

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Elaine Cristina de Oliveira Braga

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DOS FRUTOS DE
DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Rio de Janeiro

2016

Elaine Cristina de O. Braga

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DOS FRUTOS DE
DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Dissertação de Mestrado- Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.
Orientador: Prof. D.Sc. Alexandre Porte.
Co-orientadora: D.Sc. Renata Galhardo Borguini.

Rio de Janeiro

2016

B813 Braga, Elaine Cristina de O.
Caracterização química de substâncias bioativas dos frutos de duas espécies do gênero *Eugenia* / Elaine Cristina de O. Braga, 2016.
113 f. ; 30 cm

Orientador: Alexandre Porte.

Coorientador: Renata Galhardo Borguini.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1. Compostos bioativos. 2. Myrtaceae. 3. Carotenóides.
4. Flavonoides. 5. Antocianinas. 6. Compostos fenólicos. 7. Ácido Ascóbico. I. Porte, Alexandre. II. Borguini, Renata Galhardo.
III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição.
IV. Título.

CDD – 613.28

Elaine Cristina de Oliveira Braga

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DOS FRUTOS DE
DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Alimentos e Nutrição da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

D.Sc. Alexandre Porte.

PPGAN -Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

D.Sc. Sidney Pacheco.

Embrapa Agroindústria de Alimentos.

D.Sc. Otniel Freitas.

PPGAN- Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO/ Embrapa
Agroindústria de Alimentos.

Dedico este trabalho aos meus pais, meus heróis, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu Senhor e Salvador, por sempre estar ao meu lado me abençoando e por ter dado toda a força para vencer mais uma etapa em minha vida.

À minha família por todo apoio incondicional ao longo da minha vida. Por sempre terem apoiado as minhas decisões e por todo carinho e força que dedicaram a mim quando eu mais precisei.

Ao professor D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy por todo apoio e por confiar no meu trabalho, e por todos os ensinamentos ao longo desses dois anos. Muito obrigada por tudo!

Aos meus orientadores, D.Sc. Renata Borguini e professor D.Sc. Alexandre Porte, pela dedicação, carinho e paciência. Obrigada por ter confiado no meu potencial, pelas conversas, pelas orientações tanto no trabalho como na vida, pelo tempo dedicado e pela amizade durante a construção desse trabalho.

À equipe do laboratório de Cromatografia Líquida: ao analista D.Sc. Sidney Pacheco pelo vasto conhecimento e atenção com os alunos, por sempre estar disposto a sanar dúvidas, ajudar e incentivar os alunos. Pelas brincadeiras e pela amizade construída ao longo desses anos de convívio. À analista D.Sc. Manuela Santiago e a técnica Luzimar do Nascimento pela paciência, pelas broncas, por sempre estarem dispostas a ajudar e principalmente pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo. Obrigada por dividir experiências tanto profissionais como de vida. Obrigada por tudo. Não tem como descrever o quanto sou grata a toda equipe do laboratório de Cromatografia Líquida!

Aos meus queridos “Embrapianos”: Karen Mazza, Beatriz Luna, Igor Julião, Alessandra Duarte, Jéssica Rocha, Amanda Martins, Yasmim Ferreira e Diego Gonçalves. Obrigada pelos incentivos, pelo carinho, pelas brincadeiras, sorrisos e abraços. Vocês fizeram os meus dias na Embrapa os mais felizes possíveis.

A “doutora” Carolina Passos pela amizade, carinho e ajuda prestada na construção desse trabalho e por ser um exemplo de pessoa.

Ao meu amigo Vítor de Carvalho pelo companheirismo, carinho, compreensão e principalmente pela paciência nos meus momentos difíceis, que foram muitos, mas sempre estive disposto a me ouvir e ajudar, e por compartilhar comigo momentos bons e ruins ao longo desses anos. Obrigada pela sua amizade! E a todos que de algum modo ajudaram na construção desse trabalho, meu carinho e agradecimento!

“Não canso,não desisto de lutar. Ainda assim tropeço, só uma coisa importa.”

Rosa de Saron.

BRAGA, E.C.O. **Caracterização química de substâncias bioativas dos frutos de duas espécies do gênero *Eugenia***. 2016. 113 páginas. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Alimentos e Nutrição). Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, 2016.

RESUMO

A família *Myrtaceae* constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas existente no Brasil e é amplamente empregada na medicina popular brasileira. Algumas espécies já foram estudadas e tiveram sua composição química e propriedades medicinais descritas na literatura. Além disso, as mirtáceas possuem um grande potencial econômico, devido algumas de suas espécies frutíferas serem exploradas comercialmente e já apresentam estudos avaliando a presença de substâncias com ação antioxidante em suas matrizes, denominadas de compostos bioativos que são substâncias oriundas do metabolismo secundário dos vegetais, possuindo um papel relevante na qualidade dos alimentos, contribuindo para a redução do risco de doenças crônicas não degenerativas. É neste contexto que o presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o perfil de compostos bioativos nos frutos de *Eugenia puniceifolia* Kuth DC e *Eugenia astringens* Cambess com a finalidade de promover o conhecimento do potencial nutritivo dos frutos da biodiversidade brasileira. Para isto, os frutos maduros foram coletados na Restinga da Marambaia, localizada no Município do Rio de Janeiro e na Restinga de Maricá, localizada no Município de Maricá-RJ. As análises de açúcares e compostos bioativos foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os teores encontrados de açúcares ($11,17 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), de ácido ascórbico ($74,14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), carotenoides totais ($632,00 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) e licopeno ($503,00 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) nos frutos de *Eugenia puniceifolia* Kunth DC foram superiores aos encontrados em outros frutos considerados ricos nessas substâncias. Em relação aos frutos de *Eugenia astringens* Cambess, os teores encontrados dessas substâncias foram mais baixos. Entretanto, o fruto apresentou um teor elevado de ácido gálico ($4,52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e antocianinas ($1504,10 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) quando comparado a outros frutos considerados fontes. Portanto, a caracterização química desses dois frutos, ainda pouco explorados cientificamente, possibilitou o conhecimento de novas fontes de substâncias bioativas (licopeno da *Eugenia puniceifolia* e antocianinas da *Eugenia astringens*), os quais possuem importantes propriedades nutricionais e funcionais, destacando a importância dos frutos da biodiversidade brasileira.

Palavras chaves: *Myrtaceae*, carotenoides, flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos e ácido ascórbico.

BRAGA, E.C.O. Chemical characterization of bioactive compounds of fruits of two species of the genus *Eugenia*. 2016. 113 pages. Dissertation (master degree in foods Nutrition Academic). Graduate program in foods and nutrition, Federal University of Rio de Janeiro State (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, 2016.

ABSTRACT

The *Myrtaceae* family is one of the most important families of flowering plants that exists in Brazil and is widely used in Brazilian folk medicine. Some species have already been studied and had their chemical composition and medicinal properties described in the literature. In addition, the *Myrtaceae* family has a great economic potential, because some of its species fruit are explored commercially and have studies evaluating the presence of substances with antioxidant action in its headquarters, called bioactive compounds which are substances from the secondary metabolism of plants, having an important role in food quality, contributing to reducing the risk of no degenerative chronic diseases. It is in this context that the present work aimed to chemically characterize the profile of bioactive compounds in fruits of *Eugenia puniceifolia* Kuth DC and *Eugenia astringens* Cambess with the purpose of promoting the knowledge of the nutritional fruit potential of Brazilian biodiversity. For this, the mature fruits were collected in the Restinga da Marambaia, located in the municipality of Rio de Janeiro and in the Restinga de Maricá, located in the municipality of Maricá-RJ. Analyses of sugars and bioactive compounds have been carried out by high-performance liquid chromatography. The levels found of sugars (11.17 mg.100 g⁻¹), ascorbic acid (74.14 mg.100 g⁻¹), total carotenoids (632.00 µg. g⁻¹) and lycopene (503.00 µg.g⁻¹) in fruit of *Eugenia puniceifolia* DC were superior to Kunth found in other fruits considered rich in these substances. In relation to fruits found fruits of *Eugenia astringens* Cambess, the levels found of these substances have been lower. However, the result showed a high content of Gallic acid (4.52 mg.g⁻¹) and anthocyanins (1504.1 mg.100 g⁻¹) when compared to other fruits considered sources of these substances. Therefore, the chemical characterization of these two fruits, yet little explored scientifically, made possible a knowledge of new sources of bioactive compounds (lycopene from *Eugenia puniceifolia* and anthocyanins of *Eugenia astringens*), which have important nutritional and functional properties, highlighting the importance of the fruits of Brazilian biodiversity.

Keywords: *Myrtaceae*, carotenoids, flavonoids, anthocyanins, phenolic acids and ascorbic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Características de <i>Eugenia punicifolia</i> Kunth DC	20
Figura 2: Característica da <i>Eugenia astringens</i> Cambess	22
Figura 3: Ciclo biossintético de formação dos metabólitos secundários.....	25
Figura 4: Estrutura química do ácido ascórbico e seus isômeros	26
Figura 5: Propriedade ácida do ácido ascórbico.....	27
Figura 6: Oxidação do ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico.....	27
Figura 7: Biossíntese de uma molécula de carotenoide.....	29
Figura 8: Estruturas químicas dos principais carotenoides encontrados em alimentos.....	30
Figura 9: Esquema da conversão dos carotenoides em vitamina A	31
Figura 10: Esquema de formação do licopeno	32
Figura 11: Ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico	34
Figura 12: Esquema básico de formação de um flavonoide.....	36
Figura 13: Estrutura química das principais subclasses de flavonoides em alimentos	37
Figura 14: Estrutura química do cátion flavílico	38
Figura 15: Representação do equilíbrio das antocianinas em meio aquoso	39
Figura 16: Estruturas químicas das principais antocianidinas encontradas em alimentos	40
Figura 17: Esquema básico de um cromatógrafo líquido	42
Figura 18: Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas	44
Figura 19: Pó obtido do fruto de <i>E. astringens</i>	53
Figura 20: Coleta manual dos extratos antociânicos	55
Figura 21: Cartucho Sep-Pack para concentração dos extratos antociânicos.....	55
Figura 22: Cromatograma de açúcares da parte comestível (A) e semente (B) de <i>E. punicifolia</i>	60
Figura 23: Cromatograma de açúcares da parte comestível (A) e semente (B) de <i>E. astringens</i>	61
Figura 24: Estruturas dos açúcares encontrados nos frutos de <i>E. punicifolia</i> e <i>E. astringens</i> .	62
Figura 25: Cromatograma da vitamina C na parte comestível (A) e semente (B) de <i>E. punicifolia</i>	64
Figura 26: Cromatograma da análise de vitamina C na semente (A) e na parte comestível (B) de <i>E. astringens</i>	64
Figura 27: Cromatograma do padrão analítico comercial de ácido ascórbico	65

Figura 28: Cromatograma do extrato de carotenoides à 450 nm da parte comestível do fruto de <i>E. puniceifolia</i> antes (A) e após a saponificação (B) e espectros de absorção no UV/ Vis (C)	68
Figura 29: Estruturas químicas dos carotenoides presentes na parte comestível do fruto de <i>E. puniceifolia</i>	69
Figura 30: Separação das antocianinas dos carotenoides do fruto de <i>E. astringens</i> através de partição água: éter.....	70
Figura 31: Cromatograma do extrato de carotenoides da parte comestível de <i>E. astringens</i> antes (A) e após saponificação (B) e espectros de absorção no UV/ Vis.....	71
Figura 32: Cromatograma e espectros de UV/ Vis de ácidos fenólicos na parte comestível do fruto de <i>E. puniceifolia</i> : fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).....	74
Figura 33: Cromatograma e espectros de UV/ Vis de ácidos fenólicos na semente do fruto de <i>E.puniceifolia</i> : fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).....	75
Figura 34: Cromatograma e espectros de UV/Vis de ácidos fenólicos na parte comestível do fruto de <i>E. astringens</i> : fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).....	78
Figura 35: Cromatograma e espectros de UV/Vis de ácidos fenólicos na semente do fruto de <i>E. astringens</i> : fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).....	79
Figura 36: Estruturas dos ácidos fenólicos identificados nos frutos de <i>E. puniceifolia</i> e <i>E. astringens</i>	80
Figura 37: Cromatograma e espectro de UV/Vis de flavonoides presentes na parte comestível do fruto de <i>E. puniceifolia</i>	84
Figura 38: Cromatograma e espectro de UV/Vis de flavonoides na parte comestível de <i>E. astringens</i>	84
Figura 39: Flavonoides na semente de <i>E. astringens</i>	84
Figura 40: Cromatograma do extrato de antocianinas e espectro de UV/Vis da parte comestível de <i>E. puniceifolia</i> e espectros de UV/ Visível.	85
Figura 41: Espectros de massas das antocianinas presentes no fruto de <i>E. puniceifolia</i>	86
Figura 42: Sobreposição do perfil cromatográfico de antocianinas do fruto de <i>E. puniceifolia</i> e jabuticaba.....	87
Figura 43: Cromatograma do extrato de antocianinas à 520 nm da polpa+ casca de <i>E. astringens</i>	88
Figura 44: Estrutura química das antocianinas encontradas no perfil do fruto de <i>E.puniceifolia</i> e <i>E. astringens</i>	89
Figura 45: Espectros de massas das antocianinas presentes no fruto de <i>E. astringens</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sinonímia da Espécie <i>Eugenia punicifolia</i> Kunth DC	21
Tabela 2: Sinonímia da Espécie <i>Eugenia astringens</i> Cambess.	23
Tabela 3: Exemplos de cores de carotenoides encontrados na natureza	28
Tabela 4: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos ácidos fenólicos.....	51
Tabela 5: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos flavonoides	52
Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel para separação das antocianinas	54
Tabela 7: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos carotenoides	58
Tabela 8: Teor de umidade da parte comestível, semente e fruto integral das duas espécies ..	59
Tabela 9: Teores médios de açúcares e desvio padrão no fruto de <i>E. punicifolia</i>	60
Tabela 10: Teores médios de açúcares e desvio padrão no fruto de <i>E. astringens</i>	61
Tabela 11: Média dos teores de ácido ascórbico e desvio padrão no fruto de <i>E. punicifolia</i> ...	63
Tabela 12: Média dos teores de ácido ascórbico e desvio padrão no fruto de <i>E. astringens</i> ...	63
Tabela 13: Teor de carotenoides e desvio padrão na polpa+casca dos frutos de <i>E. punicifolia</i>	66
Tabela 14: Teor de ácidos fenólicos, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) da parte comestível e da semente dos frutos de <i>E. punicifolia</i>	76
Tabela 15: Teor de ácidos fenólicos, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) da parte comestível e da semente dos frutos de <i>E. astringens</i>	81
Tabela 16: Teor de antocianinas na parte comestível liofilizada, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) dos frutos de <i>E. punicifolia</i> (mg.100 g ⁻¹).....	87
Tabela 17: Teor de antocianinas e desvio padrão da parte comestível liofilizada, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) dos frutos de <i>E. astringens</i> em mg.100 g ⁻¹	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência.

CLUE- Cromatografia líquida de ultra eficiência.

INCA- Instituto Nacional do Câncer.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

APA- Área de proteção ambiental.

°C - graus Celsius

A - absorvância

BHT - Antioxidante di-*terc*-butil metil fenol

C₁₈ - Fase estacionária reversa octadecilsilano

C₃₀ - Fase estacionária reversa com estrutura alifática de 30 carbonos ligada ao grupamento silanol

CL - Cromatografia líquida

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

cm - Unidade de comprimento: centímetro

D.Sc. - Doutor em ciências

DAD – detector de arranjo de fotodiodos.

PDA- photodiode array detector.

FE - fase estacionária

FM - fase móvel

g - unidade de massa: grama

µg. g⁻¹ - Unidade de concentração : micrograma por cem gramas.

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

HCl - Ácido clorídrico.

M - Unidade de concentração molar: mol.L⁻¹.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L - Unidade de volume: litro

m - Unidade de comprimento: metro.

mg.100 g⁻¹ - Unidade de concentração: miligrama por grama.

mL - Unidade de volume: mililitro

mL.h⁻¹ - Unidade de fluxo: mililitros por hora.

mL.min⁻¹ - Unidade de fluxo: mililitros por minuto

mm - Unidade de comprimento: milímetro

N_2 - Gás nitrogênio

NaOH - Hidróxido de sódio

HCl- ácido clorídrico

Água MilliQ®- água ultrapura.

H_2SO_4 - ácido sulfúrico.

nm - Unidade de comprimento: nanômetro

PA - Grau de pureza de produtos químicos: para análise

UV-Vis - ultravioleta e visível

v - volume

v/v - volume por volume

μL - Unidade de volume: microlitro

μm - Unidade de comprimento: micrometros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3.	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1.	FAMÍLIA <i>MYRTACEAE</i>	17
3.2.	CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA	19
3.2.1.	<i>Eugenia puniceifolia</i> Kunth DC	19
3.2.2.	<i>Eugenia astringens</i> Cambess	22
3.3.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	23
3.3.1.	Açúcares.....	24
3.3.2.	Ácido ascórbico	25
3.3.3.	Carotenoides	27
3.3.3.1.	<i>Carotenoides precursores de vitamina A</i>	31
3.3.3.2.	<i>Licopeno</i>	32
3.3.4.	Compostos fenólicos.....	33
3.3.4.1.	<i>Ácidos fenólicos</i>	34
3.3.4.2.	<i>Flavonoides</i>	35
3.3.4.2.1.	<i>Antocianinas</i>	37
3.4.	A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	40
3.4.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
3.5.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1.	MATERIAL.....	46
4.1.1.	Solventes e reagentes	46
4.1.2.	Equipamentos.....	47
4.2.	PARTE EXPERIMENTAL	48
4.2.1.	Procedência dos frutos	48
4.2.2.	Preparo das amostras.....	48
4.3.	MÉTODOS	48
4.3.1.	Análise de umidade.....	48
4.3.2.	Análise de açúcares por CLAE	49

4.3.2.1.	<i>Extração de açúcares e análise de açúcares</i>	49
4.3.3.	Análise de ácido ascórbico por CLAE	50
4.3.3.1.	<i>Extração e análise de ácido ascórbico</i>	50
4.3.4.	Análise de ácidos fenólicos por CLAE	50
4.3.4.1.	<i>Extração e análise de ácidos fenólicos</i>	50
4.3.5.	Análise de flavonoides por CLAE	52
4.3.5.1.	<i>Extração e análise de flavonoides</i>	52
4.3.5.2.	<i>Extração e análise de antocianinas</i>	52
4.3.5.3.	<i>Coleta e concentração das antocianinas isoladas</i>	54
4.3.5.4.	<i>Identificação das antocianinas por espectrometria de massas</i>	55
4.3.6.	Análise de carotenoides por CLAE	56
4.3.6.1.	<i>Extração e análise de carotenoides</i>	56
4.3.6.2.	<i>Reação de saponificação</i>	57
4.3.6.3.	<i>Método cromatográfico para carotenoides</i>	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1.	UMIDADE	59
5.2.	AÇÚCARES	59
5.3.	ÁCIDO ASCÓRBICO(VITAMINA C)	62
5.4.	CAROTENOIDES TOTAIS E PERFIL	65
5.5.	ÁCIDOS FENÓLICOS	72
5.6.	FLAVONOIDES	82
5.6.1.	Antocianinas	85
6.	CONCLUSÃO	93
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que se destaca por sua vasta extensão territorial e condições climáticas diferenciadas, garantindo uma grande diversidade de espécies que compõem a sua flora. Dentre elas, encontra-se o gênero *Eugenia*, pertencente à família *Myrtaceae*, uma das mais importantes famílias frutíferas. Essa família se encontra distribuída principalmente na Mata Atlântica, podendo ser encontrada em áreas do ecossistema restinga, que são áreas de proteção ambiental.

Ao certo, não se sabe o número real de potenciais espécies presentes nessas áreas e poderá nunca ser conhecido. Entretanto, algumas espécies desse gênero vêm sendo incorporadas, principalmente, na alimentação humana, por serem frutíferas e bastante apreciadas, como por exemplo a jabuticaba, a pitanga e o jamelão, frutos bastante populares. Contudo, eles representam apenas uma pequena parte da grande diversidade dessa família e desse gênero, e do seu potencial econômico, tendo em vista que ainda não existem muitos estudos dos frutos comestíveis não comerciais, como é o caso dos frutos de *Eugenia puniceifolia* Kunth DC e *Eugenia astringens* Cambess.

Atualmente, a maioria dos estudos das espécies *Eugenia puniceifolia* Kunth DC e *Eugenia astringens* Cambess) são sobre características botânicas, composição química de óleos essenciais, obtidos de suas folhas, e sua aplicação terapêutica. Com relação a seus frutos, que apresentam colorações características de substâncias bioativas quando maduros, há poucos.

Substâncias bioativas são substâncias oriundas do metabolismo secundário dos vegetais que possuem um papel relevante na qualidade dos alimentos, e contribuem para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Também denominados de fitoquímicos, compreendem diferentes classes de substâncias, dentre as quais se destacam os tetraterpenoides (carotenoides), as substâncias fenólicas (ácidos fenólicos, flavonoides e sua subclasse: as antocianinas) e o ácido ascórbico.

É nesse contexto que uma avaliação da composição química dos frutos resultaria em mais informações, até mesmo inéditas, sobre os tipos de compostos bioativos presentes em sua constituição, agregando valor às duas espécies e promovendo o conhecimento do potencial nutritivo dos frutos da biodiversidade brasileira, além de conscientizar na diminuição do desmatamento e ocupação dos ecossistemas restinga, desfavorecendo o risco de extinção das mesmas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar quimicamente os frutos de *Eugenia punicifolia* Kunth DC e *Eugenia astringens* Cambess, com foco nas substâncias bioativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência:

- ✓ Açúcares por CLAE;
- ✓ Ácido ascórbico;
- ✓ Carotenoides totais e perfil;
- ✓ Os ácidos fenólicos;
- ✓ O teor de antocianinas;
- ✓ Confirmar e identificar as antocianinas por meio da técnica de espectrometria de massas.
- ✓ Os flavonoides.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A biodiversidade brasileira não é muito conhecida devido à vasta extensão territorial, estimando-se que haja um número bastante elevado de espécies distintas de plantas que compõem a flora das regiões do país, podendo-se destacar o táxon Angiosperma (*angios*, urna + *sperma*, semente), sendo também conhecida por apresentarem plantas com flores (SIMÕES, 2007).

Dentre as espécies de Angiospermas encontradas na flora brasileira, pode-se destacar as pertencentes à família *Myrtaceae*, uma família de grande importância para a produção de substâncias de interesse farmacêuticos, como os metabólitos secundários (SIMÕES, 2007; LEITÃO et al., 2014).

Myrtaceae constitui uma das maiores famílias de Angiospermas, compreendendo duas subfamílias, *Leptospermoideae* e *Myrtoideae*. A segunda subfamília possui uma única subtribo, *Myrtae*, dividida por três subtribos: Myrciinar, Eugeniinae e Myrtinar, que englobam mais de 4.000 espécies e 130 gêneros. Em grande número, são neotropicais, ou seja, predominantes nas regiões tropicais e subtropicais, em florestas e regiões litorâneas. Dentre os gêneros existentes nessa tribo, 23 deles ocorrem no Brasil (LAUDRUM & KAWASAKI, 1997).

Apresenta como característica botânica um hábito arbustivo a arbóreo, tronco lenhoso com presença e/ou ausência de caule esfoliar. As folhas são simples e, frequentemente, opostas, com nervura marginal. Suas flores, em geral, são pentâmeras, brancas ou, às vezes, vermelhas, e seus frutos são do tipo baga (frutos carnosos com sementes envolvidas por uma polpa carnosa rica em água). Uma característica marcante é a presença de canais oleíferos nas folhas, flores e frutos dessa família (BARROSO, 1991; LAUDRUM & KAWASAKI, 1997).

Muito conhecida por sua elevada riqueza de espécies, ao longo do tempo, a família *Myrtaceae* vem sendo amplamente empregada na medicina popular. Algumas já foram estudadas e tiveram sua composição química e propriedades medicinais descritas na literatura, atuando no combate a doenças infecciosas (CRUZ & KAPLAN, 2004; FRANCO et al., 2005; LEITÃO et al., 2014).

Além disso, as mirtáceas apresentam um grande potencial econômico, devido algumas de suas espécies serem fornecedoras de frutos comestíveis, como a goiaba (*Psidium guajava*

L.), a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart. O. Berg) e a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), muito apreciados pela fauna silvestre e pelo homem (MARCHIORI & SOBRAL, 1997, LORENZI et al., 2015). Por outro lado, essas espécies representam uma pequena parte do grande potencial dessa família, devendo ser considerado o grande número de frutos comestíveis produzidos por outras espécies não comercializadas (LAUDRUM & KAWASAKI, 1997).

No Brasil, dentre todos os gêneros pertencentes à família *Myrtaceae*, o gênero *Eugenia* encontra-se bem representado, devido à frequência, abundância e riqueza de suas espécies (CHAGAS & SILVA et al., 1995; ARANTES & MONTEIRO, 2002, LOURENÇO & BARBOSA, 2012). Esse gênero é muito encontrado na Mata Atlântica, principalmente em áreas de formações arenosas denominadas restingas.

Segundo a resolução nº 303 de 20 de março de 2002 da Comissão Nacional do Meio Ambiente- CONAMA (BRASIL, 2002), por definição, restingas são depósitos arenosos produzidos por processos de sedimentação, geralmente alongados, localizados paralelos à linha da costa, formando cordões arenosos, dunas e depressões, apresentando uma cobertura vegetal composta por diferentes comunidades vegetais, que dependem mais da natureza do que do clima.

Essas áreas representam grande importância para a preservação dos ecossistemas. Contudo, ao longo dos anos, as restingas vêm sofrendo crescentes impactos, principalmente com a expansão agropecuária e com o avanço da construção civil, além da inserção de espécies exóticas nas tentativas de reflorestamento, retirada de areia das dunas, extração ilegal de mudas e diversas outras interferências ocasionadas pelo homem (BARCELLOS et al., 2012). É nesse contexto que as restingas da Marambaia e a de Maricá têm como objetivo preservar uma parte da flora nativa do Estado do Rio de Janeiro.

A Restinga da Marambaia é uma longa faixa de areia que separa a Baía de Sepetiba do Oceano Atlântico, abrangendo uma extensão de aproximadamente 40 Km, percorrendo os municípios de Itaguaí, Rio de Janeiro e Mangaratiba (SOUZA et al., 2007). A Restinga de Maricá possui uma extensão de 8 km e encontra-se aproximadamente a 20 Km da Baía de Guanabara (RIZZINI et al., 1990).

Atualmente, essas duas áreas de restingas são reconhecidas como áreas de preservação ambiental (APA). Juntas, abrangem o maior número de espécies do gênero *Eugenia* no estado do Rio de Janeiro, compreendendo entre elas, as espécies *Eugenia puniceifolia* Kunth DC e *Eugenia astringens* Cambess (RIZZINI et al., 1990; PEREIRA et al., 2001; SOUZA & MORIM, 2008).

3.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

3.2.1 *Eugenia puniceifolia* Kunth DC

A espécie *Eugenia puniceifolia* Kunth DC, popularmente conhecida como cereja da praia, pitanga do campo e murta vermelha, possui um aspecto arbustivo a arbóreo (Figura 1a), podendo alcançar até 8 metros de altura. Suas flores são brancas (Figura 1b), com período de floração de junho a março, e sua frutificação ocorre no período de novembro a fevereiro (SILVA & PINHEIRO, 2007; SOUZA & MORIM, 2008; KUHLMANN, 2012; LOURENÇO & BARBOSA, 2012; LORENZI et al., 2015).

Os frutos dessa espécie são do tipo baga (característica da família), pequenos e globulosos e, quando maduros, assumem um tom vermelho intenso (Figura 1c). A distribuição dessa espécie abrange quase todo o litoral brasileiro, além de ser encontrada em países vizinhos como Paraguai e Venezuela (SOUZA & MORIM, 2008; LOURENÇO & BARBOSA, 2012, LORENZI et al., 2015).

É uma espécie muito abundante em áreas de restinga, sendo encontrada em diversas APA's no estado do Rio de Janeiro, como a Reserva da Praia do Sul, Grumari, Marambaia, Barra de São João, Jacarepaguá, Cabo Frio, São João da Barra, Macaé e Maricá (SOUZA & MORIM, 2008). Também possui uma vasta distribuição em todo território brasileiro, estendendo-se do sul ao norte do país, sendo encontrada em diferentes biomas (SOBRAL et al., 2015).

Identificada pela primeira vez como *Myrtus puniceifolia* Kunth em 1823, devido a sua grande variação foliar e por ter uma ampla distribuição ao longo de toda América do Sul, a espécie começou a receber mais de 50 sinonímias, como mostrado na tabela 1. Entretanto, é frequentemente identificada nos herbários como *Eugenia ovalifolia* Cambess (GOVAERTS et al., 2008; SOUZA & MORIM, 2008; COSTA et al., 2010; LOURENÇO & BARBOSA, 2012), sendo o nome *Eugenia puniceifolia* Kunth DC o mais atual e válido na literatura científica. Vale ressaltar que a pesquisa bibliográfica do presente trabalho foi realizada para todas as sinonímias, e nenhum trabalho foi encontrado com relação aos seus frutos.



1 A- Arbusto em plena floração



1 B- Flores da espécie



1 C- Frutos produzido pela espécie

Figura 1: Características de *Eugenia punicifolia* Kunth DC

FOTOS: Sidney Pacheco.

Tabela 1: Sinonímia da Espécie *Eugenia puniceifolia* Kunth DC

Sinônimos	
<i>Myrtus puniceifolia</i> Kunth	<i>Eugenia ovalifolia</i> Cambess
<i>Eugenia ambigua</i> O. Berg	<i>Eugenia phillyraeoides</i> Willd ex. O. Berg
<i>Eugenia arbutifolia</i> O. Berg	<i>Eugenia platyclada</i> O. Berg
<i>Eugenia arctostaphyloides</i> O. Berg	<i>Eugenia polyphylla</i> O. Berg
<i>Eugenia benthamii</i> O. Berg	<i>Eugenia prominens</i> O. Berg
<i>Eugenia boliviensis</i> O. Berg	<i>Eugenia psammophila</i> Diels
<i>Eugenia calycolpoides</i> Griseb	<i>Eugenia psychotrioides</i> Mart. ex. O. Berg
<i>Eugenia ciarensis</i> O. Berg	<i>Eugenia pyramidalis</i> O. Berg
<i>Eugenia clinocarpa</i> DC	<i>Eugenia pyrroclada</i> O. Berg
<i>Eugenia coarensis</i> DC	<i>Eugenia rhombocarpa</i> O. Berg
<i>Eugenia dasyantha</i> O. Berg	<i>Eugenia romana</i> O. Berg
<i>Eugenia decorticans</i> O. Berg	<i>Eugenia rubrescens</i> Mattos & D. Legrand
<i>Eugenia diantha</i> O. Berg	<i>Eugenia rufoflavescens</i> Mattos
<i>Eugenia dipoda</i> DC	<i>Eugenia sabulosa</i> Cambess
<i>Eugenia erythroxyloides</i> Mart. ex O. Berg	<i>Eugenia sancta</i> DC
<i>Eugenia flava</i> O. Berg	<i>Eugenia spathophylla</i> O. Berg
<i>Eugenia fruticulosa</i> DC	<i>Eugenia spathulata</i> O. Berg
<i>Eugenia glareosa</i> O. Berg	<i>Eugenia sphathulata</i> O. Berg
<i>Eugenia insipida</i> Cambess	<i>Eugenia subalterna</i> Benth
<i>Eugenia kochiana</i> (DC) O. Berg	<i>Eugenia subcorymbosa</i> O. Berg
<i>Eugenia kunthiana</i> DC	<i>Eugenia suffruticosa</i> O. Berg
<i>Eugenia lineariflora</i> O. Berg	<i>Eugenia surinamensis</i> Miq
<i>Eugenia macroclada</i> O. Berg	<i>Eugenia triphylla</i> O. Berg
<i>Eugenia maximiliana</i> O. Berg	<i>Eugenia vaga</i> O. Berg
<i>Eugenia myrtillifolia</i> DC	<i>Myrtus arbutifolia</i> (O. Berg) Kuntze
<i>Eugenia nhanica</i> Cambess	<i>Myrtus fasciculata</i> Vell
<i>Eugenia obtusifolia</i> Cambess	<i>Myrtus oleifolia</i> Kunth
<i>Eugenia obversa</i> O. Berg	<i>Myrtus psychotrioides</i> Colla
<i>Eugenia oleifolia</i> (Kunth) DC	<i>Pseudomyrcianthes kochiana</i> (DC) Kausel
<i>Eugenia chlorophyta</i> Barb. Rodr	<i>Eugenia dipoda</i> DC

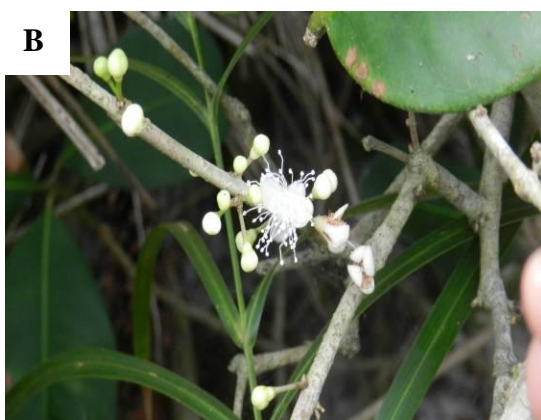
FONTE: refflora.jbrj.gov.br, theplantlist.org, world check list (acesso em 15/12/14 e 05/05/15)

3.2.2 *Eugenia astringens* Cambess

Eugenia astringens Cambess, conhecida popularmente como jabuticaba da praia, jabuticaba-do-mangue, abajuru-genérico e araponga (SOUZA & MORIM, 2008; DEFAVERI et al., 2011, LORENZI et al., 2015), possui caráter arbustivo, podendo atingir até 3 metros de altura (Figura 2 A). Apresenta flores de coloração branca (Figura 2 B), com floração de fevereiro a junho (SILVA & PINHEIRO, 2007; SOUZA & MORIM, 2008; LOURENÇO & BARBOSA, 2012). Os frutos são característicos da família, globulosos, com até 10 mm de diâmetro e adquirem uma cor negra quando maduros, semelhantes aos frutos de jabuticaba (Figura 2 C). O período de frutificação estende-se de abril a dezembro (SOUZA & MORIM, 2008; LORENZI et al., 2015).



