileiras também podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos, apresentando, portanto, potenciais efeitos benéficos sobre a saúde humana e justificando a ampliação dos estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC (1995). **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists. 16ed., Washington, DC., 1995.
- AKINWALE, T.O. Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. **European Food Research and Technology**, v. 221 (3), p.205-207, 2000.
- AL-AZZAWIE, H.F.; ALHAMDANI, M-S.S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v.76, p.1371-1377, 2006.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 449-455, 2006.
- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V.U. **As frutas silvestres brasileiras**. 2ed. Rio de Janeiro: Publicações Globo Rural, 1988.
- APG II. Angiosperm Phylogeny Group. **Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 [and more or less continuously updated since]**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
Acesso em: 28 de setembro de 2007.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I; SHETTY, K. Potential of select yogurts for diabetes and hypertension management, **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p. 699-717, 2006.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

- BARRET, R. L. DEL C.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Choque a frio e atmosfera modificada no aumento da vida pós-colheita de tomates: 2- Coloração e textura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, n.14, p. 14-26, 1994.
- BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potential health benefits of berries. **Current Nutrition & Food Science**, v. 1, p. 71-86, 2005.
- BENDICH, A., LANGSETH, L. The health effects of vitamin C supplementation, a review. **Journal American College Nutrition**, v.14, p.124-136, 1995.
- BISCHOFF, H. Pharmacology of α -glucosidase inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24 (3), p.3-10, 1994.
- BORS, W.; BUETTNER, G.R. The vitamin C radical and its reactions in Vitamin C. In **Health and Disease**, ed. by L. Packer and J. Fuchs, Marcel Dekker, Inc., New York, Chapter 4, p. 75-94. 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT, Food Science and Technology**, v. 28(1), p. 25-30, 1995.
- BROWN, C.R. Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research*, v. 82 (2), p. 163-172, 2005.
- BRYANS, J.A.; JUDD, P.A.; ELLIS, P.R. The Effect of Consuming Instant Black Tea on Postprandial Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Healthy Humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26 (5), p. 471-477, 2007.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.E. 1996. **The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12th ed. New Jersey: Merck and Co., Inc. 1741p.

- BUENO, S. M.; LOPES, M.R.V; GRACIANO, R.A.S.; FERNANDES, E.C.B; GARCIA-CRUZ, C.H. Avaliação da qualidade de Polpas de Frutas Congeladas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62 (2), p. 121-126, 2002.
- BUETTNER, G.R.; SCHAFER, F;Q. Ascorbate (vitamin C) its antioxidant chemistry. **Oxygen Society of Education Program**, p.1-20, 1997.
- BUETTNER, G.R., SCHAFER, F.Q. Ascorbate as an antioxidant. In. **Vitamin C: functions and biochemistry in animals and plants**. ASARD, H., MAY, J.M.; SMIRNOFF, N., Eds. BIOS Scientific Publishers: London, UK, p.173, 2004.
- CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p.303-311, 1993.
- CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B.; WANG, H.; PRIOR, R.L. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 1738-1744, 1995.
- CAVALCANTI, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. Editora Cejup, 1991.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Planta Medica**, v. 70 (3), p. 1103-1114, 2004.
- CLIFFORD, M.N. Diet-Derived Phenols in Plasma and Tissues and their Implications for Health **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79 (3), p. 362-372, 1999.
- CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1118-1125, 2000.

- DANIEL, E.M.; KRUPNICK, A.S.; HEUR, Y.H.; BLINZLER, J.A.; NIMS, R.W.; STONER, G.D. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, p. 338-349, 1989.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance (ORAC) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DAVEY, M.W.; MONTAGU, M. V.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80 (7), p. 825-860, 2000.
- DEVASAGAYAM, T.P.A; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radical and antioxidant in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, 2004.
- DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINÃ-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80 (1), p.77–112, 1998.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26 (2), p. 446-452, 2006.

