



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LARISSA CAVALCANTE DE REZENDE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E**  
**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SEIS FRUTAS TROPICAIS**  
**CONSUMIDAS NA BAHIA**

Salvador

2010

**LARISSA CAVALCANTE DE REZENDE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SEIS FRUTAS TROPICAIS  
CONSUMIDAS NA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química - Área: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David

Salvador

2010

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu noivo,  
pessoas especiais na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais, pois sem eles não existiram neste mundo, meu corpo e minha alma.

Aos meus familiares pelo constante amor, carinho, compreensão e pela minha formação moral.

Ao meu amado Roberto pelo grande apoio, paciência, atenção, incentivo, motivação e amor para superar os momentos mais difíceis.

Ao prof<sup>o</sup> Dr. Jorge Mauricio David pela orientação, incentivo e pela confiança.

A prof<sup>a</sup> Dra. Juceni P. David pelo apoio e disponibilização do laboratório para o término do trabalho.

Ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro.

A Ilton Daltro Castro pelas análises de RMN realizadas na UNICAMP.

A Sandro e Manuela pelas análises no CG/MS e TOF.

Aos alunos de iniciação científica, Renato, Roberta e em especial Daiara, pelas inúmeras análises de AA.

Aos colegas do laboratório 110, pela ajuda constante e pelos momentos mais divertidos: Rosa, Luciano, Clayton, Jeferson, Bruno, Marcus Paraíba, Eliezer, Raul, Darlan, Charleston, Zé Cândido, Huguinho, Marcelo, Patrícia, Bel e a grande companheira Taís.

Aos amigos Vânia, Everaldo, Pedro, Maria (Nevinha) e Vando pelo apoio constante.

Aos professores do Instituto de Química, especialmente os de Química Orgânica, que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários, professores e colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS</b>	X
<b>RESUMO</b>	XI
<b>ABSTRACT</b>	XII
<b>CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	1
INTRODUÇÃO	2
MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)	5
Teste do Sequestro do radical livre DPPH	5
Teste de Inibição da Auto-oxidação do $\beta$ -caroteno	9
DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS	11
CONSIDERAÇÕES	13
REFERÊNCIAS	14
<b>CAPÍTULO 2. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS TROPICAIS DA BAHIA</b>	16
INTRODUÇÃO	17
PARTE EXPERIMENTAL	21
Material	21
Preparo dos extratos das frutas	21
Determinação dos fenólicos totais	21
Teste do sequestro do radical livre DPPH	22
Teste de Inibição da Auto-oxidação do $\beta$ -caroteno	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
<b>CAPÍTULO 3. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES PARTES DA JABUTICABA E DERIVADOS, E PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JABUTICABA (<i>MYRCIARIA CAULIFLORA</i>)</b>	34
INTRODUÇÃO	35
Planejamento fatorial	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
Amostras	38
Reagentes	38
Obtenção dos extratos	38
Determinação de fenólicos totais	39
Determinação da atividade antioxidante	39
Método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)	39
Teste de Inibição da Auto-oxidação do $\beta$ -caroteno	39
Planejamento fatorial	39
Preparação dos extratos	39
Curva de calibração	40
Estratégia de otimização da determinação de compostos fenólicos totais	40

RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
Planejamento Fatorial	44
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
<b>CAPÍTULO 4. ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DOS FRUTOS DE <i>Genipa americana</i> L.</b>	51
INTRODUÇÃO	52
Jenipapo	53
Caracterização físico-química	55
Cumarinas	56
PARTE EXPERIMENTAL	58
Procedimentos experimentais gerais	58
Material	58
Extração e isolamento dos constituintes químicos	59
Avaliação da atividade antioxidante da escopoletina isolada	59
Teste do sequestro do radical livre DPPH	59
Método da inibição da auto-oxidação do $\beta$ -caroteno	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
Identificação dos constituintes químicos isolados	61
Avaliação da atividade antioxidante da escopoletina	70
Teste do sequestro do radical livre DPPH	70
Método da inibição da auto-oxidação do $\beta$ -caroteno	71
REFERÊNCIAS	72
<b>CAPÍTULO 5. ESTUDO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DICLOMETANO DAS SEMENTES DE <i>Spondias mombin</i> L.</b>	75
INTRODUÇÃO	76
n-Alquil fenóis	80
Antioxidantes de origem vegetal	81
PARTE EXPERIMENTAL	82
Extração e isolamento dos constituintes químicos	83
Reação de Transesterificação	83
Reação de Tioalquilação	84
Teste do sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
Identificação de Triglicerídeos	86
Identificação dos Triglicerídeos presentes em <i>S. mombin</i>	89
Obtenção e identificação dos ésteres metílicos de <i>S. mombin</i>	95
n-Alquil fenóis	97
Identificação da mistura de n-alkil fenóis <b>2 e 3</b>	98
Identificação da mistura de esteróides	103
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

<b>Figura 1.</b> Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante	6
<b>Figura 2.</b> Atividade antioxidante pelo método do DPPH	6
<b>Figura 3.</b> Solução $\beta$ -caroteno/ácido linolênico	10
<b>Figura 4.</b> Atividade antioxidante pelo método do $\beta$ -caroteno	10
<b>Figura 5.</b> Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteau	12
<b>Figura 6.</b> Curva de calibração para dosagem de fenólicos totais	13

**CAPÍTULO 2. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS TROPICAIS DA BAHIA**

<b>Figura 1.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de jabuticaba	25
<b>Figura 2.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de jabuticaba	25
<b>Figura 3.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de siriguela e cajá	26
<b>Figura 4.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de sapoti, jenipapo e umbu	26
<b>Figura 5.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de umbu, cajá, siriguela e jabuticaba	27
<b>Figura 6.</b> Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de sapoti e jenipapo	27
<b>Figura 7.</b> Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas congeladas	28
<b>Figura 8.</b> Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de siriguela, cajá e jabuticaba	29
<b>Figura 9.</b> Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de sapoti, jenipapo e umbu	29

**CAPÍTULO 3. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES PARTES DA JABUTICABA E DERIVADOS, E PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA CAULIFLORA*)**

<b>Figura 1.</b> Curva de calibração do padrão ácido gálico	40
<b>Figura 2.</b> % SRL dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba (suco, polpa e casca)	41
<b>Figura 3.</b> % SRL dos extratos metanólicos da semente e polpa de jabuticaba e ácido gálico	42
<b>Figura 4.</b> AA dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba (suco, polpa e casca)	43
<b>Figura 5.</b> Gráfico de Pareto do modelo fatorial completo $2^3$ obtidos para extração dos compostos fenólicos	46
<b>Figura 6.</b> Superfícies de resposta geradas pelo modelo de planejamento fatorial $2^3$	47

**CAPÍTULO 4. ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DOS FRUTOS DE *Genipa americana* L.**

<b>Figura 1.</b> Constituintes químicos de <i>Genipa americana</i>	54
<b>Figura 2.</b> Estrutura básica da classe das cumarinas e furanocumarinas	56
<b>Figura 3.</b> Estruturas das substâncias isoladas do fruto de <i>Genipa americana</i>	61
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da mistura de $\beta$ -sitosterol e estigmasterol	62

<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico	62
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico	63
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] do ácido cinâmico	64
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] do ácido cinâmico	64
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)] da escopoletina	65
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)] (ampliação) da escopoletina	65
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)] da escopoletina	66
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)] (ampliação) da escopoletina	66
<b>Figura 13.</b> Espectro de HMBC da escopoletina	67
<b>Figura 14.</b> Espectro de HMBC (ampliação) da escopoletina	68
<b>Figura 15.</b> Espectro de HMBC (ampliação) da escopoletina	68
<b>Figura 16.</b> Cromatograma da escopoletina	69
<b>Figura 17.</b> EM-APCI modo negativo da escopoletina	69
<b>Figura 18.</b> Percentual de sequestro de radical livre (% SRL) da cumarina e do ácido gálico	70
<b>Figura 19.</b> Comparação entre os % I da cumarina isolada do jenipapo e do padrão BHT	71

## CAPÍTULO 5. ESTUDO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DICLOMETANO DAS SEMENTES DE *Spondias mombin* L.

<b>Figura 1.</b> Constituintes químicos de <i>S. mombin</i>	78
<b>Figura 2.</b> Substâncias isoladas das sementes de <i>Spondias mombin</i>	84
<b>Figura 3.</b> % SRL dos extratos diclorometano das sementes de cajá e siriguela	85
<b>Figura 4.</b> Espectro genérico de RMN de $^{13}\text{C}$ de óleo vegetal	86
<b>Figura 5.</b> Espectro genérico de RMN de $^1\text{H}$ de óleos vegetais	89
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do triglicerídeo isolado [(300 MHz), $\text{CDCl}_3$ ]	90
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de três óleos vegetais	91
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do triglicerídeo isolado [(75 MHz), $\text{CDCl}_3$ ]	91
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do triglicerídeo (ampliação) [(75 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	92
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do triglicerídeo (ampliação) [(75 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	92
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do triglicerídeo (ampliação) [(75 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	93
<b>Figura 12.</b> Experimento DEPT $135^\circ$ do triglicerídeo isolado [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	93
<b>Figura 13.</b> Deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos dos óleos vegetais	95
<b>Figura 14.</b> Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos	96
<b>Figura 15.</b> Expansão do cromatograma dos ésteres metílicos obtidos	96
<b>Figura 16.</b> Cromatograma da mistura de n-alkil fenóis ( $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$ )	99
<b>Figura 17.</b> EM-ESI (modo negativo) dos n-alkil fenóis	99
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de <b>2</b> e <b>3</b> [(250MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	100
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de <b>2</b> e <b>3</b> (ampliação) [(250 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	101
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de <b>2</b> e <b>3</b> (ampliação) [(250 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	101
<b>Figura 21.</b> Obtenção do derivado $\alpha,\beta$ -bis-(tiometílico) e fragmento (EM-IE) compatível com ligação dupla entre $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{11}$ .	102
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas dos derivados tioalquilados das substâncias <b>2</b> e <b>3</b>	102

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

<b>Tabela 1.</b> Estrutura e propriedade dos antioxidantes sintéticos e naturais mais utilizados	8
--	---

**CAPÍTULO 2. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS TROPICAIS DA BAHIA**

<b>Tabela 1.</b> FT (mg de EAG/100g de amostra $\pm$ DP) das polpas congeladas e liofilizadas	24
<b>Tabela 2.</b> CE <sub>50</sub> das polpas congeladas e polpas liofilizadas	28

**CAPÍTULO 3. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES PARTES DA JABUTICABA E DERIVADOS, E PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA CAULIFLORA*)**

<b>Tabela 1.</b> Teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba	41
<b>Tabela 2.</b> Valores da CE <sub>50</sub> (mg/mL) do teste de sequestro do DPPH dos frutos da jaboticabeira	42
<b>Tabela 3.</b> Valores da CE <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) dos extratos metanólicos da semente e polpa de jabuticaba	43
<b>Tabela 4.</b> Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup>	45

**CAPÍTULO 4. ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DOS FRUTOS DE *Genipa americana* L.**

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos constituintes químicos de <i>G. americana</i>	54
<b>Tabela 2.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)], <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] do ácido octanóico	63
<b>Tabela 3.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)], <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] do ácido cinâmico	63
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C [100 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO, $\delta$ (ppm)], <sup>1</sup> H [500 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO, $\delta$ (ppm)] da escopoletina	67

**CAPÍTULO 5. ESTUDO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DICLOMETANO DAS SEMENTES DE *Spondias mombin* L.**

<b>Tabela 1.</b> Compostos identificados no aroma de cajá após extração SPME	79
<b>Tabela 2.</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de amostras de óleo vegetais	88
<b>Tabela 3.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, $\delta$ (ppm)], <sup>1</sup> H [300 MHz, $\delta$ (ppm)] do triglicerídeo	94
<b>Tabela 4.</b> Determinação da composição em ácidos graxos no triglicerídeo	96
<b>Tabela 5.</b> Composição em ácidos graxos do triglicerídeo isolado das sementes de <i>S. mombin</i>	97
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)], <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da mistura de alquil fenóis	100

**LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS**

AcOEt - Acetato de etila

CC - Cromatografia em coluna

CCDC - Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

$\delta$  - deslocamento químico

d - duplete

dd - duplo duplete

DCM - Diclorometano

DEPT - Distortionless Enhancement Polarization Transfer

EM - Espectrometria de massas

EM-APCI - Espectrometria de massas por ionização química a pressão atmosférica

EM-ESI - Espectrometria de massas por eletrospray

Hex - Hexano

HMBC - Heteronuclear Multi Bond Correlation

HMQC - Heteronuclear Multi Quantum Correlation

*J* - constante de acoplamento

LCMS - Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrômetro de Massa

m - multiplete

mult. - multiplicidade

MHz - Megahertz

MeOH - Metanol

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - singleto

t - tripleto

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato em acetato de etila dos frutos de *Genipa americana* L. e do extrato em diclorometano das sementes de *Spondias mombin* L., bem como a determinação do teor de fenólicos totais pelo método convencional de Folin-Ciocalteu e avaliação da atividade antioxidante, medida através dos métodos do sequestro radical livre DPPH e da auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico das frutas tropicais, *Spondias mombin* L. (cajá), *Spondias purpurea* L. (siriguela), *Genipa americana* L. (jenipapo), *Manilkara achras* L. (sapoti), *Spondias tuberosa* L. (umbu) e *Myrciaria cauliflora* Berg. (jabuticaba), consumidas na Bahia. Além disso, foi avaliada a concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante de diversas partes da jabuticaba, após ser avaliado por planejamento fatorial, diferentes solventes empregados na extração dos fenólicos. Assim, a partir de sucessivos fracionamentos do extrato acetato de etila dos frutos de *G. americana* foram isolados a mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico, a mistura de sitosterol e estigmasterol, além de ácido octanóico, ácido cinâmico e escopoletina. A partir do extrato em diclorometano das sementes de *Spondias mombin* L. foram isolados o glicerol 1,3-dioleoil-2-linoleoil, a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, além da mistura de 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-octadecenil]-benzeno e 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-docosenil]-benzeno. A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi baseada na análise de dados de espectros de Massas, dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura. O teor de compostos fenólicos expressos em miligramas equivalentes ao ácido gálico das frutas variou na faixa de  $50,25 \pm 4,59$  a  $1405,79 \pm 35,97$  para as polpas congeladas, e de  $193,87 \pm 8,32$  a  $5198,11 \pm 410,92$  para polpas liofilizadas. Foi verificado que as diferentes partes de jabuticaba (polpa, casca e suco) apresentavam elevada concentração de compostos fenólicos, sendo que o suco de jabuticaba apresentava a menor concentração de fenólicos ( $270,66$  mg/100g). Assim, foi evidenciado a significativa atividade antioxidante da casca da jabuticaba, bem como, o fato de que todas as amostras estudadas apresentavam elevada concentração de compostos fenólicos, sendo que as polpas, congelada e liofilizada, de jabuticaba apresentavam a maior concentração de fenólicos.

**Palavras - chave:** Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Frutas tropicais

## ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of the ethyl acetate extract of the fruits of *Genipa americana* L. and the dichloromethane extract of the seeds of *Spondias mombin* L., besides the determination of total phenolic content by the conventional Folin-Ciocalteu and evaluation of antioxidant activity, measured using the DPPH free radical scavenging and autooxidation of  $\beta$ -caroteno/linolenic acid system of six tropical fruit Bahia: *Spondias mombin* L. (Caja), *Spondias purpurea* L. (Siriguela), *Genipa americana* L. (Jenipapo), *Manilkara achras* L. (Sapodilla), *Spondias tuberosa* L. (Umbu) and *Myrciaria cauliflora* Berg. (Jaboticaba). Furthermore, it was evaluated the concentration of total phenolics and antioxidant activity of different parts of jaboticaba after a experimental design with different solvents used for extraction. Thus, from successive fractionations of ethyl acetate extract of the fruits of *Genipa americana* were isolated mixture of cinnamic acid and octanoic acid, the mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, as well as octanoic and cinnamic acids and scopoletin. From the dichloromethane extract of the seeds of *Spondias mombin* were isolated the glycerol 1,3-dioleoil-2-linoleoil, the mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, and the mixture of 1-hydroxy-3-[(Z)-10'-octadecenyl]-benzene and 1-hydroxy-3-[(Z)-10'-docosenyl]-benzene. Structural elucidation of isolated compounds was based on data analysis of mass spectra, the spectra of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and comparison with literature data. The phenolic content expressed as milligrams of gallic acid equivalent to fruit ranged from  $50.25 \pm 4.59$  to  $1405.79 \pm 35.97$  for the frozen pulps, and  $193.87 \pm 8.32$  to  $5198.11 \pm 410.92$  for the lyophilized pulps. It was found that different parts of jaboticaba (pulp, peel and juice) showed high concentrations of phenolic compounds, and the juice jaboticaba showed the lowest concentration of phenol ( $270.66 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ ). There was, therefore, all samples showed high concentration of phenolics compounds, and the pulps, frozen and lyophilized, of jaboticaba had the highest concentration of phenolics, as well as significant antioxidant activity of jaboticaba peel.

Keywords: Phenolic compounds. Antioxidant activity. Tropical fruits

## **CAPÍTULO 1**

### **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## INTRODUÇÃO

Atualmente, os antioxidantes têm despertado grande interesse devido principalmente às descobertas da ação deles sobre os radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Portanto, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são comumente denominados de ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso destas espécies pode apresentar efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios das membranas, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, alteração do DNA e inativação de enzimas. Dessa forma, podem estar relacionados com várias patologias, tais como artrite, catarata, choque hemorrágico, problemas cardíacos, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS, 2006).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Além dos antioxidantes de natureza endógena, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides e poliflavonoides. Dentre os aspectos preventivos é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de retardar o envelhecimento das células, bem como inibir o aparecimento de células cancerígenas. Outro interesse ligado aos antioxidantes é a aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS, 2006).

Trabalhos relacionando atividade antioxidante de alimentos e substâncias isoladas de fontes naturais demonstram que o consumo de frutas, vegetais, vinhos e chás, está relacionado à redução de risco de câncer e doenças cardiovasculares. Esse efeito benéfico deve-se a presença de substâncias fenólicas como, por exemplo, os flavonoides.

Vários estudos *in vitro* demonstram que os flavonoides presentes em vegetais inibem a oxidação da proteína de baixa densidade (LDL). As classes predominantes de flavonoides em frutas são os flavanóis, flavonóis, antocianidinas ou seus derivados glicosilados. Assim, considera-se que, a alimentação rica em grãos, sementes, frutas e vegetais certamente corresponde à ingestão de grande suplemento de antioxidantes, como por exemplo, as vitaminas E e C (CARVALHO, 2004).

A inclusão de frutas e seus produtos na dieta é uma recomendação nutricional relacionada à saúde tendo em vista que estes alimentos fornecem quantidades apreciáveis de fibras, vitaminas e minerais. Desta forma, uma dieta rica em vegetais encontra-se associada a uma maior expectativa de vida (AJILA, 2007).

Portanto, visto que muitas frutas e vegetais são ricos em flavonóides, existe um forte consenso de que os flavonoides e polifenóis relacionados são responsáveis por grande parte da atividade antioxidante de frutas e vegetais. Os flavonoides dão cor e sabor a flores e frutas, e estima-se que os seres humanos consomem entre algumas centenas de miligramas a um grama de flavonoides todos os dias. Chá verde (*Camellia sinensis*) tem recebido atenção generalizada de pesquisa baseada em parte na evidência epidemiológica sugerindo que as culturas que utilizam a bebida apresentam menor incidência de doença de oxidação induzida. O chá é rico em flavan-3-óis tais como 3-galoil-epicatequina (EGCG); estas catequinas podem conter 35-52% de extrato de chá verde sólido (REYNERTSON, 2007).

O consumo de flavonoides regularmente aumenta a longevidade, reduzindo a inflamação e contribui para a melhoria da aterosclerose. A gama de atividade biológica dos flavonoides é grande; além de capturarem radicais livres e ERO, flavonoides apresentam atividades antiinflamatória, antialérgica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-hemorrágica (REYNERTSON, 2007).

Do ponto de vista comercial, antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) são comumente utilizados como preservantes de alimentos processados. Tem sido relatado que estes compostos apresentam alguns efeitos colaterais e são suspeitos de causar câncer. Assim, a busca de novos antioxidantes de origem natural presentes nos alimentos e outros materiais biológicos têm atraído grande interesse devido à sua suposta segurança e potencial nutricional e valor terapêutico. Por isso, o aumento do interesse em antioxidantes naturais tem levado à avaliação da atividade antioxidante de várias espécies de frutas, legumes, ervas, especiarias e cereais, e especial atenção tem sido dada às frutas, pois são fontes ricas de compostos fenólicos (AJILA, 2007).