A- Arbusto da espécie em frutificação



B- Flores da espécie



C- Frutos produzido pela espécie

Figura 2: Característica da *Eugenia astringens* Cambess

FOTOS: Sidney Pacheco.

Endêmica do Brasil, pode ser encontrada ao longo do litoral brasileiro, estendendo-se desde Santa Catarina até a Bahia. No Rio de Janeiro, sua distribuição ocorre, principalmente, nas áreas de restinga, como Grumari, Jacarepaguá, Cabo Frio, São João da Barra, Maricá e Marambaia (SOUZA & MORIM, 2008; SOBRAL et al., 2015), assim como a *Eugenia puniceifolia*.

Frequentemente identificada nos herbários como *Eugenia rotundifolia* Casar, termo mais antigo (GOVAERTS et al., 2008; SOUZA & MORIM, 2008; COSTA et al., 2010), sendo o nome *Eugenia astringens* Cambess DC o mais atual e válido na literatura científica, foi identificada pela primeira vez em 1830 (GOVAERTS et al., 2003). Possui também outros sinônimos, como é mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Sinonímia da Espécie *Eugenia astringens* Cambess.

Sinônimos
<i>Eugenia apiocarpa</i> O. Berg
<i>Eugenia cassinoides</i> O. Berg
<i>Eugenia cyclophylla</i> O. Berg
<i>Eugenia rotundifolia</i> Casar
<i>Eugenia umbelliflora</i> O. Berg

FONTE: Sites refflora.jbrj.gov.br, theplantlist.org e world check list (acesso em 15/12/14 e 05/05/15).

Assim como para *Eugenia puniceifolia* Kunth DC, a pesquisa bibliográfica foi realizada para todos os sinônimos desta espécie.

Logo, essas duas espécies representam uma pequena parte de uma grande biodiversidade existente no gênero *Eugenia*, que já possui estudos envolvendo principalmente seus frutos, que adquirem coloração característica de compostos bioativos, com dados já elucidados na literatura na prevenção de algumas doenças crônicas não transmissíveis (PEREIRA, 2011; ARAÚJO et al., 2012; SANTOS et al., 2015).

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

A composição química produzida pelo metabolismo vegetal abrange dois grupos distintos, classificados como metabólitos primários e metabólitos secundários.

Os metabólitos primários são os produtos químicos essenciais oriundos das reações de síntese, degradação e conservação de energia, como a síntese de compostos orgânicos

(açúcares) a partir da reação entre CO₂ e água utilizando a energia solar, processo denominado de fotossíntese (SIMÕES, 2007; FENNEMA, 2010; LEHNINGER, 2011).

O segundo grupo, os metabolitos secundários, são originados por diversas rotas biossintéticas que utilizam a energia produzida pelo metabolismo primário. Apresentam estruturas complexas e marcantes atividades biológicas, além de serem encontrados em concentrações baixas se comparados aos primários na planta. Tem como funções proteção contra raios UV e defesa contra predadores (DEWICK, 2009).

Dentro desse grupo, se destacam substâncias como o ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos (os ácidos fenólicos, os flavonoides e sua subclasse, as antocianinas).

3.3.1 Açúcares

Açúcares são as substâncias mais abundantes no reino vegetal. Também denominados de biomoléculas orgânicas, são constituídos por átomos de carbono e hidrogênio ligados por ligações covalentes, podendo ter alguns grupos oxigenados. Representam quase 90 % do material celular, e atuam como combustíveis para as reações metabólicas. Além disso, são amplamente disponíveis, estando entre os principais componentes dos alimentos, podendo tanto fazer parte da constituição natural ou serem adicionados como ingredientes (FENNEMA, 2010; LEHNINGER, 2011). Os carboidratos são divididos em 3 classes: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

Os monossacarídeos são os açúcares simples, constituídos por uma única unidade de grupamento aldeído ou cetona. Pertencem a essa classe a glicose, a frutose e a galactose (LEHNINGER, 2011).

Os oligossacarídeos são polímeros formados por duas ou mais unidades de monossacarídeos. Os mais comuns encontrados em alimentos são a sacarose (glicose + frutose), a lactose (glicose + galactose), a maltose (glicose + glicose) e a rafinose (galactose + frutose + glicose). Os polissacarídeos são formados através de inúmeras moléculas de monossacarídeos, o mais comum é o amido, sendo considerado a mais importante reserva de energia nas plantas superiores (FENNEMA, 2010; LEHNINGER, 2011).

Dentre as classes descritas, os monossacarídeos, em especial a glicose, é um dos metabolitos primários mais importantes, pois é através do seu metabolismo que são originados os metabolitos secundários, como é ilustrado na Figura 3.

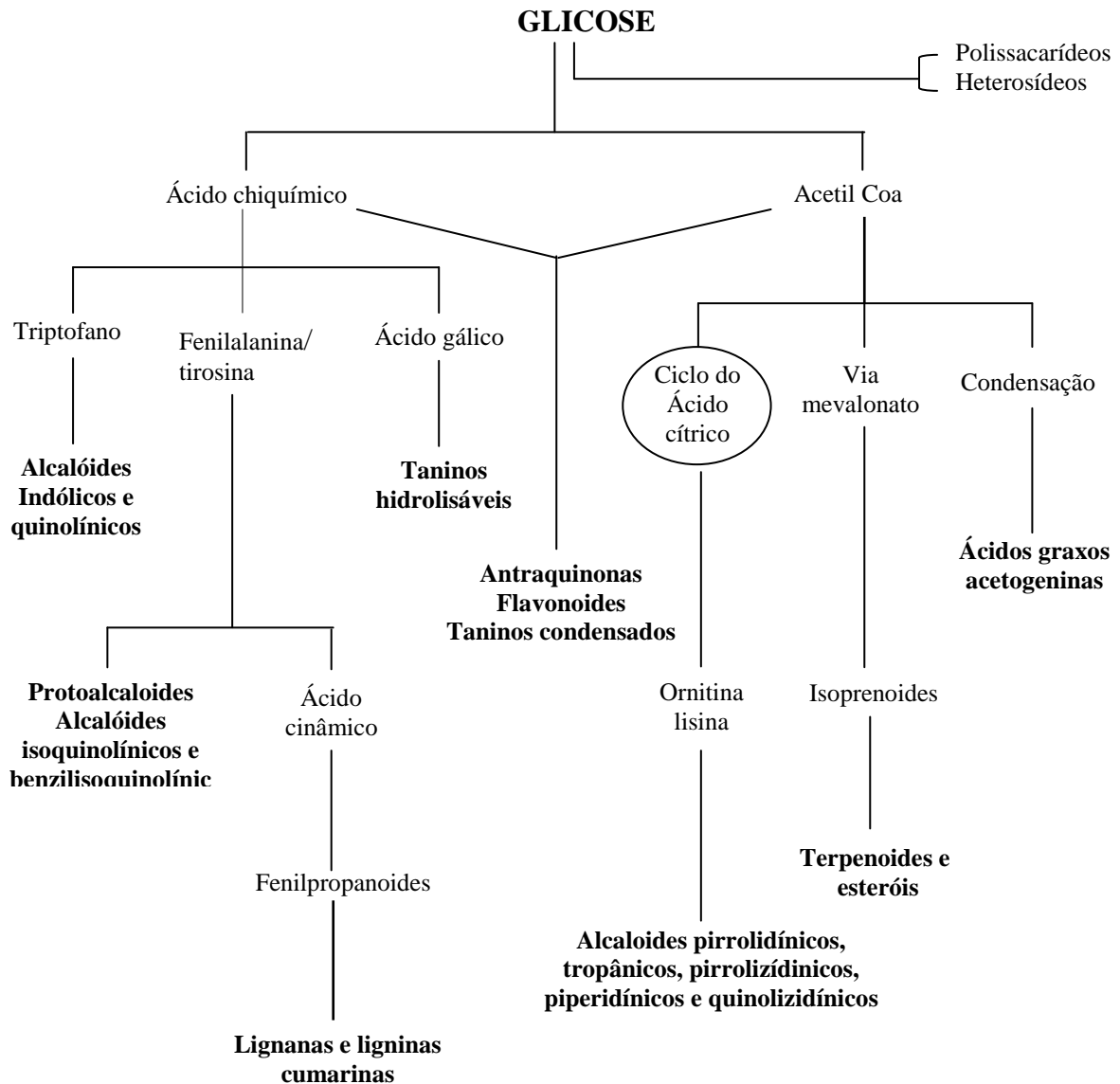


Figura 3: Ciclo biossintético de formação dos metabólitos secundários

FONTE: SIMÕES (2007).

3.3.2 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um dos ácidos orgânicos mais importantes da alimentação. Pertencente à classe das vitaminas hidrossolúveis, funciona como agente preservativo em alimentos e participa de diversos processos metabólicos no organismo, como a formação do colágeno e na síntese de ácidos biliares, além de atuar como cofator enzimático (ARANHA, 2000; MELÉNDEZ et al., 2004; LEHNINGER, 2011). Está presente nos tecidos de plantas superiores e de alguns animais, onde é sintetizado através da glicose pela enzima *L*-gulonalactona oxidase.

Os seres humanos não são capazes de sintetizar vitamina C devido à ausência dessa enzima, logo há a necessidade de ingerir alimentos que sejam ricos nessa substância, como frutas frescas, particularmente as cítricas e algumas hortaliças (FIORUCCI et al., 2003; ROSA et al., 2007; LEHNINGER, 2011).

A molécula de ácido ascórbico apresenta uma lactona com dois centros quirais nas posições 4 e 5, determinando dois pares de estereoisômeros (ROSA et al., 2007; Figura 4).

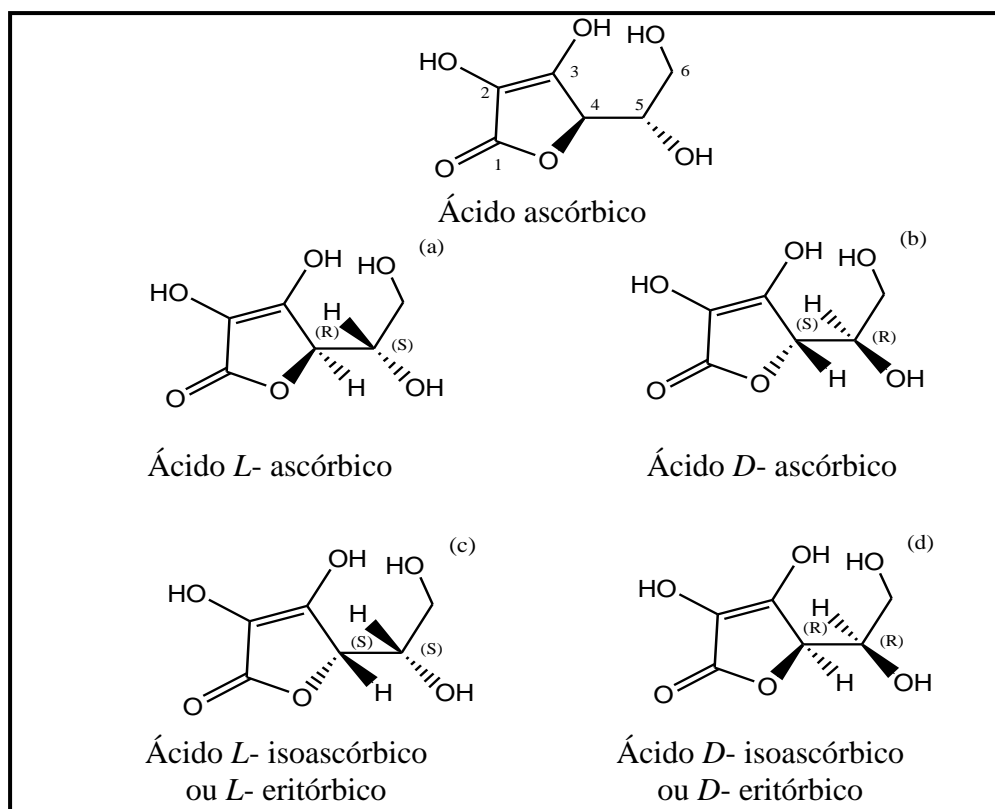


Figura 4: Estrutura química do ácido ascórbico e seus isômeros

O ácido ascórbico apresenta duas propriedades: uma química e uma biológica. Na primeira, a vitamina possui um caráter ácido devido a sua estrutura conter um grupo hidróxi-enólico na α -hidroxicetona, conferindo uma capacidade redutora e um comportamento ácido (Figura 5). A segunda propriedade está relacionada com o isômero o ácido *L*-ascórbico, um agente redutor em soluções aquosas. Esse isômero, na presença de oxigênio e um combustível, é oxidado à forma de ácido dehidroascórbico, uma forma oxidada da vitamina C (Figura 6), apresentando uma maior atividade vitamínica (LIÃO & SEIB, 1988, FIORUCCI et al., 2003; LEHNINGER, 2011).

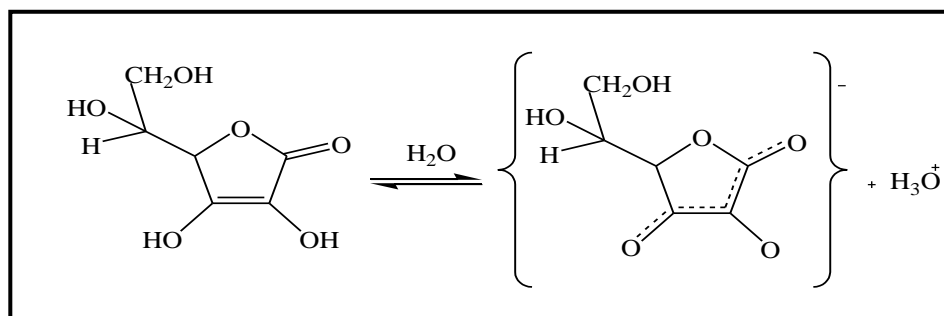


Figura 5: Propriedade ácida do ácido ascórbico.

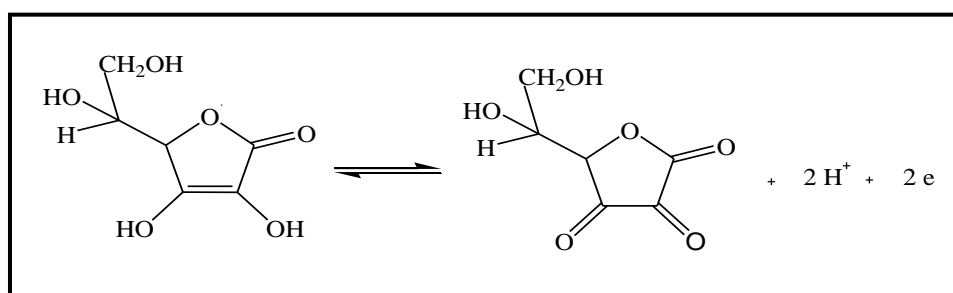


Figura 6: Oxidação do ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico

Segundo Snyder (1995) (*apud* FIORUCCI, SOARES, CAVALHEIRO, 2003) a deficiência dessa vitamina no organismo pode acarretar o desenvolvimento do escorbuto, uma doença provocada pela síntese defeituosa do tecido colagenoso, que tem como sintomas inchaço das gengivas causando sangramentos, quedas dos dentes e dificuldade de cicatrização subcutânea.

A vitamina C ainda possui um importante papel na indústria alimentícia além do nutricional, sendo muito empregada como antioxidante natural, preservando a coloração de muitos alimentos (STADLER, 1999; FIORUCCI, SOARES, CAVALHEIRO, 2002).

3.3.3 Carotenoides

Carotenoides são substâncias lipossolúveis que compreendem mais de 600 variações estruturais já caracterizadas na natureza, sendo cerca de cem relatadas em alimentos. Dentre as classes de metabólitos secundários existentes, apresentam-se em maior quantidade na natureza, somando mais de 150 anos de estudos (O'NEIL & SCHWARTZ, 1992; KRINSKY & JOHNSON, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

Denominados pigmentos naturais, são biossintetizados por plantas, fungos, bactérias fotossintéticas e algumas espécies de algas, possuindo um importante papel na proteção contra

processos oxidativos e na captação de energia para os tecidos vegetais. (O'NEIL & SCHWARTZ, 1992; KRINSKY & YEM, 2003).

Além disso, são responsáveis pelas cores que compreendem o amarelo, laranja e o vermelho do tecido de muitas frutas e hortaliças, podendo também ser encontrados em outros tecidos vegetais como sementes, flores e folhas (Tabela 3). Nesta última, os carotenoides estão associados às clorofilas, pigmento verde que promove a coloração característica das hortaliças (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008; WEBER & GRUNE, 2012).

Segundo Dewick (2009), existem carotenoides que são encontrados em alguns animais, como a astaxantina, que promove uma coloração rosa avermelhada em crustáceos e mariscos. Contudo, esses animais são incapazes de sintetizar esse carotenoide, sendo a obtenção dessas substâncias através da alimentação.

Tabela 3: Exemplos de cores de carotenoides encontrados na natureza

Cor	Carotenoide	Alimento
Amarela	Zeaxantina	Milho
Laranja	β - caroteno	Cenoura
Vermelho	Licopeno	Caqui
Rosa avermelhado	Astaxantina	Salmão
Marron avermelhado	Fucoxantina	Alga marrom
Vermelho brilhante	Capsantina	Pimenta vermelha
Amarelo brilhante	Violaxantina	Pimentão amarelo

FONTE: Adaptado de RODRIGUEZ- AMAYA (1999); RODRIGUEZ- AMAYA et al. (2008) e DEWICK (2009).

A intensidade da coloração de um carotenoide está diretamente relacionada com o número de ligações duplas conjugadas. À medida que esse número aumenta, a cor se modifica. Isso ocorre em virtude da deslocalização eletrônica existente na região dos cromóforos que conferem a tonalidade da cor. Nessa região, os elétrons são deslocados ao longo de toda cadeia isoprênica, promovendo absorção da energia visível, a deixando mais reativa para que ocorra a transição eletrônica. Logo, quanto maior o número de duplas ligações conjugadas na substância, menos energia é necessária para que haja a transferência de elétrons de um orbital a outro (BRITTON, 1995; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; DEWICK, 2009; PACHECO, 2009; MARTINS, SUCUPIRA, SUAREZ, 2015).

A biossíntese dos carotenoides derivada de duas rotas: via da deoxixilulose - 5 - fosfato e a via do mevalonato. A primeira ocorre nos plastídios de plantas e em bactérias, a segunda via, acontece nos fungos. As duas rotas têm como principal objetivo gerar a molécula de isopentenilpirofosfato (IPP- C₅), denominado bloco de construção, que irá sofrer sucessivas reações de encadeamento cabeça-cauda para formar a molécula de geranylgeranylpirofosfato (GGPP- C₂₀). A partir da condensação de duas moléculas de GGPP por encadeamento cauda-cauda, ocorre à formação da primeira molécula precursora dos carotenoides, o fitoeno (Figura 7).

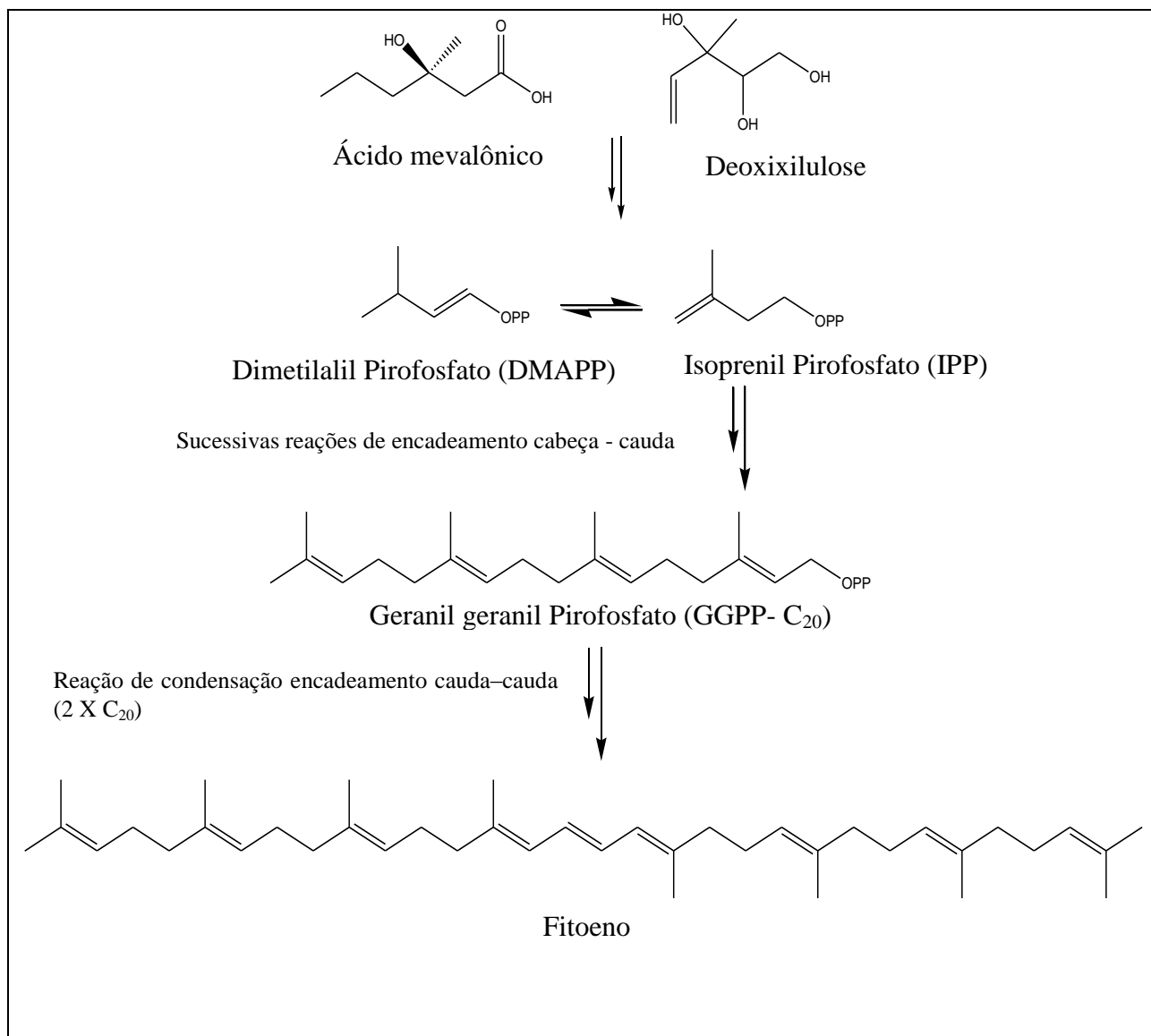


Figura 7: Biossíntese de uma molécula de carotenoide.

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

A classificação dos carotenoides está relacionada com a função química existente na sua estrutura, podendo ser denominados como carotenos (constituídos apenas por hidrocarbonetos) ou como xantofilas (uma ou mais funções químicas oxigenadas presentes na

estrutura), sendo considerados os mais importantes na alimentação o licopeno, o β -caroteno, o α -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína e a zeaxantina (Figura 8) (BRITTON, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

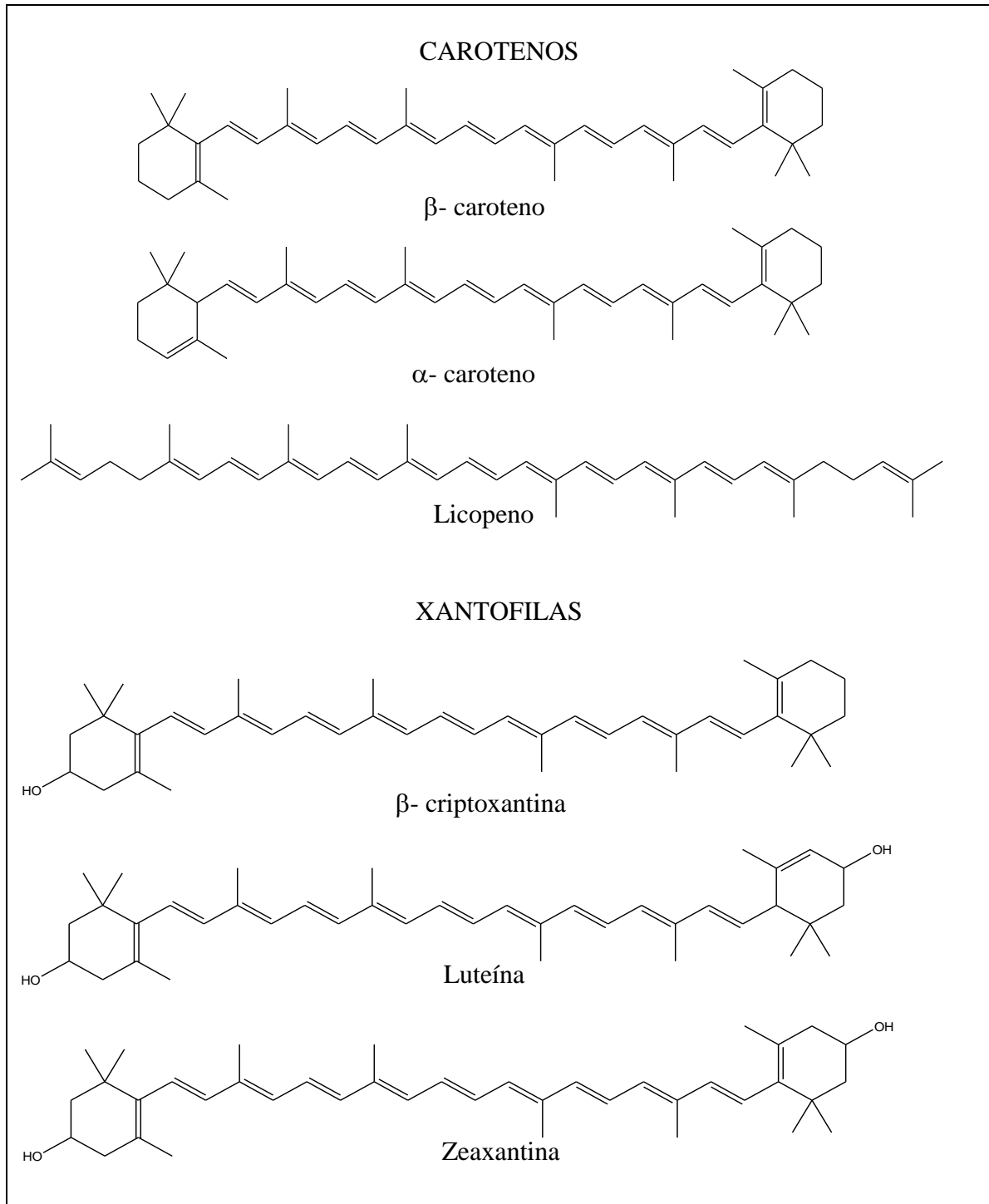


Figura 8: Estruturas químicas dos principais carotenoides encontrados em alimentos

Na alimentação, a importância dessa classe de compostos tem sido tema com bastante repercussão. Estudos apontam que a função antioxidante dos carotenoides desempenha um papel importante na redução do risco de câncer, catarata, aterosclerose e no retardo do

processo de envelhecimento. Dentre os carotenoides mais amplamente estudados o que possui maior atividade antioxidante é o licopeno (WILLIAMS, WILLIAMS, WEISBURGER, 1999; KRINSKY & JOHNSON, 2005; JÁUREGUI, CARILLO, ROMO, 2011). Além disso, atuam como pigmentos maculares, como é o caso da luteína e da zeaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008; CANOVAS et al., 2009).

3.3.3.1 Carotenoides precursores de vitamina A

Alguns carotenoides são considerados precursores de vitamina A por terem um anel β -ionona não substituído e uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos. Dos aproximadamente 600 carotenoides, cerca de 50 apresentam essa característica, e apenas 3 estão em altas concentrações no sangue: o β - caroteno, o α - caroteno e a β -criptoxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; FENNEMA, 2010).

Em teoria, o β -caroteno é o carotenoide de maior atividade pró-vitamina A por apresentar dois anéis β -ionona não substituídos, no qual ocorre uma conversão em duas moléculas de vitamina A, enquanto que os demais, como o α - caroteno e a β -criptoxantina só possuem um anel não substituído, resumindo em 50% as suas conversões (Figura 9) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RAO & RAO, 2007; DEWICK, 2009).

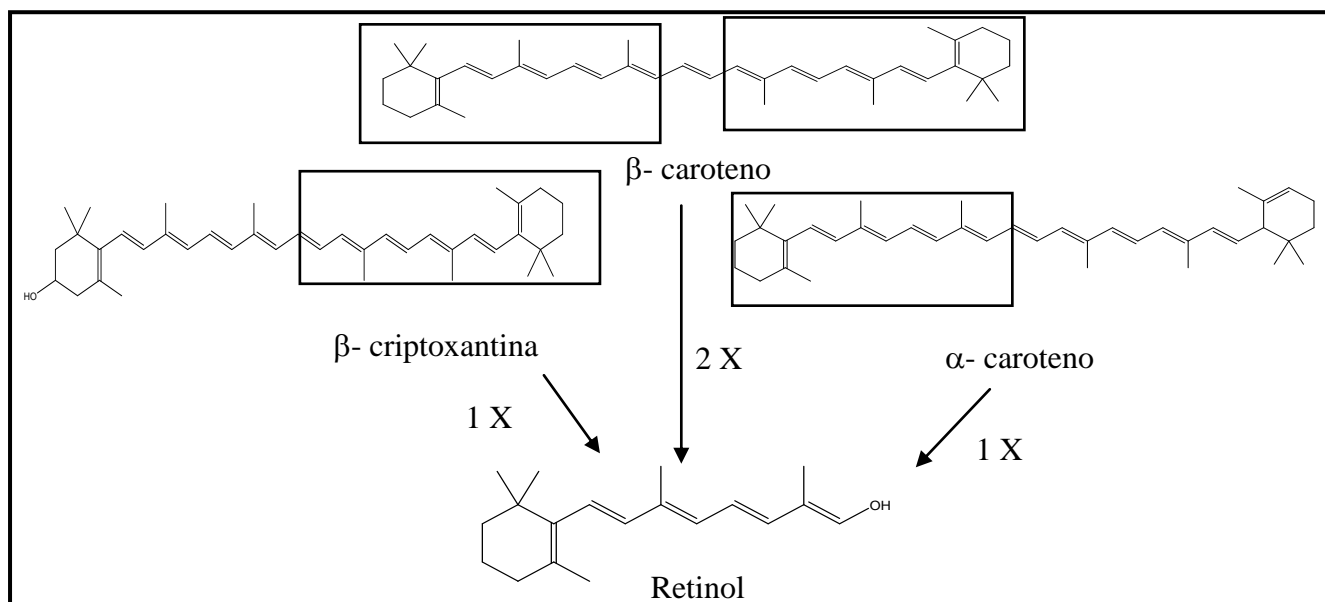


Figura 9: Esquema da conversão dos carotenoides em vitamina A

FONTE: Adaptado de PACHECO (2009).