- FRANCO, M.R.B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 86, p. 6377-6381, 1989.
- GAL, J.Y.; FOVET, Y. ADIB-YADZI, M. About a synthetic saliva for *in vitro* studies, **Talanta**, v.53, p. 1103-1115, 2001.
- GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, p. 67-69, 2003.
- GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals and Targets of Chronic Disease. In: **Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W.R., OMAJE, S.T, MESKIN, M.S., JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. **Chemistry**, v. 53, p. 1370 -1373, 2005.
- GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n.11, p.1106-1114, 2000.
- GLAZER, A.N. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. **FASEB Journal**, v. 2, p.2487-2491, 1988.
- GONZALO, J.C.R.; ALONSO, M.G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación, Nutrición y Salud**, v.9, n.2, p.31-38, 2002.

- GROVER, J.K.; YAVAD, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 81-100, 2002.
- GULLAND, J.C., LEQUEU, B. **As vitaminas do nutriente ao medicamento**. São Paulo: Santos, 1995. 375p.
- HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.
- HALLIWELL, B. Oxidative Stress, Nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v.25, n.1, p. 57-74, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C .In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAM, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusion, wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1242-1246, 1993.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic of flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 2379-2383, 1992.

- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.453-464, 2004.
- KIM, J-S.; KWON, C-S., SON, K-H. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64 , n.11, p. 2458-2461, 2000.
- KWON, Y.I.; VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Clonal herbs of *Laminaceae* species against diabetes and hypertension. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, p. 424-432, 2006.
- LANGSETH, L. Antioxidants and their effect on health. In: SCHMIDL, M.K.; LABUZA, T.P. **Essential of functional foods**. Maryland: Aspen Publication, 2000. p.303-317.
- LEWIS, C.E.; WALKER, J.R.L.; LANCASTER, J.E.; SUTTON, K.H. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I. Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77 (1), p. 45-57, 1998.
- MAEDA, R.N.; PANTOJA , L.; YUYAMA, L.K.O; CHAAR, J.M. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* Mcvaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26 (1), p. 70-74, 2006.
- MALES, R.; FARNSWORTH, N. Plants as sources of antidiabetic agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. **Economic and Medicinal Plant Research**, v. 6, p. 149-187, 1994.

- MALMBERG, A.G.; THEANDER, O. Determination of Chlorogenic Acid in Potato Tubers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p. 549-551, 1985.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.45, p. 594-598, 1968.
- MARCUS, R., COULSTON, A.M. Vitaminas hidrossolúveis. In: GILMAN, A.G., ROLL, T.W., NIES, A.S. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1991. p.1017-1032.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.50 (1), p. 5-18, 2000.
- MATSUI, T.; UEDA, T.; OKI, T.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K.; α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1952-1956, 2001.
- MCCARTER, J.D.; WITHERS, S.J. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4 (6), p.885-892, 1994.
- MCCUE, P.; KWON, Y-I.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 278-294, 2005.
- MCDOUGALL, G.J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v. 23 (4), p. 189-195, 2005.
- MCDOUGALL, G.J.; SHPIRO, F.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2760-2766.

- MCGREGOR, G.P; BIESALSKI, H.K. Rationale and impact of vitamin C in clinical nutrition. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care**, v. 9, p. 697- 703, 2006.
- MILLER, H.E. A simplified method for evaluation of antioxidants **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 48, p.91, 1971.
- MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M.E.J.; MACLEAN, M.R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; YOKOTA, T.; CROZIER, A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5191-5196, 2002.
- MUNIZ, M.B.; QUEIROZ, J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; DUARTE, M.E.M. Caracterização termofísica de polpas de bacuri. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26 (2), p. 360-368, 2006.
- NARAYANAN, B.A.; GEOFFROY, O.; WILLINGHAM, M.C.; RE, G.G.; NIXON, D.W. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Letters**, v. 136, p. 215-221, 1999.
- NORDBERG J., ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p. 1287 - 1312, 2001.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4629, 2001.