A geração de radicais livres está diretamente relacionada com a oxidação em alimentos e sistemas biológicos. Portanto, a busca de métodos para determinação do sequestro de radical livre é importante. No caso dos alimentos é necessário determinar a eficácia de antioxidantes naturais para a proteção dos alimentos contra danos oxidativos, bem como evitar efeitos deletérios e perda de valor comercial e nutricional. Além disso, um método rápido para determinar a capacidade antioxidante em alimentos vegetais é necessária. Este método pode ser uma ferramenta útil para fazer uma seleção entre as diferentes espécies, variedades, grau de maturação e condições de cultura, a fim de obter alto teor de antioxidantes naturais em alimentos. Assim, a capacidade antioxidante total de um produto vegetal comestível pode ser um parâmetro para avaliar a qualidade dos alimentos de origem vegetal.

A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende tanto de sua estrutura quanto da sua concentração no alimento. Por sua vez, a concentração destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. Sabe-se, ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura (DE OLIVEIRA, 2009).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma com os resultados são expressos. Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal. Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (DE OLIVEIRA, 2009).

Os métodos disponíveis para medida de atividade antioxidante são vários e não serão todos aqui apontados. Desta forma, serão descritos os métodos mais utilizados e vantajosos pela sua simplicidade metodológica, tempo de análise, custo e relativa especificidade, sendo cada um deles direcionado a um mecanismo antioxidante particular. São métodos que utilizam equipamentos disponíveis na maioria dos laboratórios de pesquisa.

Os testes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os testes utilizados para avaliar a peroxidação lipídica e ensaios utilizados para medir a capacidade de sequestrar radicais livres (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

## MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

### Teste do Sequestro do Radical Livre DPPH

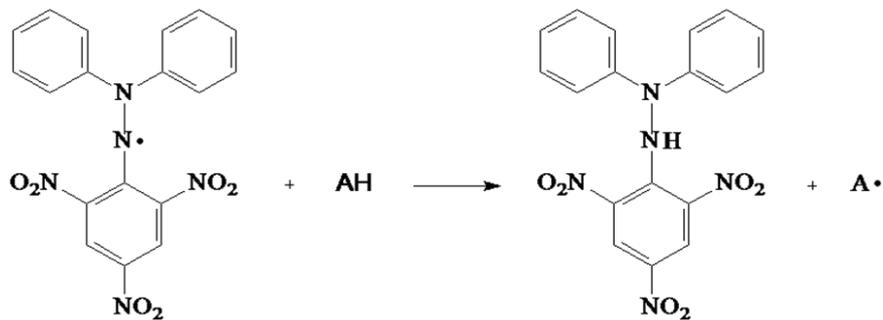
Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que atualmente tem sido usado como reagente colorimétrico para processos de oxi-redução. O DPPH pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) (VEDANA, 2008). As vantagens do método DPPH são:

- avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente;
- um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado;
- permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol.

Esse método apresenta em contrapartida o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (VEDANA, 2008).

O teste do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é um método colorimétrico rápido e eficaz para estimar a atividade antiradicalar. Este ensaio químico é amplamente utilizado em pesquisas de produtos naturais no isolamento de antioxidantes e para testar a capacidade geral dos extratos e compostos puros de absorção de radical. O radical DPPH é um composto orgânico estável contendo nitrogênio com uma forte absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  517 nm e uma cor púrpura escura. Depois de reagir com compostos antioxidantes, ele é reduzido e a cor muda para amarela. A mudança pode ser medida por um espectrofotômetro e plotada contra a concentração. Para expressar a atividade antiradicalar (ou % SRL) utiliza-se o EC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação.

BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) propuseram o método envolvendo a utilização do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>), no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol. A redução do DPPH<sup>•</sup> é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH<sup>•</sup> apresenta absorbância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R<sup>•</sup>) a absorbância diminui (**Figura 1**).



**Figura 1.** Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Este método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em um curto período de tempo. Portanto, este método tem sido uma ferramenta útil para avaliar a capacidade antioxidante de frutos (BORGUINI, 2006). A intensidade da cor varia de acordo com a concentração, conforme mostra a **Figura 2**.



**Figura 2.** Atividade antioxidante pelo método do DPPH (VEDANA, 2008)

Segundo Leon e Shui (2002, *apud* PRADO, 2009) os modelos como DPPH são práticos e recomendados para a avaliação da capacidade antioxidante total de frutas, visto que o sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. Assim, na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor. Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado rápido, prático e estável.

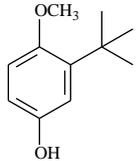
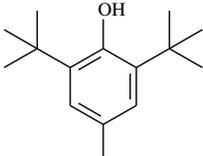
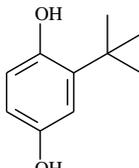
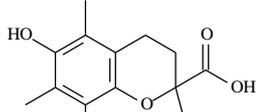
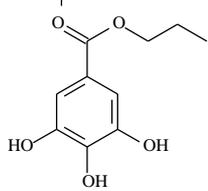
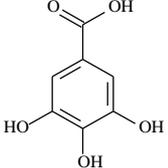
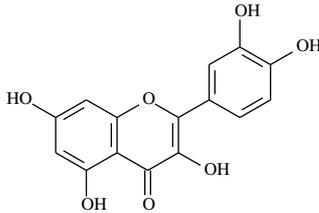
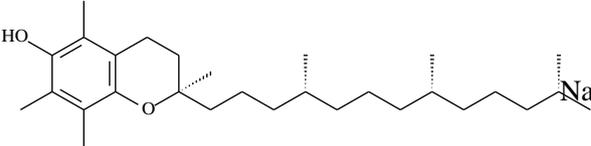
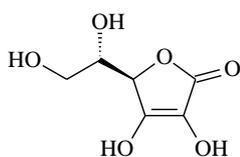
Além disso, o DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e representa, portanto, um excelente método para medir a atividade antioxidante em frutas e sucos de frutas (PRADO, 2009).

O radical DPPH• é muito usado também para se avaliar a capacidade sequestrante de produtos da apicultura, como pólen, própolis e mel. Esse radical orgânico estável é muitas vezes preferido na análise de sequestro de radicais livres em função da sua rapidez e simplicidade. Também permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, ou seja, independe da polaridade do substrato. Yamaguchi *et al.* sugeriram que a lipofilicidade e hidrofilicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH, uma vez que foi observada similaridade entre as atividades de sequestro de radicais livres do Trolox e  $\alpha$ -tocoferol. Entretanto, existem substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH• implicando em uma cinética diferenciada. Podemos citar os compostos que reagem lentamente, como o BHT e BHA, os compostos de cinética rápida, que levam poucos segundos, como o ácido ascórbico, e o de cinética intermediária, com reações entre 5 e 30 min, como o  $\alpha$ -tocoferol (CARPES, 2008).

Assim, podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, chegando ao final da reação em menos de um minuto (cinética rápida); substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos (cinética intermediária) e substâncias de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação (cinética lenta) (BRAND-WILLIAMS, 1995; VEDANA, 2008).

A **Tabela 1** sumariza os antioxidantes comerciais mais comuns relacionando-os com a cinética bem como seu caráter lipofílico ou hidrofílico.

**Tabela 1.** Estrutura e propriedade dos antioxidantes sintéticos e naturais mais utilizados

Antioxidante	Estrutura	Natureza	Cinética	Caráter
BHA		Sintético	lenta	Lipofílico
BHT		Sintético	lenta	Lipofílico
TBHQ		Sintético	lenta	Lipofílico
Trolox		Sintético	intermediária	Hidro e lipofílico
Galato de <i>n</i> -propila		Sintético	rápida	Hidro e lipofílico
Ácido gálico		Natural	rápida	Hidrofílico
Quercetina		Natural	rápida	Lipofílico
$\alpha$ -tocoferol		Natural	intermediária	Lipofílico
Ácido ascórbico		ambos	rápida	Hidrofílico

### **Teste de Inibição da Auto-oxidação do $\beta$ -caroteno**

O  $\beta$ -caroteno é o mais abundante dos carotenoides e largamente utilizado em terapias. É quase completamente insolúvel em água, mas facilmente solúvel em ambientes hidrofóbicos e solventes pouco polares. Nos últimos 30 anos, tem sido reportado que o  $\beta$ -caroteno exibe alta reatividade com eletrófilos e oxidantes. Muitos estudos têm demonstrado que ele inibe a auto-oxidação de lipídios em tecidos biológicos e produtos alimentícios, porém poucos detalhes da cinética e mecanismo destas reações têm sido revelados (ALVES, 2010).

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico, que consiste da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linolênico, estima a habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes em extratos de plantas de sequestrar o radical peróxido do ácido linolênico ( $\text{LOO}^\bullet$ ), que oxida o  $\beta$ -caroteno presente na emulsão. O método é amplamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de matrizes alimentares. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (BORGUINI, 2006).

O método de auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico. Este método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linolênico. Por o sistema ser constituído por uma emulsão (sistema aquoso-lipídico), a atividade antioxidante é medida pela capacidade do extrato ou antioxidante isolado inibir o processo de oxidação do sistema, avaliado durante certo tempo em que os antioxidantes deverão apresentar certa estabilidade para garantir maior atividade antioxidante. A habilidade em inibir a oxidação de substratos lipídicos em testes *in vitro* é resultado da combinação de vários fatores como temperatura, presença de oxigênio em condições que acelerem a reação de oxidação (PRADO, 2009).

O Tween é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos, como BHA, BHT e trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (ALVES, 2010).

Desta forma, o método da co-oxidação empregando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico é um teste simples e sensível, porém apresenta alguns inconvenientes. A utilização



Portanto, a atividade antioxidante pelo método do  $\beta$ -caroteno está baseada na perda da coloração amarela do  $\beta$ -caroteno em função do ataque dos radicais formados pela oxidação do ácido linolênico na emulsão. A atividade antioxidante por este método pode ser útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos, como os óleos essenciais. Por outro lado, se compostos polares forem testados apenas pelo método do  $\beta$ -caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos, como o do DPPH• que independe da polaridade do substrato. Em função das diferenças de especificidade e sensibilidade entre os métodos pode não ser possível usar quantidades iguais de antioxidantes em cada teste. Por outro lado, o uso de concentrações distintas nos dois métodos torna difícil a comparação dos resultados. Porém, independente do método escolhido, a medida da atividade antioxidante em várias concentrações fornece uma compreensão melhor do potencial dos compostos presentes (CARPES, 2008).

## **DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS**

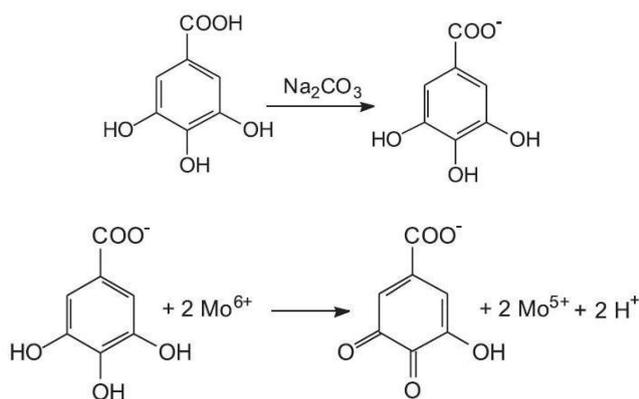
A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos. Todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais extensivamente empregado. Assim, o ensaio de Folin-Ciocalteu (1927) tem sido utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais e o seu mecanismo básico é uma reação de oxi-redução.

O RFC consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos ou outros de natureza não fenólica, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (DE OLIVEIRA, 2009).

Esse método espectroscópico de Folin-Ciocalteu é um dos mais utilizados para a determinação de fenólicos totais em vegetais e bebidas. Baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico-fosfotungstico pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos azuis de tungstênio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) e de molibdênio ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ), um complexo que absorve em  $\lambda_{\text{máx}}=760$  nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  é a base mais indicada. O grupo

fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions produzirem a oxidação (MOYER *et al.*, 2002).

A **Figura 5** mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions (neste caso, carboxilado). A partir daí, ocorre uma reação de oxi-redução entre o ânion e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.



**Figura 5.** Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu

O RFC, popularmente conhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis, mede a capacidade redutora das amostras. Outro ponto fraco do método é que ocorre superestimação do conteúdo fenólico, em larga extensão. Vários interferentes não fenólicos são conhecidos, como por exemplo, a vitamina C e açúcares (DE OLIVEIRA, 2009).

Para fins quantitativos, um método de extração altamente eficiente deve ser desenvolvido antes desta experiência. Por outro lado, este teste pode ser usado para avaliar o poder de extração dos compostos fenólicos de um método. O método de RFC é amplamente utilizado em pesquisa de produtos naturais antioxidantes, porque é simples, sensível e preciso. Uma limitação deste método é que, com amostras complexas, pode haver interferência de compostos descritos acima.

A amostra pode ser seca e re-suspensa no intervalo de diluição adequado para a detecção ou a extração em si pode ser levado até um volume conhecido para análise. Determinar um fator de diluição, diluindo uma alíquota com água, a quantidade vai variar dependendo da quantidade de compostos fenólicos na planta ou concentração do extrato em solução. A concentração deve cair dentro do intervalo linear para o espectrofotômetro UV a ser utilizado para a análise. Se a concentração estiver fora da faixa linear da curva padrão (ou

muito concentrada ou muito diluída), então a amostra deve ser diluída ou concentrada e re-analisada (REYNERTSON, 2007). Assim, os resultados são calculados com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão do ácido gálico. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra.



**Figura 6.** Curva de calibração para dosagem de fenólicos totais (VEDANA, 2008)

## CONSIDERAÇÕES

Durante as últimas décadas, o consumo de frutas e vegetais tem aumentado visto que muitos estudos epidemiológicos e bioquímicos demonstraram que possuem efeitos benéficos sobre a saúde humana (WOJDYŁO, 2008). Compostos bioativos como os polifenóis, os carotenóides e antocianinas presentes em frutas e legumes tem despertado bastante interesse devido ao seu potencial antioxidante (AJILA, 2007).

Muitos métodos analíticos têm sido utilizados para o monitoramento antioxidante, por exemplo, compostos fenólicos em frutas monitorados por HPLC ou colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu. Além disso, a capacidade antioxidante total de alimentos e extratos de plantas tem sido avaliada por métodos espectrofotométricos como o DPPH e o  $\beta$ -caroteno.

Deve-se destacar que o propósito dos testes *in vitro* foi avaliar a atividade antioxidante potencial das amostras, uma vez que extrapolações para sistemas *in vivo* requerem pesquisas mais detalhadas, o que está além dos objetivos do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

AJILA *et al.* Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982-988, 2007.

ALVES, *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BORGUINI, R. G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. **Tese de Doutorado**, 178f., 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CARPES *et al.* Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Tecmed, Ribeirão Preto, p. 125-161, 2004.

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

KUSKOSKI *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOYER, *et al.* Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação de Mestrado**. ESALQ/USP, 106f., 2009.

REYNERTSON, K. A. Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruits. **Tese de Doutorado**. 141f., 2007.

RUFINO, *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 126**, Fortaleza, CE, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

VEDANA, M. I. S. Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva. **Dissertação de Mestrado**, 85 f., 2008.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI J.; LASKOWSKI, P. Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6520-6530, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

### **FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS TROPICAIS DA BAHIA**

# FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS TROPICAIS DA BAHIA

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de frutas tropicais da Bahia. O extrato etanólico, das polpas congeladas e liofilizadas, de seis frutas (*Spondias tuberosa* L., *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L., *Genipa americana* L., *Manilkara achras* L. e *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.) foi utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante, obtida através dos métodos do sequestro do radical livre DPPH e da auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico. O teor de compostos fenólicos expressos em miligramas equivalentes ao ácido gálico das frutas variou na faixa de  $50,25 \pm 4,59$  a  $1405,79 \pm 35,97$  para as polpas congeladas, e de  $193,87 \pm 8,32$  a  $5198,11 \pm 410,92$  para polpas liofilizadas. Verificou-se, portanto, que todas as amostras estudadas apresentam elevada concentração de compostos fenólicos, sendo que as polpas, congelada e liofilizada, de jabuticaba apresentaram a maior concentração de fenólicos. Todos os testes efetuados indicaram significativa atividade antioxidante para as amostras de polpas congeladas e liofilizadas em diferentes concentrações testadas para cada uma das frutas.

## INTRODUÇÃO

Estudos químicos desenvolvidos com frutas das espécies *Spondias tuberosa* L., *S. mombin* L., *S. purpurea* L., *Genipa americana* L., *Manilkara achras* L. e *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg., revelaram a presença de metabólitos secundários das mais variadas classes. Como exemplo, pode-se citar a *Genipa americana* da qual foram isolados iridóides glicosilados, aminoácidos, terpenos, etc. (RENHE, 2008).

Vale ressaltar que não existem estudos sistemáticos de frutas produzidas no estado da Bahia. Em virtude da ampla utilização destas frutas pela população local e da importância da atividade antioxidante para a saúde humana, torna-se relevante à avaliação da atividade

biológica das mesmas, bem como a determinação dos compostos fenólicos e verificar se existe variação da composição de antioxidantes entre frutas coletadas em diferentes regiões.

Portanto, devido à crescente comercialização e consumo de frutas tropicais tanto no mercado brasileiro como internacional e à sua constante indicação como fonte de antioxidantes naturais, objetivou-se neste trabalho determinar a concentração de compostos fenólicos totais pelo método convencional de Folin-Ciocalteu, e avaliar a atividade antioxidante, pelo método do sequestro do radical livre DPPH e pelo teste de inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, de seis frutas tropicais da Bahia: *Spondias mombin* L. (cajá), *Spondias purpurea* L. (siriguela), *Genipa americana* L. (jenipapo), *Manilkara achras* L. (sapoti), *Spondias tuberosa* L. (umbu) e *Myrciaria cauliflora* Berg. (jabuticaba).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas do mundo, sendo que o nordeste brasileiro destaca-se como um dos maiores produtores e exportadores de frutas do país visto que, pelas suas condições climáticas, apresenta diversidade de frutos tropicais com boas perspectivas para exploração econômica.

Além disso, por possuir um extenso território, o Brasil destaca-se com significativo volume e produção mundial de frutas. No entanto, são insignificantes as quantidades de frutas exóticas nativas da Região Nordeste que são exportadas, como o cajá (*S. mombin* L.), umbu (*S. tuberosa* Arr.), siriguela (*S. purpurea* L.), entre outras (BRITO, 2009).

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) espécie da família Anacardiaceae se adapta muito bem às condições nordestinas, produz frutos nutritivos, saborosos, podendo ser consumidos “in natura” ou na forma de sucos, sorvetes, picolés e cremes. Além disso, tem grande aceitação pelo mercado consumidor nacional.

O cajá é uma fruta cuja industrialização está voltada principalmente para a produção de polpas. A polpa de cajá pode ser usada no preparo de bebidas levemente ácidas com agradável sabor, o qual é muito apreciado pelos europeus. O cajá ou taperebá é uma das mais populares frutas do Norte e Nordeste do Brasil, gerando ótimos sucos e sorvetes e ainda aguardente e licor se faz a partir do suco (SCHWAN, 2003).

Além das reconhecidas características aromáticas, os frutos ou sucos de frutas tropicais representam excelentes fontes de pró-vitamina A. Segundo RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA (1989) o cajá, de polpa e película comestível, fornece um valor de vitamina A maior que o de caju, goiaba e alguns cultivares de mamão e manga (DA SILVA, 1997).

A sirigueleira (*Spondias purpurea* L.), originária da América Tropical, produz a siriguela, fruto tipo drupa de cor vermelha-escuro quando maduro e que possui polpa de aroma e sabor agradáveis. Devido sua excelente qualidade organoléptica, a siriguela é muito apreciada no Nordeste brasileiro, refletido pelo contínuo aumento do consumo do fruto *in natura* ou processado na forma de diversos produtos, normalmente disponibilizados no mercado, o que tem proporcionado crescente interesse para seu cultivo comercial (MARTINS, 2003).

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à família Rubiaceae, sendo considerada uma espécie de importância econômica, tanto pela sua essência florestal, quanto pela produção de alimentos. O jenipapo é uma fruta comum do Norte e Nordeste brasileiro, que apresenta polpa suculenta e ácida, porém doce e exala um aroma bastante característico. Os frutos do jenipapeiro são comestíveis e muito apreciados, sendo consumidos na forma de suco, doce cristalizado e na fabricação de licor.

O sapotizeiro (*Manilkara achras* L.) é uma espécie exótica da família Sapotaceae que se adaptou bem em praticamente todas as regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste do País onde é cultivada essencialmente por seus frutos. Seu fruto, o sapoti, é reconhecido por seu delicioso sabor adocicado e levemente adstringente, e, na maioria das vezes, é consumido *in natura* ou na forma de doces, compotas ou geléias.

O sapoti é um fruto muito perecível e por ser climatérico, ou seja, que possui uma vida útil pós-colheita curta (de 8 a 12 dias), seu amadurecimento sob condições naturais é rápido, o que dificulta sua conservação e comercialização. Como o sapoti é muito apreciado ao natural, há a necessidade de estabelecerem-se técnicas de manejo e conservação pós-colheita do fruto para que este possa ser ofertado em mercados mais distantes, com boa qualidade (MIRANDA, 2008).