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel, encontrada em alimentos de origem animal, especialmente em ovos, leite e seus derivados e no fígado, órgão onde é armazenada a maior quantidade dessa vitamina.

Nos seres humanos, nesse caso, a atividade de vitamina A está sob a forma de retinol, que participa nos processos de manutenção da visão, na função imunológica, atuando no crescimento de células ósseas e na prevenção da anemia. Sua carência acarreta distúrbios na manutenção desses processos (FONTANA et al., 1997; DEWICK, 2009; WEBER & GRUNE, 2012; YI et al., 2015).

3.3.3.2 Licopeno

O licopeno é um caroteno acíclico que apresenta o maior número de ligações duplas conjugadas (onze) e, além destas, duas não conjugadas. Não apresenta atividade como pró-vitamina A devido a sua estrutura linear, sendo obtido a partir do fitoeno, após quatro etapas de desidrogenação (FIGURA 10), sendo considerado precursor de formação dos demais carotenoides cíclicos (DEWICK, 2009).

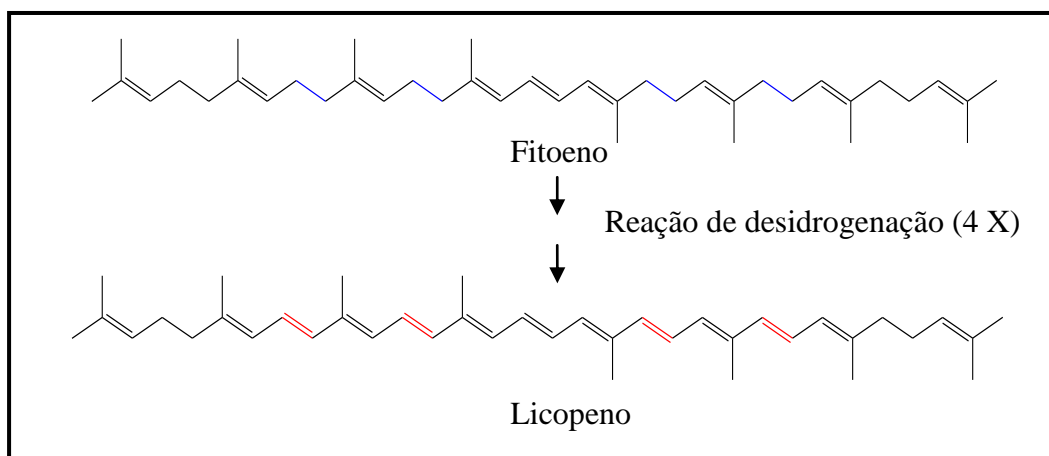


Figura 10: Esquema de formação do licopeno

FONTE: Adaptado de PACHECO (2009)

Responsável pela coloração vermelha de muitas frutas e hortaliças, e até mesmo presente em algumas espécies de alguns microrganismos como fungos e bactérias, seu consumo está relacionado à redução do risco de alguns tipos de câncer, em especial, o da próstata e de doenças cardiovasculares (CLINTON, 1998; BLUM et al., 2005; KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de próstata é o segundo com mais casos registrados no Brasil, com estimativa de 68.800 novos casos em 2014, e o

sexto tipo mais comum mundialmente prevalente nos homens. Considerado um câncer de terceira idade, atinge homens com idades a partir dos 65 anos. Ademais, já está comprovado que esta doença pode acometer pessoas também com idades menores, cerca de 50 anos, aumentando a taxa de mortalidade significativamente após essa faixa etária (INCA, 2015).

Pesquisas feitas por Clinton (1998), Giovannucci (1999) e Vitale (2010), descreveram que o consumo de alimentos ricos em licopeno, como o tomate e seus produtos, têm uma influência positiva na diminuição do risco alguns tipos de câncer, em especial, o de próstata. Esta função é atribuída ao licopeno devido à ausência de anel β -ionona, que favorece uma maior capacidade de sequestrar radicais livres, causadores de doenças, quando comparado a outros tipos de carotenoides (DI MASCIO, KAISER, SIES, 1989).

Embora encontrado em elevados níveis no plasma sanguíneo, o licopeno não é sintetizado pelo organismo humano, devendo ser obtido exclusivamente através da alimentação. Entretanto, a forma predominante do licopeno em alimentos é a forma *trans*, sendo necessária a isomerização da molécula para que esta se transforme na forma *cis*. É essa forma que possui uma função biológica no organismo e é encontrada no plasma (CLINTON, 1998; KRINSKY & JOHNSON, 2005; RAO & RAO, 2007).

A ingestão diária de licopeno para que este tenha algum efeito protetor no organismo ainda não foi definida, pois a biodisponibilidade da substância está relacionada à diversos fatores, dentre os quais se destacam o preparo do alimento, o nível de concentração e o meio em que se encontra no mesmo, pois o licopeno é um composto lipossolúvel, não sendo dissolvido em meio aquoso, além da influência dos hábitos alimentares e da pré-disponibilidade genética (PORRINI & RISO, 2005; MORITZ & TRAMONTE, 2006).

3.3.4 Compostos Fenólicos

Classe de metabólitos secundários com uma grande diversidade estrutural, englobando desde moléculas simples à complexas, os compostos fenólicos são substâncias bioativas que apresentam ao menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila. São hidrossolúveis e de ampla distribuição na natureza, sob a forma livre ou ainda heterosídeos. Apresentam diferentes propriedades, incluindo características ácidas como quelantes (SOARES, 2002; CUNHA, 2009).

Fazem parte desse grupo, os fenilpropanoides, os fenilpropenos, as xantinas, as naftoquinonas, os estilbenos, as antraquinonas, as lignanas, os taninos, as ligninas, os ácidos fenólicos, as cumarinas e os flavonoides, como as antocianinas, as isoflavonas, entre outros.

3.3.4.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são uma grande classe destas substâncias largamente distribuídos na natureza e constituídos quimicamente por um anel benzênico, um grupamento carboxílico e uma ou mais hidroxilas, podendo apresentar metoxilas. Dividem-se em 2 grupos: ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) e ácidos cinâmicos (C6-C3) (Figura 11) (ANGELO & JORGE, 2007; DEWICK, 2009).

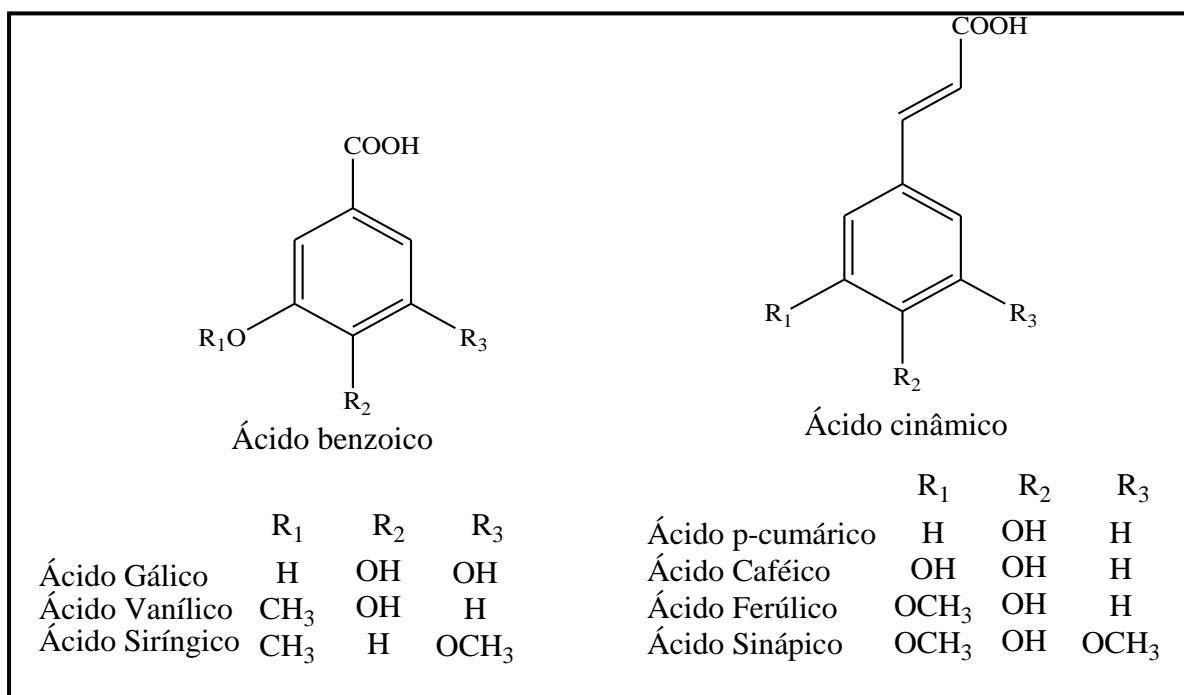


Figura 11: Ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico

Nos organismos vegetais, têm função de proteção contra condições adversas e contribuem para as características de adstringência, cor e sabor e sua estabilidade oxidativa (SOARES, 2002; NACZK e SHAHIDI, 2004).

Os derivados do ácido cinâmico são antioxidantes mais ativos que os derivados do ácido hidroxibenzoico devido à presença de uma dupla ligação próxima ao grupamento carboxila, capaz de estabilizar por ressonância o elétron desemparelhado de uma espécie radicalar (ANGELO & JORGE; 2007).

Nos alimentos, são importantes constituintes de frutas e hortaliças, promovendo a proteção do alimento contra ataques de insetos e capacidade antioxidante total dos vegetais, função esta de grande importância para o organismo humano (TALCOTT et al., 2003; ROCKENBACH et al., 2008).

3.3.4.2 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de substâncias naturais caracterizadas pelo arranjo estrutural de 15 átomos de carbono em 3 anéis (A, B, C), sendo 2 destes aromáticos (configuração C₆-C₃-C₆). Nos vegetais, são de extrema importância, tendo funções antioxidante, antimicrobiana, de fotorreceptor e de defesa contra insetos. Ocorrem abundantemente como derivados glicosilados e contribuem para coloração de folhas, flores e frutos (HARBONE & WILLIAMS, 2000; PIETTA, 2000; MARTÍNEZ- FLORES, 2002; DEWICK, 2009).

Sua biossíntese é considerada de via mista. A formação do anel A está relacionada à condensação de 3 moléculas de malonil-coenzima A (CoA), enquanto os anéis B e C são resultantes da via do chiquimato a partir da fenilalanina, que é convertida em ácido cinâmico e após em ácido cumárico. Ambos são formados no metabolismo da glicose (Figura 12) (MERKEN & BEECKER, 2000; DEWICK, 2009).

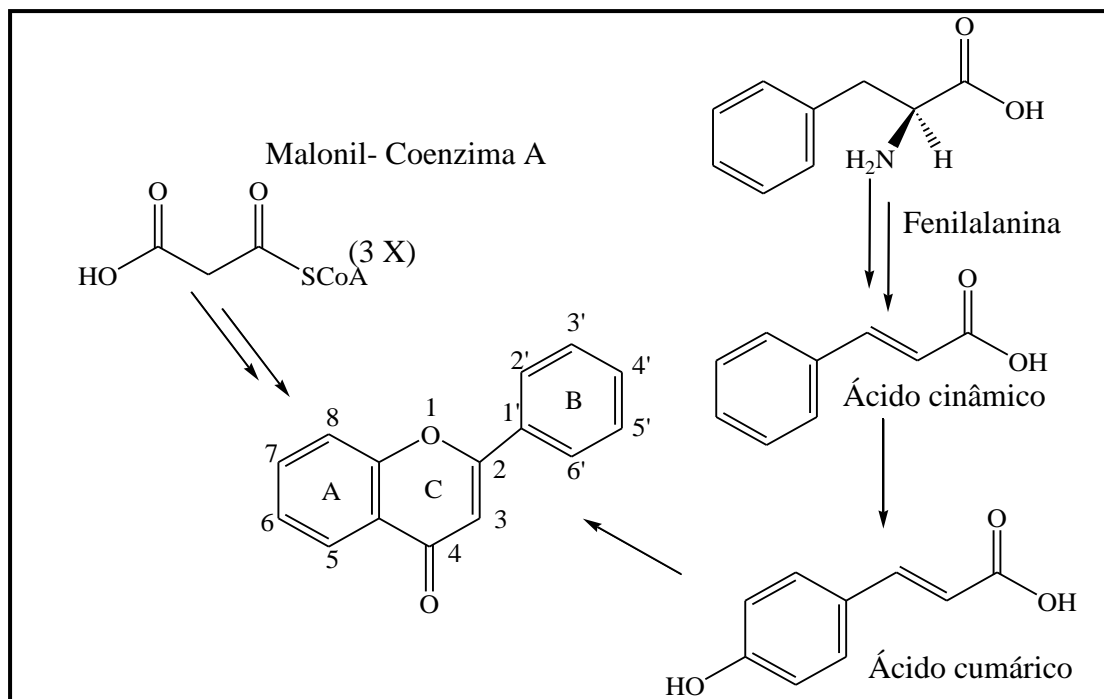


Figura 12: Esquema básico de formação de um flavonoide

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

Atualmente há cerca de 8000 flavonoides já identificados, devido às diferentes reações, como oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfonação, que ocorrem também nos anéis A e B. Como consequência dessas reações, essas substâncias podem ocorrer sob a forma livre (sem açúcar), sendo denominado aglicona ou na forma glicosídica (com açúcar ligado), chamado de *O*- heterosídeo, quando a ligação se dá por intermédio de um átomo de oxigênio, ou *C*- heterosídeo, quando a ligação se dá por um átomo de carbono (HARBONE & WILLIAMS, 2000; PIETTA, 2000; ANGELO & JORGE, 2007).

Os flavonoides apresentam diferentes subclasses, que se diferem entre si pelo nível de oxigenação e pelo padrão de substituição do anel C (MARTÍNEZ- FLORES, 2002), originando as antocianidinas, as catequinas, as flavonas, os flavonols, as flavanonas, as isoflavonas, entre outros (Figura 13).

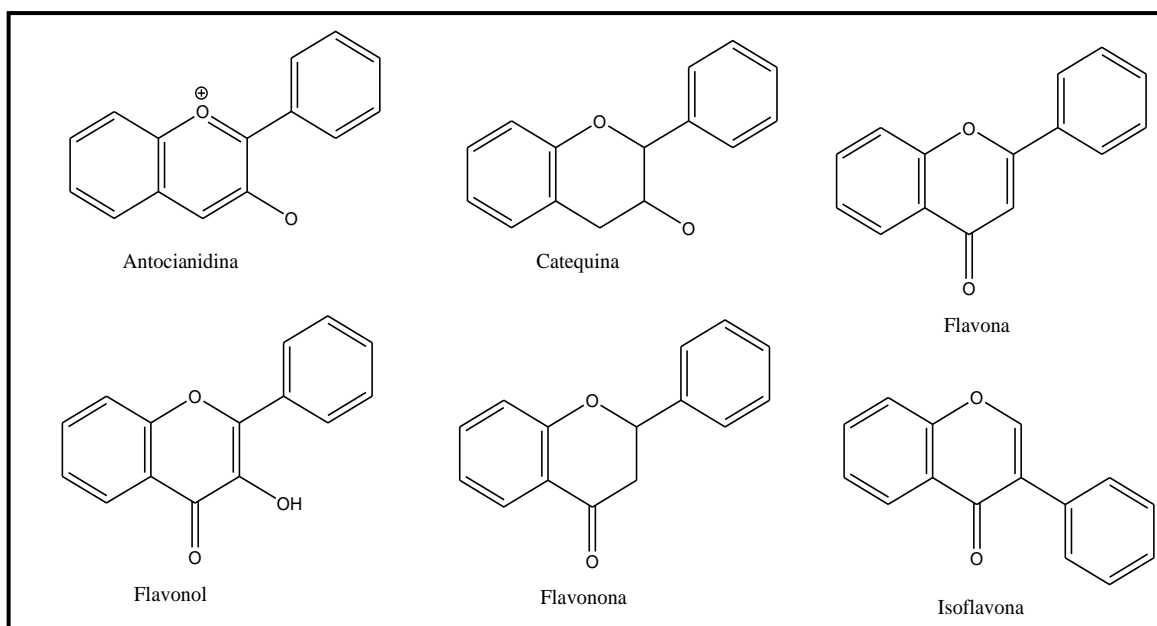


Figura 13: Estrutura química das principais subclasses de flavonoides em alimentos

Ao longo dos anos, essa classe de metabólitos vem recebendo bastante atenção. Alguns estudos destacam a sua importância biológica e fisiológica, baseando-se, principalmente, na atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres provenientes do estresse oxidativo dos tecidos (PRIOR & CAO, 2000; RIJKE et al., 2006). Segundo alguns autores, uma dieta composta de alimentos ricos em flavonoides como frutas e hortaliças pode estar associada ao baixo risco de se desenvolver doenças cardiovasculares e prevenção de alguns tipos de câncer (YOCHUM, 1999; NEURHOUSE, 2004; WALLE, 2004; YÁÑES et al., 2013).

3.3.4.2.1 Antocianinas

Da classe dos flavonoides, as antocianinas (do grego *anthos*, uma flor, *kyanos*, azul escuro), compõem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis, sendo largamente distribuídas nas famílias do reino vegetal (HARBONE, 1988; BRIDDLE & TIMBERLAKE, 1997). Responsáveis pelas cores que variam do vermelho ao azul, passando pelo laranja, rosa e púrpura, que promovem a coloração de muitas pétalas de flores, frutos, folhas e até mesmo raízes, sendo encontradas principalmente nas Angiospermas (VAN TUNEN & MOL, 1991; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

As antocianinas, na natureza, ocorrem frequentemente sob a forma glicosilada, tendo como forma básica o cátion flavílico (Figura 14). Os açúcares frequentemente encontrados são a glicose, a ramnose, a xilose, a galactose, a arabinose e a frutose com a substituição

glicosídica realizada nos carbonos C-3 e C-5 (FRANCIS, 1989; MALACRIDA & MOTTA, 2005; GIOVANINNI & MANFROI, 2009). Também podem ser encontradas como agliconas (forma não glicosilada).

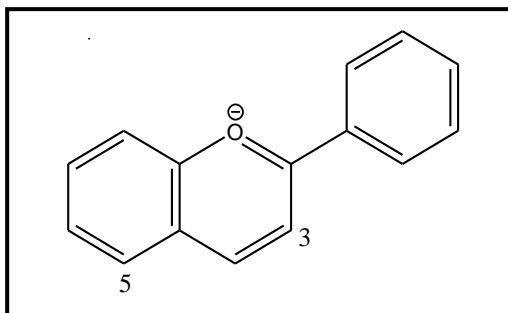


Figura 14: Estrutura química do cátion flavílico

De acordo com Xavier (2004), as antocianinas comumente se apresentam, em soluções aquosas, sob a forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavílico (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo- base carbitol (incolor) e chalcona (incolor ou levemente amarela). Isso vai depender do meio em que se encontram. Dependendo do pH, as formas dessas estruturas podem sofrer alterações.

Segundo Heredia (1998), em pH ácido ($\text{pH} \leq 2$), a forma predominante é a catiônica. Conforme ocorre a variação do pH, acontece uma rápida desprotonação, formando a base quinoidal. Em meio aquoso, ocorre a hidratação do cátion flavílico, levando ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. Sob temperatura ambiente e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento, levando algumas horas para se atingido. Com o aumento da temperatura, o equilíbrio é deslocado em direção à formação da base chalcona (Figura 15)

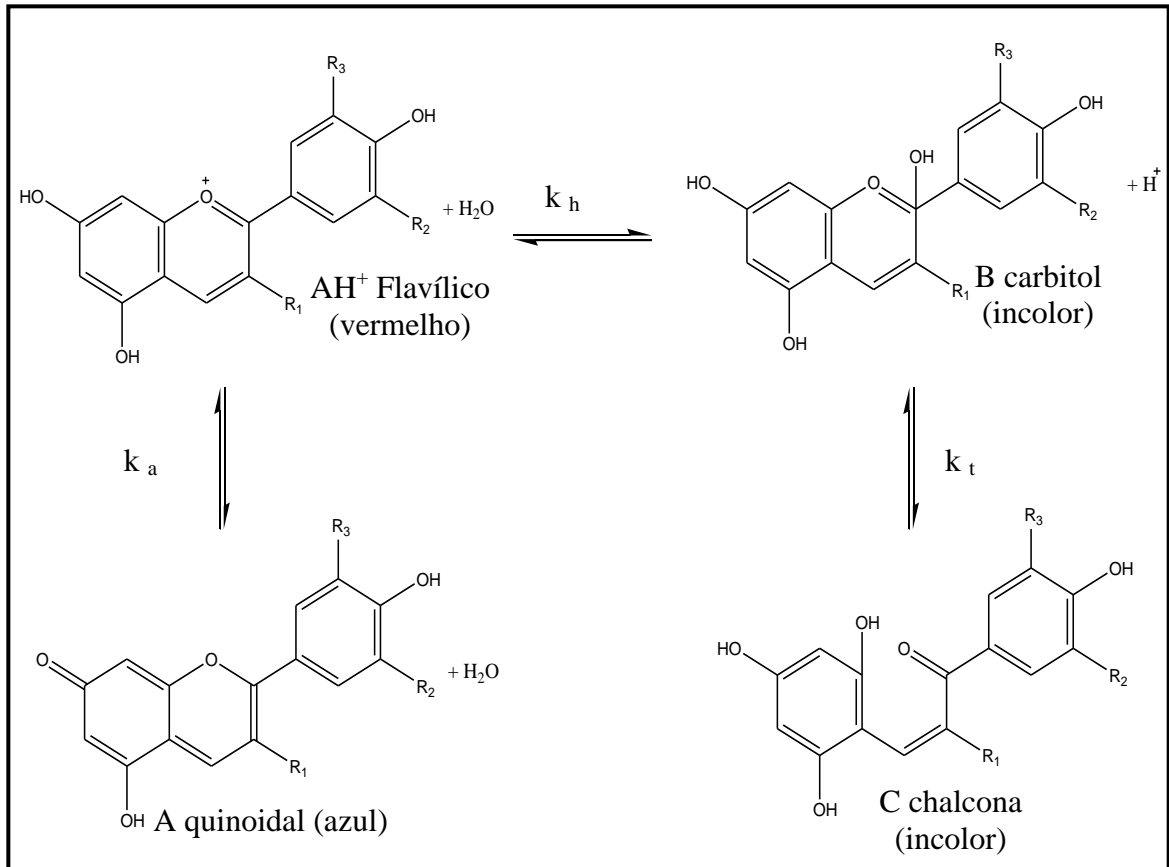


Figura 15: Representação do equilíbrio das antocianinas em meio aquoso

FONTE: XAVIER (2004).

Em plantas, as funções das antocianinas podem ser muito variadas, desempenhando papéis na proteção contra a ação dos raios UV, atuando como antioxidante, participando dos mecanismos de defesa contra predadores, além de participar de funções biológicas, como polinização e dispersão de sementes (LOPES et al., 2007).

Embora existam mais de 400 antocianinas, 22 são conhecidas, sendo 18 delas agliconas de ocorrência natural, e apenas 6 delas com destaque em alimentos: delphinidina, cianidina, peonidina, petunidina, pelargonidina e malvidina (Figura 16) (KONG et al., 2003; COULTATE, 2004; CARVALHO et al., 2010).

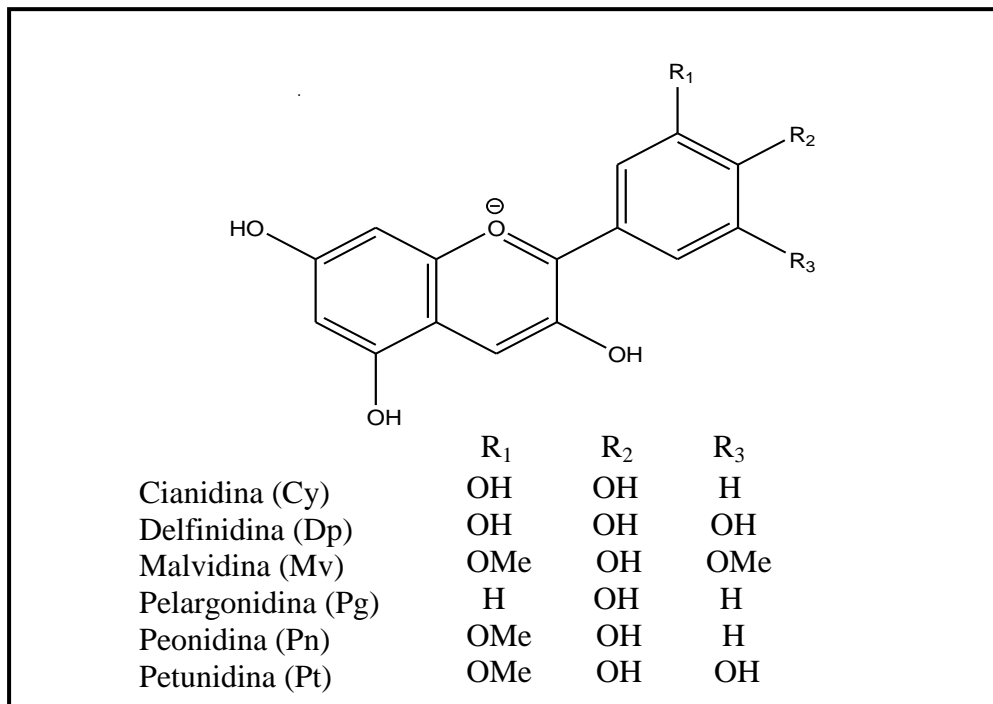


Figura 16: Estruturas químicas das principais antocianidinas encontradas em alimentos

Devido a sua capacidade antioxidante, a incorporação de alimentos ricos em antocianinas vem crescendo ao longo dos últimos anos, atribuindo a essas substâncias um importante papel na minimização dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou até mesmo reduzindo os efeitos causados por eles (MARTÍNEZ- FLORES, 2002).

Pesquisas realizadas por Volp et al. (2008) descreveram os benefícios da capacidade antioxidante das antocianinas na prevenção de doenças cardiovasculares e de alguns tipos de câncer. Mauray et al. (2009) relatou em seus estudos com ratos que foram alimentados com suplementação de extratos de uvas, uma redução nas lesões provocadas pela arteriosclerose. Cardoso et al. (2011) investigou os efeitos que uma ingestão dessas substâncias com alta capacidade antioxidante pode exercer sobre a arteriosclerose.

Ainda há muitos estudos sendo feitos sobre o efeito que os compostos fenólicos podem ter no organismo humano. No entanto, ainda não está definida a quantidade à ser ingerida para que estes possam vir a ter algum efeito.

3.4 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Muitos estudos envolvendo a análise de substâncias bioativas como ácido ascórbico, carotenoides e substâncias fenólicas são realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo esta uma das técnicas analíticas mais utilizadas devido a sua

precisão na separação dessas substâncias (FRANCIS, 1989; ROSA et al., 2007; MOTILVA et al., 2014).

O termo “cromatografia” originado do grego *Chroma* (cor) e *graphein*,⁰ (escrita da cor) é creditado ao botânico russo Mikhael Tswett que descreveu, em 1903, em seus experimentos a separação das substâncias coloridas existentes nos extratos de folhas verdes, usando um tubo de vidro recheado com carbonato de cálcio umedecido com um solvente. O processo em si não dependia da cor, contudo a utilizava para facilitar a identificação dos componentes da amostra (PACHECO et al., 2015).

A cromatografia líquida é um método físico-químico de análise que tem como objetivos principais a separação, identificação e a quantificação de substâncias que se encontram em uma mistura. Emprega colunas de diferentes tamanhos de partículas e com diferentes materiais (fase estacionária), além de ter uma fase móvel que é responsável pela eluição das substâncias.

O processo de separação das substâncias fundamenta-se na migração dos compostos de interesse de uma mistura, que ocorre através da interação entre a fase móvel, que carrega os analitos, e a fase estacionária, responsável pela seletividade e retenção dos analitos, resultando na migração diferencial de cada um (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998; SKOOG, 2006).

Pode ser classificada de acordo com a polaridade das fases: Cromatografia Líquida de Fase Normal (fase estacionária polar) ou Cromatografia Líquida de Fase Reversa (fase estacionária apolar). Também, pode ser classificada quanto ao tamanho interno das colunas, podendo ser considerada preparativa (com 6-50 μm), analítica (com 2-6 μm), microdiâmetro (1-2 μm) e capilar (com tamanho máximo de 1 μm).

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Com uma instrumentação mais sofisticada, a CLAE é uma técnica de separação que faz uso de colunas fechadas com diferentes tamanhos de partículas e recheios, podendo utilizar a mesma coluna para diversas análises.

Com os avanços no tamanho das colunas (2-10 μm), que possibilitou um tempo de análise reduzido, tornou-se um método preciso, por proporcionar uma boa resolução, separação de misturas complexas em poucas horas ou até mesmo em minutos, gerando resultados quantitativos mais confiáveis, além de fazer uso de poucas quantidades de amostra

e de solventes, logo foi uma técnica bastante difundida nos últimos 40 anos (MALDANER & JARDIM, 2009).

Basicamente, um sistema cromatográfico é constituído por uma fase móvel, válvulas, bomba, injetor, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados, como ilustrado na Figura 17.

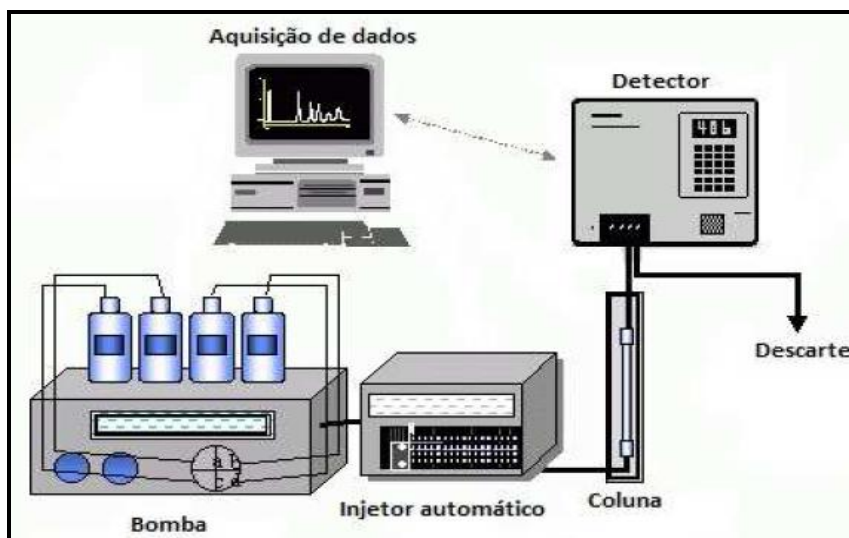


Figura 17: Esquema básico de um cromatógrafo líquido

FONTE: SANTIAGO (2014).

O funcionamento do sistema cromatográfico se dá através do sistema de bombas que é responsável por bombear a fase móvel (líquida), que irá eluir sobre a fase estacionária que se encontra no interior da coluna. Dessa forma, os solutos com maior afinidade com a fase móvel serão eluídos primeiro e, posteriormente, os que têm maior afinidade com a fase estacionária ficarão mais tempo retidos na coluna. Conforme ocorre a passagem da fase móvel pela coluna, os analitos passam pelo detector, que produz um sinal identificado pelo software do sistema de dados, caracterizando um Cromatograma (MALDANER & JARDIM, 2009; RUTZ, 2009).

Com relação aos detectores, uma melhor instrumentação é requerida para a CLAE, tendo como atributos uma alta sensibilidade, uma resposta independente da FM e uma menor sensibilidade a mudanças nas temperaturas e na vazão da FM, além da resposta aumentar de acordo com a quantidade do soluto e não ocasionar a destruição do mesmo, devendo ter uma informação quantitativa do pico (SKOOG, 2006).

Dentre os detectores existentes, o mais utilizado é o de absorção da radiação, como o detector de arranjo de diodos (PDA, em inglês *Photodiode Detector Array- DAD*), sendo o mais usado nas análises de substâncias bioativas, por possui uma ampla faixa de comprimento de onda que auxilia na detecção dessas substâncias. Conforme ocorre o aumento no número

de ligações duplas conjugadas existentes, haverá um aumento na absorvidade da amostra, logo o uso de um detector com uma grande faixa de espectro faz-se necessário (COLLINS et al., 2007). Além disto, possui algumas vantagens quando comparado a outros detectores, como geração de espectros tridimensionais e de espectros de cada pico durante o tempo de corrida, devido à existência de uma rede de fotodiodos, possibilitando que o mesmo seja armazenado em um software e permite o cálculo da pureza de cada pico cromatográfico, além de conceder a obtenção de cromatogramas em dois comprimentos de ondas distintos (LANÇAS, 2009).