- PANNALA, A.S., CHAN, S.I.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282 (5), p. 1161-1168, 2001.
- PASTERNAK, T., POTTERS, G., CAUBERGS, R., Complementary interaction between oxidative stress and auxin control plant growth responses at plant, organ and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 418, 2005.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107 (4), p. 1629-1635, 2008.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 4290-4302, 2005.
- PRIOR, R.L.; GU, L.; WU, X.; JACOB, R.A.; SOTOUDEH, G.; KADER, A.A.; COOK, R.A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter *in vivo* antioxidant status. **Journal of the American College of Nutrition**, v.26 (2), p.170-181, 2007.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; HARTMANN-SCHMIDLIN, S., KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.; OKSMAN-RANGKADILOK, K.M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 991-1000, 2005.
- RATTER, J.A.; RIBEIRO J. F.; BRIDGEWATER S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

- RIBEIRO, E.P; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Editora Edgar Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004, 184p.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RODRIGUES, R.B.; MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M.; REYNES, M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Fruits**, v.56 (5), p. 345–354, 2001.
- ROLO, A.P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.212, p. 167-178, 2006.
- SACRAMENTO, C.K.; FARIA, J.C.; CRUZ, F.L.;BARRETTO, W.S.; GASPAR, J.W.; LEITE, J.B.V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25 (2), p. 329-331, 2003.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.45, p. 287-306, 2005.
- SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567- 579, 2007.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press, p. 403-427, 2004.

- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, 299, p. 152-178, 1999.
- SONG, Y.; MANSON, J. E.; BURING, J. E., SESSO, H. D.; LIU, S. Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross-Sectional Analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24 (5), p. 376-384, 2005.
- SOUZA FILHO, M.S.M., LIMA, J.R., NASSU, R.T., BORGES, M.F., MOURA, C.F.H.. Avaliação físico-química e sensorial de frutas nativas da região Norte e Nordeste do Brasil: estudo exploratório. **Brazilian Journal of Food Technology** v.5, p. 139-143, 2002.
- STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruits, and cancer prevention: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96 (10), p. 1027-1039, 1996.
- TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 149-153, 2006.
- TOELLER, M. Alpha glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24 (3), p.31-35, 1994.
- USDA – United States Department of Agriculture, 2007. **Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods – 2007**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866/> Acesso em: 07 de dezembro de 2007.

- VALKON, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.;
TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and
human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.
39, p. 44- 84, 2007.
- VALLILO, M.I.; GARBELOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L.C.A.
Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia
phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27 (2), p. 241-244, 2005.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of
Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.
- WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry
and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of
Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 140-146, 2000.
- WANNMACHER, L. Uso racional de medicamentos – **Antidiabéticos orais:
comparação entre diferentes intervenções**. Disponível em:
http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_URM_ADO_1005.pdf/
Acesso em 10 de novembro de 2007.
- WATANABE, J.; KAWABATA, J.; KURIHARA, H.; NIKI, R. Isolation and
identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. **Bioscience,
Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 177-178, 1997.
- WHITLEY, A.C.; STONER, G.D.; DARBY, M.V.; WALLE, T. Intestinal epithelial cell
accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid – extensive binding to
protein and DNA. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 907-915, 2003.

WHO – World Health Organization, 1999. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/publications/en/>
Acesso em: 19 de novembro de 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE,R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36 (7), p. 838-849, 2004.

YAMAMOTO,M.; YAMATO, E.; SHU-ICHI,T.; TASHIRO,F.; IKEGAMI, H.; YODOI, J.; MIYAZAKI, J. Transgenic Expression of Antioxidant Protein Thioredoxin in Pancreatic β Cells Prevents Progression of Type 2 Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10 (1), p. 43-50, 2008.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, v. 32 (1), p. 169-174, 2002.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from camu–camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC–PDA, HPLC-MS and NMR. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, p. 9531–9535, 2005.