*Spondias tuberosa* é endêmica do semi-árido brasileiro, ocorrendo desde o Piauí até o Norte de Minas Gerais. Conhecida popularmente como umbuzeiro ou imbuzeiro, apresenta muitas utilidades econômicas, sendo seu fruto comercializado *in natura* ou em forma de polpa. Pode ser cultivada em larga escala, tanto para a alimentação humana, quanto para suplementação alimentar de animais (NADIA, 2007).

O umbu, fruta típica do semi-árido nordestino, pode ser consumido “*in natura*” e/ou nas mais diversas formas por apresentarem excelente sabor ácido e refrescante, aroma e

qualidade nutritiva. Assim, o umbuzeiro é utilizado pelo sertanejo como uma das principais fontes econômica e alimentar durante seu período de frutificação. Além disso, seus frutos apresentam boas características para industrialização na forma de sucos, néctares, geléias, etc.

As características físicas e químicas dos frutos são de grande importância para sua comercialização e manuseio. A aparência externa dos frutos, tais como, tamanho, consistência, espessura, forma e coloração da casca são fatores importantes para a aceitabilidade pelos consumidores. O fruto do umbuzeiro apresenta em média um peso de 15g, distribuído em epicarpo (12,80%), mesocarpo (76,80%) e endocarpo (10,40%), e o tamanho do fruto pode variar de 2,85 a 4,96 cm de comprimento e 2,64 a 4,91 cm de largura.

Para a caracterização química, a acidez e os sólidos solúveis são as variáveis que mais interessam à indústria de processamento de frutos. O teor de sólidos solúveis totais, expresso em °Brix, é uma medida indireta do teor de açúcares do fruto. O umbu possui pH ácido (2,45) e razoável teor de sólidos solúveis totais (10,0 °Brix) (COSTA, 2004).

A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.) é uma planta nativa do Brasil, pertence à família Myrtaceae, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções.

A jabuticabeira ocupa lugar de destaque entre as plantas frutíferas tropicais, em face da crescente comercialização de seus produtos principais: frutos, sucos e derivados como licores e análogos de vinho. A jabuticaba é um fruto tropical de alto valor nutricional, pois possui alto teor de carboidratos, fibras, vitaminas, flavonoides e carotenóides e, ainda, sais minerais, tais como, ferro, cálcio e fósforo, quando comparado com outros similares. Assim, apresenta grande potencial para a complementação da alimentação humana (ASCHERI, 2006).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

Os frutos *Spondias mombin* L. (cajá), *Spondias purpurea* L. (siriguela), *Genipa americana* L. (jenipapo), *Manilkara achras* L. (sapoti), *Spondias tuberosa* L. (umbu) foram adquiridos em feira livre de Salvador, enquanto que *Myrciaria cauliflora* Berg. (jabuticaba) foi adquirida em feira livre de Feira de Santana, Bahia. Os frutos foram despulpados manualmente, a polpa embalada em sacos plásticos de polietileno, com capacidade para 100g e armazenada em freezer (-18°C) sem aditivo químico. Parte desta polpa foi reservada para o processo de liofilização. Foram utilizados como antioxidantes de referência ácido gálico e BHT (Acros organics). Foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu (procedência SPECTRUM); o DPPH e o  $\beta$ -caroteno (SIGMA) e o ácido linolênico de procedência ALDRICH CHEM. CO. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro VARIAN, modelo CARY 50.

### Preparo do extrato das frutas

Vários métodos e solventes são utilizados em estudos de composição fenólica e atividade antioxidante de frutas e plantas em geral. Fatores tais como, tipo de solvente, pH, temperatura, número de etapas de extração, volume de solvente e tamanho das partículas da amostra, influenciam a eficiência de extração. Neste estudo foi utilizado o sistema etanol:água (60:40 v/v) para a extração, visto que além de ser um bom sistema de extração, apresenta facilidade de manipulação e baixa toxicidade. As amostras de polpa foram preparadas e diluídas de acordo com a indicação para consumo (100g/250 mL) e centrifugadas.

### Determinação dos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o procedimento convencional espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu desenvolvido por Singleton e Rossi (1965) e adaptado por Georgé *et al.* (2005). Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. O aparecimento de coloração azulada produzida é diretamente proporcional ao teor de fenólicos presentes no material analisado e medido em  $\lambda=760$  nm. Os resultados obtidos foram calculados com base no ácido gálico como padrão. Preparou-se uma curva, e os resultados foram calculados e representados graficamente, utilizando o gradiente concentração em função da absorbância. As

concentrações de FT das frutas foram expressas em mg de equivalente de ácido gálico/100g de polpa.

Para a determinação do teor de fenólicos totais, o extrato (0,5 mL) foi misturado com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e com 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% (m/v). Após 15 min de incubação no escuro à temperatura de 50°C, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 10 a 60 mg/L.

### **Teste do Sequestro do Radical Livre DPPH**

A determinação da atividade antioxidante (AA) foi medida em função da atividade de sequestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) a partir do método descrito por Rufino *et al.* (2007). Neste método, o radical DPPH de coloração violeta é reduzido por substâncias antioxidantes e a sua cor muda para amarelo. O grau de descoloração do radical é medido espectrofotometricamente em  $\lambda=517$  nm. A atividade antioxidante foi expressa em CE<sub>50</sub> (quantidade de antioxidante necessária para reduzir a 50% à concentração inicial de DPPH).

Solução etanólica 0,06 mM de DPPH foi preparada a partir de 2,4 mg de DPPH dissolvido em etanol com seu volume completado a 100 mL em balão volumétrico. A solução preparada no dia da análise foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. O meio reacional consistiu de 3 mL da solução etanólica 0,06 mM de DPPH adicionado de 200  $\mu$ L de extrato etanólico. Foi utilizado como controle positivo solução etanólica de ácido gálico. O controle foi obtido a partir de 3 mL da solução de DPPH e 200  $\mu$ L de etanol. O sistema foi colocado em repouso e protegido da luz, a partir da adição da amostra, do padrão ácido gálico ou do etanol (Controle) sendo considerado como tempo 0, e após 30 minutos foi feita a segunda leitura da absorbância a 517 nm. O percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), foi calculado como:

$$\% \text{ SRL} = [(C-A)/C] \times 100$$

Onde:

C é a absorbância do controle

A é a absorbância da amostra em solução.

Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto, o método DPPH é um dos mais utilizados, por ser considerado prático, rápido e estável. Segundo alguns autores, o tempo de medida de reação entre o radical e a amostra de 30 minutos é suficiente embora alguns autores determinem 20 minutos (SOARES, 2008). Neste trabalho, determinou-se a capacidade antioxidante (%SRL) no tempo de 30 minutos.

A atividade de sequestrar o radical livre DPPH também pode ser expressa em termos de CE<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH). Os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas o percentual de sequestro de radical livre (% SRL). Desta forma, quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, maior é a capacidade antioxidante dos compostos presentes (SOUSA, 2007).

### **Teste de Inibição da Auto-oxidação do β-caroteno**

O método é baseado na inibição da reação de auto-oxidação do β-caroteno comparado com padrões conhecidos. A reação é provocada pela adição de ácido linolênico e aeração do meio, levando à formação de agente oxidante radicalar. O método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico (Duarte-Almeida, 2006), ou seja, avalia-se a capacidade protetora da amostra frente a um meio oxidante. Foi utilizada como referência a metodologia descrita por Hidalgo (1994) e Rufino *et al.* (2006).

Os extratos etanólicos da polpa congelada e polpa liofilizada foram testados em soluções de diferentes concentrações, dependendo da fruta e natureza da amostra (congelada ou liofilizada), e o padrão utilizado BHT, em soluções etanólicas de 1 mg/mL. O meio oxidante consistiu da mistura de 2 mg de β-caroteno dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), 40 mg de ácido linolênico e 400 mg do emulsificador Tween 80. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do CHCl<sub>3</sub> e então adicionados 100 mL de água destilada, agitando-se para promover a aeração. Aliquotas de 300 μL do padrão e dos extratos foram transferidas para cubetas e adicionadas 2,7 mL do meio oxidante, sendo a reação acompanhada por espectrofotometria no visível em λ= 470 nm com leitura imediata e em intervalos de 15 minutos durante 1 h; as cubetas foram incubadas em banho-maria à 50° C. O controle foi preparado com 2,7 mL do meio oxidante e 300 μL de etanol. O percentual de inibição da oxidação (%I) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\% I = 100 [1 - (A_o - A_t) / (A_o^0 - A_t^0)]$$

Onde:

Ao = Absorbância inicial da amostra

At = Absorbância final da amostra

Ao<sup>0</sup> = Absorbância inicial do controle

At<sup>0</sup> = Absorbância final do controle

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Polpa congelada é aquela obtida do despulpamento de frutos e que foi imediatamente armazenada em sacos de polietileno e congelada à -18°C. A polpa liofilizada representa a polpa congelada que foi submetida ao processo de liofilização.

A Tabela 1 apresenta os valores de fenólicos totais (FT) equivalentes ao ácido gálico no extrato etanólico das polpas congeladas e liofilizadas das frutas, com base no volume de solvente e na quantidade de polpa congelada utilizada na extração.

Analisando os resultados obtidos, foi observada diferença significativa na quantidade de fenólicos totais nas frutas. A maior concentração de fenólicos foi da jabuticaba, seguida pela siriguela e cajá. As polpas de jenipapo, umbu e sapoti foram as que apresentaram a menor concentração de fenólicos.

**Tabela 1.** FT (mg de EAG/100g de amostra ± DP) das polpas congeladas e liofilizadas

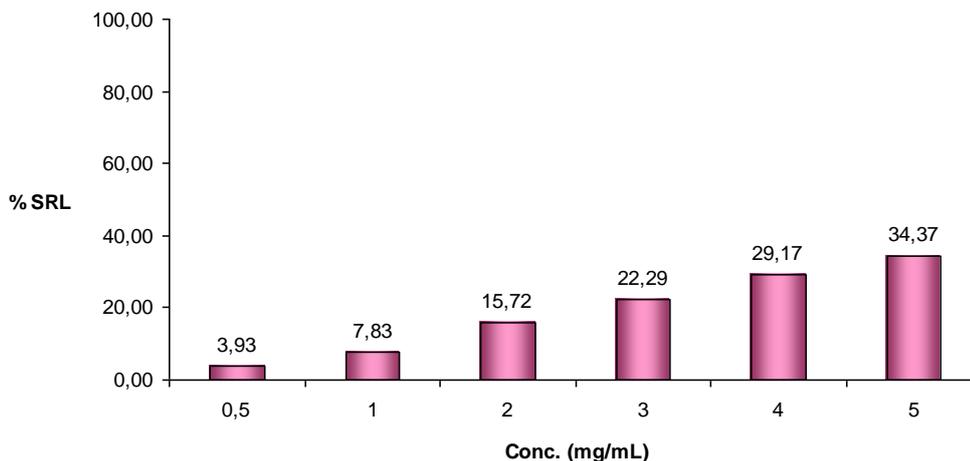
Amostra	FT (mg de EAG/100g de amostra) ± DP	
	Polpa congelada	Polpa liofilizada
Jabuticaba	1405,79 ± 35,97	5198,11 ± 410,92
Siriguela	427,12 ± 5,99	2084,08 ± 34,19
Cajá	400,96 ± 22,70	1645,75 ± 15,79
Jenipapo	338,96 ± 7,46	686,71 ± 74,82
Umbu	52,76 ± 2,65	223,55 ± 4,45
Sapoti	50,25 ± 4,59	193,87 ± 8,32

Assim, era de se esperar que a concentração de compostos fenólicos na polpa liofilizada fosse superior a concentração da polpa congelada, já que este processo proporciona a redução do volume da amostra e concentração dos seus constituintes.

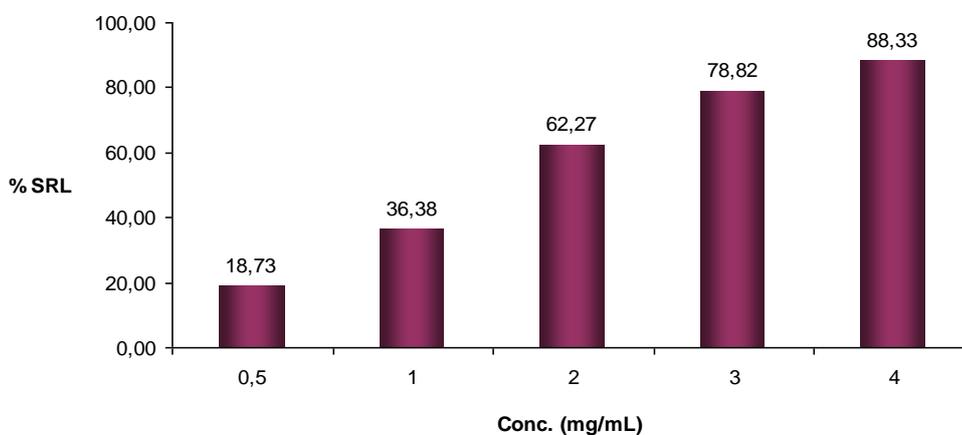
Embora o método de Folin-Ciocalteu seja o método mais utilizado para quantificação de compostos fenólicos, o reagente Folin-Ciocalteu pode interagir com outros constituintes

químicos não fenólicos como carotenóides, aminoácidos, açúcares e vitamina C, o que pode levar a resultados superestimados de fenóis totais (OLIVEIRA, 2009).

Os resultados da avaliação quantitativa do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL), das amostras polpa congelada (Figura 1) e polpa liofilizada da jabuticaba (Figura 2) estão representados a seguir:



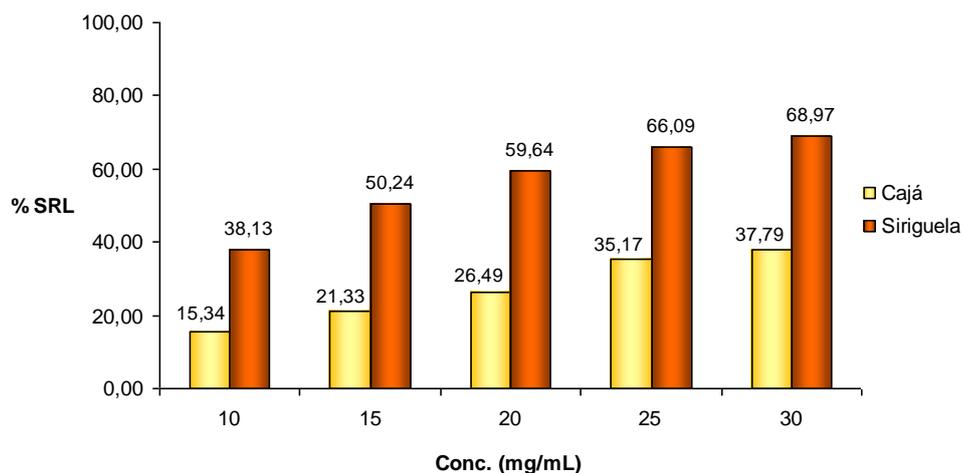
**Figura 1.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de jabuticaba



**Figura 2.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de jabuticaba

Percebe-se que as duas amostras avaliadas apresentam poder oxidante, contudo a polpa congelada foi menos ativa. Observando as concentrações utilizadas nas amostras polpa congelada e polpa liofilizada da jabuticaba nota-se que a polpa liofilizada mesmo em menor concentração apresenta maior % SRL.

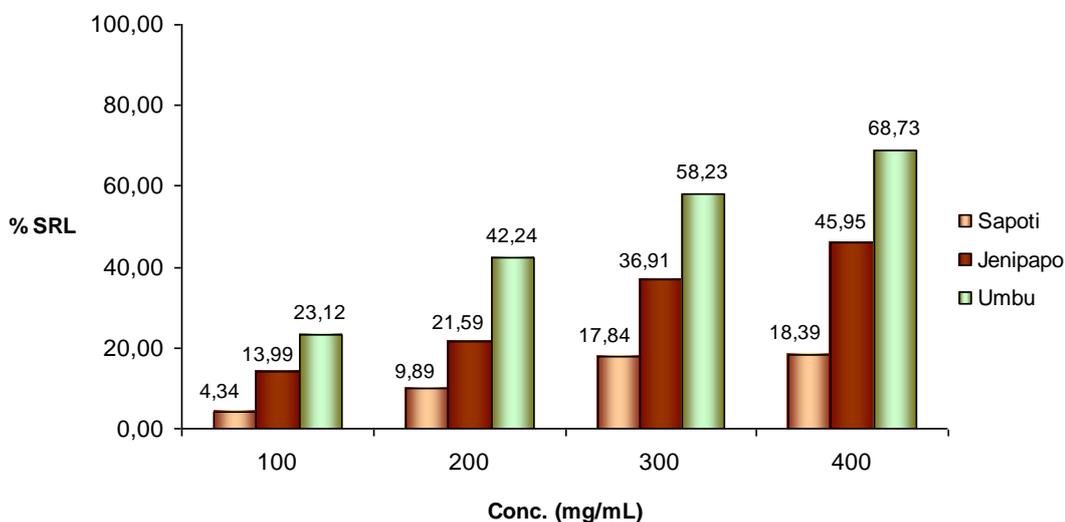
Os resultados da avaliação quantitativa do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL), das amostras polpa congelada da siriguela e cajá estão representados na Figura 3:



**Figura 3.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de siriguela e cajá

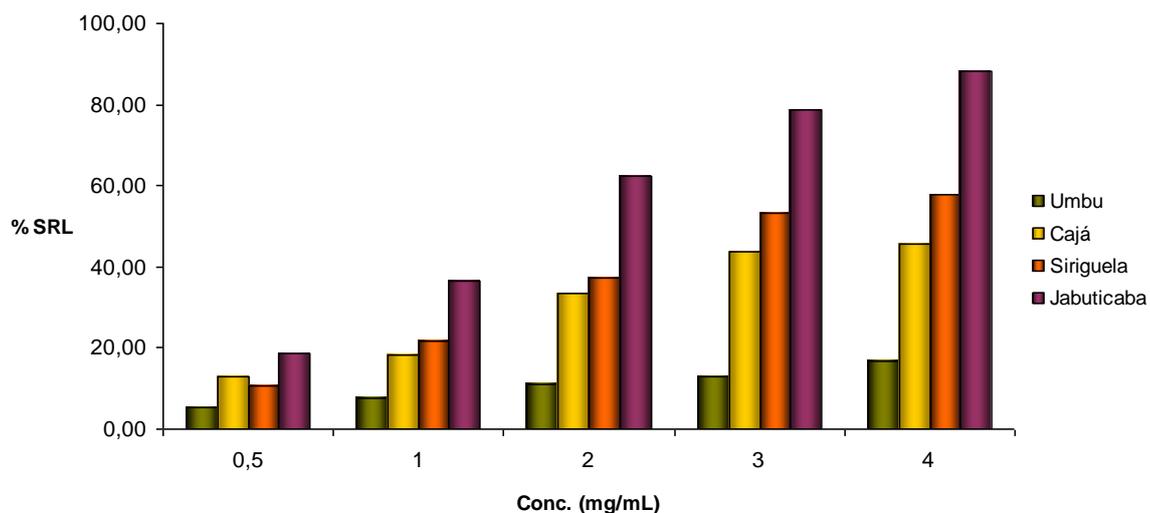
Percebe-se que as duas amostras avaliadas apresentam capacidade de sequestro de radical livre, contudo a polpa congelada de cajá foi menos ativa nas concentrações testadas.

Comparando os resultados do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL) das amostras polpa congelada do sapoti, jenipapo e umbu representados na Figura 4, verifica-se que a polpa congelada de umbu foi a que apresentou maior capacidade de sequestro de radical livre.



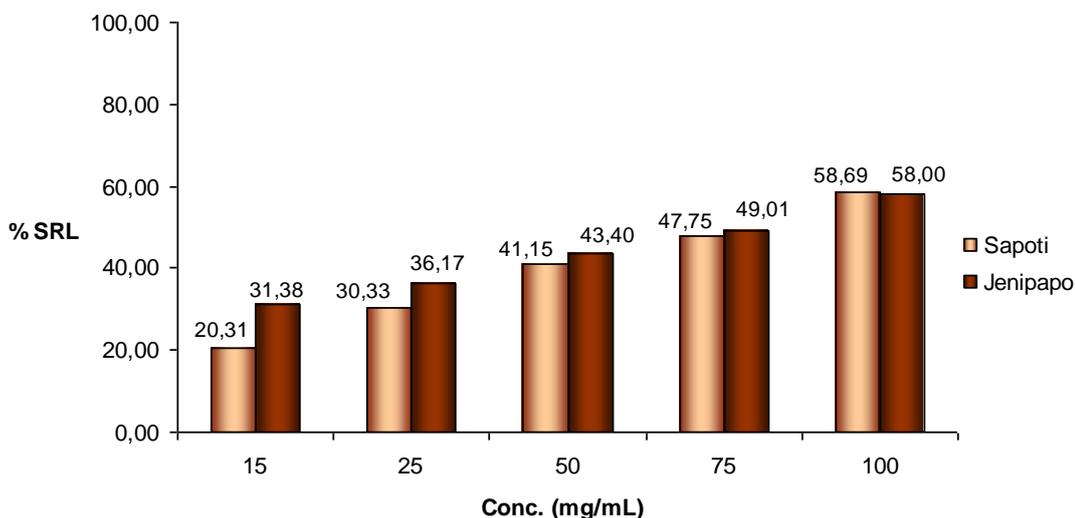
**Figura 4.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa congelada de sapoti, jenipapo e umbu

Os resultados do percentual de sequestro do radical livre (% SRL) das amostras polpa liofilizada de umbu, cajá, siriguela e jabuticaba, representados na Figura 5 abaixo, mostram que a jabuticaba foi a mais ativa nas concentrações testadas.