3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

Segundo Vessecchi (2011), por definição, espectrometria de massas é uma técnica analítica que estuda a composição química estrutural de uma determinada substância através da formação de íons no estado gasoso, com posterior caracterização pela massa, carga e propriedades físico-químicas, empregando o espectrômetro de massas.

De acordo com Silverstein (2007), a espectrometria de massas pode ser descrita como a ionização de um ou mais compostos, onde seus íons são separados com base na razão massa/carga e o número de íons que corresponde a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro.

O espectrômetro de massas é muito usado acoplado a uma técnica de cromatografia, seja ela líquida ou gasosa, sendo muito útil nas análises de compostos com massas já conhecidas ou até mesmo em compostos com massas desconhecidas. No caso de compostos conhecidos, ocorre uma busca numa biblioteca de dados com o auxílio de um sistema computacional (cromatografia gasosa). Caso seja desconhecido, recorre-se ao íon molecular, e a sua sequência de fragmentação e evidências de outros tipos de espectrometria, como Infravermelho (IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (SILVERSTEIN, 2007).

Basicamente, um espectrômetro de massas é constituído por 3 setores: fonte, analisador e detector, como ilustrado na Figura 18.

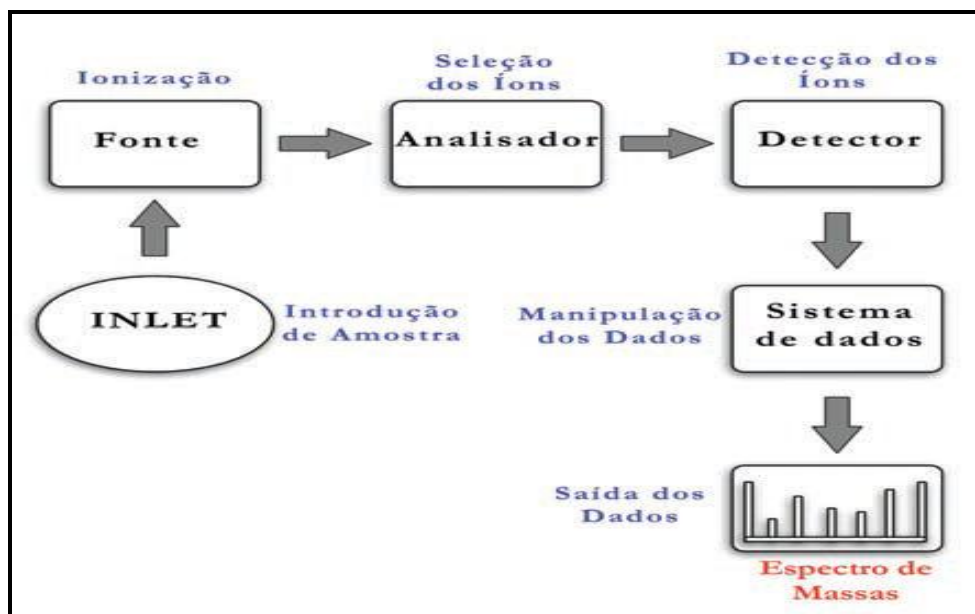


Figura 18: Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas

FONTE: LANÇAS (2009).

A amostra (sólida, líquida ou gasosa) é introduzida diretamente no espectrômetro de massas ou através de outra técnica, no caso mais comum, o uso de um cromatógrafo. A amostra é injetada sendo direcionada para uma fonte. Nessa fonte, ocorre a etapa de ionização onde há formação de íons gasosos. Em seguida, ocorrem as etapas de seleção, fragmentação e separação da mistura de íons formados durante o processo de ionização, segundo a relação massa /carga (m/z) no analisador. Posteriormente, ocorre a captura do sinal originado pela corrente de íons que passam pelo analisador no detector, sendo o sinal transferido para um software que irá processar os dados, gerando os espectros de massa (SMITH, 2004; SILVERSTEIN, 2007; CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009).

Na espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida, a fonte de ionização mais utilizada é o Eletronebulização e os analisadores mais usados são o quadrupolo e tempo de voo (TOF, em inglês *Time of flight*).

A ionização por Eletronebulização permite que os íons sejam criados sob pressão atmosférica, sem a necessidade de vácuo. Nesse caso, a amostra, que se encontra dissolvida em um solvente, é pressurizada através de um tubo capilar sob uma determinada voltagem que fará com que o líquido seja emerso do tubo à pressão atmosférica, na forma de um aerosol. Com isso, o solvente é eliminado sucessivamente e os íons formados são direcionados para o analisador (LANÇAS, 2009; LANÇAS, 2013).

O analisador tipo quadrupolo é formado por 4 tubos cilíndricos paralelos que possuem uma voltagem de radiofrequência que é aplicada nos tubos. Quando os íons gerados pela fonte

passam por esses tubos, é aplicada uma determinada voltagem fazendo com que apenas os que possuam um certo valor de m/z possuam uma trajetória estável, atravessando o quadrupolo até chegarem ao detector. Já no analisador por tempo de voo, os íons sofrem uma aceleração provocada por uma alta voltagem e seguem por um tubo até chegarem ao detector. Os íons que apresentam diferentes m/z , logo vão apresentar velocidades diferentes. No entanto, se todos os íons retiverem a mesma energia, os de menor massa terão uma velocidade maior (SILVERSTEIN, 2007; LANÇAS, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram:

- ✓ Acetato de etila ($C_4H_8O_2$) grau HPLC (Tedia);
- ✓ Acetonitrila (C_2H_3N) grau HPLC/ Spectrum (Tedia);
- ✓ Acetona (C_3H_6O) grau HPLC (Tedia);
- ✓ Ácido acético ($C_2H_4O_2$) grau HPLC (Tedia);
- ✓ Ácido clorídrico (HCl) grau PA (Tedia);
- ✓ Ácido fórmico (CH_2O_2) ACS (Emsure);
- ✓ Ácido fosfórico (H_3PO_4) grau PA (Tedia);
- ✓ Ácido sulfúrico (H_2SO_4) grau PA (Tedia);
- ✓ Água Milli-Q® (ultrapura);
- ✓ Celite 545 (Tedia);
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) (Vetec);
- ✓ Éter etílico ($C_4H_{10}O$) grau CG (Tedia);
- ✓ Éter de petróleo grau HPLC (Tedia);
- ✓ Éter metil *terc*-butílico ($C_5H_{12}O$) grau HPLC (Tedia);
- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) PA (Vetec);
- ✓ Hidroxitoluenobutilato -BHT ($C_{15}H_{24}O$) (Spectrum);
- ✓ Metanol (CH_4O) grau HPLC/ Spectro (Tedia);
- ✓ Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) (Vetec);

Padrões analíticos Sigma Aldrich® nas análises de:

- ✓ Ácido ascórbico (99%);
- ✓ Ácidos fenólicos (pureza acima de 95%);
- ✓ Glicose (pureza de 99,5%);
- ✓ Frutose (99%);

Para análise de sacarose, empregou-se um padrão Spectrum® com pureza de 99%.

As colunas empregadas nos métodos cromatográficos foram:

- ✓ Coluna amino (Amino 30cm x 4,6mm, High Performance Carbohydrate);
- ✓ Coluna C₁₈ (Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm, 2,4µm);
- ✓ Coluna C₃₀ (YMC Carotenoid S-3; 4,6 x 250mm);
- ✓ Coluna de troca iônica HPX 87 H BIO RAD[®] 7,8 cm x 300 mm);
- ✓ Coluna Thermo ODS HYPERSIL C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram:

- ✓ Agitador tipo vórtex modelo Genie 2 – Scientific Industries[®];
- ✓ Balança analítica com resolução de quatro casas decimais (AY220, Marte Shimadzu);
- ✓ Banho-maria com agitação (929, GyromaxTM);
- ✓ Banho ultrassônico modelo Branson 2210;
- ✓ Centrífuga Thermo (Electron Corporation Sorvall Biofuge Stratos)
- ✓ Cromatógrafo líquido com forno para colunas e injetor automático (Alliance[®] 2695, Waters);
- ✓ Cromatógrafo líquido modelo Modular W 600 Waters[®] injetor automático 717 plus;
- ✓ Detector de arranjo de fotodiodos UV/Vis (2996, Waters);
- ✓ Detector índice de refração (IR 2410, Waters[®]);
- ✓ Espectrofotômetro Modelo UV-1800 – Shimadzu[®];
- ✓ Espectrômetro de massas Q-TOF (SYNAPT mass spectrometry, Waters);
- ✓ Estufa modelo WTB - Binder[®];
- ✓ Geladeira modelo DF45 -Eletrolux
- ✓ Liofilizador (L101, Líotop);
- ✓ Microcentrífuga (Hsiangtai);
- ✓ Microcomputador modelo Optiplex GX 240 – Dell[®]
- ✓ Pipetadores automáticos com capacidade para 10 a 100 µL, de 100 a 1000 µL e de 0,5 a 5 mL Brand[®];
- ✓ Sistema de aquisição de dados software Empower;
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q (A10, Milipore);

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho foi executada no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, acreditado pelo INMETRO pela ISO 17.025 para análises de carotenoides, situado no município do Rio de Janeiro.

4.2.1 Procedência dos frutos

Os frutos de *Eugenia astringens* Cambes foram coletados na restinga da Marambaia, localizada no bairro de Guaratiba, no município do Rio de Janeiro- RJ, com coordenadas geográficas 23°03'02.0"S 43°35'42.3"W no mês de agosto. Os frutos de *Eugenia puniceifolia* Kunth DC foram coletados na restinga de Maricá, localizada no Município de Maricá- RJ, sendo as coordenadas geográficas 22° 56' 56.959" S 42° 53' 12.735" W no mês de novembro. Foram coletados frutos maduros de acordo com a coloração. A identificação botânica foi realizada pelo D.Sc. Marcelo da Costa Souza, professor e pesquisador do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2.2 Preparo das amostras

Os frutos foram selecionados de acordo com o estágio de maturação, higienizados e separados manualmente em partes: semente e parte comestível (polpa + casca). As partes foram pesadas em triplicatas e submetidas separadamente às análises de umidade e vitamina C. Para as demais análises (açúcares, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides), os frutos foram estocados em freezer (-18°C) até o momento da análise. Para as análises de antocianinas, uma pequena fração da parte comestível dos frutos foram congeladas e liofilizadas. A partir do material seco foram pesadas, em triplicata, e submetidas à análise.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Análise de umidade e características físicas

A análise de umidade foi realizada por gravimetria pelo método da AOAC (2010). Inicialmente, as partes dos frutos *in natura* foram pesadas em frascos previamente secos. Em

seguida foram deixados em estufa à 105°C durante 3 h, em seguida, após esfriarem em dessecador, foram pesados. Os frutos foram, novamente, levados à estufa à 105°C durante uma hora e, após esfriarem em dessecador, foram novamente pesados. Este procedimento foi repetido até se obter peso constante. O resultado foi expresso segundo a Equação 1:

$$\% \text{ umidade} = 100 - \left[\frac{(M - m)}{M_a} * 100 \right] \text{ (Equação 1).}$$

Onde,

M = Massa do frasco de vidro mais amostra secos;

m = Massa do frasco de vidro;

Ma = Massa da amostra.

Para a análise de características físicas, as partes dos frutos foram pesadas separadamente em triplicata, e foi feita uma média para se obter um percentual das partes.

4.3.2 Análise de Açúcares por CLAE

4.3.2.1 Extração e análise de açúcares

A extração foi realizada segundo Macrae (1998). Os açúcares foram extraídos das amostras dos frutos *in natura* com água Milli-Q em ultrassom por 20 minutos. Após, as amostras foram então filtradas e submetidas à análise por CLAE-IR.

Para o preparo da solução padrão, pesou-se 0,125 g de cada padrão analítico para um mesmo balão volumétrico de 25 mL, avolumando-se este em seguida com água ultrapurificada.

A quantificação dos açúcares foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva analítica a partir de diluições da solução padrão preparada.

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® modelo Alliance 2690/5, detector de índice de refração Waters® modelo 2410, e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção dos padrões. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna amino (Amino 30cm x 4,6mm, High Performance Carbohydrate) à temperatura de 30°C em modo de eluição isocrático com fase móvel acetonitrila:água (75:25), sob fluxo de 1,4 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 20 min.

4.3.3 Análise de ácido ascórbico por CLAE

4.3.3.1 Extração e análise de ácido ascórbico

A extração de ácido ascórbico foi realizada segundo a metodologia de Rosa et al. (2007). A vitamina C foi extraída dos frutos *in natura* com solução aquosa de H₂SO₄ 0,05M em banho ultrassônico por 10 minutos. Após, as amostras foram então filtradas e submetidas à análise por CLAE-DAD.

Para o preparo da solução padrão, pesou-se 25 mg do padrão analítico para balão volumétrico âmbar de 25 mL, avolumando-se este em seguida com solução de ácido sulfúrico 0,05 M. A quantificação do ácido ascórbico foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva analítica a partir de diluições da solução padrão preparada.

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters[®] modelo Alliance 2690/5, detector de arranjo de fotodiodos Waters[®] modelo 2996 (quantificação em 242,6 nm). O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de troca iônica (HPX 87 H BIO RAD[®] 7,8 cm x 300 μm) à temperatura ambiente (28°C), em modo de eluição isocrático com solução aquosa de H₂SO₄ 0,05 M, sob fluxo de 0,70 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 20 μL, tempo de corrida de 10 min.

4.3.4 Análise de ácidos fenólicos por CLAE

4.3.4.1 Extração e análise de ácidos fenólicos

A extração foi realizada segundo a metodologia descrita por Mattila & Kumpulainen (2002), para se obter as frações de ácidos fenólicos livres, os derivados de hidrólise básica e de hidrólise ácida.

As amostras dos frutos *in natura* foram submetidas à extração com solução de metanol contendo BHT (2 g.L⁻¹)/ ácido acético 10% em água (85:15 v/v) seguida de agitação em vórtex e extração em banho ultrassônico. Após a decantação, foi retirada uma alíquota de 100 μL para análise de ácidos fenólicos livres por CLAE-DAD.

Posteriormente, foi adicionado ao extrato 17 mL de solução aquosa NaOH 3 M, onde borbulhou-se com N₂ durante 1 min., tampou-se o frasco e o mesmo foi mantido sob agitação mecânica por 16h. Em seguida, o pH foi ajustado com solução aquosa de HCl 6 M para 2,0 ± 0,1 com auxílio de um pHmetro. Posteriormente foi realizada partição com 15 mL de solução

éter etílico: acetato de etila (1:1 v/v) por três vezes. A fase orgânica foi avolumada para 50 mL com a mistura éter etílico: acetato de etila (1:1 v/v). Uma alíquota de 1 mL foi retirada e seca sob fluxo de N₂, sendo o resíduo dissolvido com 100 µL de metanol, procedendo-se com a análise cromatográfica, obtendo-se a fração básica.

Subsequentemente, a fase aquosa foi inserida novamente ao resíduo sólido, onde adicionou-se 2,5mL de HCl concentrado e levado para estufa à 85°C durante 35 min., dando procedimento a hidrólise ácida. Posterior ao resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 5mL de NaOH 3M, e então ajustou-se o pH para 2,0±0,1 em pHmetro. Logo depois, foi realizada uma nova partição com éter etílico:acetato de etila (1:1 v/v), seguida por concentração, dissolução em metanol e análise cromatográfica, obtendo-se a fração ácida.

A quantificação dos ácidos fenólicos foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva analítica a partir de padrões analíticos comerciais (ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido *o*-cumárico e ácido gálico), os quais foram dissolvidos em metanol.

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996 (varredura 210 a 600 nm com quantificação em 270 nm).O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6 mm e 2,4 µm) à 30°C em modo de eluição gradiente (Tabela 3) de ácido fosfórico 1,5 mL.L⁻¹ em água (Fase A) e acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0 à 1,2 mL.min⁻¹, o volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 28 min.

Tabela 4: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos ácidos fenólicos

Tempo	Fluxo (mL. min ⁻¹)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	1,0	95,0	5,0
6,00	1,0	95,0	5,0
12,00	1,2	88,0	12,0
18,00	1,2	80,0	20,0
20,00	1,2	50,0	50,0
24,00	1,2	50,0	50,0
25,00	1,2	95,0	5,0
28,00	1,0	95,0	5,0

4.3.5 Análise de flavonoides por CLAE

4.3.5.1 Extração e análise de flavonoides

A extração de flavonoides foi realizada com base no método de Klump e colaboradores (2001). As amostras dos frutos *in natura* foram maceradas e adicionados 10 mL de solução metanol: água (80:20 v/v). Os frascos contendo as amostras foram mantidos em estufa por 2,5 h a 65°C. Após esse tempo, adicionou-se 600 µL de solução aquosa de NaOH 2M e os frascos foram agitados vigorosamente. Depois, deixou-se as amostras em repouso por 10 min. e acrescentou-se 200 µL de ácido acético glacial e agitou-se. As amostras foram então mantidas em temperatura ambiente até a decantação do material sólido e retirou-se uma alíquota que foi submetida à análise por CLAE-DAD. A identificação dos flavonoides foi feita comparando-se o tempo de retenção e os espectros de padrões injetados sob as mesmas condições de análise.

A análise cromatográfica foi realizada por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996 (varredura 210 a 600 nm com quantificação em 260 nm). O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6 mm e 2,4 µm) à 45°C em modo de eluição gradiente (Tabela 4) de ácido fórmico 1% em água (1: 9 v/v) (Fase A) e acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, o volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 28 min.

Tabela 5: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos flavonoides

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	95,0	5,0
15,00	95,0	5,0
23,00	88,0	12,0
24,00	80,0	20,0
28,00	50,0	50,0

4.3.5.2 Extração e análise de antocianinas

A extração de antocianinas foi realizada conforme método descrito por Santiago et al., (2010). As amostras liofilizadas (Figura 19) foram submetidas à extração com solução de

ácido fórmico 10% em metanol, com agitação durante 1 min., posteriormente extração em banho ultrassônico por 10 min. e subsequente centrifugação a 6000 rpm à 20°C por 10 min., sendo o sobrenadante transferido para balão de 10 mL. O processo foi repetido com o resíduo sólido obtido na centrifugação até que o sobrenadante não apresentasse a coloração característica de antocianinas. Em seguida, o balão volumétrico foi avolumado com solução de extração e uma alíquota foi retirada e transferida para tubo de microcentrífuga, onde o extrato foi submetido à centrifugação a 120 rpm por 5 min. Uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi evaporada sob fluxo de ar comprimido até a secura e em seguida o resíduo foi dissolvido em solução de ácido fórmico 5% em água : metanol (9:1 v/v), submetida à análise por CLAE-DAD.

A quantificação das antocianinas foi realizada por padronização externa através da construção de curvas analíticas a partir de padrões analíticos isolados segundo a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2012), utilizando como matrizes a uva (*Vitis* sp), a jabuticaba e frutos de *E. astringens*. O teor de antocianinas dos pós foi calculado através da Equação 3.

$$\text{Teor de Antocianina}(mg/100g) = \frac{R \times FD}{M} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

R= Resultado fornecido pela curva analítica das antocianinas ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)

M= Massa da amostra (g)

FD= fator de diluição.



Figura 19: Pó obtido do fruto de *E. astringens*

A análise cromatográfica foi feita de acordo com a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2015), em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996 (varredura 210 a 600 nm com quantificação em 520 nm) e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção, dos espectros de UV e espectros de massa acurada dos padrões. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6mm e 2,4µm) à 40°C em modo de eluição gradiente (Tabela 6) com fase móvel ácido fórmico 5% em metanol (9: 1 v/v) (Fase A) e acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0mL.min⁻¹, o volume de injeção foi 10µL e o tempo de corrida de 20 min.

Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel para separação das antocianinas

Tempo	Fase A(%)	Fase B(%)
0,00	95	5
15,00	87	13
16,50	86	14
18,00	95	5
20,00	95	5

4.3.5.3 Isolamento e concentração dos extratos antociânicos

Os extratos metanólicos de *E. puniceifolia* e *E. astringens* secos foram secos e então dissolvidos em 1 e 2 mL respectivamente com solução utilizada para injeção no cromatógrafo composta por 5% de ácido fórmico em água: metanol (9:1 v/v). Posteriormente, alíquotas de cerca de 1 mL foram centrifugadas e, em seguida, acondicionadas em *vials* e levadas ao injetor do cromatógrafo. A coleta foi realizada manualmente (Figura 20) para as duas antocianinas majoritárias de interesse em *E. puniceifolia* e para as cinco antocianinas majoritárias de interesse em *E. astringens*.

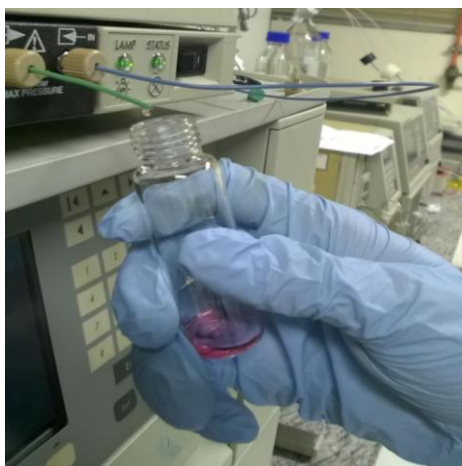


Figura 20: Coleta manual dos extratos antociânicos

Para a etapa de concentração, foram utilizados cartuchos Sep-Pak C18 Waters® (Figura 21) previamente acondicionados com metanol. Após saturação dos cartuchos com os extratos aquosos antociânicos, os mesmos foram eluídos com solução de ácido fórmico 10% em metanol. Os extratos antociânicos foram secos sob fluxo de nitrogênio e dissolvidos com solução de ácido fórmico 5% em água: metanol (9:1 v/v).



Figura 21: Cartucho Sep-Pak para concentração dos extratos antociânicos

4.3.5.4 Identificação das antocianinas por espectrometria de massas

Para identificação das antocianinas isoladas, utilizou-se o sistema de espectrometria de massas Synapt da Waters®, com inserção direta dos mesmos. Este sistema é composto pelos analisadores quadrupolo ortogonal (t-wave®) e tempo de voo (em inglês, *Time of Fly*) de alta resolução. A fonte de ionização utilizada foi electrospray (ESI) positiva com as seguintes condições: temperatura da fonte de 80°C, fluxo do gás de arraste (N₂) de 5 L. min⁻¹ com temperatura de 150°C, energia de capilar de 2,5 KV, energia do cone de amostragem de 35 V e energia do cone de extração de 4,0 V para os frutos de *E. puniceifolia*.

Para os frutos de *E. astringens*, as condições foram: temperatura da fonte de 80°C, fluxo do gás de arraste (N₂) de 25 L. min⁻¹ com temperatura de 250°C, energia de capilar de 4,0 KV, energia do cone de amostragem de 40 V e energia do cone de extração de 4,0 V

4.3.6 Análise de carotenoides por CLAE

4.3.6.1 Extração e análise de carotenoides

A extração de carotenoides foi baseada na metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001). As amostras dos frutos *in natura* já pesadas foram transferidas para graal de porcelana com 3 g de celite onde se homogeneizou a mistura com o auxílio de um pistilo e se adicionou acetona até um volume suficiente para cobrir toda a mistura celite/ amostra, dando seguimento à etapa de extração. A mistura obtida foi filtrada sob vácuo em funil de vidro com placa porosa sinterizada conectado a Kitassato de 500 mL. O sólido retido no funil de placa sinterizada foi retornado ao graal e procedida nova extração até que o sólido apresentasse ausência de coloração característica de carotenoide. O extrato cetônico retido no Kitassato foi vertido para um funil de separação contendo 40 mL de éter de petróleo com auxílio de funil raiado. Em seguida, o extrato foi lavado sucessivamente com água MilliQ até que houvesse a eliminação da fase cetônica. Foram necessárias aproximadamente 4 a 5 lavagens seguidas de descarte da fase aquosa, no caso de formação de emulsão, foi adicionado aproximadamente 20 mL de solução concentrada de cloreto de sódio para desfazê-la. Após a separação, os extratos etéreos foram filtrados através de camada de sulfato de sódio anidro. Posteriormente, os extratos de *E. puniceifolia* foram recolhidos em balão volumétrico de 100 mL e de 10 mL (casca + polpa e semente, respectivamente) e os de extratos de *E. astringens* foram recolhidos em balão volumétrico de 25 mL e de 10 mL (parte comestível e semente, respectivamente), sendo depois avolumados com éter de petróleo.

Os extratos de carotenoides da polpa mais casca e da semente de ambos os frutos foram submetidos, primeiramente, à leitura em espectrofotômetro utilizando o $\lambda_{\max} = 450$ nm (absorção do β -caroteno) para se obter o teor de carotenoides totais nos frutos, respeitando as faixas de variações de absorvância entre 0,200 à 0,800, sendo que para valores acima de 0,800, foi necessário realizar uma diluição do extrato. O teor de carotenoides totais foi calculado através da Equação 7:

$$\text{Carotenoides Totais } (\mu\text{g} / 100\text{g}) = \frac{\text{ABS} \times \text{FD} \times \text{Vf} \times 1000000}{\text{M} \times \varepsilon} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

ABS=Absorvância;

FD= fator de diluição (quando necessário)

Vf= Volume final;

M= Massa da amostra

ε = 2592 (Coeficiente de absorvidade do β -caroteno em éter de petróleo)

Após a quantificação dos carotenoides totais, uma alíquota de cada extrato foi retirada para a secagem sob fluxo de N_2 e o resíduo dissolvido com acetona para avaliar o perfil cromatográfico a fim de se verificar a necessidade da etapa de saponificação das amostras.

4.3.6.2 Reação de saponificação

A reação de saponificação faz-se necessária para algumas matrizes (em particular hortaliças e alguns frutos) quando a amostra contém lipídios ou os carotenoides que podem estar esterificados. Essa reação, proporciona a hidrólise dos ésteres de carotenoides, liberando o carotenoide anteriormente ligado.

Para tal reação, retirou-se uma alíquota do extrato etéreo de 5 mL e transferiu-se para um frasco âmbar com tampa de silicone onde se adicionou 5 mL de solução de KOH 10% em metanol (m/v) e, logo após, purgou-se o frasco com fluxo de N_2 para que aja a remoção da atmosfera oxidante. A reação foi mantida em local que não houvesse luz por 16 horas.

Posteriormente à reação de saponificação, o volume do frasco âmbar foi completado com água e agitou-se vigorosamente. Após a separação das fases, o conteúdo do frasco foi transferido quantitativamente para uma bureta onde se procedeu a etapa de lavagem da solução etérea com aproximadamente 100 mL de água MilliQ. Em seguida, registrou-se o volume da solução etérea na bureta e descartou-se a fase aquosa em recipiente apropriado para uma posterior neutralização do material. Depois, transferiu-se a solução etérea para um frasco de 10 mL e adicionou-se sulfato de sódio anidro e agitou-se, e procedeu-se novamente com a leitura em espectrofotômetro em 450 nm seguida de análise cromatográfica.

4.3.6.3 Método cromatográfico de carotenoides

A análise cromatográfica foi realizada segundo Pacheco et al. (2014) usando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® W 600 e detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 996 (varredura 300 a 500 nm, com quantificação em 450 nm) e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção e dos espectros de UV dos padrões. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₃₀, YMC Carotenoid S-3; 4,6 x 250mm) à 33°C em modo de eluição gradiente (Tabela 7) de metanol (Fase A) e éter metil-*terc*-butílico (Fase B) com fluxo de 0,8 mL. min⁻¹, o volume de injeção foi 15µL e o tempo de corrida de 28 min.

Tabela 7: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos carotenoides

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	80,0	20,0
0,50	75,0	25,0
15,00	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,50	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,00	80,0	20,0

A quantificação dos carotenoides foi realizada por padronização externa através da construção de curvas analíticas a partir de padrões analíticos isolados segundo a metodologia descrita por Pacheco et al. (2013), utilizando matrizes de fontes vegetais. O teor do perfil de carotenoides foi calculado através da concentração obtida pela construção de uma curva analítica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 UMIDADE E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Após realizar-se a separação dos frutos de *E. puniceifolia*, verificou-se que o fruto apresentou um valor de 69% da parte comestível e 31% referente a semente. Já os frutos de *E. astringens*, apresentou um valor de 62% referente a parte comestível e 38% de semente.

O teor de umidade da parte comestível e da semente dos frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens* foram expressos em percentagem (%) de água no fruto, como é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Teor de umidade da parte comestível, semente e fruto integral das duas espécies

Umidade (%) ± Desvio padrão		
	<i>E. puniceifolia</i>	<i>E. astringens</i>
Parte comestível	79,40 ± 0,75	80,80 ± 1,37
Semente	45,80 ± 0,75	43,10 ± 6,07
Fruto integral	68,90	66,00

Os valores de umidade apresentados na tabela mostram que os frutos são constituídos principalmente de água (cerca de 80 %), característica essa atribuída aos frutos em geral, conforme descrito na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

A análise de umidade é um dos parâmetros para se determinar a atividade de água nos alimentos. A umidade está relacionada com estabilidade, qualidade e composição do alimento, podendo influenciar diretamente no tipo de armazenamento, tipo de embalagens e no processamento do mesmo (CHAVES et al., 2004).

5.2 AÇÚCARES

A quantificação dos açúcares foi realizada por padronização externa por meio de curvas (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Teores médios de açúcares e desvio padrão no fruto de *E. puniceifolia*

Parte do fruto	Analito	Média (g/ 100g) ± Desvio padrão
Parte comestível	Frutose	5,72 ± 1,20
	Glicose	5,45 ± 1,16
Semente	Frutose	1,20 ± 0,10
	Glicose	1,16 ± 0,10
	Sacarose	1,94 ± 0,11
Fruto integral	Açúcares totais (frutose+glicose+sacarose)	9,03

Conforme os dados da tabela 9, a análise de açúcares do fruto da espécie *E. puniceifolia* apresentou na sua constituição os açúcares frutose e glicose na parte comestível (Figuras 22a e 24) e na semente, além de frutose e glicose, foi identificada e quantificada a sacarose (Figuras 22b e 24).

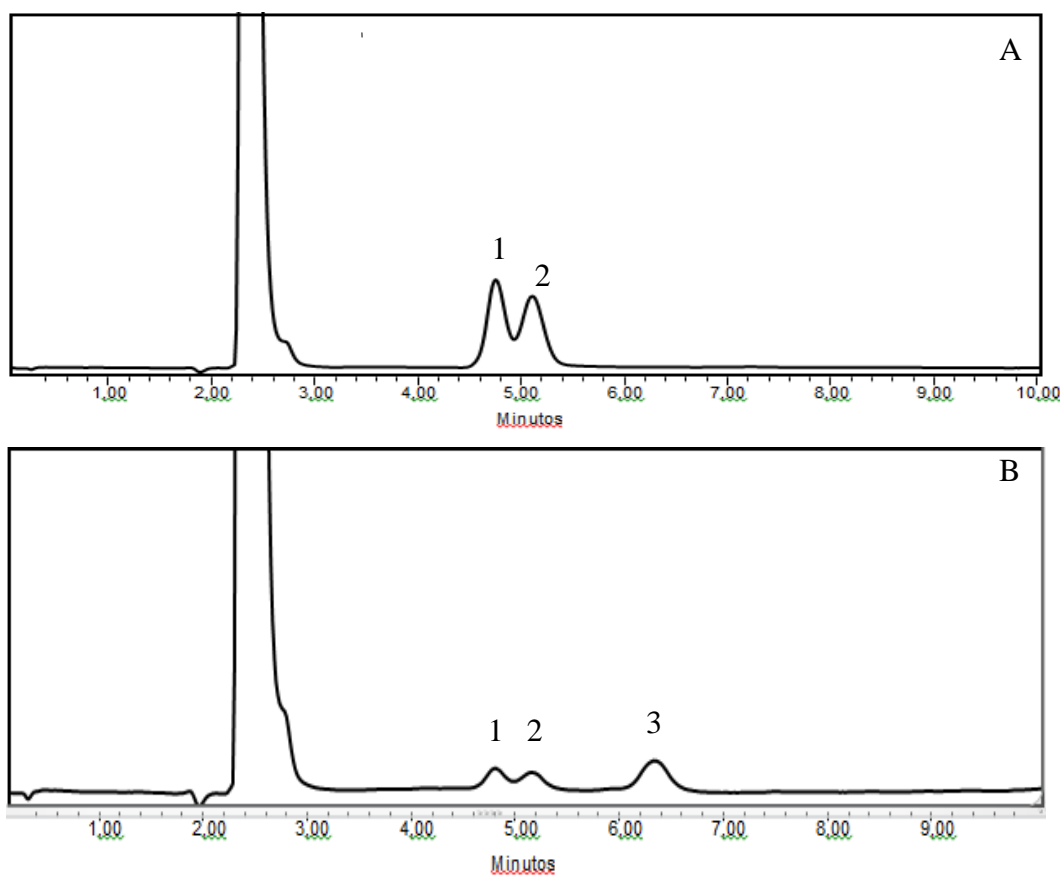


Figura 22: Cromatograma de açúcares da parte comestível (A) e semente (B) de *E. puniceifolia*.