8. ANEXOS

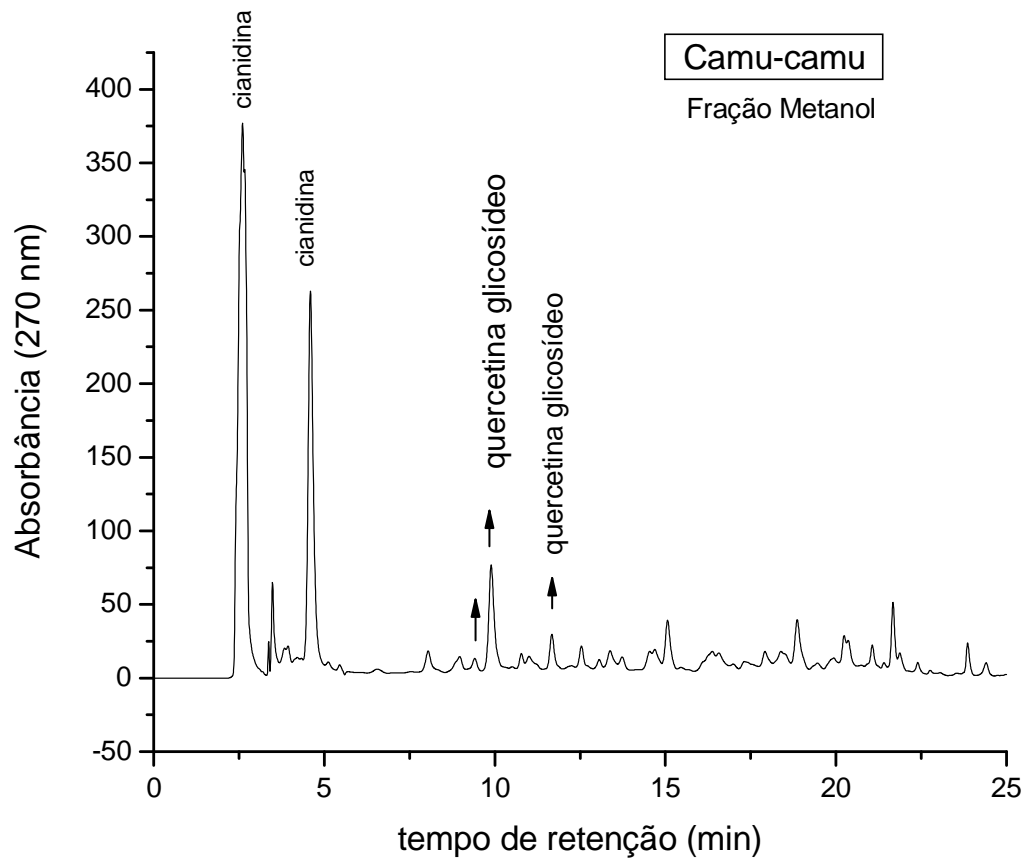


Figura A-1. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica de camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) através da detecção a 270 nm.