**Figura 5.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de umbu, cajá, siriguela e jabuticaba

Comparando os resultados do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL) das amostras polpa liofilizada do sapoti e jenipapo da Figura 6, observa-se que ambas as frutas apresentam moderada capacidade de sequestro de radical livre, mesmo em concentrações superiores àquelas testadas nas polpas liofilizadas de umbu, cajá, siriguela e jabuticaba.



**Figura 6.** Percentual de sequestro de radical livre da polpa liofilizada de sapoti e jenipapo

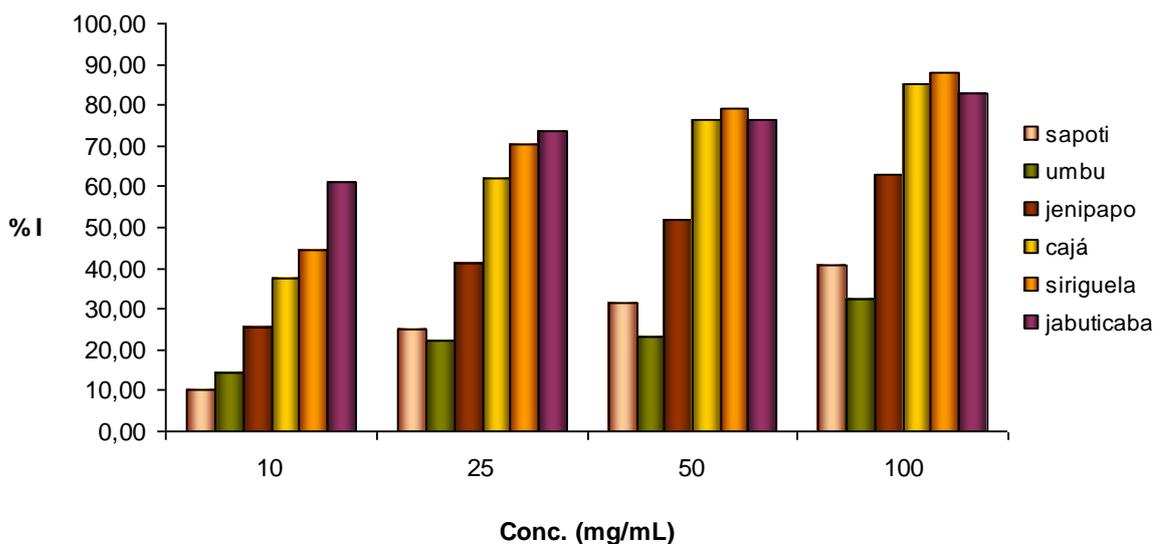
A Tabela 2 apresenta a  $CE_{50}$  das amostras polpa congelada e polpa liofilizada de cada fruta.

**Tabela 2.** CE<sub>50</sub> das polpas congeladas e polpas liofilizadas

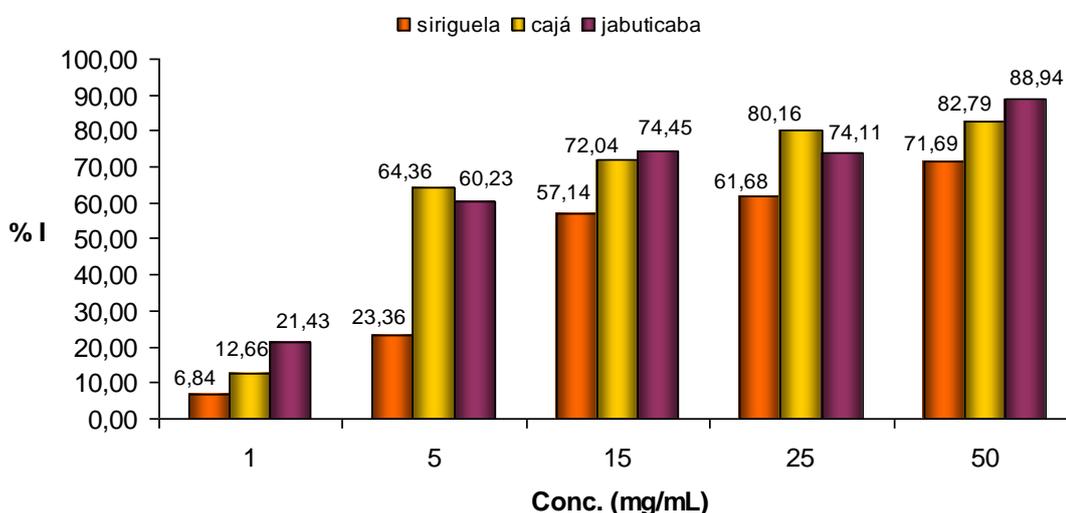
Amostra	CE <sub>50</sub> (mg/mL)	
	Polpa congelada	Polpa liofilizada
Jabuticaba	8,35 ± 0,40	1,75 ± 0,09
Siriguela	16,23 ± 5,86	3,13 ± 0,37
Cajá	44,67 ± 19,89	4,03 ± 0,08
Umbu	265,52 ± 78,47	15,33 ± 3,95
Jenipapo	442,80 ± 83,78	74,51 ± 0,10
Sapoti	1009,08 ± 161,36	77,71 ± 0,70

O valor de CE<sub>50</sub> corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. Os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear, do gráfico da atividade antioxidante em diferentes concentrações, com intervalo de confiança de 95%. Portanto, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o valor da CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante. Assim, a polpa liofilizada de jabuticaba apresentou o melhor CE<sub>50</sub> (1,75 ± 0,09 mg/mL) dentre as amostras.

O percentual de inibição da oxidação foi avaliado pela capacidade de proteção da auto-oxidação do β-caroteno, pelos extratos etanólicos das polpas congeladas nas concentrações 10, 25, 50 e 100 mg/mL e substância padrão (BHT) na concentração de 1 mg/mL. As polpas congeladas de cajá, siriguela e jabuticaba apresentaram maior atividade antioxidante em relação às outras frutas, em todas as concentrações testadas.

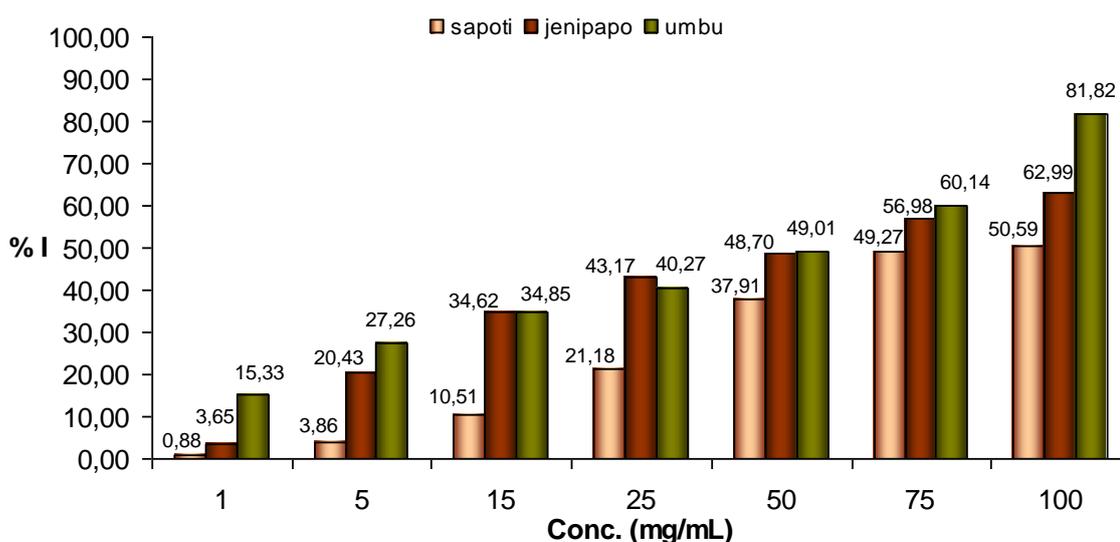
**Figura 7.** Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas congeladas

Analisando os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de siriguela, cajá e jabuticaba em diferentes concentrações, verifica-se que todas apresentam alta atividade antioxidante em concentrações superiores à 15 mg/mL.



**Figura 8.** Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de siriguela, cajá e jabuticaba

Comparando os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de sapoti, jenipapo e umbu em diferentes concentrações, verifica-se que todas apresentam baixa atividade antioxidante quando comparado às polpas liofilizadas de siriguela, cajá e jabuticaba nas concentrações inferiores e iguais à 50 mg/mL.



**Figura 9.** Comparação entre os percentuais de inibição da oxidação (% I) das polpas liofilizadas de sapoti, jenipapo e umbu

## CONCLUSÃO

Neste estudo, a atividade antioxidante das amostras pode ser atribuída à habilidade de sequestrarem radicais livres por meio da doação de hidrogênio, e a habilidade de proteção da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, visto que todas as amostras mencionadas apresentam altas concentrações de compostos fenólicos, exceto umbu e sapoti.

Todas as frutas estudadas apresentaram capacidade antioxidante, entretanto a intensidade desta ação foi diferenciada entre elas. Levando-se em consideração os resultados obtidos, a capacidade antioxidante das amostras demonstrou-se dependente do método utilizado, DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico.

A siriguela, cajá e a jabuticaba destacaram-se por apresentar alto teor de fenólicos totais, bem como potente capacidade antioxidante, atribuída principalmente aos compostos responsáveis pela coloração tais como carotenóides e antocianinas.

O teor de compostos fenólicos expressos em miligramas equivalentes ao ácido gálico das frutas variou na faixa de  $50,25 \pm 4,59$  a  $1405,79 \pm 35,97$  para as polpas congeladas, e de  $193,87 \pm 8,32$  a  $5198,11 \pm 410,92$  para polpas liofilizadas. Assim, verificou-se que a concentração de compostos fenólicos nas polpas liofilizadas foi superior a concentração das polpas congeladas, assim como a capacidade antioxidante, visto que o processo de liofilização proporciona redução do volume da amostra e concentração dos seus constituintes.

Frente à ação antioxidante exibida, as frutas podem ser apontadas como boas fontes de antioxidantes naturais que podem ser mais efetivas e econômicas do que o uso de suplementos dietéticos na proteção do organismo contra os danos oxidativos e, portanto, o seu consumo deve ser estimulado.

## REFERÊNCIAS

ASCHERI *et al.* Efeito da extrusão sobre a adsorção de água de farinhas mistas pré-gelatinizadas de arroz e bagaço de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 325-335, 2006.

ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. de. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 897-905, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, London, v. 22, p. 25-30, 1995.

BRITO *et al.* Tratamento térmico de frutos da cajazeira utilizando vapor d'água, visando ao controle de *Ceratitidis capitata* e à qualidade do fruto. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 407-411, 2009.

BROINIZI *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

COSTA *et al.* Caracterização físico-química de frutos de umbuzeiro. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 2, p. 65-71, 2004.

DA SILVA *et al.* Características de qualidade do suco polposo de cajá (*Spondias lutea* L.) obtido por extração mecânico-enzimática. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 233-236, 1997.

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

DUARTE-ALMEIDA *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

GEORGÉ *et al.* Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370, 2005.

HIDALGO *et al.* Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1585-1587, 1994.

KUSKOSKI *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

KUSKOSKI *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

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

MARTINS *et al.* **Desenvolvimento de frutos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.)**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 1, p. 11-14, 2003.

MELO *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MELO *et al.* Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MIRANDA *et al.* Caracterização físico-química e histológica do desenvolvimento de sapoti. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 4, p. 575-582, 2008.

NADIA, T. de L.; MACHADO, I. C., LOPES, A. V. Polinização de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) e análise da partilha de polinizadores com *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), espécies frutíferas e endêmicas da caatinga. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 89-100, 2007.

RENHE, I. R. T. Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.) **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, MG, 49f, 2008.

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

ROESLER *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUFINO *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 126**, Fortaleza, CE, 2006.

RUFINO *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 127**, Fortaleza, CE, 2007.

SCHWAN *et al.* Elaboração de fermentado de cajá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 342-350, 2003.

SINGLETON, V. L, ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Americal Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.

SOARES *et al.* Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 727-732, 2008.

SOUSA *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

### **FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES PARTES DA JABUTICABA E DERIVADOS, E PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA CAULIFLORA*)**

# FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES PARTES DA JABUTICABA E DERIVADOS, E PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA CAULIFLORA*)

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante de diferentes partes dos frutos da jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). As atividades antioxidantes foram determinadas utilizando-se o teste do sequestro do radical livre DPPH e o teste de inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno. Foi verificado que todas as amostras estudadas (polpa, casca e suco) apresentavam elevada concentração de compostos fenólicos, sendo que o suco de jabuticaba apresentava a menor concentração de fenólicos (270,66 mg/100g). Todos os testes efetuados indicaram significativa atividade antioxidante da casca de jabuticaba. Foi realizada também a comparação da atividade de sequestrar radical livre DPPH entre os extratos metanólicos da semente e polpa de jabuticaba. Além disso, este estudo padronizou a quantificação dos compostos fenólicos no fruto de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg.), utilizando a metodologia convencional de Folin-Ciocalteu e matriz fatorial  $2^3$  que permitiu rápida resposta com menor número de experiências possível.

## INTRODUÇÃO

A jabuticabeira é uma planta nativa do Brasil pertencente à família Myrtaceae, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará até o do Rio Grande do Sul, mas é nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções. Portanto, é uma planta de clima tropical e subtropical úmido não suportando estiagens prolongadas e geadas fortes (CITADIN, 2005).

Dentre as espécies atualmente conhecidas, destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba açu) e a *M. jabuticaba* (Vell) Berg (jabuticaba sabará), que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo *in natura*.

Segundo WILBANK *et al.*, o fruto de jabuticaba é uma baga, subgloboso, negro, quando maduro, liso, com 1,6 a 2,2 cm de diâmetro, contendo de 1 a 4 sementes. A casca é fina e muito frágil; a polpa é doce com leve acidez, de ótimo sabor e de cor branca a translúcida (ASCHERI, 2006).

A jabuticabeira é uma das frutíferas que tem despertado grande interesse entre os produtores rurais devido a sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus frutos nas mais diversas formas. É uma fruta tipicamente brasileira, que apesar de ser considerada apropriada tanto para consumo *in natura* como para a indústria tem comércio limitado devido a sua alta perecibilidade, que não somente reduz a quantidade produzida como também compromete a qualidade, principalmente o aspecto externo. Dentre os fatores que comprometem a qualidade dos frutos pode-se citar a perda de água, que resulta em murchamento, enrugamento da casca e perda de peso, fatores estes importantes na comercialização. Estudos indicam que, em apenas dois dias após a colheita, há uma rápida alteração da aparência e do sabor decorrente da intensa perda de água, deterioração e fermentação da polpa (BRUNIN, 2004).

A jabuticaba é altamente perecível devido ao elevado teor de água e açúcares e outros constituintes presentes na polpa. Estudos com frutos de jabuticaba “sabará” cultivada na Região Centro-Oeste do Brasil mostraram teores de umidade, lipídios e proteínas de 83,3 g, 2,1 g e 1,0 g em 100 g de polpa de jabuticaba, respectivamente e, teores de açúcares totais de 11,2 g, bem como de açúcares redutores e não redutores, 9,3 g e 1,9 g, respectivamente (ASCHERI, 2006).

Assim, a jabuticabeira ocupa lugar de destaque entre as plantas frutíferas tropicais, em face da crescente comercialização de seus produtos principais, tais como, frutos, sucos e derivados como licores e análogos de vinho. A jabuticaba é um dos frutos tropicais de alto valor nutricional, pois possui alto teor de carboidratos, fibras, vitaminas, flavonoides, carotenóides e, ainda, sais minerais, tais como, ferro, cálcio e fósforo, comparado com outros similares (ASCHERI *et al.*, 2006).

Reynertson (2007) realizou o fracionamento bioguiado de atividade do fruto de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e determinou o teor de fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antiradicalar em extratos, frações e compostos purificados. Apesar disso, existem poucos estudos sobre a análise dos compostos bioativos em frutos de jabuticaba.

## Planejamento fatorial

É crescente o estudo da determinação de compostos fenólicos em produtos vegetais, particularmente frutos. São várias as metodologias empregadas para a extração de fenólicos de frutas, não havendo, portanto uma maneira de escolher a metodologia mais eficiente, pois ela pode sofrer a influência de diferentes fatores. Dentre estes, podem ser citados, o estado fisiológico em que o fruto é colhido e o armazenamento, bem como outros fatores de caráter geral, isto é, o solvente usado na extração, o tamanho da área de superfície de contato, o tempo e a temperatura de extração.

Além disso, a solubilidade de compostos fenólicos é influenciada por sua estrutura química, o grau de polimerização em que se encontram (no caso dos taninos), a interação com outros componentes de sua matriz, a dimensão das partículas da matriz, a polaridade do solvente de extração, a técnica de extração (sonicação, agitação, Soxhlet, dentre outros), além das condições físicas (tempo, pressão, temperatura). Portanto, existem vários métodos de extração que podem ser aplicados na quantificação de compostos fenólicos, havendo a necessidade apenas de aperfeiçoar o processo que melhor se adequa a amostra de interesse (OLIVEIRA, 2009).

Em relação aos solventes orgânicos, o metanol tem sido apontado como o mais efetivo por conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioativos. Por exemplo, num estudo sobre a determinação do teor de fenólicos totais em hortaliças foi utilizado metanol 100% como solvente extrator (Melo *et al.*, 2006). Em outro, a determinação do conteúdo de fenólicos totais na soja e derivados foi realizada utilizando-se metanol 80% na extração das isoflavonas (Barbosa *et al.*, 2006). Enquanto que, foi observado que a acetona 70% foi mais eficaz para a extração de polifenóis totais em amostras de uvas, quando compararam dois diferentes solventes extratores: acetona 70% e etanol 70% (Falcão *et al.*, 2007).

Através do estudo de planejamento fatorial aplicado a quantificação de compostos fenólicos em polpa de jamelão (*Syzygium cumini* Lamark), foram estabelecidos a concentração da solução extratora em 60% e o melhor solvente de extração como sendo o etanol (Oliveira, 2009).

Vale ressaltar que muitos frutos comestíveis são processados para fabricação de sucos naturais, sucos concentrados, doces em conserva, polpas e extratos. Esses frutos possuem sementes e cascas, fontes naturais de antioxidantes, que são muitas vezes descartadas em vez de serem utilizadas, evitando o desperdício de alimentos. Desta forma, este trabalho teve

também como objetivo determinar o teor dos fenólicos totais e avaliar a capacidade antioxidante “in vitro” nas diferentes amostras de jabuticaba (suco, polpa, casca e semente); bem como padronizar a metodologia de extração e quantificação dos compostos fenólicos na polpa de jabuticaba e, através da técnica de planejamento fatorial obter maior rendimento na extração, utilizando menor número possível de testes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras**

Os frutos da jabuticaba, safra 2010, foram adquiridos no comércio local de Feira de Santana, no Estado da Bahia. Logo após, foram lavados em água clorada e selecionados. Após a drenagem do excesso de água, as jabuticabas foram descascadas manualmente, separando-se em partes (casca, suco, polpa e semente). Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas no freezer a -18 °C até o uso, exceto as sementes que foram submetidas à secagem a temperatura ambiente e posteriormente trituradas e extraídas em metanol, originando o extrato metanólico. Parte da polpa também foi extraída com metanol resultando no extrato metanólico e posteriormente, submetido à análise.

### **Reagentes**

Reagente de Folin-Ciocalteu (procedência SPECTRUM). Ácido gálico e Água destilada; Etanol 99% (QHEMIS); Metanol 99,8% (QHEMIS); Carbonato de sódio foi adquirido da ECIBRA e BHT, da Acros Organics. DPPH,  $\beta$ -caroteno e ácido linolênico utilizados foram de procedência SIGMA ALDRICH CHEM. CO. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro VARIAN, modelo CARY 50.

### **Obtenção dos extratos**

Para a extração de compostos fenólicos, as amostras (suco, casca e polpa) foram descongeladas e extraídas em solução etanólica 60%. Massas conhecidas das amostras foram misturadas com o solvente numa razão de 1:10 (m/v), seguido por extração a temperatura ambiente por 30 min. As misturas foram filtradas e posteriormente acondicionados em frascos âmbar.