A concentração média do teor total de açúcares solúveis para a parte comestível do fruto de *E. puniceifolia* foi de 11,17 mg.100 g⁻¹, sendo o teor de frutose 5, 72 g.100 g⁻¹ e de glicose 5,45 g.100g⁻¹. Confrontando esse resultado com dados da literatura, observa-se que o fruto apresentou um valor similar a goiaba (*Psidium guajava* L) 12,40 g.100 g⁻¹ e um teor

elevado quando comparado ao jambo (*Eugenia malaccensis* L.) 6,50 g.100 g⁻¹ frutos pertencentes à família *Myrtaceae* (TACO, 2011).

Para o fruto de *E. astringens*, de acordo com a tabela 10, o teor médio de açúcares, considerando os açúcares solúveis totais identificados e quantificados na parte comestível e na semente, foi de 2,79 g.100 g⁻¹.

Tabela 10: Teores médios de açúcares e desvio padrão no fruto de *E. astringens*

Parte do fruto	Analito	Média (g.100 g ⁻¹) ± Desvio padrão
Parte comestível	Frutose	1,87 ± 0,84
	Glicose	1,75 ± 0,76
Semente	Frutose	0,81 ± 0,39
	Glicose	0,66 ± 0,32
Fruto integral	Açúcares totais (frutose+glicose+sacarose)	2,79

Os açúcares identificados e quantificados tanto na fração polpa mais casca como na fração semente foram a frutose e a glicose (Figuras 23a, 23b e 24).

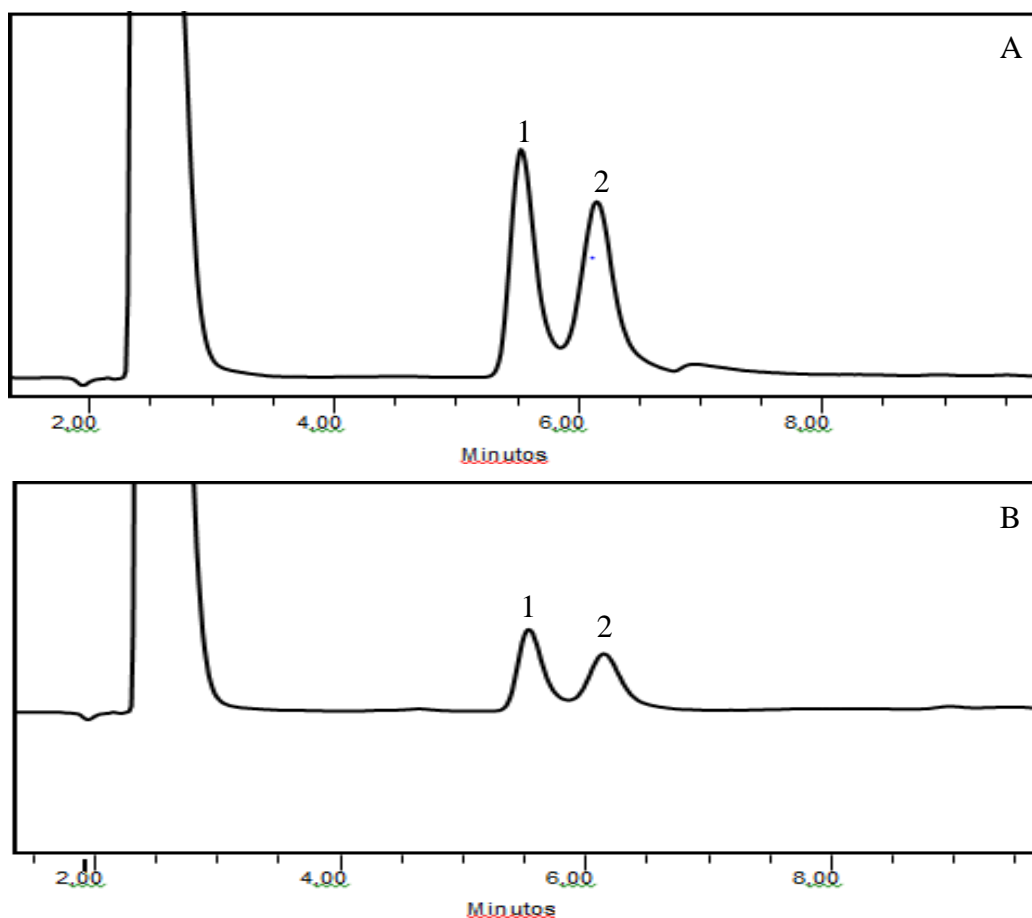


Figura 23: Cromatograma de açúcares da parte comestível (A) e semente (B) de *E. astringens*

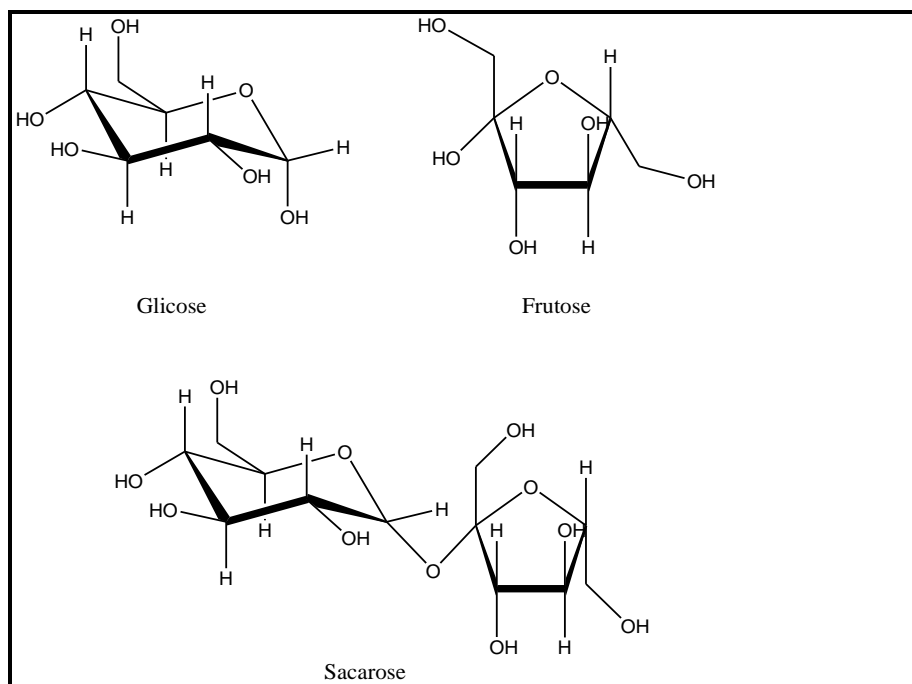


Figura 24: Estruturas dos açúcares encontrados nos frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens*

Através do valor médio obtido de $3,63 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ na parte comestível do fruto, observa-se que esse fruto apresentou teor duas vezes menor de açúcares solúveis na sua constituição química se comparado ao fruto de *E. puniceifolia* ($11,17 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e a outros frutos. Pode ser classificado como um alimento com baixo teor de açúcares, segundo a classificação da RDC 54 de 12 de novembro de 2012, que determina alimentos/ produtos na faixa abaixo de $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de açúcares como possuindo baixo teor de tais substâncias (BRASIL/ MS ANVISA, 2012).

A presença de açúcares é um fator de qualidade na aceitação do fruto in natura ou processado, promovendo uma melhor aceitação sensorial dos mesmos.

5.3 ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

Neste estudo, a detecção e a quantificação de ácido ascórbico presente nos frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens* foi verificada após a análises da parte comestível e da semente de ambos os frutos (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Média dos teores de ácido ascórbico e desvio padrão no fruto de *E. puniceifolia*

Parte do fruto	Teor médio (mg.100g⁻¹) ± Desvio padrão
Parte comestível	74,14 ± 3,55
Semente	24,58 ± 5,40
Fruto integral	58,72

A concentração média de vitamina C quantificada na parte comestível dos frutos de *E. puniceifolia* foi de 74,14 mg.100 g⁻¹ na parte comestível e de 24,58 mg.100 g⁻¹ na semente. Portanto considerando a proporção das partes analisadas separadamente, o valor total de vitamina C encontrado no fruto integral foi de 58,72 mg.100 g⁻¹

Os valores de ácido ascórbico quantificados na parte comestível dos frutos de *E. astringens* foram de 1,57 mg/ 100 g na polpa mais casca e de 4,89 mg/100 g na semente, tendo o fruto integral 2,86 mg/ 100 g de vitamina C (tabela 12).

Tabela 12: Média dos teores de ácido ascórbico e desvio padrão no fruto de *E. astringens*

Parte do fruto	Teor médio (mg/ 100g) ± Desvio padrão	Equação da reta	R²
Parte comestível	1,57 ± 0,11		
Semente	4,89 ± 1,68	y=2,21e+006x-4,51e+004	0,9932
Fruto integral	2,86		

A presença de ácido ascórbico foi verificada através do tempo de retenção e espectro de UV/ Vis do padrão (Figuras 25, 26 e 27).

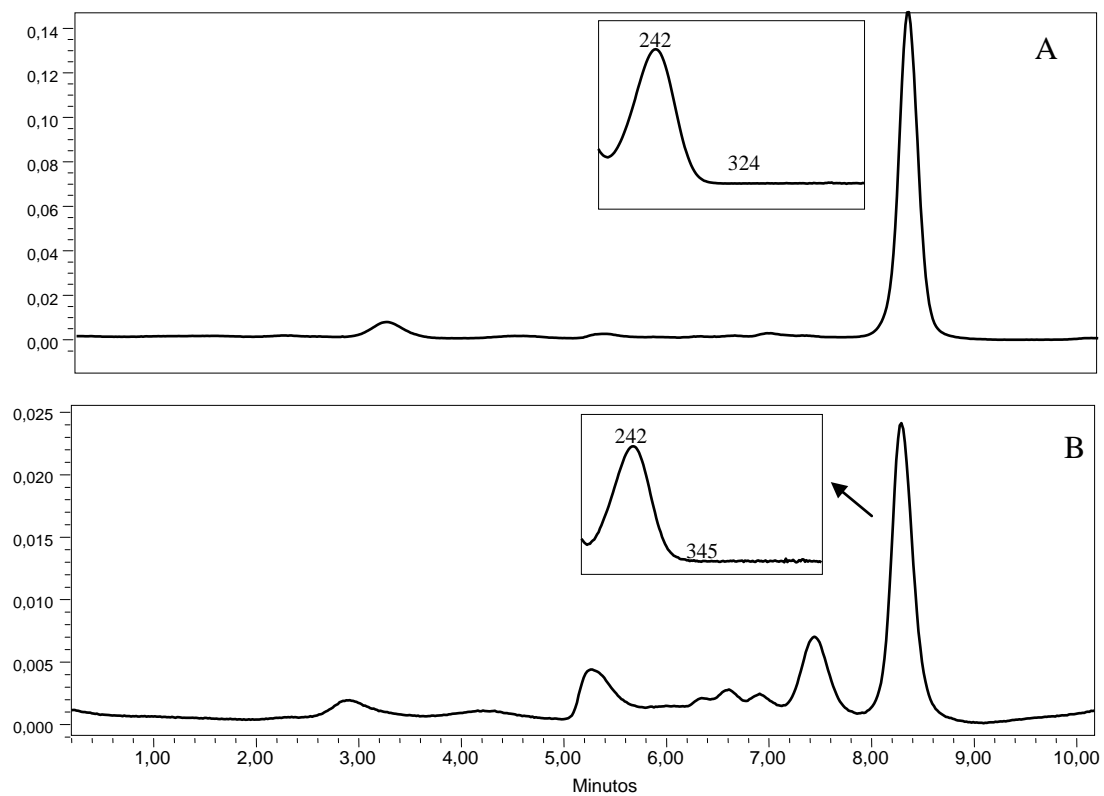


Figura 25: Cromatograma da vitamina C na parte comestível (A) e semente (B) de *E. punicifolia*

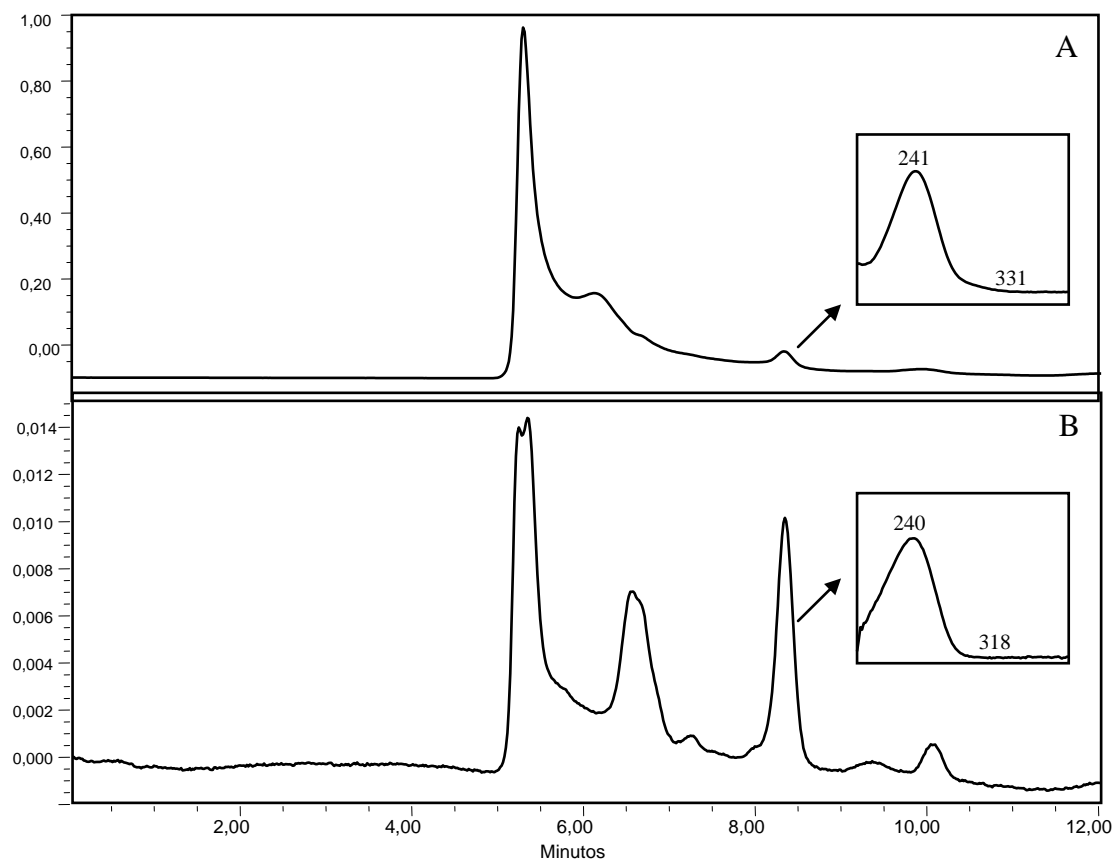


Figura 26: Cromatograma da análise de vitamina C na semente (A) e na parte comestível (B) de *E. astringens*.

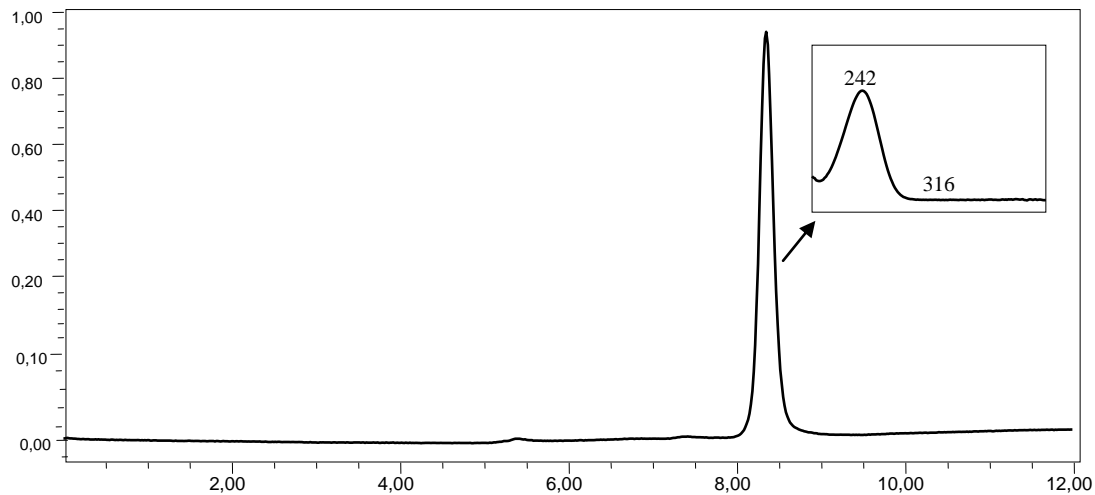


Figura 27: Cromatograma do padrão analítico comercial de ácido ascórbico

Pode-se observar que alguns frutos apresentaram teores similares aos frutos de *E. puniceifolia*, como mostrou um estudo feito por Valente et al. (2011) que reportou para frutos considerados exóticos, como a goiaba, também pertencente a família *Myrtaceae*, valores de $65,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Além disso, comparando-se o teor de vitamina C com os outros frutos como a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* O Berg) $16,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e a laranja pêra (*Citrus sinensis*) $53,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, fruta considerada rica nessa substância e bastante consumida no Brasil segundo a última Pesquisa de Orçamentos Familiares- POF (IBGE, 2009), esses resultados mostram que o fruto pode ser considerado fonte de vitamina C (TACO, 2011).

Com relação aos frutos de *E. astringens*, o teor encontrado na parte comestível foi de $1,57 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, uma quantidade considerada baixa de ácido ascórbico. No entanto, o valor está próximo a outros frutos como a pêra (*Pyrus communis*) $0,62 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, araçá amarelo (*Psidium cattleianum* Sabine) $5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e a uvaia $5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, frutos pertencentes à mesma família (BARCIA et al., 2010; PEREIRA, 2011).

Considerando-se a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para a vitamina C de 45 mg para um adulto (FAO, 1998; USDA, 2000; Brasil, 2005), os frutos de *E. puniceifolia* apresentaram um valor acima do recomendado, 64% a mais que a IDR, portanto esses frutos podem ser considerados uma fonte alternativa dessa substância. Para os frutos de *E. astringens*, o teor obtido foi bem inferior ao recomendado, devido à baixa concentração de ácido ascórbico em sua composição química.

5.4 CAROTENOIDES TOTAIS E PERFIL

A quantificação de carotenoides totais e de cada substância analisada individualmente presentes na composição dos frutos de *E. punicifolia* estão descritos na tabela 13.

Tabela 13: Teor de carotenoides e desvio padrão na polpa+casca dos frutos de *E. punicifolia*

Parte comestível	
	Teor ($\mu\text{g. g}^{-1}$) \pm Desvio padrão
Totais	632,00 \pm 4,20
Luteína	3,00 \pm 1,76
Zeaxantina	4,45 \pm 2,60
β -criptoxantina	32,00 \pm 4,45
β -caroteno	5,70 \pm 0,56
Licopeno	503,00 \pm 3,60

Analisando os resultados da tabela 13, pode-se observar que o fruto em questão apresentou um elevado teor de carotenoides totais quando comparado ao buriti (*Mauritia flexuosa* L.) 446 $\mu\text{g. g}^{-1}$, fruto considerado fonte de carotenoides (RODRIGUEZ- AMAYA, 2001). Além disso, apresentou um valor superior de zeaxantina quando comparado ao milho (*Zea mays*) 4,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$, sendo este considerado a principal fonte dessa substância na dieta do brasileiro (RODRIGUEZ-AMAYA et al, 2008).

Para o extrato da parte comestível dos frutos de *E. punicifolia*, o cromatograma antes da reação de saponificação apresentou os picos 4, 5 e 6 que foram identificados através de seus tempos de retenção e seus espectros de absorção característicos de carotenoides como β -caroteno ($t_r= 16,1$), *cis* licopeno ($t_r= 20,1$) e licopeno ($t_r= 23,5$), respectivamente (Figura 28a).

De acordo com Rodríguez-Amaya (2001), os carotenoides são substâncias suscetíveis a isomerização e oxidação durante os processos de análise e de estocagem. Singh et al. (2015) analisaram em seu estudo a mudança do licopeno e no teor de carotenoides totais através de diferentes estágios de maturação no fruto *Momordica subangulata* G. Don de Wilde e observaram que a maturação pode influenciar na quantificação e até mesmo no processo de isomerização. Portanto, o aparecimento do isômero de licopeno no extrato antes da reação de saponificação pode ser atribuído ao tempo de exposição sob temperatura ambiente ou até mesmo ao estágio de maturação do fruto.

Com relação aos picos de menor intensidade, esses não foram identificados inicialmente, contudo, apresentaram espectros característicos de carotenoides e os tempos de retenção sugerem se trataram de derivados esterificados.

Após a reação de saponificação, no cromatograma do extrato saponificado foi verificada a presença adicional dos carotenoides luteína (1) ($t_r= 7,1$), zeaxantina (2) ($t_r= 8,1$) e β -criptoxantina (3) ($t_r= 12,1$) (Figura 28 b), e a Figura 29 apresenta as estruturas dos carotenoides identificados na parte comestível do fruto.

A reação de saponificação foi importante para que ocorresse a liberação das xantofilas (carotenoides hidroxilados), como a β -criptoxantina que apresenta atividade pró-vitamina A, e a luteína e a zeaxantina, importantes constituintes maculares da visão (DELCOURT et al., 2006; TRIESCHMANN et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

Observou-se ainda nesse estudo que após a reação de saponificação, ocorreu um aumento na razão *cis/trans* licopeno. Isso pode ser explicado pelo tempo de reação, que foi de 16 h sob temperatura ambiente, influenciando ainda mais na isomerização da substância.

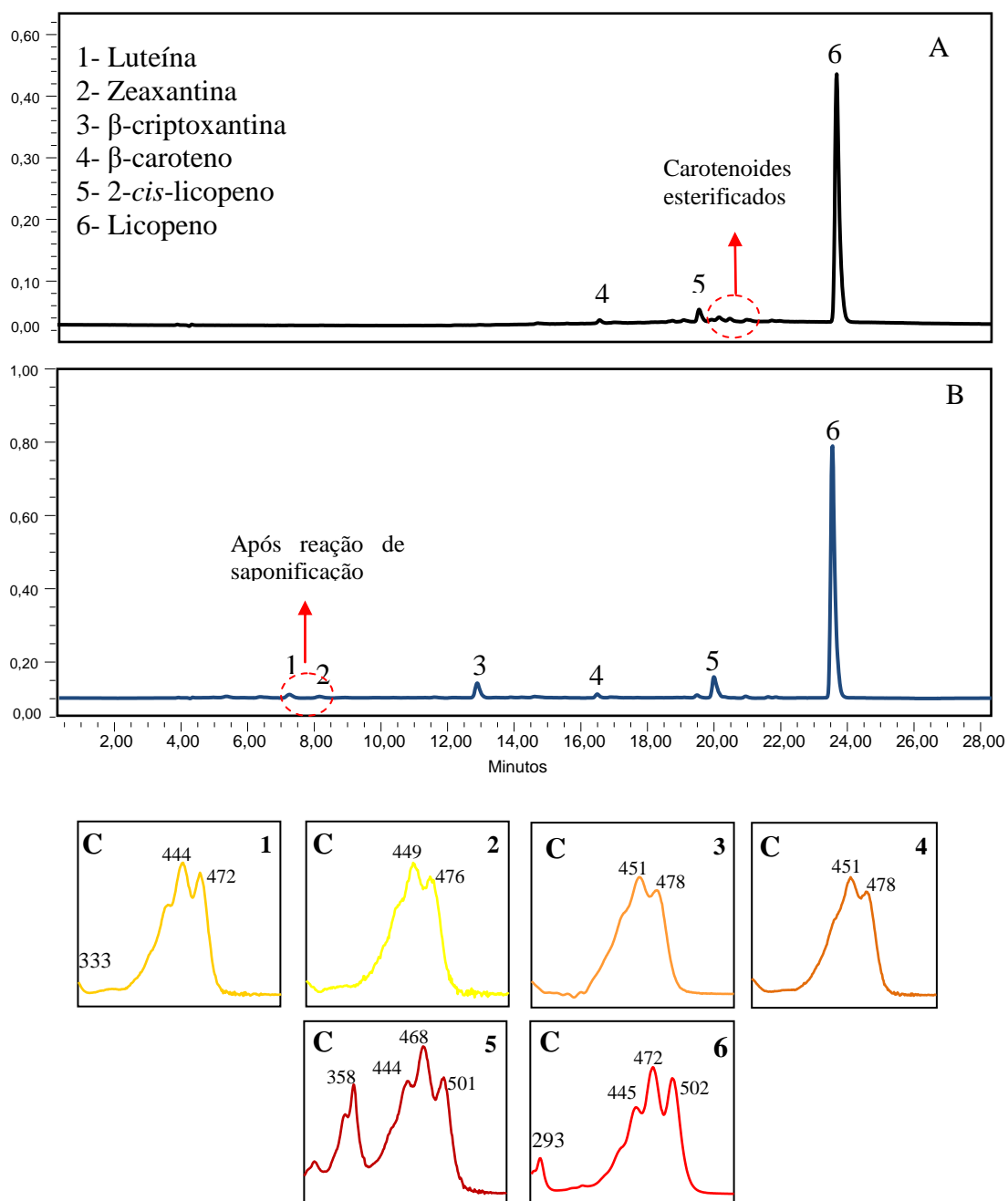


Figura 28: Cromatograma do extrato de carotenoides à 450 nm da parte comestível do fruto de *E. punicifolia* antes (A) e após a saponificação (B) e espectros de absorção no UV/ Vis (C)

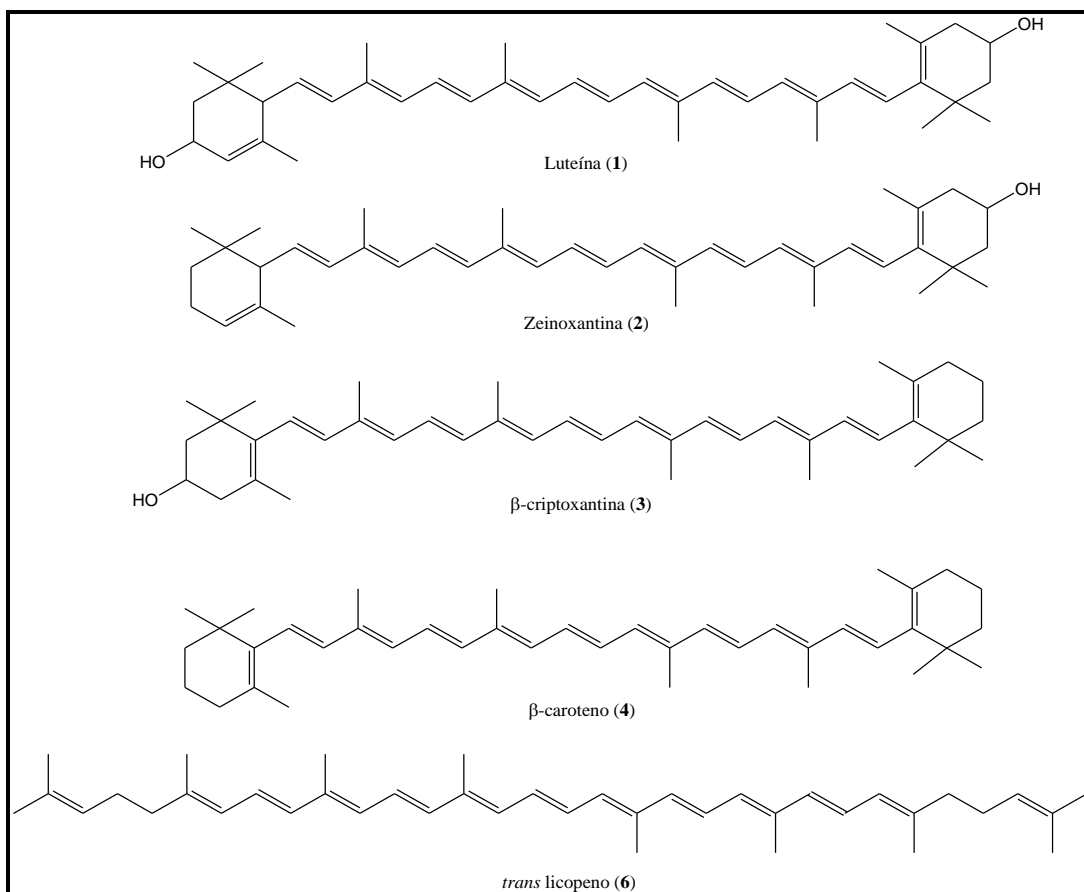


Figura 29: Estruturas químicas dos carotenoides presentes na parte comestível do fruto de *E. punicifolia*

Segundo Bramley (2000), 85 % do licopeno consumido pela população humana é obtido através do tomate e seus produtos derivados, seguido pelo consumo da melancia e da goiaba. No Brasil, entre os frutos considerados fontes, além dos já citados, pode-se destacar a pitanga e o mamão (SENTANIM & RODRIGUEZ-AMAYA, 2007; PORCU & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

O fruto de *E. punicifolia* apresentou um elevado teor de licopeno, 6,62 vezes superior ao encontrado na pitanga, fruto pertencente à mesma família e o mesmo gênero, o qual possui um teor de $76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ desta substância. Também apresentou teores superiores dessa substância quando comparado a outros frutos considerados fontes e bastante comercializado, como a melancia (*Citrillus lanatus*) $36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e a goiaba $70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (NIIZU & RODRÍGUEZ-AMAYA, 2003; RODRÍGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Comparando-se com o fruto tomate (*Lycopersicum esculentum L.*), considerado a principal fonte deste carotenoide na dieta do brasileiro (IBGE, 2009), e que apresenta teor de

35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (fruto), (RODRIGUÉZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008), o fruto de *E. puniceifolia* apresentou uma quantidade de licopeno aproximadamente 15 vezes superior ao tomate.

Com relação aos produtos derivados do tomate, como o molho de tomate, produto a base de tomate mais consumido pela população brasileira (IBGE, 2009), considerado uma boa fonte de antioxidantes naturais devido à presença de substâncias bioativas, como carotenoides (BORGUINI & TORRES, 2009), em especial o licopeno, apresenta um teor médio de 91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (KOBORI et al, 2010), o fruto de *E. puniceifolia* apresenta aproximadamente 5 vezes mais licopeno.

O consumo de licopeno está relacionado à redução do risco de alguns tipos de câncer, em especial o câncer de próstata (GIOVANNUCCI et al., 1995; SPORN & LIBY, 2013; CHEN, SONG, ZHANG, 2013). Portanto, o fruto de *E. puniceifolia* pode ser considerado uma fonte alternativa dessa substância.

Em relação ao fruto de *E. astringens*, devido a intensa coloração roxa, não é possível observar a coloração característica de carotenoides (amarelo à vermelho). Porém, durante o processo de extração de carotenoides quando é realizada uma partição água: éter observou-se claramente a separação das substâncias antociânicas, responsáveis pela coloração roxa e permanecendo na fase aquosa, enquanto os carotenoides, por sua característica apolar, migram para a fase orgânica (Figura 30).



Figura 30: Separação das antocianinas dos carotenoides do fruto de *E. astringens* através de partição água: éter

A quantificação dos carotenoides totais no extrato saponificado foi de $6,47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 0,55$. Os carotenoides identificados foram a Luteína ($t_r= 7,1; 2,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a zeaxantina ($t_r= 8,1; 1,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a β -criptoxantina ($t_r= 12,9; 0,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e o β -caroteno ($t_r= 16,1; 0,99 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Figura 31).