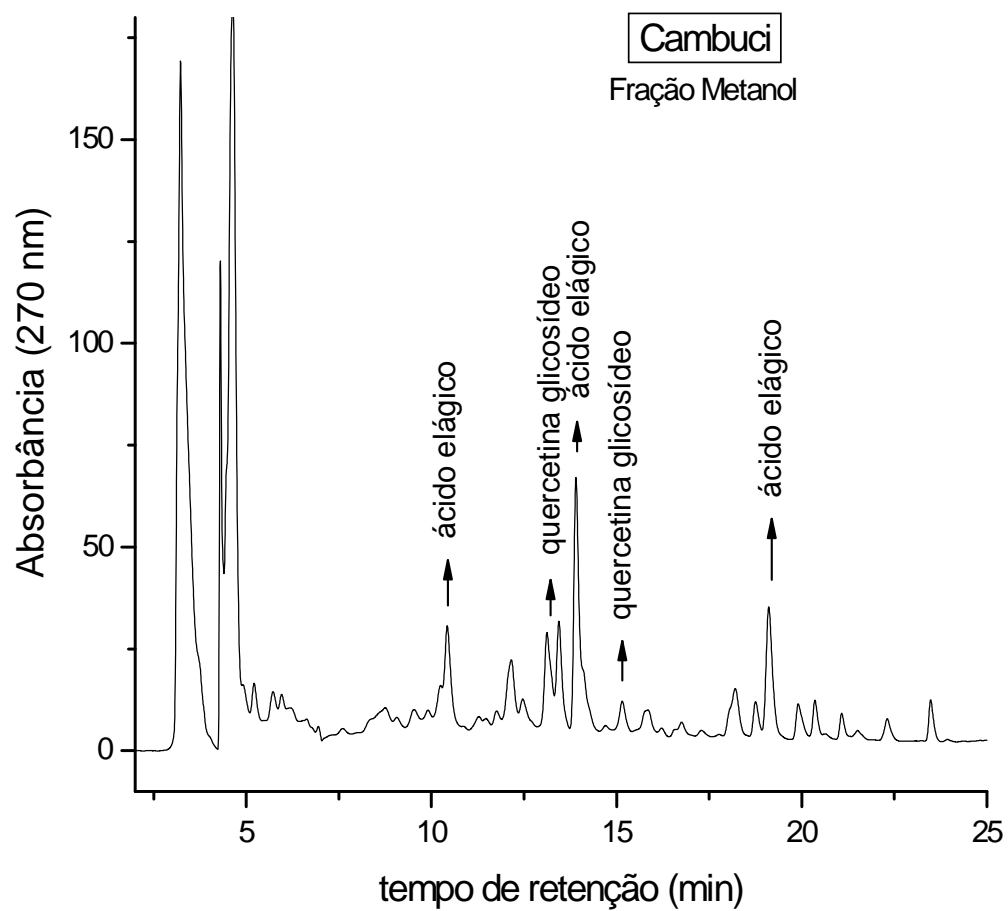


Figura A-2. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica de cambuci (*Campomanesia phae* Berg.) através da detecção a 270 nm.

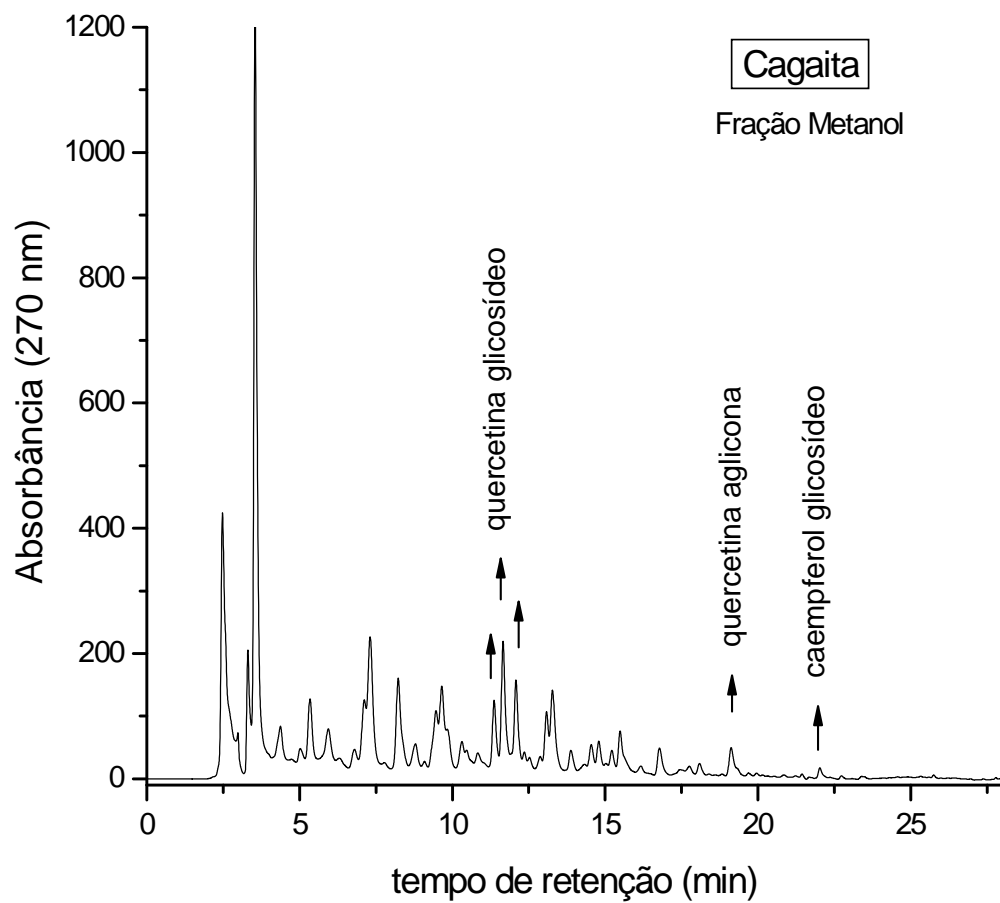


Figura A-3. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica de cagaita (*Eugenia dysenterica* D.C.) através da detecção a 270 nm.