Além disso, as sementes e a polpa de jaboticaba foram extraídas com metanol obtendo-se os respectivos extratos metanólicos, EMSJ e EMPJ, para posterior avaliação da atividade de sequestro de radical livre.

### **Determinação de fenólicos totais**

A determinação de fenólicos totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2 (Página 21).

### **Determinação da atividade antioxidante**

#### **Método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)**

A determinação da atividade antioxidante (AA) foi medida em função da atividade de sequestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2 (Página 22).

#### **Teste de Inibição da Auto-oxidação do $\beta$ -caroteno**

O teste de inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno foi realizado de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2 (Página 23).

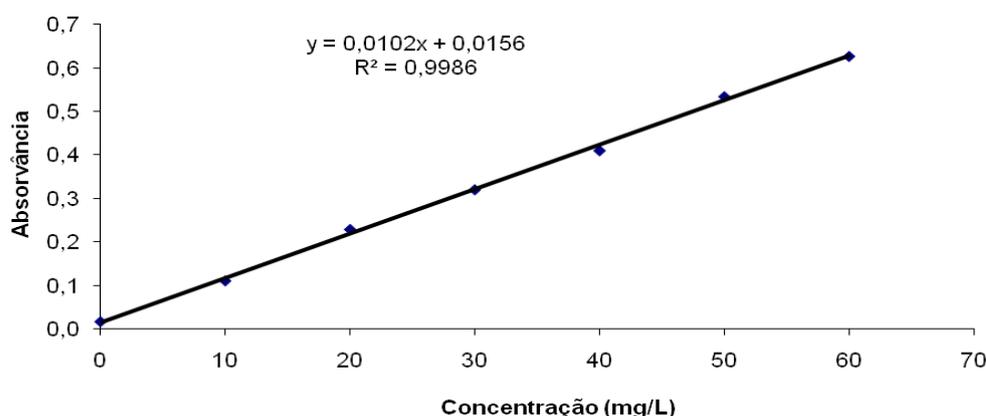
### **Planejamento Fatorial**

#### **Preparação dos extratos**

Os frutos maduros foram adquiridos em feiras livres na cidade de Feira de Santana, BA-Brasil, e em seguida higienizados e despulpados. A partir da polpa congelada foram preparados 14 extratos aquosos obtidos a partir de solução etanol ou metanol, em concentrações que variaram entre 50% e 100% de solvente. Na preparação dos extratos, a solução extratora e a polpa contida nos Erlenmeyers foram submetidas à constante agitação em agitador magnético a temperatura ambiente (27°C), variando o tempo de extração entre 20 e 60 minutos. Ao final da agitação, a mistura foi filtrada sob vácuo para a obtenção do extrato.

### Curva de calibração

O padrão ácido gálico foi dissolvido em água destilada para preparação de soluções em sete concentrações (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L) que posteriormente tiveram suas absorvâncias registradas em espectrofotômetro (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de calibração do padrão ácido gálico.

### Estratégia de otimização da determinação de compostos fenólicos totais

O delineamento experimental fatorial completo foi escolhido como uma forma de investigar os efeitos dos fatores e todas as suas possíveis interações no processo de otimização da extração de compostos fenólicos. Foi empregado o planejamento fatorial com 8 ensaios, correspondente ao modelo fatorial  $2^3$ , conforme descritos na Tabela 4 (Página 45). Este fatorial apresentou dois níveis relativos ao menor (-1) e maior (+1) tempo de agitação, concentração de solvente e tipo de solvente. Além disso, foram realizados seis experimentos no ponto central (tipo de solvente, metanol ou etanol, normalizados em 0) para avaliação do erro experimental. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória evitando-se assim que os resultados fossem direcionados para uma condição específica. A determinação dos fatores foi realizada de acordo com testes preliminares e revisão da literatura.

Objetivando-se obter o máximo de informações e as melhores condições para definir a préconcentração simultânea, a análise do conjunto de dados foi realizada utilizando a absorvância total. Os dados experimentais foram processados utilizando-se o programa Statistica (Statistica for Windows, Statsoft, Inc., 1999. Tulsa, OK, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

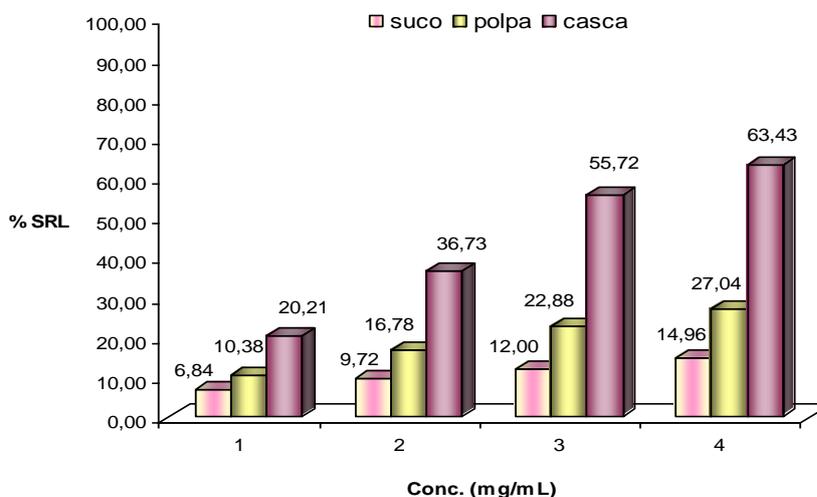
Os compostos fenólicos, presentes nas frutas e hortaliças, são um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destas. Seu conteúdo final pode estar influenciado por fatores, tais como, a maturação, a espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento (Kim *et al.*, 2003). Daí, a importância de se quantificar esses compostos.

Analisando os resultados obtidos (Tabela 1), foi observada uma diferença significativa na quantidade dos compostos fenólicos em diferentes matrizes da jabuticaba: suco, polpa e casca. A maior concentração de compostos fenólicos foi encontrada na casca (939,17 mg AG/100 g de amostra), enquanto que o suco apresentou a menor concentração de compostos fenólicos 270,66 mg AG/100 g de amostra).

**Tabela 1.** Teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba

Amostra	Fenólicos Totais (mg AG/100 g de amostra)
Suco	270,66
Polpa	778,51
Casca	939,17

Os resultados da avaliação quantitativa do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL) das diferentes frações de jabuticaba (suco, polpa e casca) em diferentes concentrações (Figura 2), mostram que todas as amostras apresentam atividade de sequestrar o radical DPPH, sendo que o suco e a polpa apresentaram o menor % SRL.



**Figura 2.** % SRL dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba (suco, polpa e casca)

Os resultados de CE<sub>50</sub> foram expressos em mg/mL e estão mostrados na tabela abaixo:

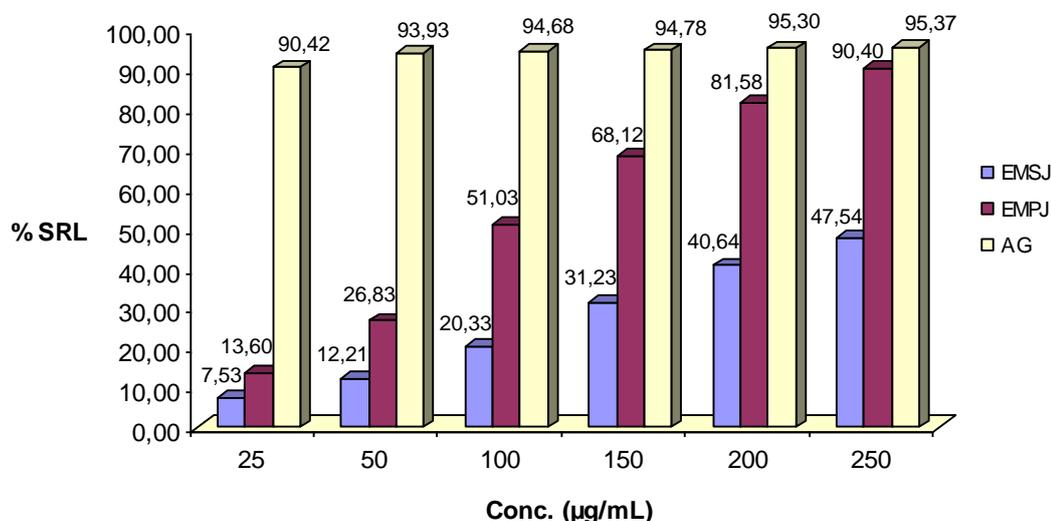
**Tabela 2.** Valores de CE<sub>50</sub> (mg/mL) do teste de sequestro do DPPH dos frutos da jaboticabeira

Amostras	CE <sub>50</sub> (mg/mL)*
Suco	18,98 ± 8,54
Polpa	8,57 ± 3,30
Casca	2,98 ± 0,86

\*Média das duplicatas ± desvio padrão

Os menores valores das concentrações dos extratos necessários para reduzir em 50% o radical DPPH foram referentes aos extratos da polpa e principalmente da casca. Assim, estes extratos são mais eficientes, pois quanto menor o valor de CE<sub>50</sub> maior é a capacidade antioxidante dos compostos presentes no extrato.

Foi realizada também a comparação do percentual de sequestro do radical livre DPPH (% SRL) entre os extratos metanólicos da semente e polpa de jaboticaba, EMSJ e EMPJ, respectivamente, e o ácido gálico (Figura 3).



**Figura 3.** % SRL dos extratos metanólicos da semente e polpa de jaboticaba e ácido gálico

Em estudo realizado por Melo *et al.* (2006) com hortaliças, os extratos que apresentaram atividade de sequestro do radical DPPH superior a 70% foram considerados eficazes, os extratos que exibiram atividade entre 60-70% apresentaram ação moderada, e aqueles que apresentaram atividade inferior a 60% foram considerados com fraca ação antioxidante. Assim, comparação dos resultados mostra que o extrato metanólico da polpa de jaboticaba apresenta atividade sequestradora do radical DPPH maior que o extrato metanólico

da semente em todas as concentrações testadas, esta última apresentando ação eficaz somente a partir de 200 µg/ml.

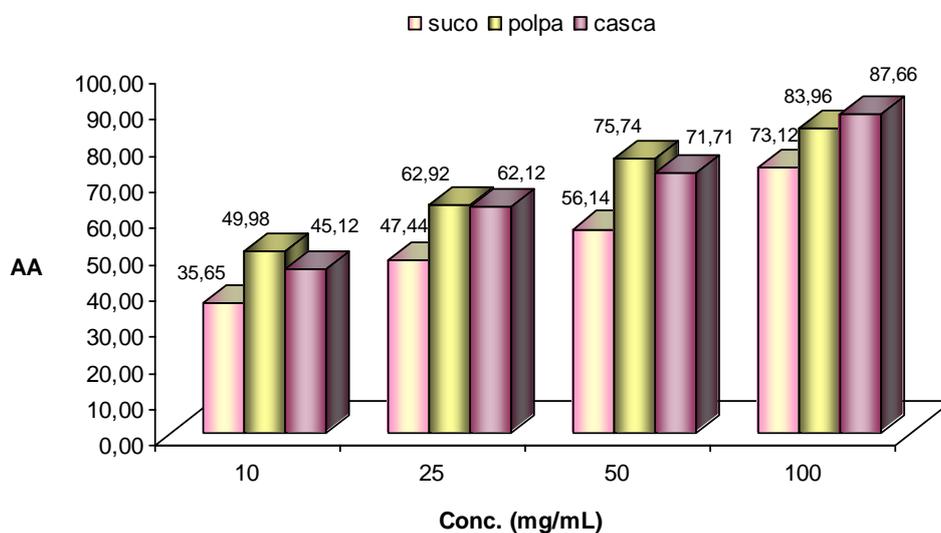
Os resultados da CE<sub>50</sub> do extrato metanólico da semente (EMSJ) e do extrato metanólico da polpa de jabuticaba (EMPJ) foram expressos em µg/mL e estão mostrados na Tabela 3:

**Tabela 3.** Valores da CE<sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos metanólicos da semente e polpa de jabuticaba

Amostras	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
EMSJ	257,61
EMPJ	113,90

Assim, o menor valor da concentração do extrato necessário para reduzir em 50% o radical DPPH foi referente ao extrato metanólico da polpa de jabuticaba sendo, portanto mais eficaz que o extrato metanólico da semente.

A comparação da atividade antioxidante do suco, polpa e casca da jabuticaba, através do teste de inibição da auto-oxidação do β-caroteno no sistema com ácido linolênico encontra-se ilustrada na Figura 4.



**Figura 4.** AA dos extratos etanólicos das diferentes frações de jabuticaba (suco, polpa e casca)

Analisando os resultados neste teste, todas as amostras apresentaram elevada atividade antioxidante na concentração de 100 mg/mL, ou seja, atividade superior a 70% (MELO, 2006). Os extratos da polpa e da casca, nas concentrações de 50 mg/mL, também apresentaram atividade superior a 70%. Em suma, todas as amostras reduziram em graus diferentes o descolorimento do β-caroteno, protegendo assim o sistema.

A ação dos extratos das diferentes frações de jabuticaba testadas nos dois ensaios (DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico) foi diferenciada. Enquanto no ensaio do DPPH o suco de jabuticaba exibiu baixa atividade de sequestrar o radical, no ensaio  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico apresentou significativa atividade antioxidante. Estas discrepâncias podem ser inerentes às características e ao mecanismo de ação do(s) composto(s) bioativo(s) e a metodologia utilizada para avaliar sua propriedade antioxidante.

Algumas frutas já são muito conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e por serem fontes de substâncias que exercem essa atividade. Por exemplo, a goiaba cuja polpa e casca possuem alto teor de fenólicos, contribuindo para a alta atividade dessa fruta; a pitanga, fonte promissora de compostos antioxidantes, visto que apresenta teores consideráveis de fenólicos e carotenóides. Além disso, em trabalho sobre atividade antioxidante em polpas de frutas, Kuskoski *et al.* concluíram que as polpas de frutas tropicais congeladas e comercializadas no Brasil possuem elevados valores de atividade antioxidante, especialmente as polpas de acerola e manga (PRADO, 2009).

### **Planejamento Fatorial**

Vários estudos indicam que a preparação da amostra para a extração dos compostos fenólicos é influenciada não apenas pelos constituintes fenólicos, mas também pelo tipo de solvente utilizado. Assim, diferentes solventes resultam em significativa variabilidade de concentração fenólica, além da concentração da solução extratora que também influencia.

Neste estudo, a otimização do processo de extração dos compostos fenólicos em polpa de jabuticaba compreendeu o planejamento fatorial  $2^3$ , envolvendo as variáveis tipo de solvente, concentração do solvente e tempo de extração. O fator tipo de solvente é uma variável qualitativa e desta forma o ponto central foi estabelecido para os dois solventes estudados resultando em 14 experimentos (Tabela 4, página 45), que foram realizados de forma aleatória. A temperatura de extração do sistema para obtenção dos extratos foi fixada em 27°C (temperatura ambiente) como previsto em testes preliminares.

A realização de repetições pode ser considerada um problema principalmente pelo grande número de experimentos que devem ser feitos para cada variável acrescentada. Para superar esse problema e obter boa estimativa de erros, um experimento é incluído no centro do planejamento (ponto central), onde os níveis médios de todas as variáveis são empregados. Assim, é possível avaliar a significância dos efeitos, reduzir o risco de perder a relação não

linear, a fim de verificar se existe falta de ajuste. Desta forma, o número de repetições é significativamente reduzido (TEÓFILO e FERREIRA, 2006 *Apud* OLIVEIRA, 2009) e limita-se ao ponto central.

Conforme ilustrado na Tabela 4, as concentrações de compostos fenólicos na polpa de jabuticaba variaram de 405,00 a 1833,92 mg/100g.

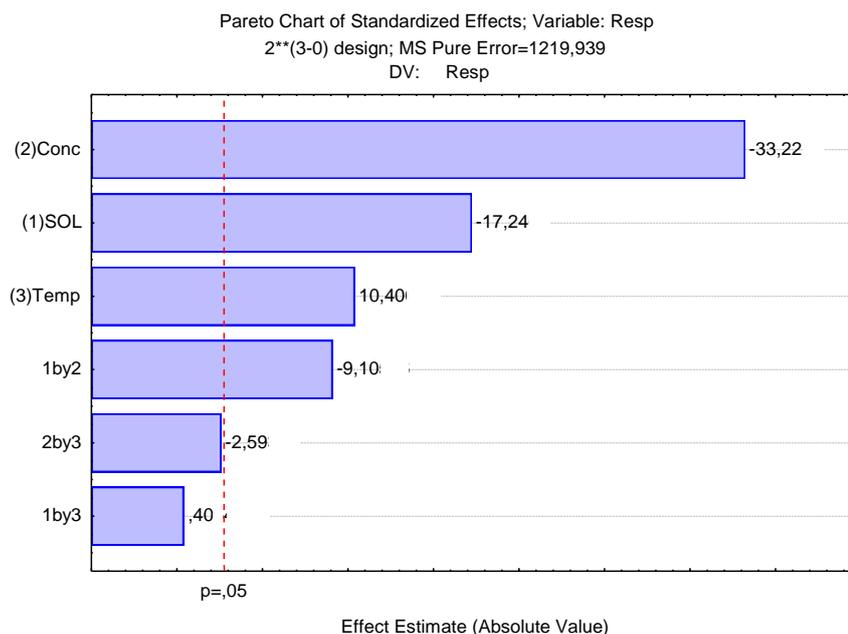
**Tabela 4.** Planejamento fatorial  $2^3$

Ensaio	Fatores			Respostas (mg/100g)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	1	1	665,62
2	1	1	-1	405,00
3	1	-1	1	1717,25
4	1	-1	-1	1444,12
5	-1	1	1	1116,47
6	-1	1	-1	991,47
7	-1	-1	1	1833,92
8	-1	-1	-1	1465,20
9	1	0	0	1213,86
10	1	0	0	1164,71
11	1	0	0	1256,73
12	-1	0	0	1560,78
13	-1	0	0	1561,27
14	-1	0	0	1591,99

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> Solvente	metanol	metanol/etanol	etanol
X <sub>2</sub> Concentração do solvente	50	75	100
X <sub>3</sub> Tempo de extração	20	40	60

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi verificada por meio da aplicação de análise de variância (ANOVA) e com base em gráfico de Pareto (Figura 5, página 46) construído a partir das concentrações de compostos fenólicos, expressas em mg/100g após aplicação do planejamento fatorial  $2^3$ . Foi observado número notável de diferenças, entre as composições e parâmetros estudados.



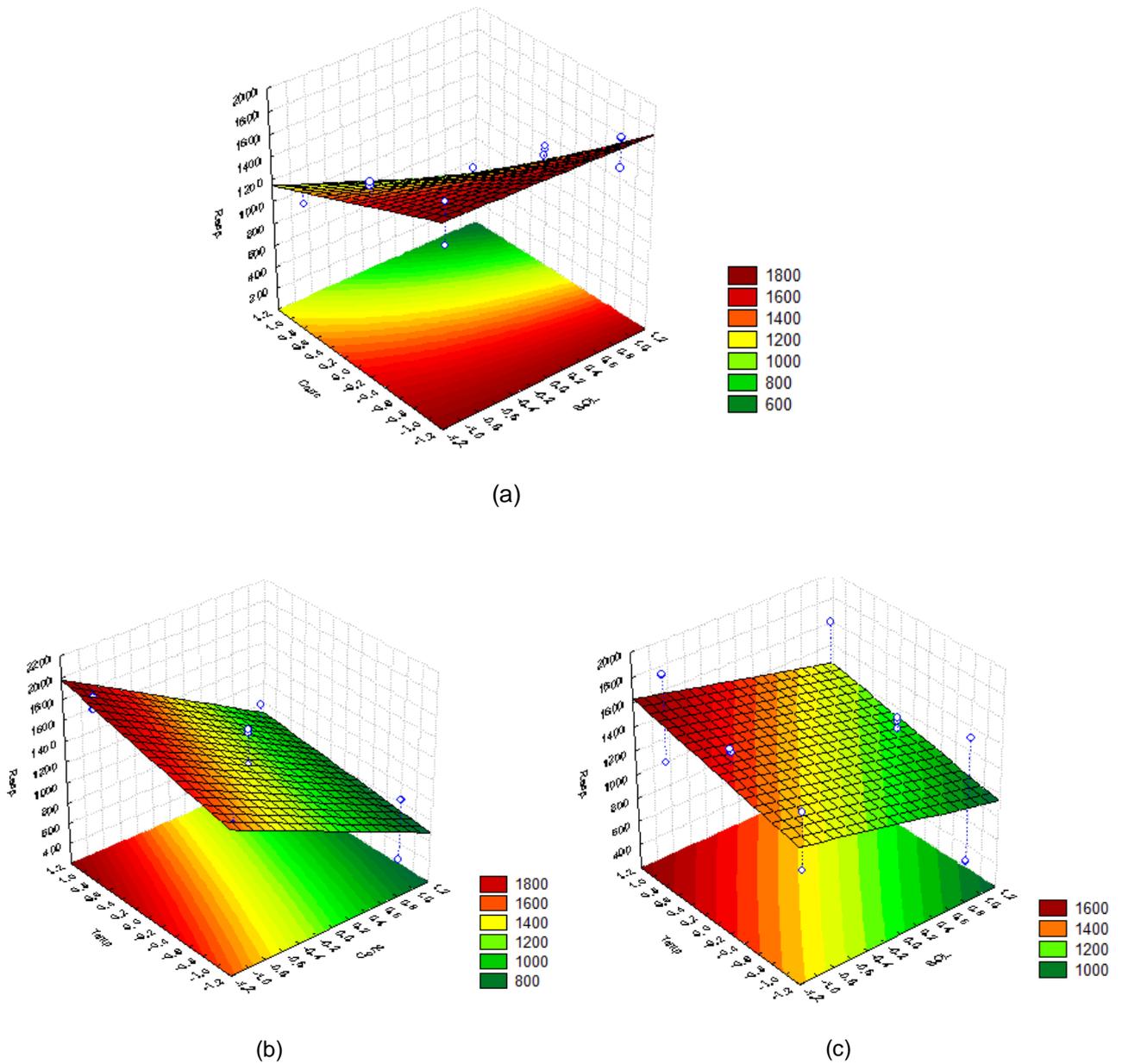
**Figura 5.** Gráfico de Pareto do modelo fatorial completo  $2^3$  obtidos para extração dos compostos fenólicos.