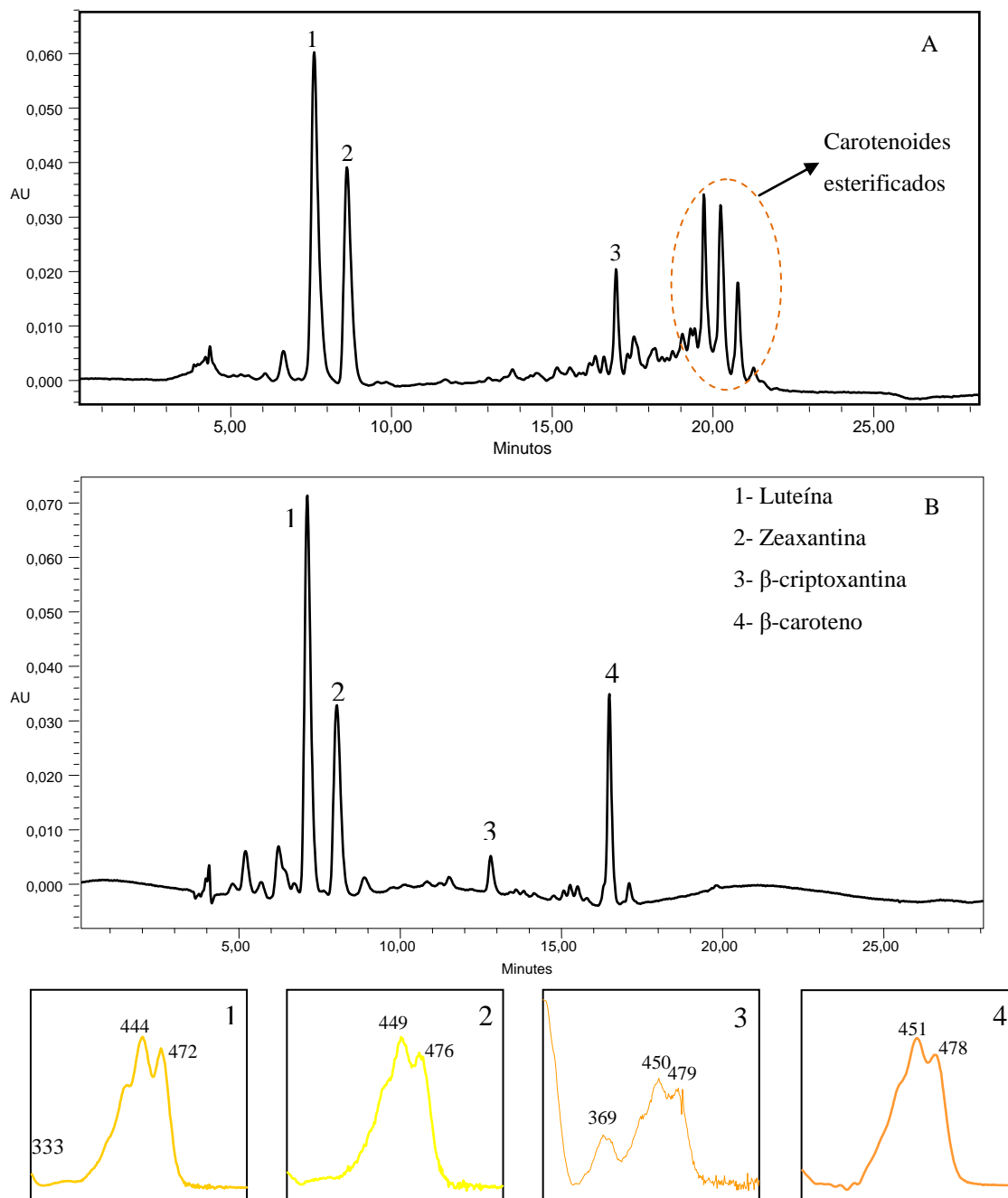


Figura 31: Cromatograma do extrato de carotenoides da parte comestível de *E. astringens* antes (A) e após saponificação (B) e espectros de absorção no UV/ Vis.

Como pode ser observado pelo cromatograma (Figura 26), o carotenoide majoritário é a luteína com 40% da área ($2,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), seguida pela zeaxantina 21% e pelo β -caroteno, representando 14% da área.

Comparando o resultado encontrado para a luteína ($2,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no fruto de *E. astringens* com o espinafre ($52,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), uma hortaliça com alto teor desse carotenoide, pode-se observar que o fruto em questão apresentou uma concentração 20x inferior a essa hortaliça considerada fonte.

Segundo Rodríguez-Amaya et al. (2008), para um fruto ser considerado fonte de carotenoides, o mesmo deve apresentar um teor mínimo de $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de um determinado carotenoide, logo, analisando o resultado apresentado para os frutos de *E. astringens*, o mesmo, não pode ser considerado uma fonte de carotenoides.

5.5 ÁCIDOS FENÓLICOS

Segundo Cheung e colaboradores (2003), a quantidade de substâncias fenólicas está correlacionada à atividade antioxidante de plantas. Logo a importância de se quantificar essas substâncias. Os compostos fenólicos ocorrem principalmente como conjugados solúveis e insolúveis, ligados covalentemente a açúcares ou componentes estruturais da parede celular (ACOSTA-ESTRADA et al.,2014).

A análise de ácidos fenólicos foi realizada em três etapas. A primeira foi à extração dos ácidos fenólicos livres, seguida por uma hidrólise básica e uma hidrólise ácida, a fim de liberar os ácidos fenólicos para serem identificados e quantificados. As Figuras 32 e 33 apresentam os cromatogramas das três frações de ácidos fenólicos para a parte comestível e semente do fruto de *E. puniceifolia*.

Na fração livre (Figuras 32 e 33), tanto para a parte comestível como para a semente, não foi observada a presença de ácidos fenólicos livres. Entretanto, foi possível observar a existência de quatro substâncias com espectro característico de flavonoides na parte comestível (duas bandas de absorção), enquanto que na semente os picos não foram identificados por falta de padrão analítico. Na fração básica (Figura 32b), foram identificados os ácidos gálico (**1**) ($t_r= 2,1$), siríngico (**2**) ($t_r=11,3$), *p*-cumárico (**3**) ($t_r= 14,1$), ferúlico (**4**) ($t_r= 15,5$) e elágico (**5**) ($t_r= 16,9$) (Figura 31b). Na fração ácida, foi verificada a presença de apenas dois ácidos, gálico (**1**) ($t_r= 2,1$) e elágico (**5**) ($t_r= 16,9$) (Figura 32c).

Pode-se observar ainda que as substâncias identificadas por seus espectros como flavonoides desaparecem nas frações básica e ácida. Isso pode ser explicado pelas hidrólises, que favorecem o desaparecimento de compostos que possuem ligações éster e éter em suas estruturas (SIMÕES, 2007).

Na semente do fruto de *E. puniceifolia*, após a hidrólise básica, o cromatograma apresentou a presença dos ácidos gálico (**1**) ($t_r= 2,1$), protocatéico (**2**) ($t_r=4,0$), siríngico (**3**) ($t_r=11,3$), *p*-cumárico (**4**) ($t_r= 14,1$), ferúlico (**5**) ($t_r= 15,5$), sinápico (**6**) ($t_r= 16,1$) e elágico (**7**) ($t_r= 16,9$) (Figura 33b). Na fração ácida, foi verificada a presença de apenas quatro desses ácidos: gálico (**1**) ($t_r= 2,1$), siríngico (**3**) ($t_r=11,3$), ferúlico (**5**) ($t_r= 15,5$) e elágico (**7**) ($t_r= 16,9$) (Figura 33c).

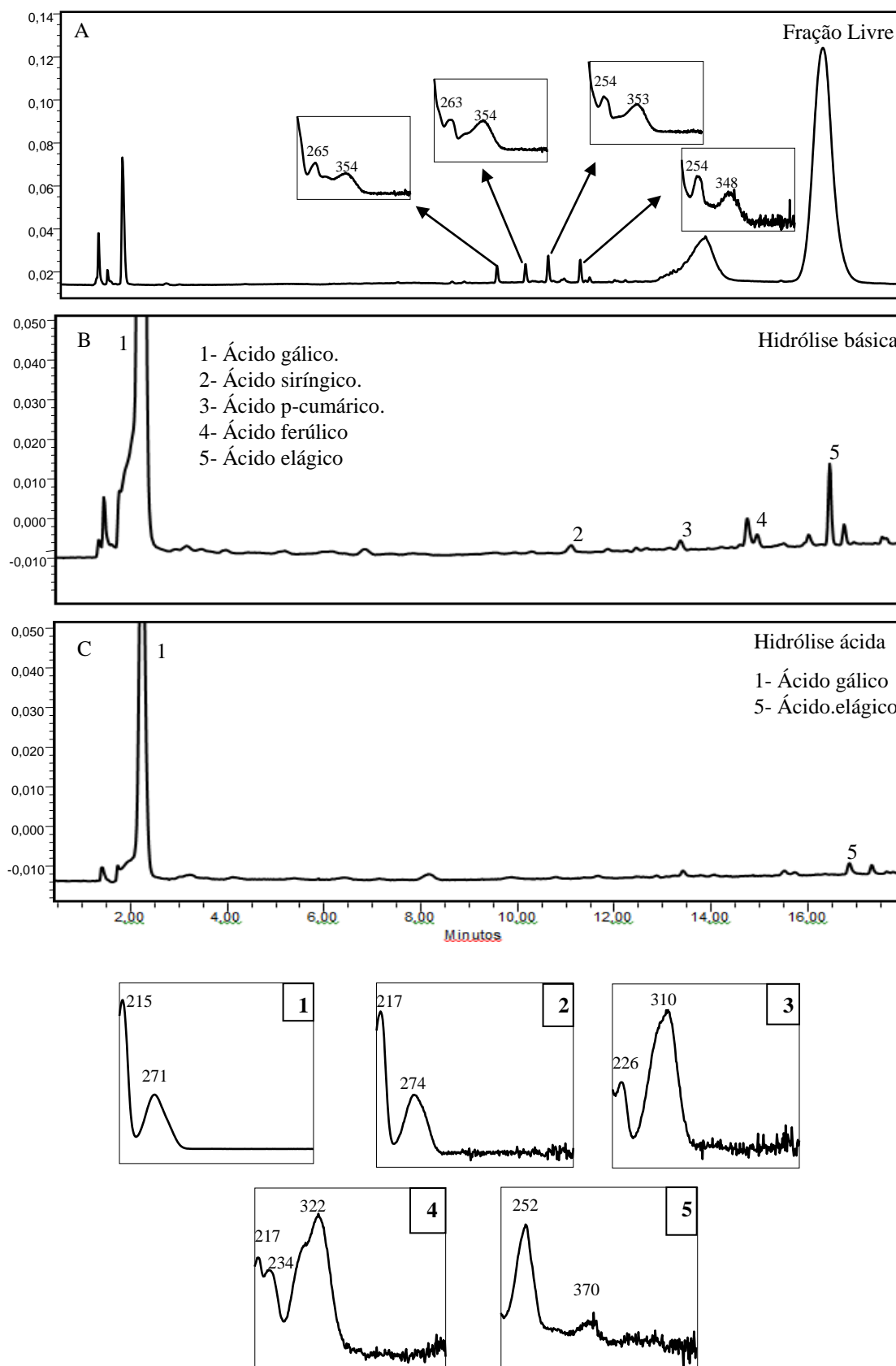


Figura 32: Cromatograma e espectros de UV/ Vis de ácidos fenólicos na parte comestível do fruto de *E. puniceifolia*: fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).

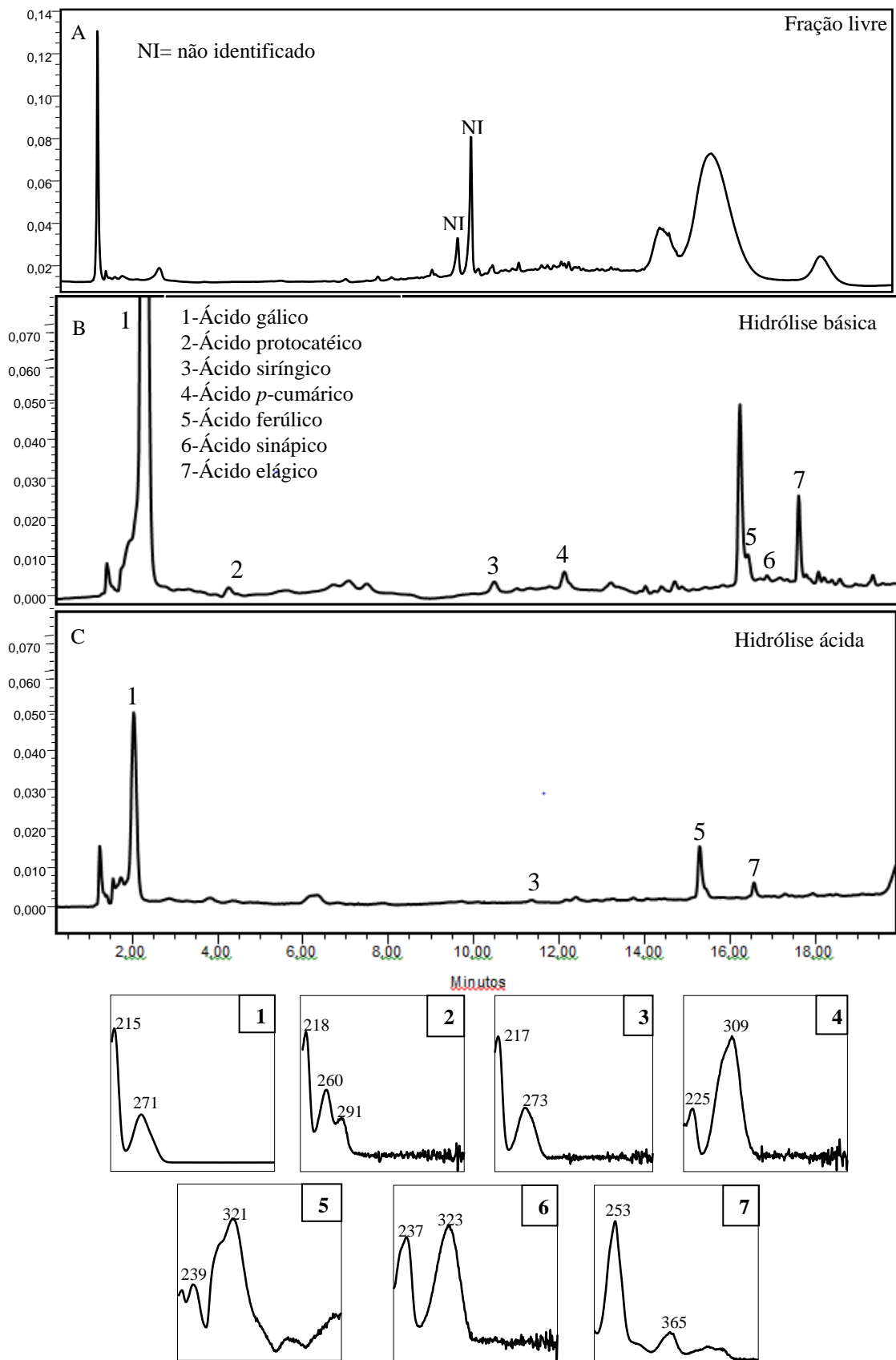


Figura 33: Cromatograma e espectros de UV/ Vis de ácidos fenólicos na semente do fruto de *E.punicifolia*: fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).

A Tabela 14 apresenta os teores de ácidos fenólicos livres e totais na polpa mais casa e semente de *E. puniceifolia*.

Tabela 14: Teor de ácidos fenólicos, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) da parte comestível e da semente dos frutos de *E. puniceifolia*

Parte comestível	
Ácidos fenólicos	Totais (mg. g ⁻¹)
Ácido gálico	1,46 ± 0,53
Ácido siríngico	0,01 ± 0,00
Ácido <i>p</i> - cumárico	0,01 ± 0,00
Ácido ferúlico	0,01 ± 0,00
Ácido elágico	0,02 ± 0,00
Totais	1,51 ± 0,65
Semente	
Ácido gálico	1,54 ± 0,80
Ácido protocateico	0,02 ± 0,00
Ácido siríngico	0,03 ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,02 ± 0,01
Ácido ferúlico	0,08 ± 0,02
Ácido sinápico	0,02 ± 0,00
Ácido elágico	0,02 ± 0,01
Totais	1,73 ± 0,57

Entre todos os ácidos fenólicos (Tabela 14), o ácido gálico se apresentou em maior quantidade no fruto de *E. puniceifolia* tanto na parte comestível (1,46 mg.g⁻¹) como na semente (1,54 mg.g⁻¹). Os demais ácidos descritos representaram valor baixo, sendo o somatório de suas áreas inferior a 2 %. Com isso, pode-se afirmar que o ácido gálico é o ácido predominante entre a classe de ácidos fenólicos.

Comparando os teores obtidos de ácido gálico (1,46 mg.g⁻¹) para a parte comestível do fruto de *E. puniceifolia* com a amora preta (1,44 mg.g⁻¹), considerada pela literatura como rica

em substâncias fenólicas (JACQUES et al., 2010), pode-se observar que o fruto estudado apresenta teor próximo ao da matriz considerada rica em ácido gálico.

Jakobek et al. (2009), analisando ácido elágico em frutas amoras maduras encontraram teor parecido ao encontrado no fruto de *E. puniceifolia* (0,02 mg.g⁻¹).

Além disso, o fruto estudado apresentou na sua composição outros ácidos fenólicos, como ácido ferúlico (0,01 mg.g⁻¹), também presente na polpa de amora (0,35 mg.g⁻¹) (JACQUES et al., 2010).

Esse resultado é importante, pois o ácido gálico, na forma de galotaninos, atuam como agentes redutores, sequestrando radicais livres do organismo, além de atuarem como quelantes de metais (MELLO & GUERRA, 2002), sendo as frutas, principalmente as de coloração vermelha à púrpura, as mais importantes fontes de compostos fenólicos na alimentação (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKY, 2004).

Em relação a *E. astringens*, foi possível observar a presença de ácido gálico livre ($t_r=2,0$) na parte comestível do fruto (Figura 34). Além disso, foi possível observar a existência de quatro substâncias com espectros característicos de antocianinas (absorção $\lambda=520$), e um pico de maior intensidade que, através do espectro de absorção, possui característica de um flavonoide (absorção $\lambda=260$).

O ácido gálico, por ser um derivado de ácido benzoico, sob sua forma de galotanino, ocorre naturalmente na natureza em chá verde, considerado uma fonte desse ácido, além de fazer parte da composição química de alguns frutos, como o morango, a framboesa, a amora, a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.)) e a ameixa (CLINFORD & SCALBERT, 2000; MANACH et al., 2004; FENNEMA, 2010; COSTA et al., 2013).

No cromatograma da fração básica da parte comestível do fruto (Figura 34b), além do ácido gálico (**1**), foram identificados os ácidos 4-hidroxibenzoico (**2**) ($t_r=7,1$), siríngico (**3**) ($t_r=11,5$), *p*-cumárico (**4**) ($t_r=14,2$) e elágico (**2**) ($t_r=17,0$). Em contrapartida, no cromatograma da fração ácida (Figura 34c), foram identificados quase todos os ácidos da hidrólise básica, com exceção do ácido 4-hidroxibenzoico. Na semente do fruto de *E. astringens*, foram identificados todos os ácidos fenólicos presentes na parte comestível, com exceção do ácido siríngico (Figura 35).

A identificação de mais ácidos fenólicos a partir das hidrólises é justificável, pois muitos ácidos podem estar ligados a outras substâncias, como açúcares, além de poderem estar esterificados. Logo, tanto a hidrólise básica como a hidrólise ácida auxiliam na quebra

dessas ligações, liberando assim a forma livre do ácido (CLINFORD & SCALBERT, 2000; MATTILA, 2002; SIMÕES, 2007).

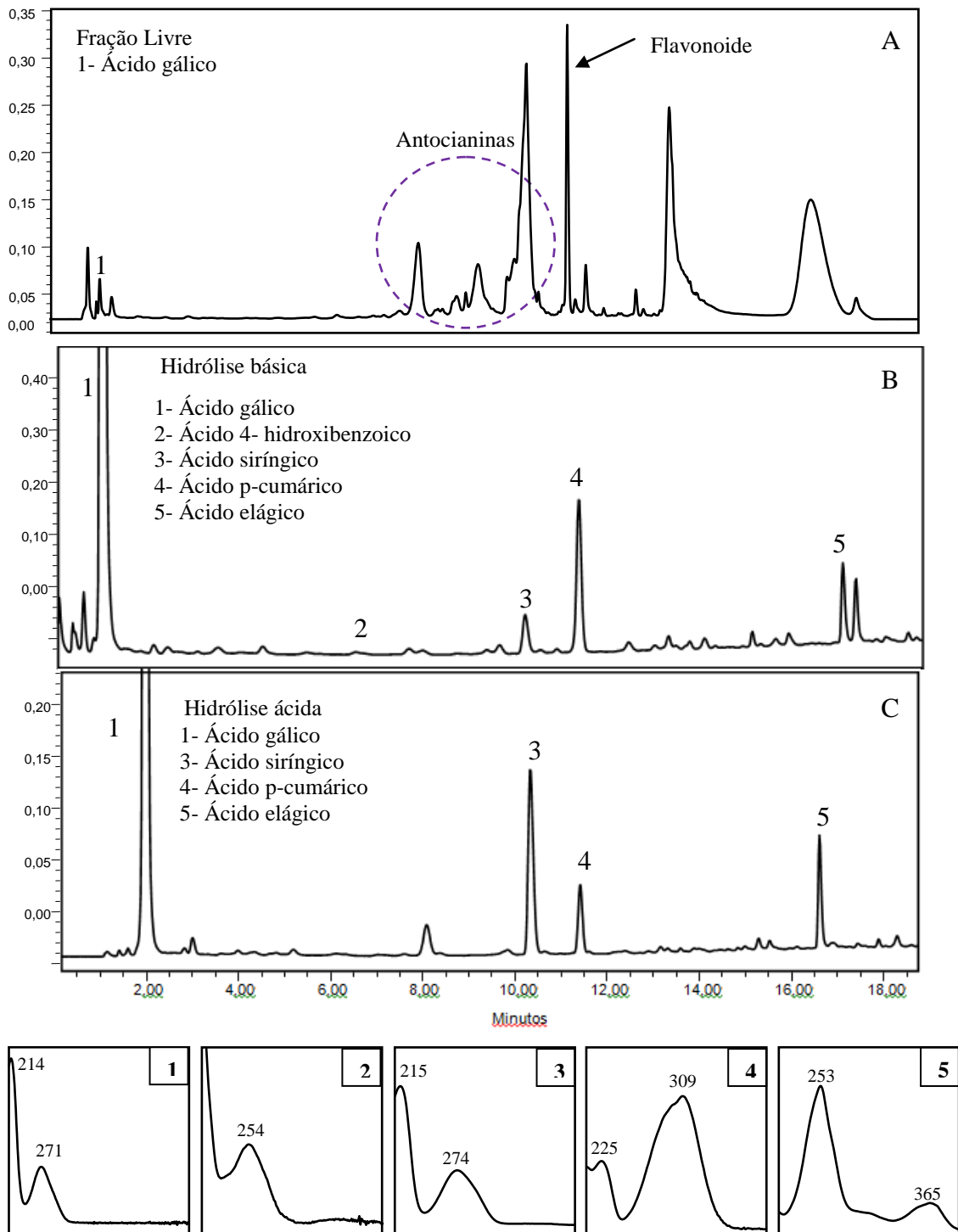


Figura 34: Cromatograma e espectros de UV/Vis de ácidos fenólicos na parte comestível do fruto de *E. astrigenes*: fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).

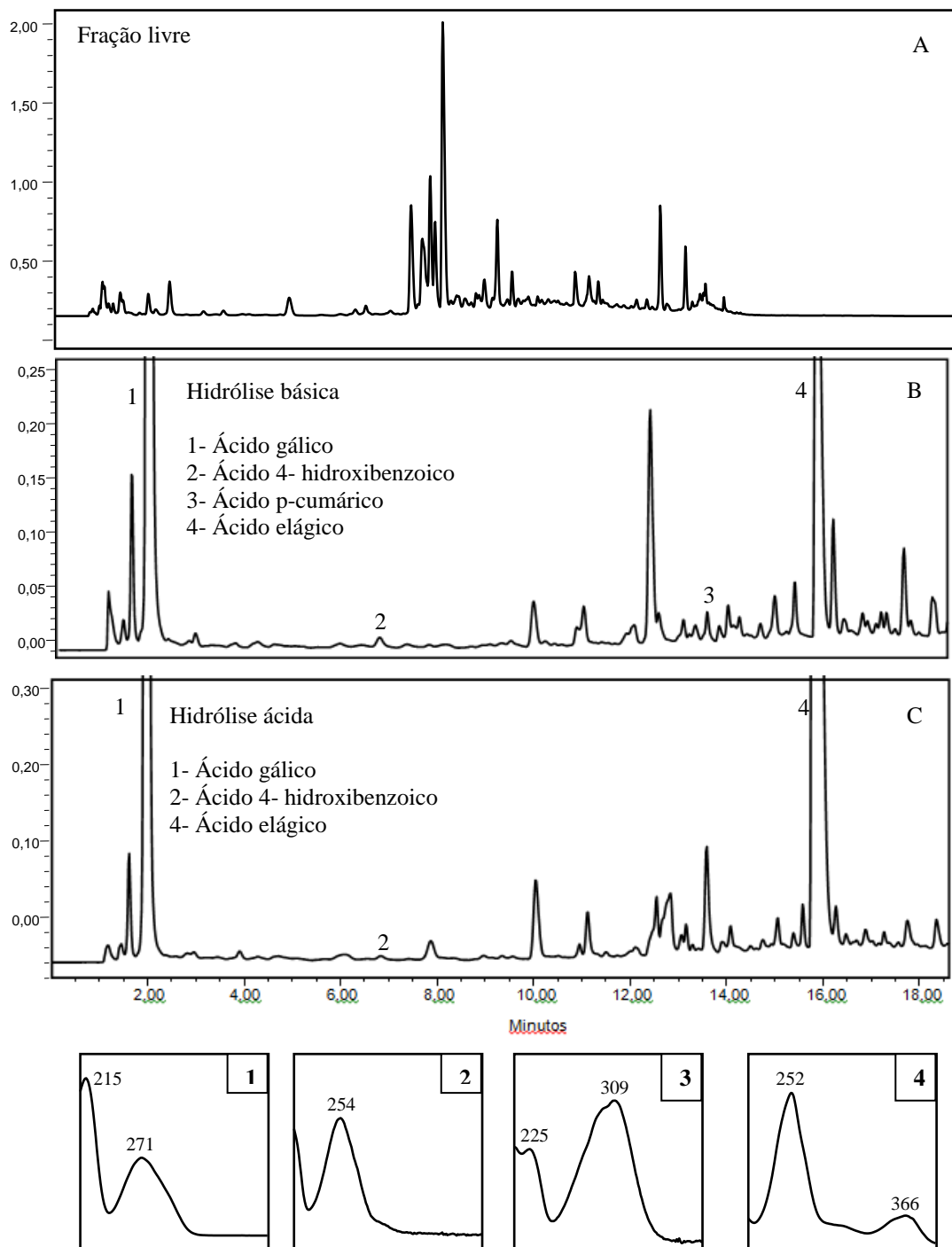


Figura 35: Cromatograma e espectros de UV/Vis de ácidos fenólicos na semente do fruto de *E. astringens*: fração livre (A), hidrólise básica (B) e hidrólise ácida (C).

A figura 36 ilustra os ácidos fenólicos presentes na composição química dos frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens*.

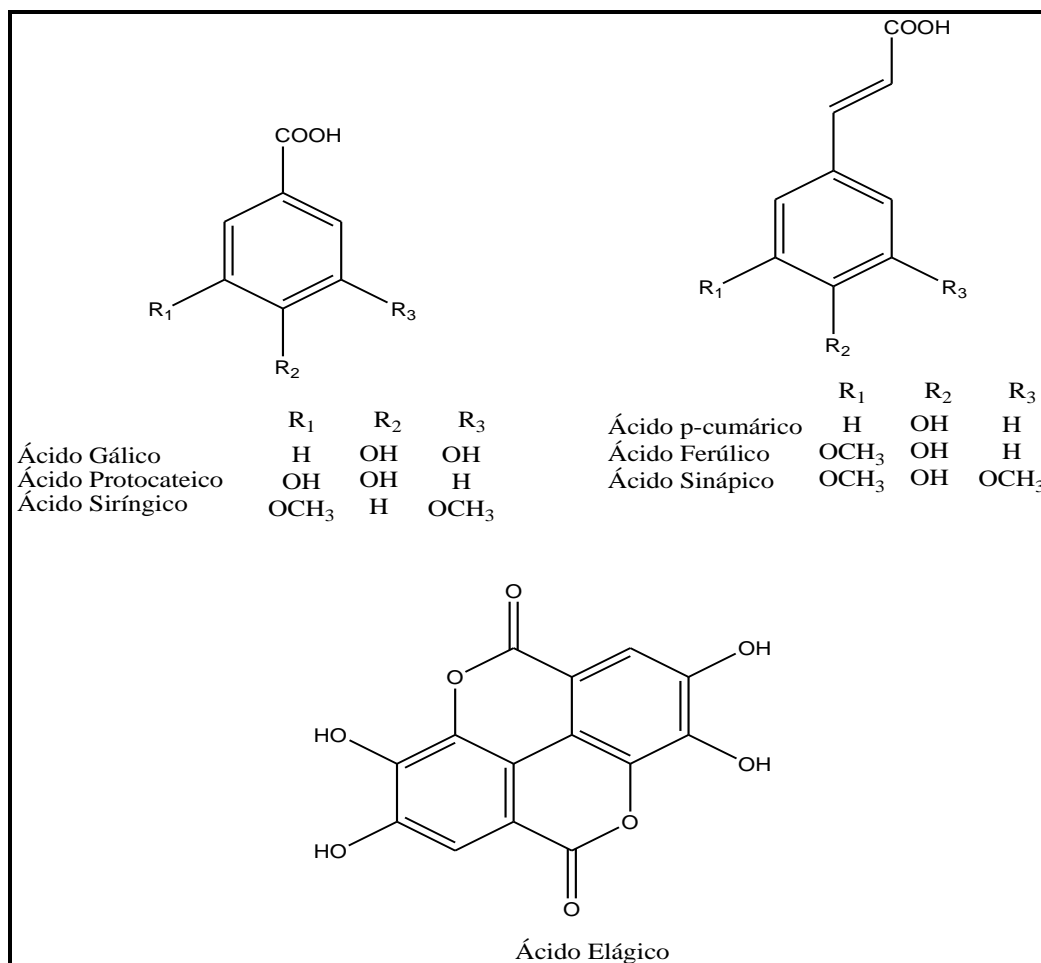


Figura 36: Estruturas dos ácidos fenólicos identificados nos frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens*

A Tabela 15 apresenta os valores da quantificação dos ácidos presentes nos frutos de *E. astringens*.

O ácido gálico foi o ácido fenólico de maior concentração na parte comestível (4,52 mg.g⁻¹) e na semente (1,99 mg.g⁻¹) no fruto de *E. astringens*, representando em torno de 64% dos ácidos quantificados na parte comestível e 70% dos ácidos quantificados na semente. Logo, pode-se destacar que esse ácido é o predominante nesse fruto, que apresentou um teor superior ao encontrado no jamelão de 1,18 mg.g⁻¹ (BARCIA, 2009) e no morango 0,0118 mg.g⁻¹ (RAMPAZZO et al., 2012).

Tabela 15: Teor de ácidos fenólicos, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) da parte comestível e da semente dos frutos de *E. astringens*

Parte comestível		
Ácidos fenólicos	Livres (mg.g^{-1})	Totais (mg.g^{-1})
Ácido gálico	0,01	$4,52 \pm 0,63$
Ácido 4- hidroxibenzóico	-	$0,01 \pm 0,01$
Ácido siríngico	-	$0,28 \pm 0,08$
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	$0,01 \pm 0,00$
Ácido elágico	-	$0,02 \pm 0$
Totais	0,01	4,85
Semente		
Ácido gálico	-	$1,99 \pm 0,40$
Ácido 4- hidroxibenzóico	-	$0,01 \pm 0$
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	$0,01 \pm 0,01$
Ácido elágico	-	$0,40 \pm 0,27$
Totais		2,41

O ácido gálico, como galotanino, contribui para o sabor adstringente de muitos alimentos, em especial, para frutas quando está em elevada concentração. Esse sabor é derivado da associação dessas substâncias com as proteínas salivares, contribuindo para a formação de precipitados ou agregados (FENNEMA, 2010). Além do ácido gálico, o fruto também conta com a presença de ácido elágico, sendo este o segundo de maior concentração na semente ($0,40 \text{ mg.g}^{-1}$).