O diagrama de Pareto foi usado para ilustrar os efeitos das variáveis estudadas e suas interações no rendimento de extração em concentração de compostos fenólicos. Ele compreende um gráfico de barras horizontais que está associado aos efeitos de cada fator individualmente e suas interações, de duas a duas, no qual o efeito é tão significativo no rendimento quanto mais à direita da linha vertical ele estiver, no nível de significância de 95% de confiança (MOURA *et al*, 2007 *Apud* OLIVEIRA, 2009).

Avaliando o gráfico de Pareto, pode-se observar que os fatores concentração da solução extratora, tipo de solvente e tempo de extração mostraram-se estatisticamente significativos. Os fatores concentração da solução extratora e tipo de solvente foram significativos para todos os ensaios avaliados e com efeito negativo, isto é, o rendimento em concentração de compostos fenólicos é maximizado quando se utiliza as menores condições dos parâmetros concentração do solvente e tipo de solvente. Enquanto que, o fator tempo de extração foi significativo para os ensaios avaliados com efeito positivo, ou seja, o rendimento em concentração de compostos fenólicos foi maximizado quando se utilizou a maior condição deste parâmetro.

Assim, verifica-se que metanol é o melhor solvente para extração dos compostos fenólicos e que a menor concentração, ou seja, solução hidroalcoólica 50% proporciona maior sinal analítico. Além disso, o maior tempo de extração (60 min.) também promove maior extração dos compostos e consequentemente, maior sinal analítico.

As informações obtidas após a construção das superfícies de resposta (Figura 6) também foram utilizadas na interpretação dos resultados, sendo possível observar conclusões semelhantes às obtidas no gráfico de Pareto.



**Figura 6.** Superfícies de resposta geradas pelo modelo de planejamento fatorial  $2^3$

Assim, os maiores rendimentos são obtidos quando se utiliza os menores níveis dos fatores concentração e tipo de solvente, bem como maior nível do tempo de extração.

## CONCLUSÃO

Todas as partes estudadas da jabuticaba apresentaram propriedade antioxidante, entretanto a intensidade desta ação foi diferenciada entre elas. O extrato da casca possui composto(s) bioativo(s) que apresenta(m) uma potente ação antioxidante, pois exibiu a maior atividade antioxidante e a mais elevada capacidade de sequestrar o radical DPPH. No entanto, frente à ação antioxidante exibida, todas as amostras podem ser vistas como fontes dietéticas de antioxidantes naturais que podem trazer benefícios à saúde e cujo consumo deve ser estimulado. Além disso, comparação entre os dados obtidos dos extratos metanólicos da semente e polpa de jabuticaba mostrou que o extrato da polpa apresenta capacidade de sequestrar o radical livre superior a da semente.

Análise dos dados obtidos e o cálculo do  $CE_{50}$  indicaram que a atividade antioxidante da casca de jabuticaba apresentou resultados mais significativos do que os do suco e a polpa. A alta atividade antioxidante da casca da jabuticaba pode ser explicada pela elevada quantidade de antocianinas encontradas nesta parte do fruto. As antocianinas são responsáveis pela intensa coloração roxa da casca desse fruto (REYNERTSON, 2006).

Portanto, o planejamento fatorial evidenciou que o solvente metanol extrai mais compostos fenólicos na polpa de jabuticaba.

## REFERÊNCIAS

ASCHERI, D. P. R., ASCHERI, J. L. R., CARVALHO, C. W. P. de. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 897-905, 2006.

ASCHERI *et al.* Efeito da extrusão sobre a adsorção de água de farinhas mistas pré-gelatinizadas de arroz e bagaço de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 325-335, 2006.

BARBOSA *et al.* Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.

BRUNINI *et al.* Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg) cv 'sabará'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378-383, 2004.

CABRAL *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1523-1527, 2009.

CARPES *et al.* Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1660-1664, 2008.

CITADIN *et al.* Qualidade de frutos de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) sob influência de duas condições de cultivo: sombreamento natural e pleno sol. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 11, n. 3, p. 373-375, 2005.

DUARTE-ALMEIDA *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FALCÃO *et al.* Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 637-642, 2007.

GEORGÉ *et al.* Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370, 2005.

KIM, D.-0.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 231-326, 2003.

MELO *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

OLIVEIRA, T. S. DE. Avaliação da composição química e atividade Antioxidante do fruto e da bebida alcoólica fermentada de jamelão (*Syzygium cumini* Lamark). **Dissertação de Mestrado**, UEFS, 96f., 2009.

REYNERTSON *et al.* Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

RUFINO *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 127**, Fortaleza, CE, 2007.

SILVA *et al.* Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 595-600, 2008.

SINGLETON, V. L, ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.

SOARES *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-064, 2008.

## **CAPÍTULO 4**

### **ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DOS FRUTOS DE *Genipa americana* L.**

# ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DOS FRUTOS DE *Genipa americana* L.

## RESUMO

*Genipa americana* L. pertence à família Rubiaceae e é considerada uma espécie de importância econômica tanto pela sua essência florestal quanto pela produção de alimentos. Assim, o extrato acetato de etila da polpa dos frutos de *G. americana* foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) utilizando como fase estacionária gel de sílica 60, e fracionamentos posteriores em CC sob sílica flash permitiu o isolamento do ácido cinâmico e ácido octanóico, uma mistura de sitosterol e estigmasterol, além da escopoletina. A identificação estrutural das substâncias isoladas foi baseada na análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura.

## INTRODUÇÃO

As regiões Norte e Nordeste do Brasil, pelas condições climáticas, produzem grande número de frutos tropicais com perspectivas para exploração econômica. A região Nordeste, em especial, tem se destacado pelo elevado número de empresas de processamento de polpa de frutas, mas devido à dificuldade na obtenção de matérias-primas relacionadas a algumas espécies existe uma grande dificuldade para a manutenção do pleno funcionamento destas empresas. Dentre as inúmeras espécies frutíferas utilizadas pela população nordestina, destaca-se o jenipapeiro (*Genipa americana* L.), cuja comercialização como fruta fresca tem-se revelado promissora, sendo realizada nas feiras livres, nos mercados atacadistas e em supermercados. A industrialização, sob as mais diferentes formas, tem estimulado bastante o crescimento da demanda dos frutos pelo mercado nordestino, com possibilidade de expansão para outras regiões brasileiras ou mesmo para o mercado internacional (HANSEN, 2008).

## Jenipapo

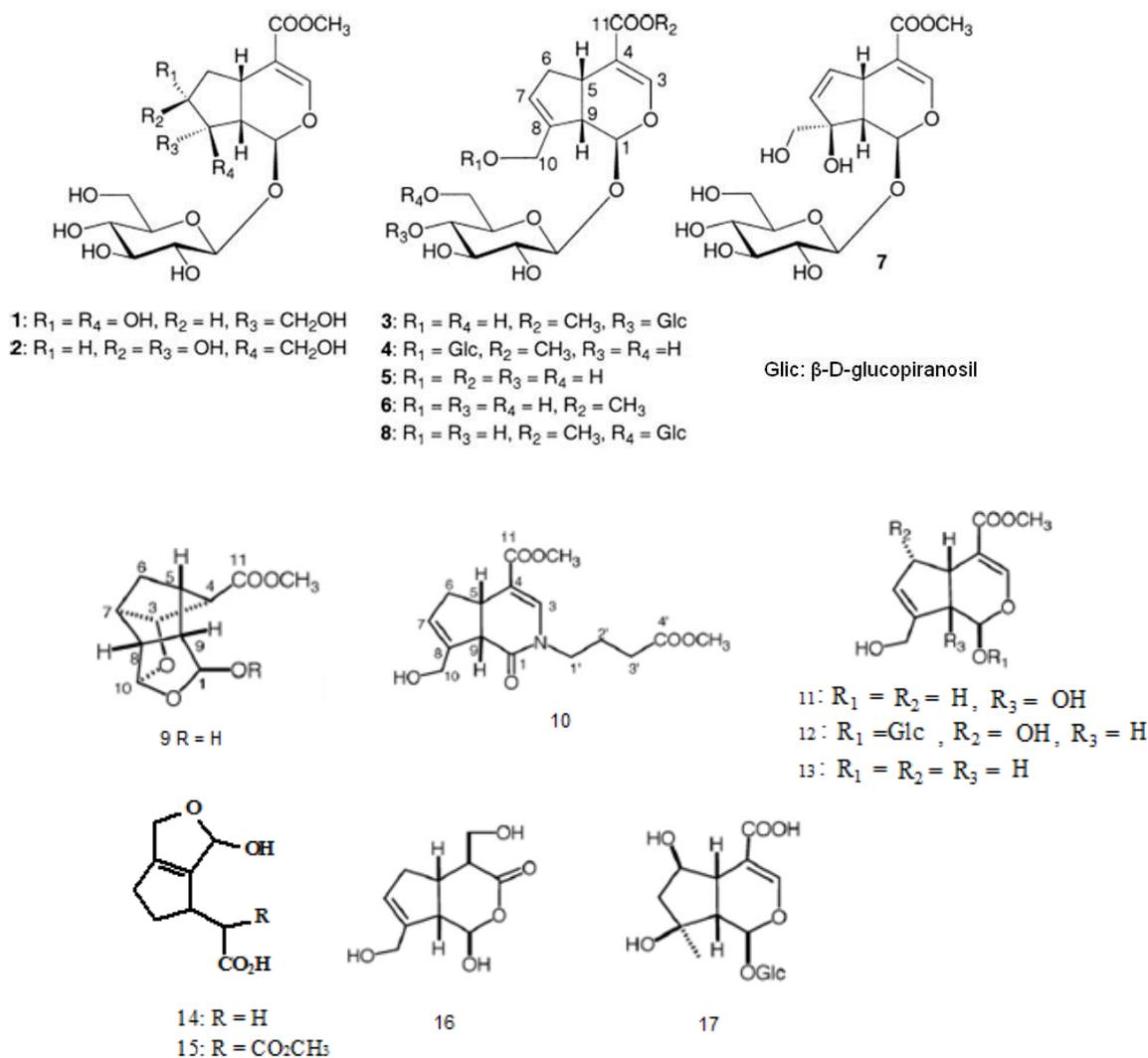
O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à família Rubiaceae, sendo considerada uma espécie de importância econômica, tanto pela sua essência florestal, quanto pela produção de alimentos. Sua distribuição geográfica no Brasil abrange desde a Guiana e Marajó até São Paulo e Mato Grosso. O jenipapeiro tem importância ecológica para o repovoamento de animais da fauna brasileira, sendo muito útil para plantio em áreas brejosas degradadas, crescendo com mais facilidade em regiões de clima quente, como os Estados do Nordeste e Norte do Brasil. A árvore floresce durante os meses de outubro a dezembro e os frutos amadurecem nos meses de novembro a dezembro (RENHE, 2008).

O fruto é empregado na alimentação do homem, na indústria de madeira e ainda na alimentação de animais. Folhas e frutos são usados para alimentar bovinos, caprinos e suínos, bem como no curtimento de couros visto que a casca do caule e o fruto verde são ricos em taninos (RENHE, 2008).

A casca e os frutos verdes contêm uma substância corante violeta ou azul-escuro, denominada genipina, isolada pela 1ª vez em 1960 a qual antigamente era usada pelos índios para se pintarem de negro e, ainda hoje é empregada na marcação de peças de roupas, pintura de tecidos de palha e outros utensílios domésticos (SILVA, 1998).

O jenipapo, na cultura popular, tem algumas indicações medicinais sendo considerado afrodisíaco em alguns lugares. Sua polpa é usada contra icterícia, afecções do estômago, baço e fígado enquanto que o suco do fruto maduro é tônico para estômago e diurético. O chá de suas raízes é utilizado como purgativo enquanto que o chá das folhas é usado como antidiarreico (RENHE, 2008).

Algumas dessas aplicações medicinais foram reportadas e pesquisadas cientificamente. Foi relatada, em um levantamento sobre o uso potencial de extratos de árvores brasileiras, a presença de alguns iridóides em *G. americana* como compostos ativos. Os ácidos genípico e genipínico foram considerados antimicrobianos enquanto os geniposídeos e ácido geniposídico apresentaram atividade purgativa (RENHE, 2008). Quatro novos iridóides glicosídicos, denominados de genamesídeos A-D, além dos conhecidos ácido geniposídico, geniposídeo, gardenosídeo e genipina-gentiobiosídeo, foram identificados por ONO *et al.* (2005). Todos apresentaram atividade anti-promotora de tumores, enquanto a genipina, além de ótima atividade também teve baixa toxicidade (ONO, 2005; ONO, 2007).



**Figura 1.** Constituintes químicos de *Genipa americana*

**Tabela 1.** Identificação dos constituintes químicos de *G. americana*

Nº	Substância
1	Genamesídeo A
2	Genamesídeo B
3	Genamesídeo C
4	Genamesídeo D
5	Ácido geniposídico
6	Geniposídeo
7	Gardenosídeo
8	Genipina-gentiobiosídeo
9	Genipacetol
10	Genipamida
11	Genipinol
12	Éster metílico do ácido diacetil asperulosídico
13	Genipina
14	Ácido genípico
15	Ácido genipínico
16	Gardendiol
17	Shanzhisídeo

## Caracterização físico-química

O jenipapo é uma fruta comum do Norte e Nordeste brasileiro, que apresenta polpa suculenta e ácida, porém doce e exala um aroma bastante característico.

O jenipapo é uma baga ovóide com 5-12 cm de diâmetro, carnuda e comestível. Quando verde é adstringente. Contém boa quantidade de açúcar e acidez pronunciada, variando com a espécie e dependendo do clima e do solo. Sua casca é mole e rugosa, de cor amarelo-pardacenta, castanho-escuro ou esverdeada. A polpa é aromática, mole e envolve numerosas sementes dura e fibrosa. Os frutos do jenipapeiro são comestíveis e muito apreciados, sendo consumidos na forma de suco, doce cristalizado e licor.

A composição de voláteis de jenipapo foi determinada por CG-MS e foram detectados como voláteis majoritários os ácidos octanóico (34,1%), 2-metil-butírico (9,1%), hexanóico (18,2%), e os ésteres 2-metil-2-(E)-butenoato de metila (4,1%), octanoato de etila (3,2%) e 2-propilfurano (2,5%), sendo os ácidos butírico, 2-metilbutírico e hexanóico responsáveis pelas notas pungentes e ácidas, e a característica frutal foi atribuída à presença dos ésteres 2- e 3-metilbutirato de etila (ALVES, 2004).

O fruto apresenta quantidade considerável de polpa, sendo a relação de 12,05% de casca, 47,81% de polpa e 40,61% de caroço. A polpa do jenipapo apresenta baixa acidez, alto conteúdo de umidade, baixo percentual de proteína e lipídeo, alto conteúdo de açúcares, regular teor de ferro, boa taxa de cálcio e fósforo, alto conteúdo de taninos, e apenas traços de vitamina C e pectina (RENHE, 2008).

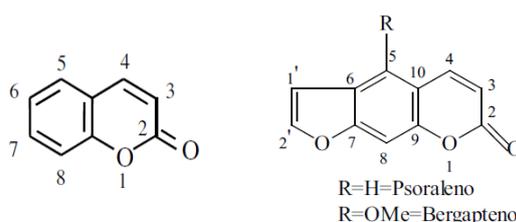
De acordo com Santos (2001), analisando frutos de jenipapo na região de Cruz das Almas-BA, os valores encontrados na constituição química foram: pH 3,60; sólidos solúveis 18,34 °Brix; acidez titulável 1,66%; açúcares totais 15,69%; umidade 73,75%; cinzas 1,22%, e relação sólidos solúveis com acidez titulável de 11,58. Figueiredo (1984), em estudos com a mesma frutífera no município de Maranguape, no Ceará, verificou que o conteúdo em ferro foi de 0,80 mg/100g, cálcio 45,82 mg/100g, fósforo 33,50 mg/100g, fibras 2,03%, lipídios 0,35% e proteína 0,68%. Para Franco (1992), o valor energético do jenipapo é de 81,70 calorias e as seguintes vitaminas podem ser encontradas em sua composição: A (30 mg/100g), B1 (24 mg/100g), B2 (275 mg/100g) e C (6,80 mg/100g) (HANSEN, 2008).

Os fitoesteróis são componentes bioativos de todos os alimentos vegetais. Tocoferol e fitoesteróis são componentes importantes na dos óleos vegetais e nozes. Ao longo dos últimos anos, seus efeitos benéficos à saúde resultaram em um grande interesse em quantificá-los em diferentes alimentos. Nas plantas, mais de 200 tipos diferentes de fitoesteróis têm sido

relatados, sendo os mais abundantes  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Os fitoesteróis têm o potencial para diminuir os níveis séricos de lipoproteína de baixa densidade (LDL), que os tornam úteis para o desenvolvimento de alguns alimentos enriquecidos com esses esteróis vegetais. Particularmente, os tocoferóis são importantes componentes funcionais em alimentos. Entre todos os homólogos de tocoferol, o  $\alpha$ -tocoferol apresenta o maior potencial biológico. Devido ao seu potencial antioxidante e diversas funções a nível molecular, acredita-se que ele reduz o risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. Assim, foi verificado que as sementes e polpa do jenipapo apresentaram altas concentrações de fitoesteróis totais, 233 mg/100 g e 216 mg/100 g, respectivamente. Estes níveis podem ser comparados com o conteúdo do feijão, soja, nozes, castanha de caju, amendoim, óleo de amendoim, azeite de oliva e óleo de soja, como mencionado por Abidi (2001) (COSTA, 2010). A polpa e sementes de jenipapo analisadas apresentaram como os principais fitoesteróis a mistura de  $\beta$ -sitosterol + sitostanol: 150,00 mg/100 g (polpa) e 123,00 mg/100 g (sementes); enquanto que a concentração de estigmasterol nas sementes foi 74,00 mg/100 g e na polpa, 8,00 mg/100 g.

## Cumarinas

As cumarinas compreendem um grupo de compostos fenólicos naturais encontrados em uma variedade de plantas. Esses metabólitos estão presentes em diferentes partes das plantas tanto nas raízes como nas flores e frutos e podem estar distribuídas em diferentes famílias de Angiospermae como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae nas quais são encontradas com ampla ocorrência. Podem ser substituídas em qualquer um dos sítios disponíveis de sua estrutura molecular básica (1,2-benzopirona). Assim, as múltiplas propriedades biológicas apresentadas pelas cumarinas, que podem ajudar a reduzir os riscos de doenças, deve-se a sua diversidade estrutural (FUZISSAKI, 2009).



**Figura 2.** Estrutura básica da classe das cumarinas e furanocumarinas

Muitas cumarinas, por exemplo, tem odor adocicado, e são comercialmente utilizadas em aromatizantes em produtos cosméticos, produtos de limpeza, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados. Algumas cumarinas possuem atividade antiviral e antibacteriana, além de atividade antiinflamatória e capacidade antioxidante. Por exemplo, para a 7-hidroxicumarina tem sido relatada a atividade antioxidante, antitumoral e antiproliferativa *in vitro* (FUZISSAKI, 2009).

Entretanto, o uso de furanocumarinas está relacionado à incidência crescente de câncer de pele, o que lhes confere toxicidade e, portanto sua utilização necessita de uma avaliação risco-benefício rigorosa. As furanocumarinas apresentam alta fototoxicidade, e muitas são alergênicas. Essa fototoxicidade decorre da habilidade que estas substâncias apresentam de absorver fortemente radiações ultravioletas. Em mamíferos, a exposição da pele a plantas que contenham furanocumarinas leva ao desenvolvimento de fotodermatites severas; o mesmo ocorre se frutos que apresentam estas substâncias forem ingeridos. O uso de furanocumarinas, combinada com a exposição a radiação UV-A, é um tratamento comum para o vitiligo, psoríase, e uma série de outras doenças de pele. Embora furanocumarinas mais UV-A seja um tratamento altamente eficaz, vários estudos têm demonstrado que a exposição a altas doses aumenta o risco para o desenvolvimento do carcinoma cutâneo (CARDOSO, 2002).

Escopoletina foi isolada do fruto de *Morinda citrifolia* Linn., conhecida popularmente por Noni (LAVAUT, 2003). Na medicina popular, o suco produzido a partir deste fruto é conhecido por prevenir e curar várias doenças tais como diabetes, diarreia, dores, hipertensão, artrite, estresse e câncer. Além disso, foi isolada dos frutos de *T. elegans* (MATOS, 2009), e dos frutos de *Tetrapleura tetraptera* T Aub (Mimosaceae) onde apresentou efeito hipotensor (OJEWOLE, 1983). Escopoletina também foi isolada dos frutos de *Solanum dasyphyllum* (Solanaceae) e mostrou ação anticonvulsivante (ADESINA, 1985).

O objetivo deste trabalho foi isolar os constituintes do extrato acetato de etila da polpa dos frutos de *G. americana* bem como avaliar a atividade antioxidante, medida através dos métodos do sequestro radical livre DPPH e da auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

Os solventes empregados no preparo dos extratos, nas eluições das cromatografias em placa e coluna (hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano) foram de grau analítico da marca Quimex. Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório da marca LABOROTA 4000.

Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm, ambas de procedência da Acros Organics. Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> da Merck. As placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254/365 nm).

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), ácido linolênico foram adquiridos da Sigma Aldrich enquanto que o BHT (butil-hidroxi-tolueno) da Acros Organics, respectivamente. As medidas de absorção foram feitas usando-se espectrofotômetro UV-Vis VARIAN, modelo Cary 50.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro da Varian, modelo GEMINI 2000 operando a 300 MHz (<sup>1</sup>H) e 75 MHz (<sup>13</sup>C), e o espectro de HMBC em espectrômetro da Bruker, operando a 500 MHz (<sup>1</sup>H) e 100 MHz (<sup>13</sup>C), utilizando-se CDCl<sub>3</sub> e (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO como solventes deuterados com grau de pureza superior a 99,8%, das marcas Aldrich®. Os sinais dos espectros foram registrados com base nos sinais do solvente empregado em relação ao TMS.

Os espectros de massas foram registrados no LC-MS da SHIMADZU, MODELO LCMS 2010 com inserção direta, modo SCAN, faixa *m/z* 50-500, modo negativo; e os espectros de massa de alta resolução, modo ESI (negativo), foram registrados no micrOTOF da Bruker Daltonics.

### Material

Os frutos de *G. americana* foram adquiridos em feira livre da cidade de Salvador-Bahia, em maio de 2007. Posteriormente, foi retirada a casca e as sementes para preparação da polpa, a qual foi embalada em sacos plásticos de polietileno, com capacidade para 100g e armazenada em freezer (-18°C) sem aditivo químico.

## **Extração e isolamento dos constituintes químicos**

A polpa de *G. americana* (1,00 Kg) foi submetida à partição com acetato de etila, originando as frações aquosa e acetato de etila. O solvente da fração acetato de etila foi removido em evaporador rotativo fornecendo 4,25 g de extrato AcOEt. Parte do extrato em acetato de etila (3,90 g), denominado GAA, foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como eluente misturas de CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 18 frações de 100 mL cada, sendo coletadas como segue: frações 1 (CHCl<sub>3</sub> 100%), 2-5 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 95:5), 6-9 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 9:1), 10-11 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 8:2), 12-14 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 7:3), 15-16 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 5:5), 17 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 3:7), 18 (MeOH, 100%). Após remoção do solvente em evaporador rotativo e análise por CCDC, as frações foram reunidas em 12 frações.

A fração GAA 3 forneceu 65,6 mg uma mistura de ácido octanóico e ácido cinâmico. A fração GAA 4 (817,4 mg) foi submetida à CC em sílica flash e eluída em sistema CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 5,6 mg de uma mistura de sitosterol e estigmasterol (GAA 4/2), 58,3 mg de uma mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico (GAA 4/4) e 135,8 mg de ácido cinâmico (GAA 4/5). A subfração GAA 4/6 (139,7 mg) foi submetida à CC em sílica flash e eluída em sistema Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade com frações coletadas a 50 mL cada, resultando em 70,6 mg de ácido cinâmico (GAA 4/6/2-7), 13,7 mg de uma mistura de escopoletina e ácido cinâmico (GAA 4/6/8-9). A subfração GAA 4/7 (43,0 mg) foi submetida à CC em sílica flash e eluída em sistema CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente crescente de polaridade com frações coletadas a 25 mL cada, resultando em 7,6 mg da cumarina escopoletina (GAA 4/7/11-14).

## **Avaliação da atividade antioxidante da escopoletina isolada**

### **Teste do sequestro do radical livre DPPH**

Este teste avalia a habilidade da substância testada de sequestrar o radical livre DPPH e está baseado no descoramento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A mistura de reação foi constituída da adição de 0,1 mL da substância teste e 3,0 mL da solução do radical DPPH em etanol (40µg/mL). As leituras das absorvâncias foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro a 517 nm, imediatamente e após 30 min de incubação a temperatura ambiente e protegida da luz. O ácido gálico, utilizado

como padrão, e a substância teste foram avaliados em 2 concentrações diferentes (50 e 100 µg/mL).

O percentual de decréscimo na absorbância foi medido para cada concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de sequestro de radical livre (% SRL) e calculado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ SRL} = (\text{Abs}_{\text{Controle}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) / \text{Abs}_{\text{Controle}} \times 100$$

Onde  $\text{Abs}_{\text{Controle}}$  é a absorbância da solução de DPPH e  $\text{Abs}_{\text{Amostra}}$  é a absorbância da amostra em solução. O % SRL foi calculado com base na diferença da absorbância da solução de amostra em teste com seu branco (controle).

### **Método da inibição da auto-oxidação do β-caroteno**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo o método espectrofotométrico (470 nm) originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Foi preparada uma mistura, com 1,0 mL de solução de β-caroteno (2 mg/mL em  $\text{CHCl}_3$ ), 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween 80<sup>®</sup>. Posteriormente a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio e então adicionados 100 mL de água destilada mantida sob atmosfera de oxigênio (30 minutos), e a absorbância inicial foi ajustada entre 0,6 e 0,7 (DURTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Em cubetas contendo 100 µL da substância teste (25, 50, 100 e 200 µg/mL), foram adicionados 2,7 mL da emulsão preparada, sendo a reação acompanhada por espectrofotometria no visível em  $\lambda = 470 \text{ nm}$ , com leitura imediata e em intervalos de 15 minutos durante 1 h. As cubetas foram mantidas em banho a 50°C e as leituras realizadas em triplicata, utilizando-se o BHT como antioxidante padrão, acompanhadas por controle sem adição de substância teste. A atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da oxidação através do decaimento da absorbância, medido em relação ao controle.

$$\% \text{ I} = 100 [1 - (\text{Ao} - \text{At}) / (\text{Ao}^0 - \text{At}^0)]$$

Onde:

Ao = Absorbância inicial da amostra

At = Absorbância final da amostra

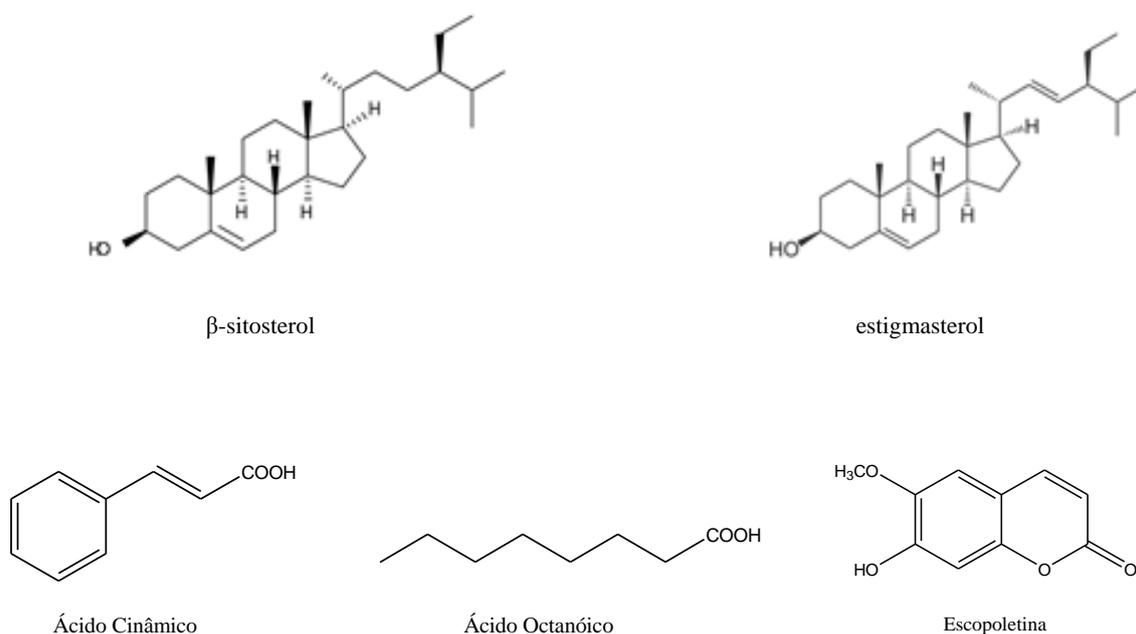
Ao<sup>0</sup> = Absorbância inicial do controle

At<sup>0</sup> = Absorbância final do controle

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

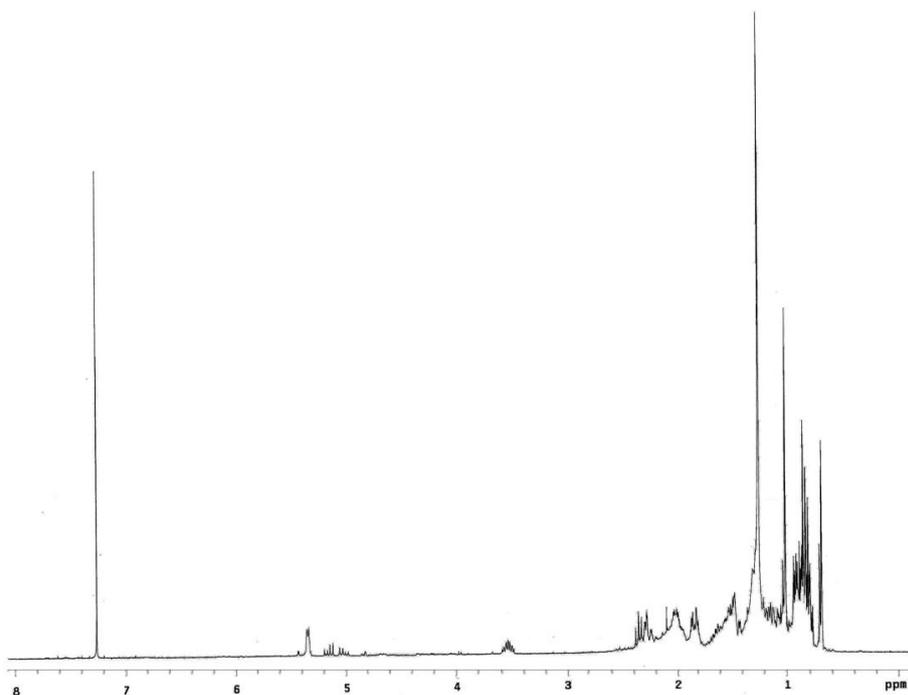
### Identificação dos constituintes químicos isolados

O fracionamento do extrato AcOEt da polpa de *G. americana* conduziu ao isolamento e identificação estrutural de uma mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico, de uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, do ácido octanóico, do ácido cinâmico e da escopoletina. A identificação estrutural foi baseada na análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura.



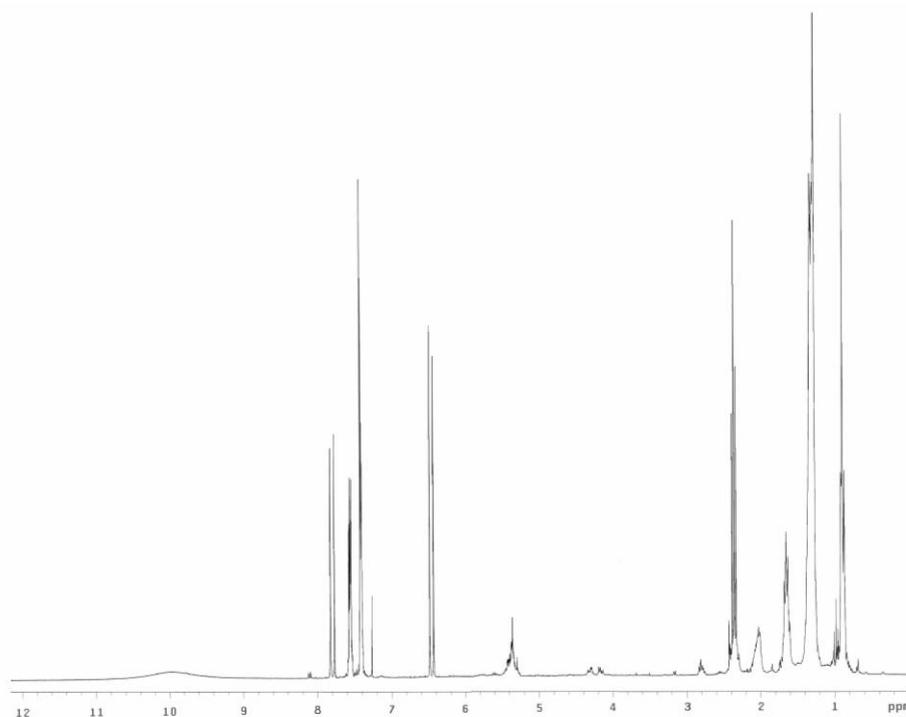
**Figura 3.** Estruturas das substâncias isoladas do fruto de *Genipa americana*

A determinação estrutural da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foi possível através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4, página 62) e comparação com dados da literatura. A presença destes esteróides era esperada uma vez que Costa *et al.* (2010) determinaram o conteúdo de fitoesteróis e tocoferóis em polpas de frutas e sementes brasileiras, onde a polpa de jenipapo apresentou alto teor de fitoesteróis (216 mg/100 g).

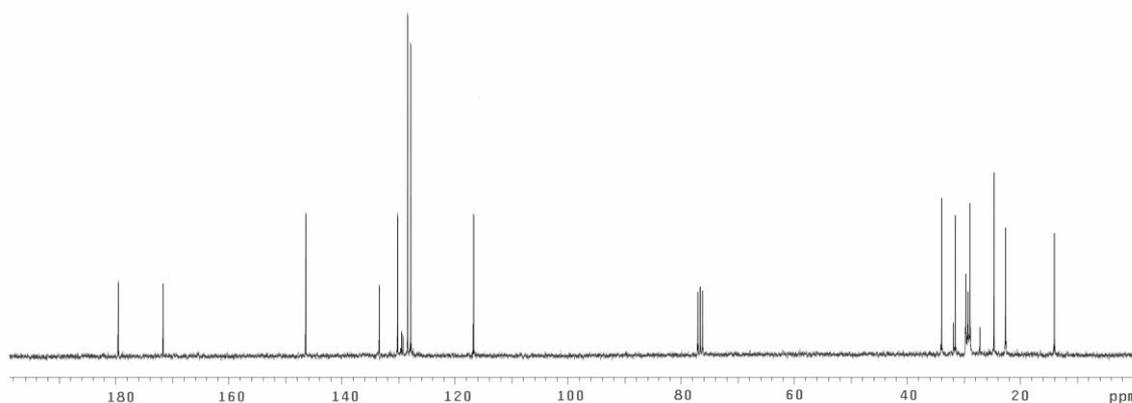


**Figura 4.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

A mistura dos ácidos cinâmico e octanóico foi identificada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico



**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura foi possível observar um sinal em  $\delta$  180,5 relativo a um carbono acila, característico de grupo carboxílico de ácidos alifáticos, além dos sinais para carbonos alifáticos saturados, atribuídos ao ácido octanóico (Tabela 2; página 63).

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  dos ácidos octanóico e cinâmico estão listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

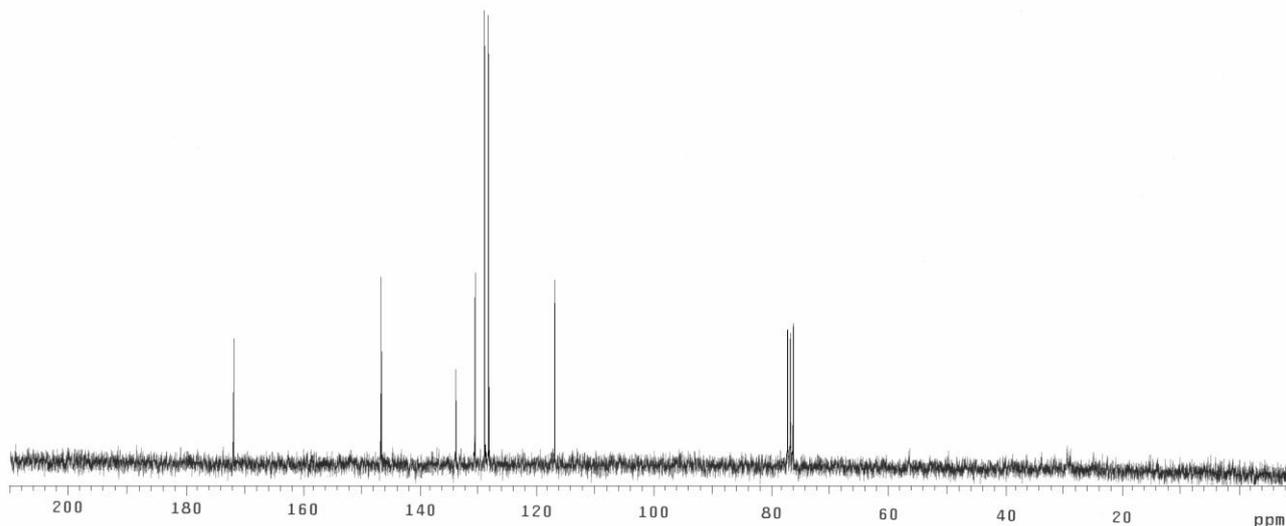
**Tabela 2.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)],  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] do ácido octanóico

Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	9,95(s)	180,5
2	2,34 (t, J=7,5Hz, 2H)	34,1
3	1,66 (quint, J=7,5Hz, 2H)	31,6
4	1,29 (m)	28,8
5	1,29 (m)	28,9
6	1,29 (m)	24,7
7	1,29 (m)	22,6
8	0,88 (t, J=7,2Hz, 3H)	14,0

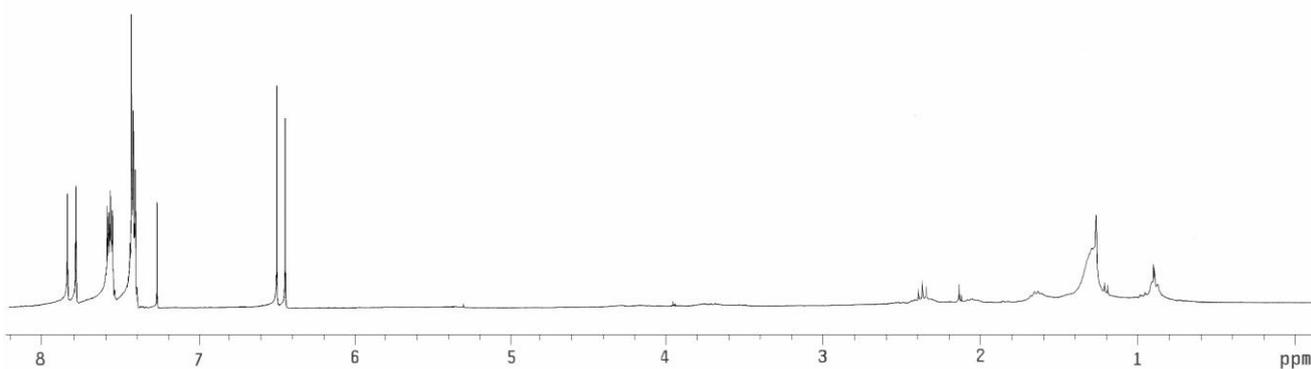
**Tabela 3.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)],  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] do ácido cinâmico

Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	9,95 (s)	172,5
2	6,46 (d, J=16,2 Hz)	117,3
3	7,80 (d, J=16,2 Hz)	147,0
4	-	134,0
5, 9	7,56 (dd, J=9/3 Hz)	130,7
6,8	7,41 (m)	128,3
7	7,42 (m)	128,9

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 7) do ácido cinâmico pode-se observar um sinal em  $\delta$  172,0, relativo ao carbono acila do grupo carboxílico, além dos sinais para carbonos olefínicos em  $\delta$  146,9 e  $\delta$  117,3. Além disso, foram observados os sinais de carbonos  $sp^2$  na região de aromático em  $\delta$  134,0,  $\delta$  130,7,  $\delta$  128,9 e  $\delta$  128,3 (Tabela 3; página 63).