Ao confrontar o teor de ácido elágico ($0,02 \text{ mg.g}^{-1}$) na parte comestível do fruto de *E. astringens* com outros dados de frutos ricos nesse composto fenólico, como na casca da grumixama ($0,1906 \text{ mg.g}^{-1}$) (NASCIMENTO, 2015), pode-se observar que o fruto possui um teor menor dessa substância. Pinto (2008), em seu estudo sobre os compostos bioativos em diferentes espécies de morango, quantificou ácido elágico livre após hidrólises e observou valores entre $0,05$ a $0,34 \text{ mg.g}^{-1}$ dessa substância na composição química do fruto. Abe (2007) avaliou o teor de ácido elágico em alimentos regionais brasileiros em 35 frutos diferentes, onde foram encontrados valores entre $0,22 \text{ mg.g}^{-1}$ e $0,31 \text{ mg.g}^{-1}$, sendo os maiores

teores relacionados à jaboticaba, grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e ao cambuci (*Campomanesia phaea*), frutos pertencentes à mesma família da *E. astringens*. Portanto, pode-se afirmar que a parte comestível não apresenta um teor elevado dessa substância.

O ácido elágico, sob sua forma de elagitanino, ainda não teve elucidado a sua ação no organismo humano, pois não se sabe ao certo o comportamento dessa substância no organismo. Porém, alguns estudos apontam que esse ácido deve ter ação hipoglicemiante, como o estudo feito por Yu et al. (2005), que verificaram a redução de colesterol LDL em sangues ratos quando estes eram suplementados com o ácido elágico. García-Niño & Zazueta (2015) listaram em seu estudo algumas atribuições a esse composto, como antimicrobiano, anticarcinogênico, antiinflamatório, além de elevada atividade antioxidante, fato esse atribuído comumente à classe dos compostos fenólicos.

Portanto, a caracterização de ácidos fenólicos em frutos pouco explorados cientificamente pode evidenciar sua função como antioxidante, ao revelarem que os frutos de *E. puniceifolia* e *E. astringens* apresentam ácidos fenólicos na sua composição química. Entretanto, ao analisar a concentração das mesmas, essas substâncias não podem ser classificadas como majoritárias dos frutos estudados.

5.6 FLAVONOIDES

Na parte comestível dos frutos de *E. puniceifolia* foi identificada a rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) com tempo de retenção em 8,3 minutos (Figura 37). Nos frutos de *E. astringens*, foram identificados os flavonoides rutina com tempo de retenção em 8,3 minutos, e isoquercetina (quercetina 3-*O*-glucosídeo) com tempo de retenção em 8,6 minutos, na parte comestível do fruto (Figura 38).

Na semente do fruto de *E. puniceifolia* não foi possível a identificação dos flavonoides, devido à baixa concentração dessas substâncias, logo os picos apresentaram magnitude muito baixa o que impossibilitou a integração dos mesmos.

Para a semente dos frutos de *E. astringens* não foi possível identificar os flavonoides majoritários devido à falta de padrões (Figura 39).

A presença de outras substâncias fenólicas (ácido elágico e antocianinas) nessa análise pode ser explicada pelo uso de solução metanol: água (80: 20) v/v para a extração dos flavonoides, pois as antocianinas são flavonoides e, portanto solúveis em solventes orgânicos polares, devido suas estruturas químicas apresentarem grupamentos polares em sua

constituição (SIMÕES, 2007). Além disso, a presença de ácido elágico foi possível também a partir da hidrólise alcalina, uma etapa realizada no método para auxiliar na quebra dos elagitaninos, derivados de ácido elágico hidrossolúveis (BEATTIE, CROZIER, DUTHIE, 2005).

A rutina é um flavonoide muito presente na composição química de frutas vermelhas, como a amora e a framboesa (RAMPAZZO, TAKIKAWA, HAMINIUK, 2010), além de fazer parte da composição de outros frutos como o jamelão (VIZZOTO & PEREIRA, 2008). Pessanha (2010) também relatou esse flavonol na composição química da pitanga. Com relação à isoquercetina, este flavonoide encontra-se presente na composição de alguns frutos, como a jabuticaba (ABE et al., 2011, COSTA et al., 2013).

Algumas atividades vêm sendo atribuídas a esses flavonoides, em especial a rutina, que se destaca pela sua potente ação sobre o endotélio capilar, além de atividade anticarcinogênica e eficiência no tratamento da artrite (MIDDLETON, KANDASWAM, THEOHARIDES, 2000; MACHADO, 2005, HAN, 2009). Além disso, também são considerados importantes agentes antioxidantes naturais por pertencerem a classe das substâncias fenólicas, substâncias que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas suas estruturas químicas.

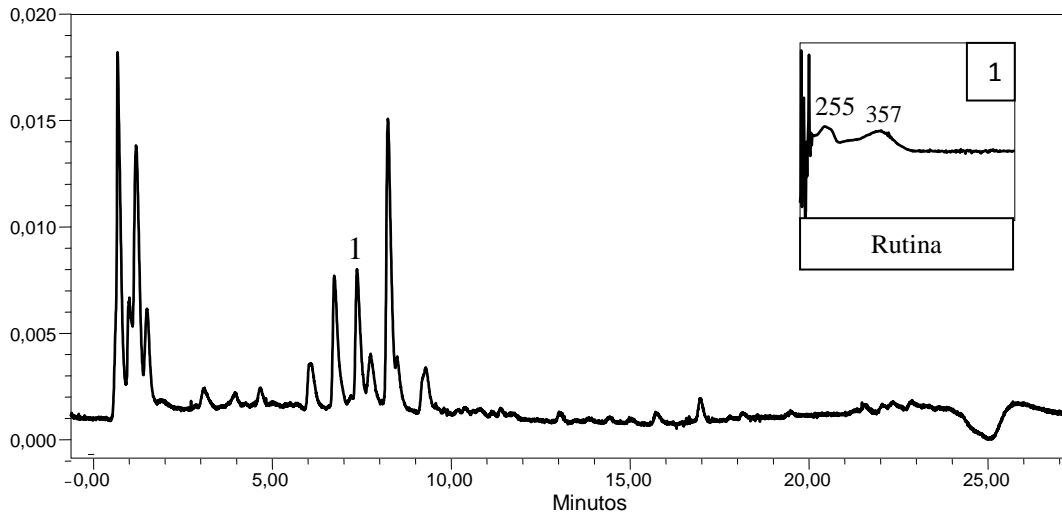


Figura 37: Cromatograma e espectro de UV/Vis de flavonoides presentes na parte comestível do fruto de *E. puniceifolia*

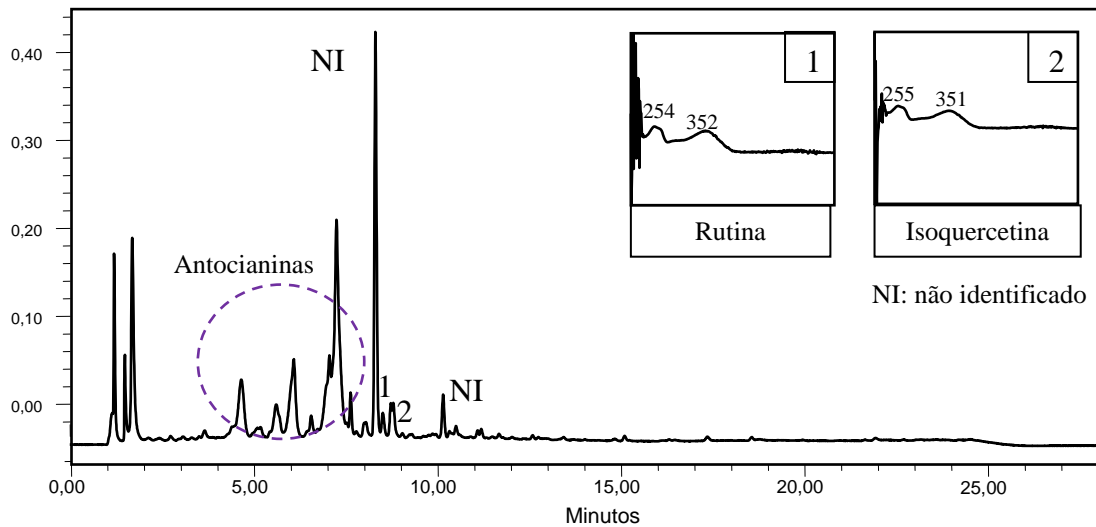


Figura 38: Cromatograma e espectro de UV/Vis de flavonoides na parte comestível de *E. astringens*

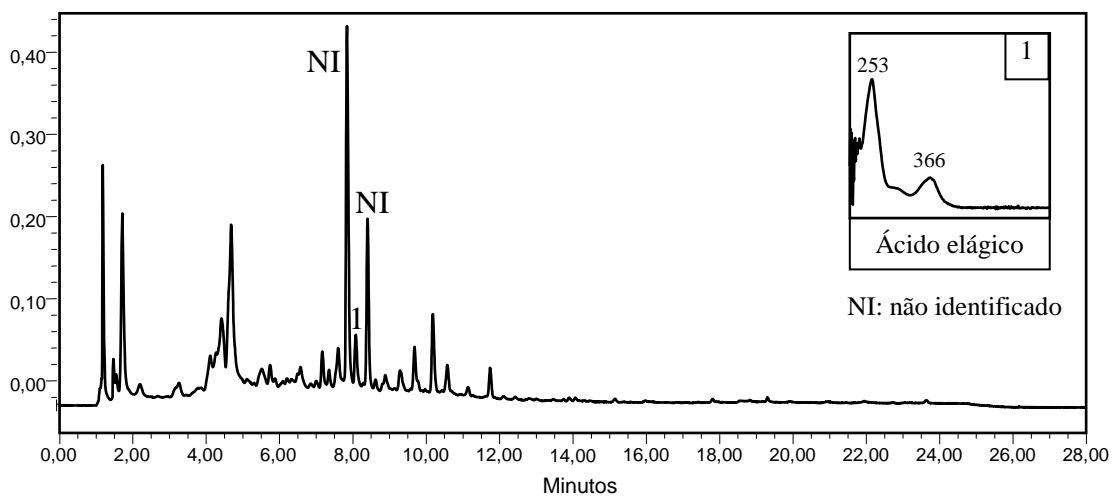


Figura 39: Flavonoides na semente de *E. astringens*

5.6.1 Antocianinas

Nos frutos de *E. puniceifolia*, foram identificadas duas antocianinas no perfil (Figura 40).

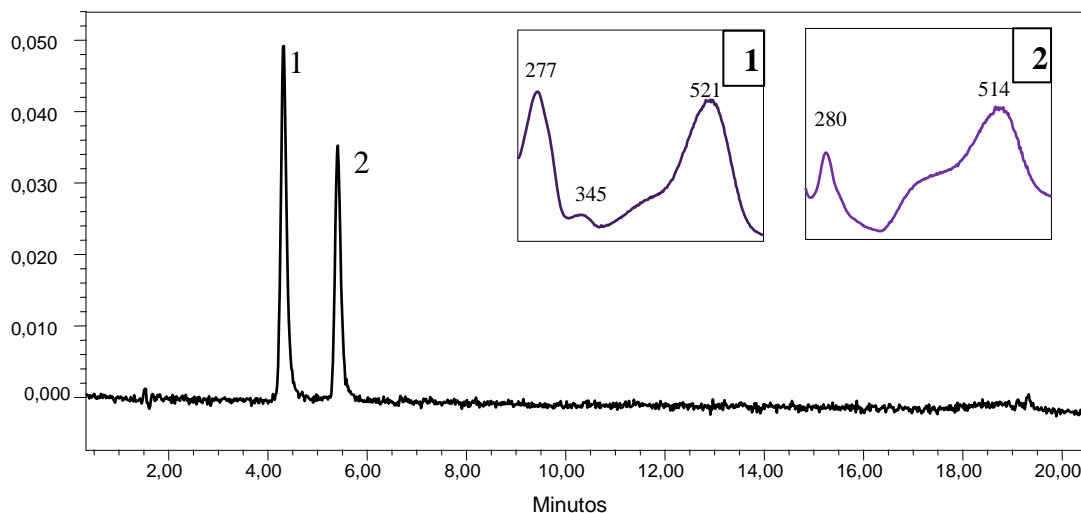


Figura 40: Cromatograma do extrato de antocianinas e espectro de UV/Vis da parte comestível de *E. puniceifolia* e espectros de UV/ Visível.

(Pico 1- delfinidina-3-*O*-glicosídeo ($t_r=4,8$); pico 2: cianidina-3- *O*-glicosídeo ($t_r=5,8$))

As antocianinas identificadas no perfil da parte comestível de *E. puniceifolia* foram a delfinidina-3-*O*-glicosídeo ($t_r=4,8$) e a cianidina-3- *O*-glicosídeo ($t_r=5,8$), sendo a primeira substância a majoritária do fruto, com 57% de área.

Para confirmação estrutural, as antocianinas foram isoladas por coleta manual na saída do detector e submetidas à análise por espectrometria de massas e seus espectros de massa acurada foram obtidos por infusão direta em espectrômetro de massas (Q-TOF Synapt (Waters®)). A figura 41 apresenta os espectros de massa acurada das antocianinas isoladas.

A análise por espectrometria de massas registrou um íon molecular de m/z 465, correspondente à massa molar da delfinidina-3-*O*-glicosídeo. A fragmentação desse íon gerou um íon de m/z de 303 que corresponde à massa molar da aglicona delfinidina (Figura 41a). para a segunda antocianina presente no fruto verificou-se o íon molecular de m/z 449, referente à cianidina-3-*O*-glicosídeo, e um fragmento de m/z de 287 referente à aglicona cianidina (Figura 41b).

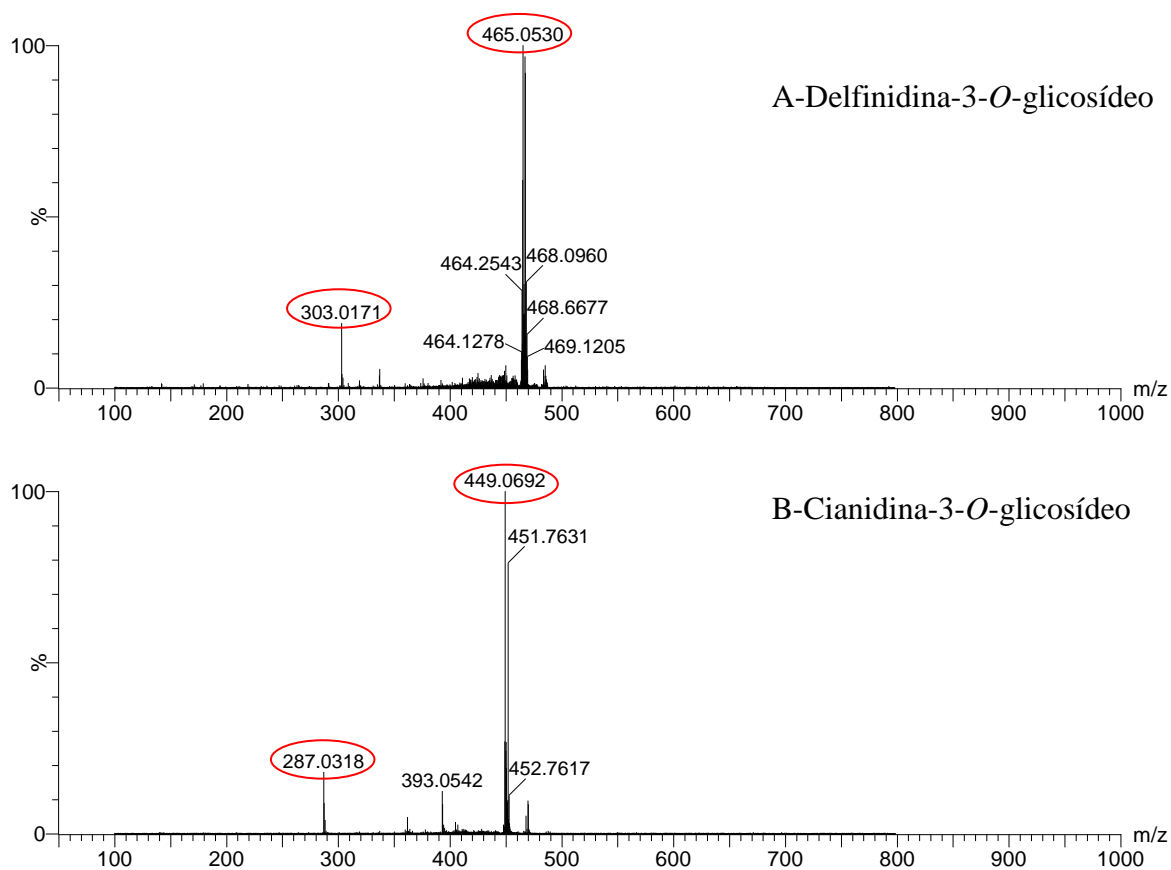


Figura 41: Espectros de massas das antocianinas presentes no fruto de *E. puniceifolia*

Após analisar e confirmar o perfil antociânico do fruto, pode-se observar por meio da sobreposição dos cromatogramas, que o perfil foi semelhante ao da jabuticaba, apenas com diferença na antocianina majoritária, que na casca da jabuticaba é a cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 42).

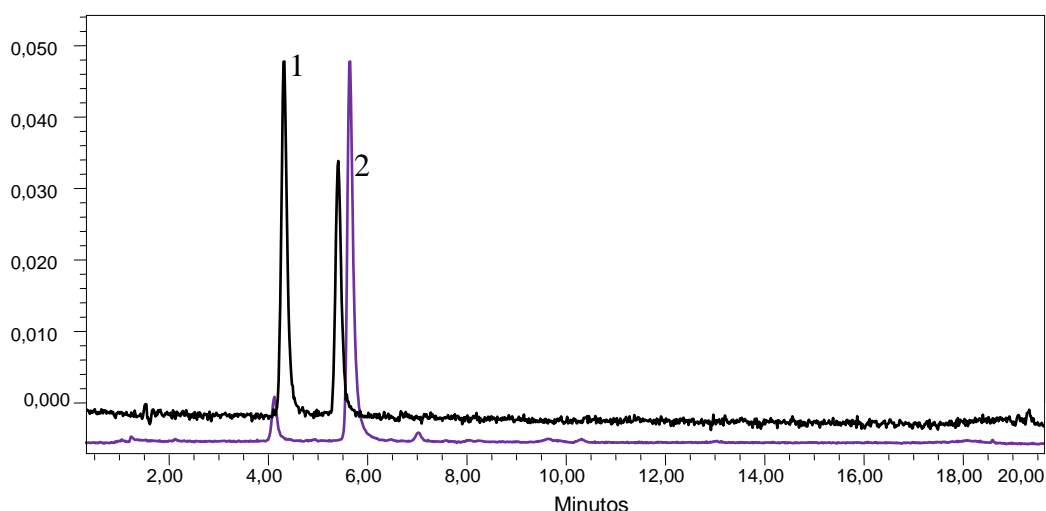


Figura 42: Sobreposição do perfil cromatográfico de antocianinas do fruto de *E. puniceifolia* e jabuticaba.

E. puniceifolia (em preto) X fruto jabuticaba (em roxo) (Pico 1- delfinidina-3-*O*-glicosídeo ($t_r=4,8$); pico 2: cianidina-3- *O*-glicosídeo ($t_r=5,8$)).

Com relação à quantificação, os resultados do teor de antocianinas caracterizadas no fruto de *E. puniceifolia* estão descritos na tabela 16.

Tabela 16: Teor de antocianinas na parte comestível liofilizada, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) dos frutos de *E. puniceifolia* ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$).

Analito	Teor ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) \pm Desvio padrão
Delfinidina	$6,40 \pm 1,60$
Cianidina	$5,20 \pm 2,34$
Total	11,60

Para a parte comestível do fruto de *E. puniceifolia*, o teor total foi de $11,6\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de antocianinas monoméricas totais, teor bem inferior quando comparado a outros frutos considerados fontes e que apresentam o mesmo perfil como a jabuticaba ($2598,32\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) e a grumixama ($4837,21\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) (LEITE-LEGATTI et al.; 2012; NASCIMENTO, 2015). Logo, pode-se apenas afirmar a presença de antocianinas na composição do fruto, porém, em baixas concentrações.

Para os frutos de *E. astringens*, a separação cromatográfica resultou em cinco antocianinas monoglicosiladas identificadas através dos tempos de retenção e seus espectros de absorção em 520 nm. Foram identificadas as seguintes antocianinas: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (pico 1- $t_r= 4,8$), cianinidina-3-*O*-glicosídeo (pico 2- $t_r= 6,2$), petunidina-3-*O*-

glicosídeo (pico 3- $t_r = 7,5$), peonidina-3-*O*-glicosídeo (pico 4- $t_r = 10,2$) e a malvidina-3-*O*-glicosídeo (pico 5- $t_r = 11,5$) (Figuras 43 e 44)

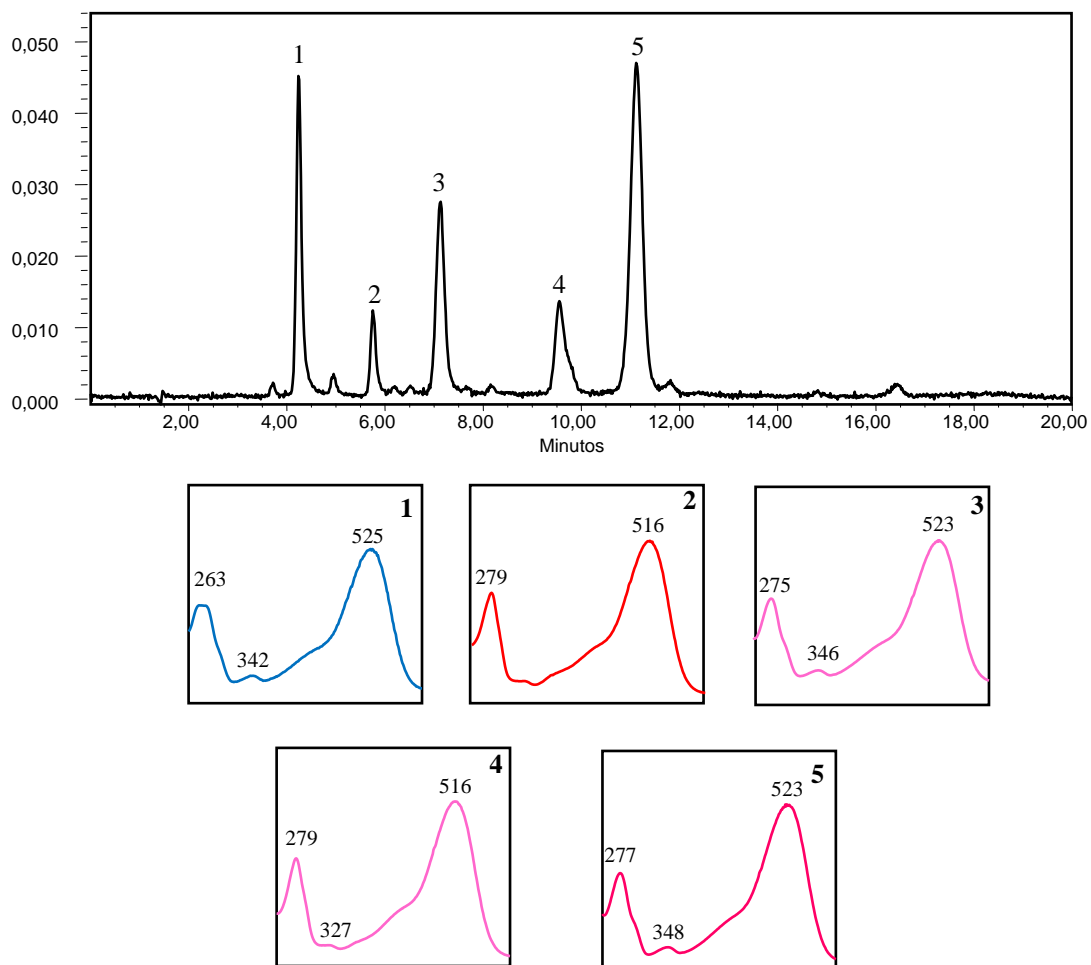


Figura 43: Cromatograma do extrato de antocianinas à 520 nm da polpa+ casca de *E. astringens*.

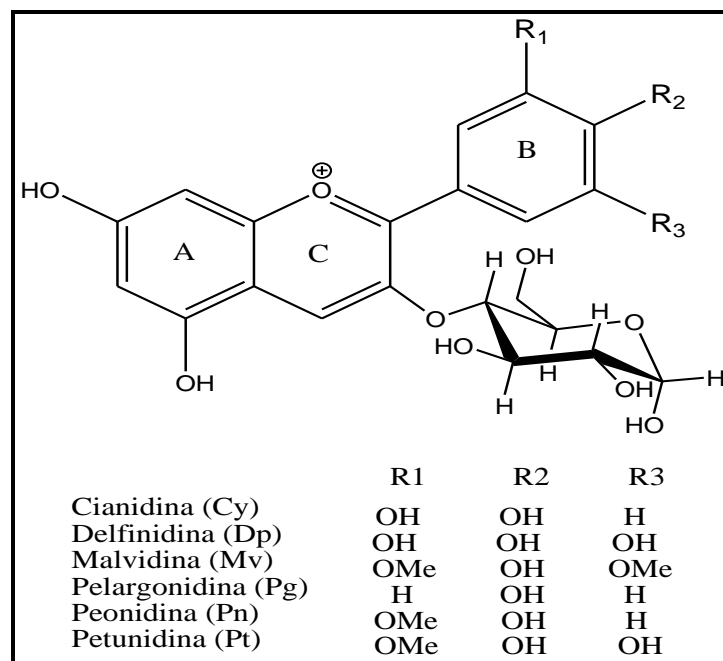


Figura 44: Estrutura química das antocianinas encontradas no perfil do fruto de *E.punicifolia* e *E. astringens*

A confirmação estrutural das antocianinas foi realizada por espectrometria de massas, que registrou os íons moleculares correspondentes a cada antocianina identificada por CLAE/DAD. As antocianinas delfinidina-3-*O*-glicosídeo (Figura 45a) e cianidina-3-*O*-glicosídeo (Figura 45b) tiveram a mesma relação íon *m/z* encontrada nos frutos de *E. puniceifolia*, demonstrando se tratar das mesmas substâncias. Porém, nos frutos de *E. astringens*, além dessas duas antocianinas, mais três foram identificadas, possuindo a seguinte relação *m/z*: íon molecular de *m/z* de 479, correspondente à massa molar da petunidina-3-*O*-glicosídeo, que após a fragmentação gerou um íon de *m/z* de 317 que corresponde à massa molar da aglicona petunidina (Figura 45c); um íon molecular com relação *m/z* 463 correspondente peonidina-3-*O*-glicosídeo seguido por fragmentação, gerando um íon de *m/z* de 301 correspondente à aglicona peonidina (Figura 45d); e um íon molecular com relação *m/z* de 493 referente à malvidina-3-*O*-glicosídeo, e um fragmento de *m/z* de 331 referente à aglicona malvidina (Figura 45e).

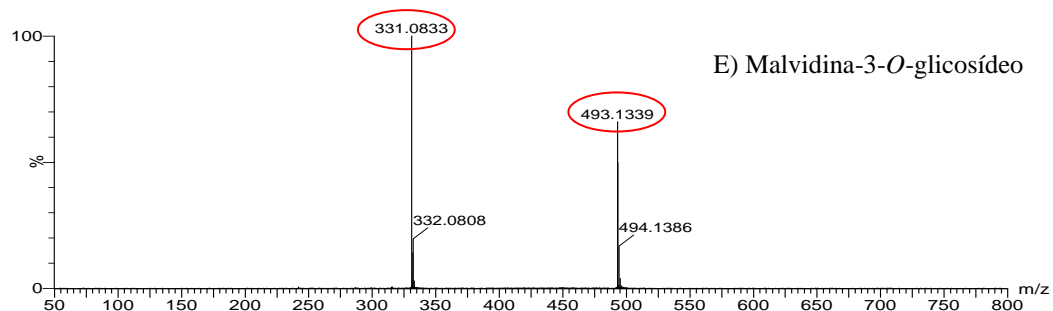
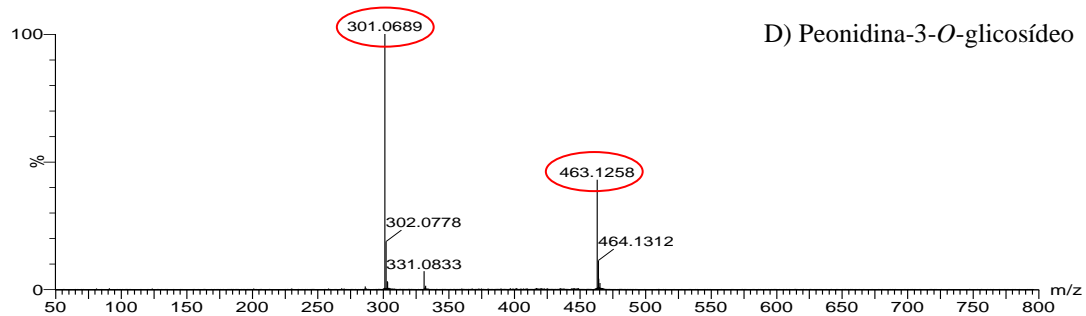
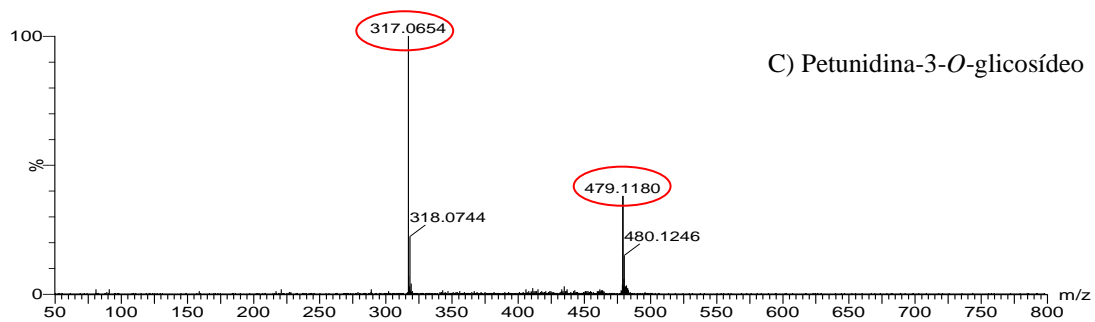
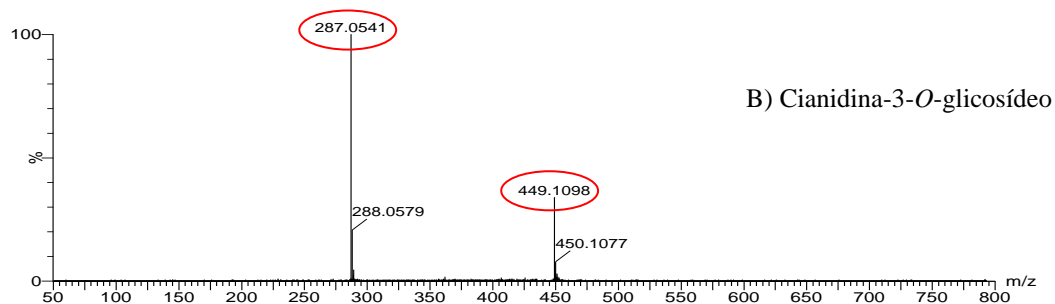
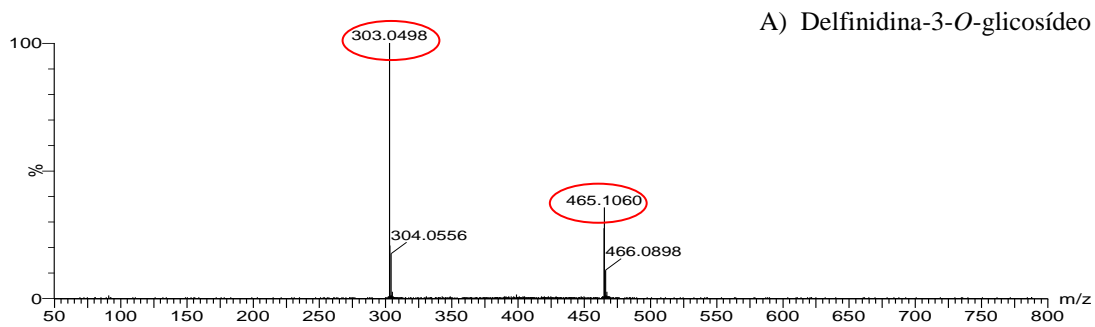


Figura 45: Espectros de massas das antocianinas presentes no fruto de *E. astringens*

A antocianina majoritária presente nos frutos de *E. astringens* foi a malvidina-3-*O*-glicosídeo, representando em média 41,56% do total de antocianinas presentes na parte comestível do fruto, seguida pela delphinidina-3-*O*-glicosídeo (18,76%), petunidina-3-*O*-glicosídeo (17,67%), peonidina-3-*O*-glicosídeo (11,20%) e cianidina-3-*O*-glicosídeo (5,05%).

O perfil antociânico encontrado para o fruto de *E. astringens* coletada na restinga possui um perfil semelhante ao encontrado no fruto de *Eugenia umbelliflora* Berg, sinônimo de *E. astringens*. Foram identificadas as cinco antocianinas analisadas no perfil do fruto de *E. astringens*, além da antocianina pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (KUSKOSKI et al., 2003).

Entretanto, no perfil antociânico apresentado no fruto de *E. astringens*, além das cinco antocianinas majoritárias, que representam 94,24%, no cromatograma, pode ser observado a presença de mais seis antocianinas minoritárias, representando cerca de 5,76% do perfil. Essa confirmação pôde ser feita devido ao espectro de absorção característica de antocianinas ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), porém não foi possível a identificação das antocianinas minoritárias devido a falta de padrão analítico.

As cinco antocianinas monoglicosiladas identificadas para o fruto em estudo também são encontradas na uva (*Vitis* spp.) (GOUVÊA et al., 2014), matriz muito consumida pela população brasileira (IBGE, 2009), além de fazerem parte do perfil antociânico do fruto mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) (WANG et al., 2014).

A Tabela 17 apresenta a quantificação individual das antocianinas monoglicosiladas e o total de antocianinas monoméricas presentes no fruto de *E. astringens*.

Tabela 17: Teor de antocianinas e desvio padrão da parte comestível liofilizada, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) dos frutos de *E. astringens* em mg.100 g^{-1}

Analito	Teor (mg. 100 g^{-1}) \pm Desvio padrão
Delfinidina-3- <i>O</i> -Glicosídeo	306 \pm 1,67
Cianidina-3- <i>O</i> -Glicosídeo	66,5 \pm 0,67
Petunidina-3- <i>O</i> -Glicosídeo	245,1 \pm 4,78
Peonidina-3- <i>O</i> -Glicosídeo	157,3 \pm 2,31
Malvidina-3- <i>O</i> -Glicosídeo	730 \pm 3,22
Total monoméricas	1504,10

A parte comestível do fruto de *E. astringens* apresentou uma concentração total de antocianinas igual a 1504,1 mg.100 g^{-1} (Tabela 17). Ao comparar este resultado com do mirtilo (2651,18 mg.100 g^{-1}), fruto considerado fonte de antocianinas (PRIMETTA, et al., 2014).

Ao comparar a concentração de cianidina-3-*O*-glicosídeo (66,5 mg.g⁻¹) encontrada no fruto de *E. astringens* com o açaí (35,29 mg.100 g⁻¹) (GOUVÊA et al.,2012), o qual é considerado fonte dessa substância, foi observado que o fruto apresentou uma concentração duas vezes maior que a desta matriz.

Quanto à concentração de delphinidina-3-*O*-glicosídeo (306 mg.100 g⁻¹), quando comparada à grumixama, que apresentou um valor médio de 949, 06 mg.100 g⁻¹ (NASCIMENTO, 2015), duas vezes o valor encontrado no fruto de *E. astringens*.

Ao comparar a concentração da antocianina majoritária no fruto (malvidina-3-*O*-glicosídeo, 730 mg.100 g⁻¹), com diferentes cultivares de mirtilo (38,03 e 86,46 mg. 100 g⁻¹) (PERTUZATTI, 2009), observou-se que o fruto *E. astringens* apresentou um teor superior.

Com relação às antocianinas petunidina-3-*O*-Glicosídeo (245,1 mg. 100 g⁻¹) e peonidina-3-*O*-Glicosídeo (157,3 mg.100 g⁻¹), quando comparados ao fruto de *Neomitransthes obscura*, o qual possui concentrações respectivas de 3,1 mg.100 g⁻¹ e 0,30mg.100 g⁻¹, foi observado que o fruto *E. astringens* possui um teor maior dessas antocianinas.

Portanto, a *E. astringens* apresenta um importante valor científico devido à elevada concentração de antocianinas existentes na mesma. Essas substâncias possuem um importante papel na saúde, principalmente como agente antioxidante atuando na redução dos riscos de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (KUSKOSKI et al., 2004; ABE et al., 2007; BORNSEK et al., 2012).

Através das comparações dos valores de concentração de antocianinas totais e antocianinas individuais, foi possível observar que o fruto de *E. astringens* pode ser considerado uma fonte alternativa dessa substância, agregando valor ao fruto pouco explorado cientificamente.

6 CONCLUSÃO

Os frutos de *Eugenia puniceifolia* Kunth DC são uma excelente fonte alternativa de carotenoides, em especial do licopeno, além de apresentar carotenoides pró-vitâmicos A na sua composição química, como β -caroteno e a β -criptoxantina. Além disso, apresentaram uma quantidade superior de ácido ascórbico em relação a dose diária recomendada. Com relação à composição de substâncias fenólicas, foram identificadas dez substâncias (7 ácidos fenólicos, 1 flavonoide e 2 antocianinas) na composição química dos frutos. O fruto apresentou uma concentração de açúcares similar quando comparado a outras mirtáceas. Portanto, pode-se concluir que as substâncias bioativas majoritárias da composição química dos frutos de *Eugenia puniceifolia* Kunth DC são os carotenoides, em especial, o licopeno.

Os frutos de *Eugenia astringens* Cambess, apresentaram baixo teor de ácido ascórbico. Com relação aos carotenoides, os frutos apresentaram luteína, zeaxantina, β -criptoxantina e β -caroteno, importantes substâncias bioativas para o organismo humano. Os frutos apresentaram, após as hidrólises, teores elevados de ácido gálico na parte comestível, quando comparado a outros frutos pertencentes à mesma família. Foi confirmada a presença de ácido elágico após as hidrólises, porém, em baixos teores. A polpa do fruto apresentou um perfil com as cinco antocianinas mais encontradas em alimentos, perfil semelhante ao da uva, além de ter um elevado teor de antocianinas monoméricas totais quando comparado a outras matrizes consideradas fontes dessa substância. Logo, pode-se concluir que essas substâncias são majoritárias na composição deste fruto.

Portanto, a caracterização química desses dois frutos, ainda pouco explorados cientificamente, possibilitou um conhecimento de novas fontes de compostos bioativos (licopeno da *Eugenia puniceifolia* e antocianinas da *Eugenia astringens*), substâncias com importantes propriedades nutricionais e funcionais, destacando a importância dos frutos da biodiversidade brasileira.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A análise de substâncias fenólicas, em especial ácido fenólicas e flavonoides ainda é um desafio devido a complexidade estrutural que essas substância encontram-se presentes na forma livre, polimerizada, glicosilada ou sob a formando complexos com proteínas e lipídeos. Logo, faz-se necessário uma maior busca na literatura por um método mais rápido e prático pra a determinação dessas substâncias.
- Ao observar uma elevada concentração de ácido gálico e após as hidrólises para os frutos de *E. astringens*, verificou-se a necessidade de futuros estudos para a determinação de taninos, podem-se sugerir que o nome da espécie seja devido a adstringência ocasionada pela presença dessas substâncias.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L.T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição, São Paulo, 2007.

ABE, L.T.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. **Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg)**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.92, n.8, p: 1679-1687, 2011.

ACOSTA-ESTRADA, B.A., GUTIÉRREZ, J.A., SERNA-SALDÍVAR. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**. v.152, p.46-55, 2014

ALMEIDA, M.M.B.; PAULA, R.C.M.; JÚNIOR, J.B.A.S.; SOUSA, P.H.M.; LOPES, M.F.G.; LEMOS, T.L.G. **Estudo da composição de açúcares em frutas tropicais do Nordeste Brasileiro**. Anais da 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 30/05 a 02/06/2009, Centro de Convenções do Ceará, Fortaleza-CE.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em Alimentos: uma breve revisão**. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. v.66, n.1, p.1-9, 2007

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**, 18 ed., 3ª rev, 2010.

ARANHA, F.Q.; BARROS, Z.F.; MOURA, L.S.A.; GONÇALVES, M.C.R.; BARROS, J.C.; METRI, J.C.; SOUZA, M.S. **O papel da Vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso**. *Revista de Nutrição*, v. 13, n. 2, p. 89-97, 2000.

ARANTES, A.A.; MONTEIRO, R. **A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil**. *Lundiana-UFMG*. v. 3, n. 2, p. 111-127, 2002

ARAÚJO, V.F.; BIALVES, T.S.; VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; FERRI, N.; SILVEIRA, C.A.P. **Propriedades funcionais e qualidade físico-química da cereja-do-Rio Grande (*Eugenia involucrata* DC.) in natura e processada na forma de geleia**. 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012.

BARCELLOS, M.E.F.; RIGUETE, J.R.; SILVA, L.T.P.; JÚNIOR, P.D.F. **Uma visão panorâmica sobre os solos das restingas e seu papel na definição de comunidades vegetais nas planícies costeiras do sudeste do Brasil.** *Natureza on line.* v.10, n. 2, p. 71-76, 2012.

BARCIA, M.T. **Composição centesimal e de fitoquímica em jambolão (*Syzygium cumini*): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas-RS, 2009.

BARCIA, M.T., JACQUES, A.C., PERTUZATTI, P.B., ZAMBIAZI, R.C. **Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE.** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* v. 31, n.2, p. 381-390, 2010.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil.** UFV, Imprensa Universitária. Viçosa, MG. v. 2, p. 114-126, 1991.

BEATTIE, J., CROZIER, A., DUTHIE, G.G. **Potential health benefits of berries.** *Cur. Nutr. Food Sci.* v.1, p.71-86, 2005.

BLUM, A.; MONIR, M.; WIRSANSKY, I.; BEN-ARZI, S. **The beneficial effects of tomatoes.** *European Journal of Internal Medicine,* v. 16, n. 6, p. 402-404, 2005.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. **S Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants.** *Food Reviews International,* v. 25, n. 4, p. 313-325, 2009.

BORNSEK, S.P.; ZIBERNA, L.; POLAK, T.; VANZO, A.; ULRIH, N.P.; ABRAM, V.; TRAMER, F.; PASSAMONTI, S. **Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells.** *Food Chemistry.* v.134, p.1878-1884, 2012.

BRAMLEY, P.M. **Is lycopene beneficial to human health?** *Phytochem.* v. 54, p.233-236, 2000.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 303 de 20 de março de 2002**. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de áreas de preservação permanente. Publicado no D.O.U em 13 de maio de 2002. Disponível em: http://mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_2002_303.pdf

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005**. Define Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Publicado no D.O.U em 23 de setembro de 2005. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012**. Define Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. Publicado no D.O.U em 21 de agosto de 2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/ResolucaoR+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES

BRIDDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. **Anthocyanins as natural food colour-selected aspects**. Food Chemistry, 58, 103–109.1997.

BRITTON, G. **Structure and properties of carotenoids in relation to function**. Faseb Journal, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

CANOVAS R.; CYPEL, M.; FARAH, M.E.; JÚNIOR, R.B. **Pigmentos Maculares**. Arq. Bras. Oftalmologia. v.72, n.6, p.839-844, 2009.

CARDOSO, L.M., LEITE, J.P.V., PELUZIO, M.C.G. **Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico**. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. v.40, n.1, p. 116-138, 2011.

CARVALHO, A. R. F.; OLIVEIRA, J.; FREITAS, V.; MATEUS, N.; MELO, A. **A theoretical interpretation of the color of two classes of pyranoanthocyanins**. Journal of Molecular Structure: Theochem. v. 948, p. 61-64, 2010.

CHAGAS & SILVA, F.; FONSECA, E.P.; SOARES-SILVA, L.H.; MÜLLER, C.; BIANCHINI, E. **Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da bacia do rio Tibagi-3**. Acta Botanica Brasilica. v. 9, n. 2, p. 289-302, 1995.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. **Caracterização físico-química do suco da acerola**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 4, n. 2, 2004.

CHEN, J; SONG, Y; ZHANG, L. **Lycopene/tomato consumption and the risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies**. J Nutr Sci Vitaminol. v. 59, n.3, p.213-223, 2013.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K., OOI, V.E.C. **Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts**. Food Chemistry. v.80, n.2, p.249-255, 2003.

CHIARADIA, M.C., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. **O estado da arte da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. Química Nova. v.31, n.3, p.623-636, 2008.

CLINFORD, M.N., SCALBERT, A. **Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden**. J. Sci. Food Agri. v.80, p.1118-1125, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1a. edição. Campinas: UNICAMP, 2007.

COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**. trad. FRAZZON, J. et al., 3 ed. Porto alegre: Artmed, 2004.

COSTA, A.G.V., GARCIA-DIAZ, D.F., JIMENEZ, P., SILVA, P.I. **Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries**. Journal of Functional Foods. v.5, p.539-549, 2013.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. **Uso medicinal de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae no Brasil.** Floresta e Ambiente. v.11, n.1, p. 47-52, 2004.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica-** Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2009.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia, um breve ensaio.** Química Nova na Escola. n° 7, p. 21-25. 1998.

DEGÁSPARI C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos.** Visão Acadêmica, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DELCOURT, C.C., CARRIÈRE, I., DELAGE, M., BARBERGER-GATEAU, P., SCHALCH, W. **Plasma Lutein and Zeaxanthin and Other Carotenoids as Modifiable Risk Factors for Age-Related Maculopathy and Cataract: The POLA Study.** Investigative Ophthalmology & Visual Science. v. 47, n.6, p.2329-2335, 2006.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural Products: a biosynthetic approach.** Editora John Wiley & Sons, 3. ed., Inglaterra, 2009.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

FAO, Human Vitamin and Mineral Requirements, 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42716/1/9241546123.pdf>. Acesso em: 29 de julho de 2015.

FENNEMA, O.R. **Química dos alimentos de Fennema.** Editora Artmed, 4. ed., Porto Alegre-Brasil, 2010.

FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. **Ácidos orgânicos: dos primórdios da Química Experimental à sua Presença em Nosso Cotidiano.** Revista Química Nova na Escola, n. 15 (maio), 2002.

FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. **A importância da vitamina C na sociedade.** Revista Química Nova na Escola, seção: Química e Sociedade, n. 17 (maio), 2003.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F; PASSOS, M. **Carotenoides: cores atraentes e ação biológica.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. p 40-45, 1997.

FRANCIS, F.J., **Food Colorants: anthocyanins,** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v.28, n.4, p.273-314, 1989.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. **Composição química e atividade microbiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 15, n. 3, p. 191-194, jul-set. 2005.

GARCÍA-NIÑO, W.R., ZAZUETA, C. **Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection.** Pharmacological Research. v.97, p.84-103, 2015.

GIOVANNUCCI, E., ASCHERIO, A., RIMM, E.B., STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A., WILLETT, W.C. **Intake of Carotenoids and Retino in Relation to Risk of Prostate Cancer.** Journal of the National Cancer Institute. v. 87, n.23, p.1767-1776, 1995.

GIOVANNUCCI, E. **Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature.** Journal of the National Cancer Institute, v. 91, n. 4, p. 317-331, 1999.

GIOVANINNI, E., MANFROI, V. **Viticultura e Enologia- Elaboração de Grandes vinhos no território brasileiro.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 344p., 2009.

GOVAERTS, R., DRANSFIELD, J., ZONA, S.F, HODEL, D.R., HENDERSON, A. **World Checklist of *Myrtaceae***. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. Disponível em: http://apps.kew.org/wcsp/furtherInformation.do?name_id=76536 (acesso em 05 de maio de 2015).

GOUVÊA, A. C. M. S; ARAUJO, M. C. P; SHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. O., CABRAL, L. M. C. **Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.1, p.1-4, 2012.

GOUVÊA, A.C.M.S. SANTIAGO, M.C.P.A.; OLIVEIRA, L.M.; GODOY, R.L.O.; PEIXOTO, F.M.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L.S.M.; BORGUINI, R.G. **Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas-pretas (*Vitis* spp.) por CLAE/DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI/EM/EM**. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*. v.6, n.1/2, 2014.

GOUVÊA, A.C.M.S. MELO, A.; SANTIAGO, M.C.P.A.; PEIXOTO, F.M.; FREITAS, V.; GODOY, R.L.O.; FERREIRA, I.M.P.V.O. **Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies**. *Food Chemistry*. v.185, p. 277-283, 2015.

HAN, Y., **Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans***. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 207-211, 2009.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992**. *Phytochemistry* v. 55, p. 481-504, 2000.

HEREDIA. F.J.; FRANCIA-ARICHA, E.M.; RIVAS-GONZALO, J.C.; VICARIO, I.M.; SANTOS-BUELGA, C. **Chromatic chaterization of anthocyanins from red grapes-I. PH effect**. *Food Chemistry*, v.63, n.4, p.491-498, 1998.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Pesquisa de orçamentos Familiares 2008-2009: **Aquisição alimentar domiciliar per capita**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf>.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Estimativa 2014: **Incidência de câncer no Brasil**. Brasil, 2015.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; ZAMBIAZI, R.C.; CHIM, J.F. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. Química Nova. v.33, n.8, p. 1720-1725, 2010.

JAKOBEK, L.; SERUGA, M.; SERUGA, B., NOVAK, I.; MEDVIDOVIC-KOSANOVIC, M. **Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia**. International Journal of Food Science and Technology. v.44, p. 860-868, 2009.

JÁUREGUI, M. E. C.; CARILLO, M. C. C.; ROMO, F. P. G. **Carotenoides y su función antioxidante: Revisión**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. v. 61, n. 3, 2011.

KLUMP, S. P.; ALFRED, M.C.; MACDONALD, J.L. **Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: Collaborative study**. Journal of AOAC International, v. 84, n.2, p. 1865-1883, 2001.

KONG, J.M., CHIA, L.-S., GOH, N.K, CHIA, T.-F, BROUILLARD, R. **Corrigendum to “Analysis and biological activities of anthocyanins”**. Phytochemistry, v.64, p. 923-93, 2003.

KOBORI, C.N; HUBER, L.S; KIMURA, M; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Teor de carotenoides em produtos de tomate**. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, v.69, n.1, p.78-83, 2010.

KRINSKY, N.I.; YEUM, K.J. **Carotenoid–radical interactions**. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 305, n. 3, p. 754-760, 2003.

KRINSKY, N.I.; YEUM, K.J. **Carotenoid actions and their relation to health and disease**. Molecular Aspects of Medicine. v. 26, p. 459-516, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; VEGA, J.M.; RIOS, J.J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. **Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguaciu (*Eugenia umbelliflora* Berg)**. J. Agric. Food Chem. v.51, p.5450-5454, 2003.

KUSKOSKI, E.M., ASUERO, A.G., GARCIA-PARILLA, M.C., TRONCOSO, A.M., FETT, R. **Atividade antioxidante de pigmentos antociânicos**. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. v.24, p.691-693, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas, SP: Editora Átomo, 382 f. 2009.

LANÇAS, F.M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas**. Scientia Chromatographica. v.5, n.1, p.27-46, 2013.

LANDRUM, L.R., KAWASAKI, M.L. **The genera of Myrtaceae in Brazil ñ an illustrated synoptic treatment and identification keys**. Brittonia. v.49, n. 4, p.508-536, 1997.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 5. ed., São Paulo-Brasil, 2011.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; FONSECA-KRUEL, V.S; SILVA, I.M; MARTINS, K. **Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential**. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 24, p. 225- 247, 2014.

LEITE-LEGATTI, A.V.; BATISTA, A.G.; DRAGANO, N.R.V.; MARQUES, A.C.; MALTA, L.G.; RICCIO, M.F.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, A.R.T.; CARVALHO-SILVA, L.B.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M.; MARÓSTICA, M.R.J. **Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities.** Food Research International. v. 49, p. 596–603. November, 2012.

LIÃO, M.L.; SEIB, P.A. **Chemistry of L-ascorbic Acid Related to Foods.** Food Chemistry. n. 30, p. 289-312, 1988.

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, MG.N.; QUADRI, M.B. **Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade.** Revista Brasileira de Agrociência. v. 13, n.3, p.291-297, 2007.

LORENZI, H. **Frutas no Brasil nativas e exóticas: de consumo in natura.** São Paulo - SP: Instituto Platarum de Estudos da Flora. 2015

LOURENÇO, A.L.R.R.; BARBOSA, M.R.V.; **Myrtaceae em restingas no limite norte de distribuição da Mata Atlântica, Brasil.** Rodriguésia. v. 63, n. 2, p. 373-393, 2012.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MACRAE, R. **A series of monographs: HPLC in food analysis.** Food Science and Technology. Editora Academic Press, 2^a ed. p. 77, 1998.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. **Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Química Nova, v.32, n.1, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** The American Journal of Clinical Nutrition. v. 79, p.727-747, 2004.

MARCHIORI, J.N.C & SOBRAL, M. **Dentologia das Angiospermas: Myrtales.** Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 1997.

MARTÍNEZ, F.; GONZÁLEZ, G. J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. **Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes.** Nutrition Hosp, v.17, n.6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, G.B.C., SUCUPIRA, R.R., SUAREZ, P.A.Z. **A química e as Cores.** Revista Virtual de Química. v.7, n.4, p.1508-1534, 2015.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. **Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 50, n.13, p. 3660-3667, 2002.

MAURAY, A.; MILENKOVIC, D.; BESSON, C.; CACCIA, N.; MORAND, C.; MICHEL, F.; MAZUR, A.; SCALBERT, A.; FELGINES, C. **Atheroprotective effects of bilberry extracts in Apo-E-deficient mice.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 23, p. 111-116, 2009.

MELÉNDEZ, A. J.; BEJINES, E.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. **Vitamin c in orange juices determined by hplc: influence of the wavelength of detection.** Italian Journal of Food Science. v.16, , n.1, p.79, 2004.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. **Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments.** Food Chemistry. v. 101, p. 1145-1150, 2007.

MELLO, E.A.; GUERRA, N.B. **Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MERKEN, H.M., BEECHER, G.R. **Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review.** J Agric Food Chem. v.48, n.3, p.577-99, 2000.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer.** Pharmacological Reviews. v.53, p.673-751, 2000.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. **Biodisponibilidade do licopeno.** Revista de Nutrição. v. 19, n. 2, p. 265-273, 2006.

MOTILVA, M. J.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; LABRADOR, A.; DOMÍNGUEZ, A.; PEIRÓ, L. **Optimisation and validation of analytical methods for the simultaneous extraction of antioxidants: Application to the analysis of tomato sauces.** Food Chemistry. v. 163, n. 0, p. 234-243, 2014.

NACZK, M., SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in foods.** Journal of Chromatography A. v.1054, p.95-111, 2004.

NASCIMENTO, L.S.M. **Identificação e quantificação de compostos bioativos em frutos de Eugenia brasiliensis, Lam.** Dissertação (Mestrado), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

NEUHOUSER, M. L. **Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies.** Nutrition and Cancer. v.50, p.1-7, 2004.

NIIZU, P. Y., RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. **A melancia como fonte de licopeno.** Revista do Instituto Adolfo Lutz. V. 62, n.3, p.195-199, 2003

OLIVEIRA, D.S.; AQUINO, P.P.; RIBEIRO, S.M.R.; PROENÇA, R.P.C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.P. **Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes do CEASA do Estado de Minas Gerais.** Acta Scientiarum. Health Sciences. v.3, n.1, p.89-98, 2011

O'NEIL, C. A.; SCHWARTZ, S. J. **Chromatographic analysis of *cis/trans* carotenoid isomers.** Journal of Chromatography. v. 624, n. 1-2, p. 235-52, 1992.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Seropédica-RJ, 2009.

PACHECO, S., GODOY, R.L.O., PEIXOTO, F.M., GOUVÊA, A.C.M.S., SANTIAGO, M.C.P.D.A., FELBERG, I., BORGUINI, R.G. **Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale.** Analytical Chemistry an Indian Journal. v. 12, n.5, p. 194-197, 2013.

PACHECO, S.; PEIXOTO, F.M.; BORUINI, R.G.; NASCIMENTO, L.S.M; BOBEDA, C.R.R.; SANTIAGO, M.C.P.A.; GODOY, R.L.O. **Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices.** Scientia Agricola. v. 71, n. 5, p. 416-419, 2014.

PACHECO, S., BORGUINI, R.G., SANTIAGO, M.C.P.A., NASCIMENTO, L.S.M., GODOY, R.L.O. **História da Cromatografia Líquida.** Revista Virtual de Química. v.7, n.4, p. 1225-1271, 2015.

PEREIRA M.C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2011.

PESSANHA, F.F. ***Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ, 2010.

PIETTA, P.G. **Flavonoids as antioxidants.** Journal of Natural Products, Columbus. v.63,n.7, p.1035-1042, 2000.

PERTUZATTI, P.B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciências e Tecnologias Agroindustrial, Pelotas-RS, 2009.

PINTO, M.S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

PORCU, O.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich brazilian fruit *Eugenia uniflora* L.** Plant Foods Hum Nutr. v. 63, p. 195-199, 2008.

PORRINI, M.; RISO, P. **What are typical lycopene intakes?** Journal of Nutrition, v. 135, n. 8, p. 2042-2045, 2005.

PRIMETTA, A.K.; JAAKOLA, L.; AYAZ, F.A.; INCEER, H.; RIIHINEN, K.U. **Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)**. Food Control. v.30, p.662-667, 2013.

PRIOR, R. L.; CAO, G. **Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication**. Horticultural Science., v.35, p.588-592, 2000.

RAMPAZZO, V., TAKIKAWA, A.Y., HAMINIUK, C.W. **Quantificação de compostos fenólicos e frutas vermelhas (*Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Morus nigra*)**. Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR. 06 a 08 de outubro de 2010, Campus Dois Vizinhos-PR.

RAMPAZZO, V.; TAKIKAWA, A.Y.; HAMINIUK, C.W.I. **Quantificação de ácidos fenólicos em frutas**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, PR, Brasil.2012.

RAO, A.V., RAO, G.L. **Carotenoids and health**. Pharmacological Research. v.55, p. 207-216, 2007.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. **Analytical separation and detection methods for flavonoids**. Journal of chromatography A. v.1112, p. 31-63, 2006.

RIZZINI, C. M.; PEREIRA, C.; OCCHIONI, E. M. L.; AGAREZ, F. V. **Considerações sobre a ocorrência de Cactaceae na APA de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil**. Acta Botânica Brasileira. v.4, n.2, 1990.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GANZAGA, L.V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. **Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L.** Alimento e Nutrição-Araraquara. v. 19, n.13, p.271-276, 2008.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 2001. 64p.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. 2008. 100p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. Journal of Food Composition and Analysis. v. 23, n.7, p. 726-740, 2010.

ROSA, J.R.; GODOY, R.L.O.; OIANO-NETO, J.; CAMPOS, R.S.; MATTA, V.S.; FREIRE, C.A.; SILVA, A.S.; SOUZA, R.S. **Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e exclusão iônica**. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 4, p. 837-846, out-dez, 2007.

RUTZ, J.K. **Avanços na cromatografia líquida**. Trabalho acadêmico (Seminário em Alimentos) - Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2009.

SANTIAGO, M. C. P. A. ; GOUVÊA, A.C.M.S. ; GODOY, R. L. O. ; OIANO-NETO, J. ; PACHECO, S. ; ROSA, J. S. **Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)).

SANTIAGO, M.C.P.A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, J.L.; CRUZ, G.C.S.; SOUZA, NASCIMENTO, C.C.H.C.; AZEVEDO, L.A.C.; PINTO, P.R.; SILVA, R.F.A.; LIMA, A.M.B.; SILVA, R.C.A.; FIGUEIREDO, K.; OLIVEIRA, F.S.G.; DIRÉ, G.F.; BARRETO, A.S. **Essential oil *Eugenia astringens* Cambess. Quantitative analysis and potencial assessment antimicrobial, cytotoxic and genotoxic**. European Journal of Botany Plant Science and Pathology. v.2, n.1, p. 1-17, 2015.

SENTANIM, M.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Teores de carotenoides em mamão e pêsego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.27, p. 87-792, 2007.

SILVA, A.L.G; PINHEIRO, M.C.B. **Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae)**. Acta Botânica Brasileira. v.22, n.3, p.652-683. 2007.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25824>>. Acesso em: 18 Mai. 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F, X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora LTC, Rio de Janeiro 2007.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora UFSC: UFRGS, 6. ed., Porto Alegre- Brasil, 2007.

SINGH, S.; SWAIN, S.; NISHA, M.; BANU, V.S.; SINGH, D.R.; ROY, S.D. **Changes in lycopene, total carotenoid and anti-radical activity in teasel gourd (*Momordica subangulata* ssp. *renigera* (G. Don) de Wilde) fruit fractions at different stages of maturity.** *Industrial crops and Products*. v.73, p. 154-163, 2015.

SKOOG, A.D. WEST, DM. HOLLER, F.J. CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo-SP. p. 728-733, 924-930. 2006.

SMITH, R. M. **Understanding mass spectra. A basic approach.** New Jersey, John Wiley & Sons, 2004.

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

SOUZA, M. C.; MORIM, M. P.; CONDE, M. M. S.; MENEZES, L. F. T. **Subtribo Myrciinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil.** *Acta Botânica Brasileira*. v.21, n.1, p.49-63. 2007.

SOUZA, M.C.; MORIM, M. P. **Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil.** *Acta Botânica Brasileira*. v.22, n.3, p.652-683. 2008.

SPORN, M.B; LIBY, K.T. **Lycopene an effective agent for preventing prostate cancer?** *Cancer Prev Res (Phila)*. v. 6, p. 384-386, 2013.

STADLER, ZECLIZ. **Determinação do Teor de Vitamina C em Alimentos.** Curitiba,1999. 27f. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Ensino de Química Experimental para o 2o. Grau, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná.

TACO - **Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.**- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas, p. 161. 2011.

TALCOTT, S.T.; BRENES, C.H.; PIRES, D.M.; POZO-INSFRAN, D. **Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.51, p.957-963, 2003.

TRIESCHMANN, M., BEATTY, S., NOLAN, J.M., HENSE, H.W., HEIMES, B., AUSTERMANN, U., FOBKER, M., PAULEIKHOFF, D. **Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: The LUNA study.** *Experimental Eye Research*. v. 84, n.4, p.718-728, 2007.

U.S.D.A., A. R. S. **USDA Nutrient Database for Standard Reference.** Disponível em <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/vitamins-and-minerals/ascorbic-acid-vitamin-c>. Acessado em 30 de julho de 2015.

VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DÖRR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; RIVEROS, J.M. **Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa.** *Química Nova*. v.34, n.10, p.1875-1887, 2011.

VITALE, A.A., BERNATENE, E.A., POMILIO, A.B. **Carotenoids in chemoprevention: lycopene.** *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. v.44, n.2, p. 195-238, 2010.

VIZZOTO, M., PEREIRA, M.C. **Caracterização das Propriedades Funcionais do Jambolão.** Pelotas-RS: Embrapa Clima Temperado, 2008 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 79).

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. **Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde.** *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. v.23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WALLE, T. Serial review: Flavonoids and isoflavonas (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.

WANG, E., YIN, Y., XU, C., LIU, J. **Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques.** Journal of Chromatography A. v.1327, P.39– 48, 2014

WEBER, D.; GRUNE, T. **The contribution of beta-carotene to vitamin A supply of humans.** Molecular Nutrition & Food Research. v. 56, n. 2, p. 251-8, 2012.

WILLIAMS, G. M.; WILLIAMS, C. L.; WEISBURGER, J. H. **Diet and cancer prevention: the fiber first diet.** Toxicological Sciences. v. 52, n. 2, p. 72-86, 1999.

XAVIER, M. F.. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis, 2004.

YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; TAKEMOTO, J. K.; VEGA-VILLA, K. R.; ANDREWS, P. K.; SAYRE, C. L.; MARTINEZ, S. E.; DAVIES, N. M. **Polyphenols and flavonoids: an overview.** In: I. John Wiley & Sons (Ed.). Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology, 2013.

YI, J.; LAM, T I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. **β -carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells.** Food Hydrocolloids, v. 43, p. 31-40, 2015.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. **Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women.** American Journal Epidemiology. v.149, p.943-949, 1999.

YU, Y., CHANG, W., WU, C., CHIANG, S. **Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid.** Journal of Nutritional Biochemistry. v. 16, p.675-681, 2005.