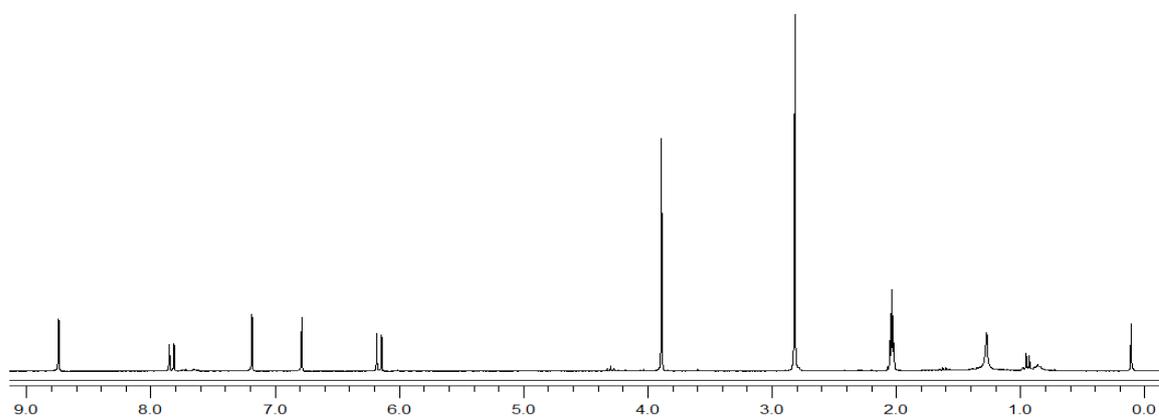


**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] do ácido cinâmico

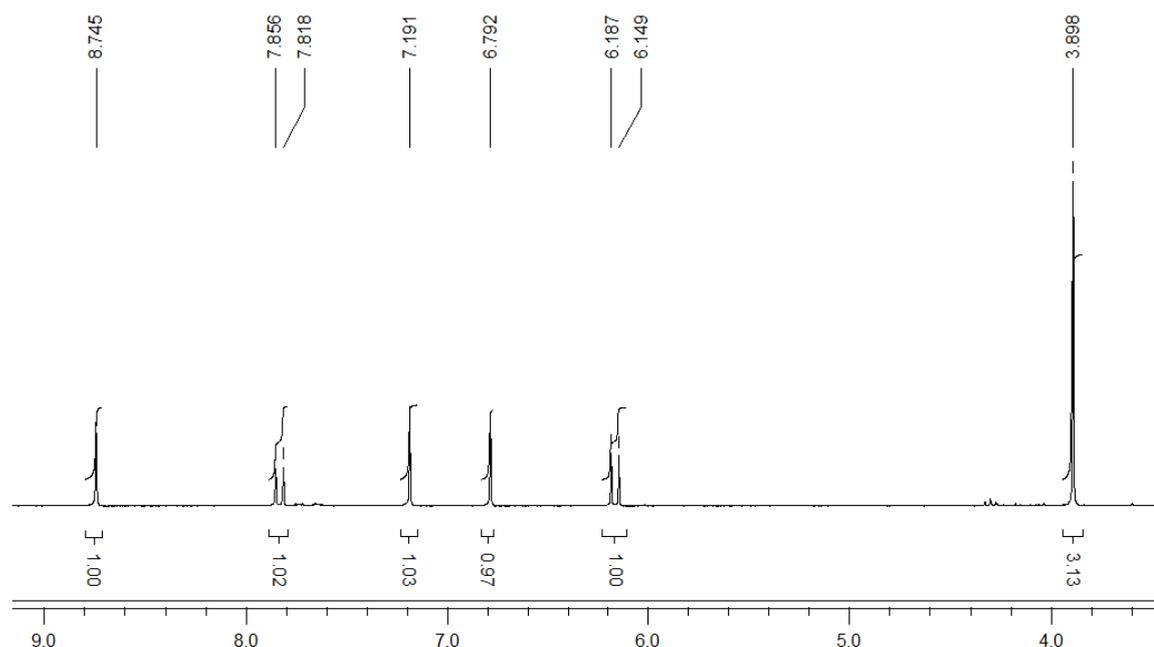


**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] do ácido cinâmico

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 9 e 10; página 65) da escopoletina pode-se observar os dupletos em  $\delta$  6,19 e  $\delta$  7,86 ( $J=10$  Hz), correspondente aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. Cumarinas não substituídas no anel pirônico exibem dupletos ( $J=9,5$  Hz) em  $\delta$  6,1-6,4 e  $\delta$  7,5-8,3 referentes aos hidrogênios H-3 e H-4 em configuração Z, onde o valor de H-4 em campo mais desprotegido que H-3 é indicativo que o mesmo encontra-se na posição  $\beta$  de um sistema carbonílico conjugado. Pode-se observar ainda a presença de dois singletos em  $\delta$  7,21 e  $\delta$  6,82, integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-5 e H-8 do anel cumarínico; além de um singlete integrando para 3H em  $\delta$  3,92, característico de hidrogênios de grupos metoxílicos, e um singlete em  $\delta$  8,81 relativo à hidroxila.

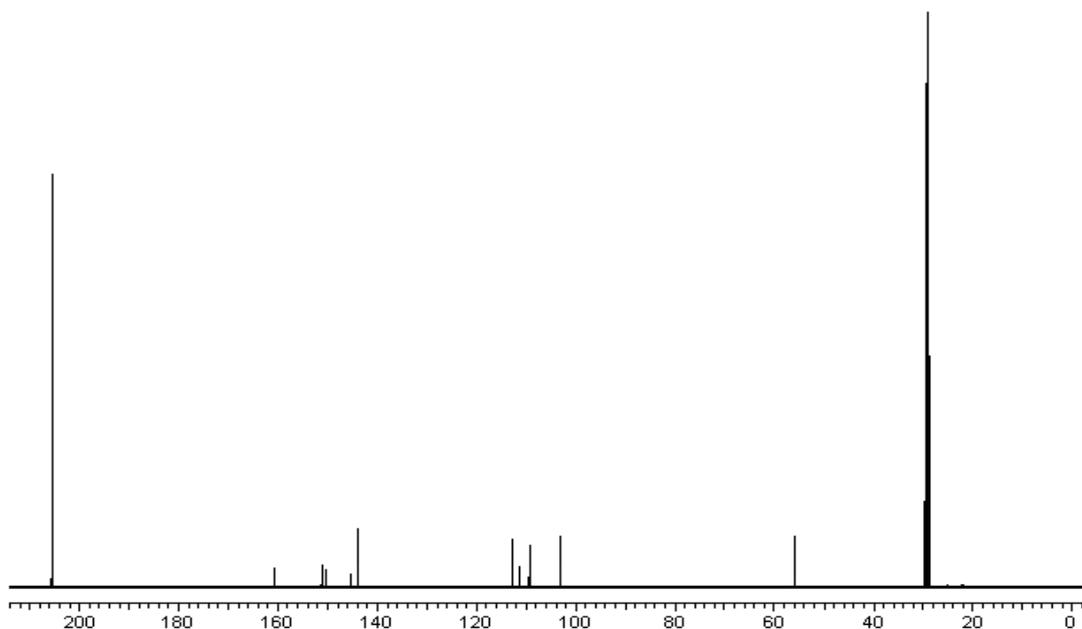


**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)] da escopoletina

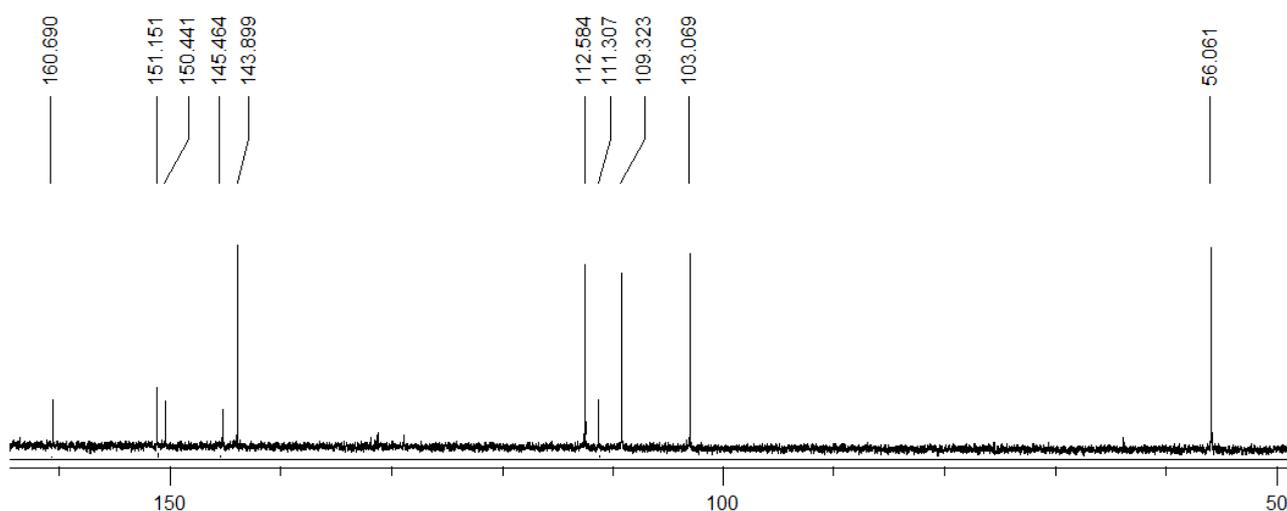


**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)] (ampliação) da escopoletina

Através destes dados, associados às informações dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 11 e 12; página 66) e HMBC (Figuras 14 e 15; página 68), foi possível atribuir os sinais dos carbonos não hidrogenados (Tabela 4; página 67) bem como confirmar a localização da metoxila na posição 6 e da hidroxila na posição 7. Desta forma, as correlações observadas no espectro bidimensional HMBC corroboraram para a elucidação estrutural desta substância.



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)] da escopoletina

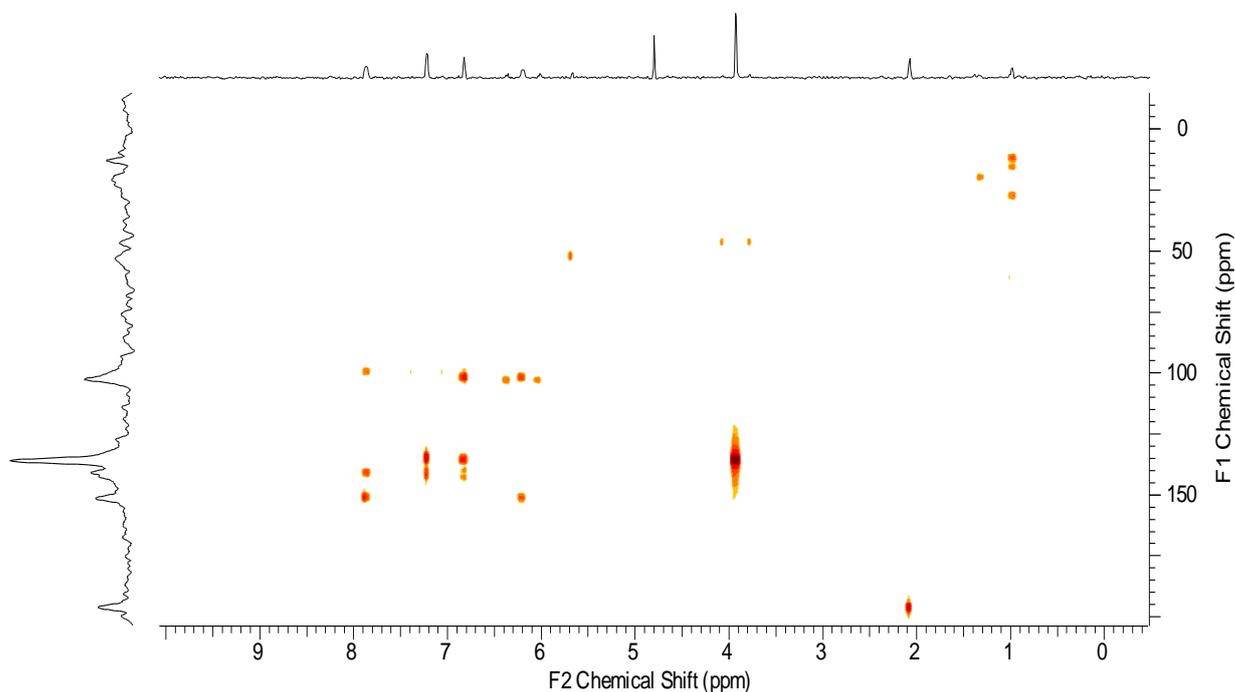


**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)] (ampliação) da escopoletina

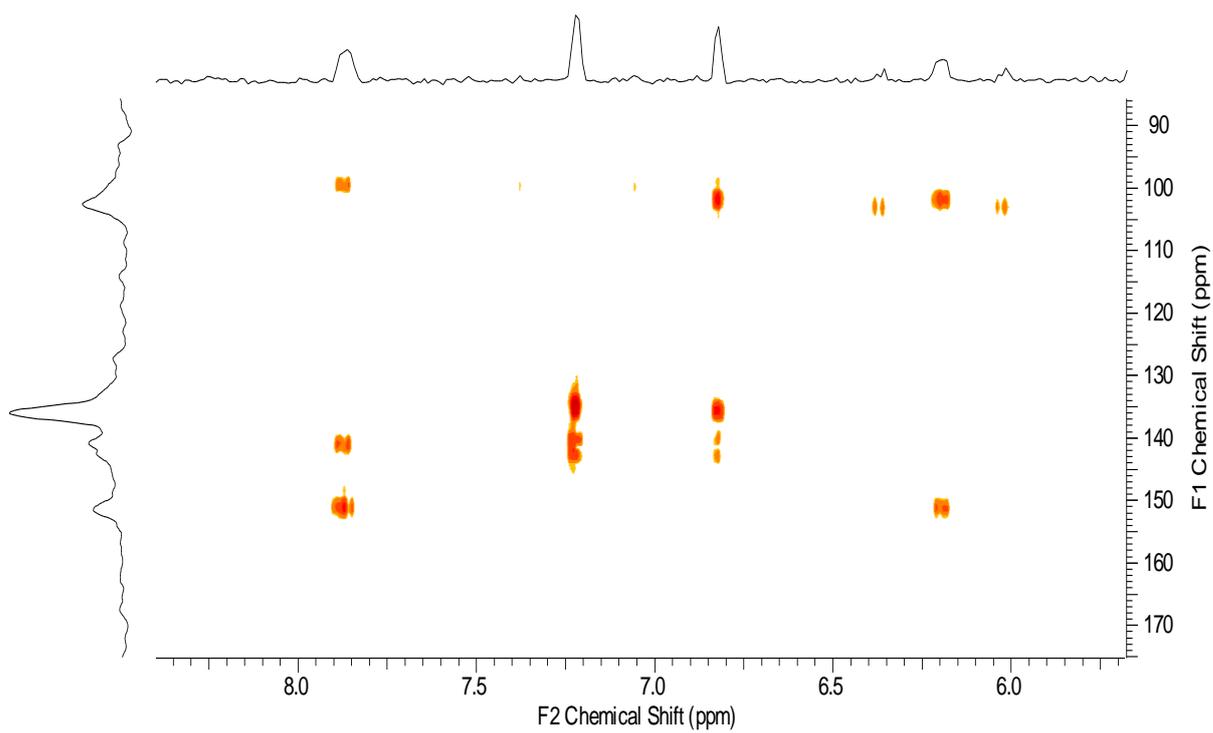
**Tabela 4.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  [100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)],  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)] da escopoletina

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult.; $J$ )	$\delta$ $^{13}\text{C}$	Correlações $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ *
1	-	-	
2	-	160,70	
3	6,19 (d, $J=10$ Hz)	112,65	C-2 ( $\delta$ 160,70) e C-10 ( $\delta$ 111,36)
4	7,86 (d, $J=10$ Hz)	145,22	C-2 ( $\delta$ 160,70), C-9 ( $\delta$ 150,59) e C-10 ( $\delta$ 111,36)
5	7,21 (s)	109,36	C-6 ( $\delta$ 143,95) e C-9 ( $\delta$ 150,59)
6	-	143,95	
7	-	151,23	
8	6,82 (s)	102,99	C-6 ( $\delta$ 143,95), C-7 ( $\delta$ 151,23) e C-10 ( $\delta$ 111,36)
9	-	150,59	
10	-	111,36	
OCH <sub>3</sub>	3,92 (s)	56,02	C-6 ( $\delta$ 143,95)
OH	8,81 (s)	-	C-6 ( $\delta$ 143,95), C-7 ( $\delta$ 151,23) e C-8 ( $\delta$ 102,99)

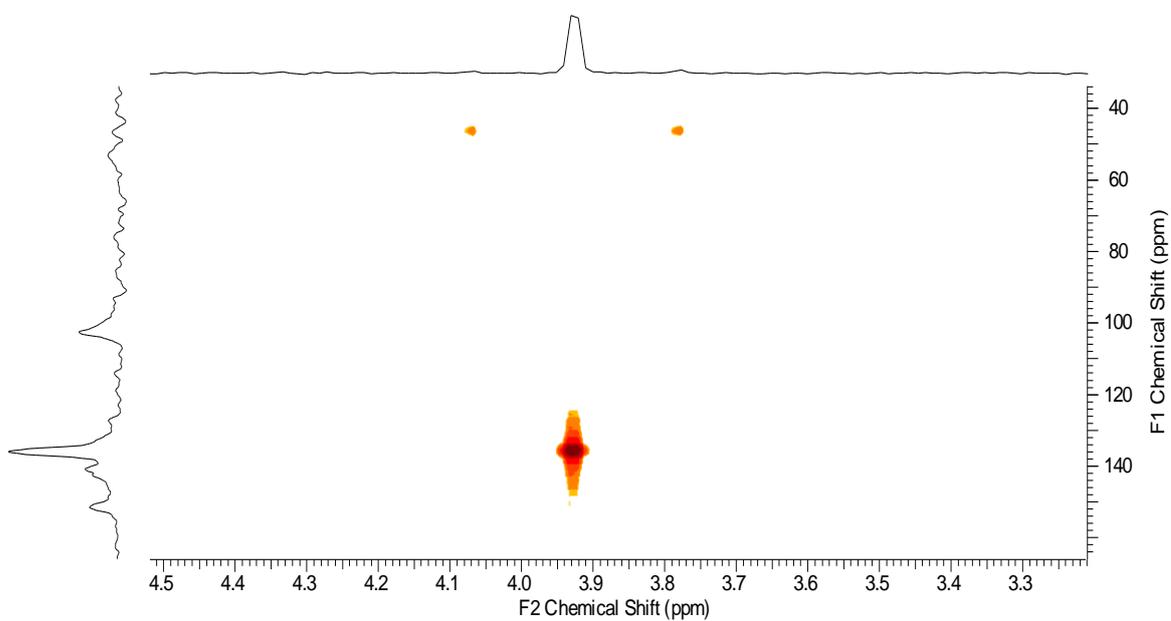
\* Atribuído através do espectro HMBC



**Figura 13.** Espectro de HMBC da escopoletina

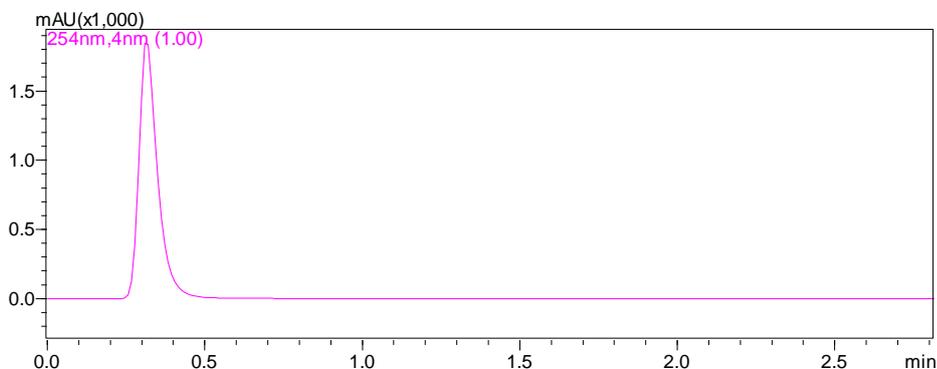


**Figura 14.** Espectro de HMBC (ampliação) da escopoletina

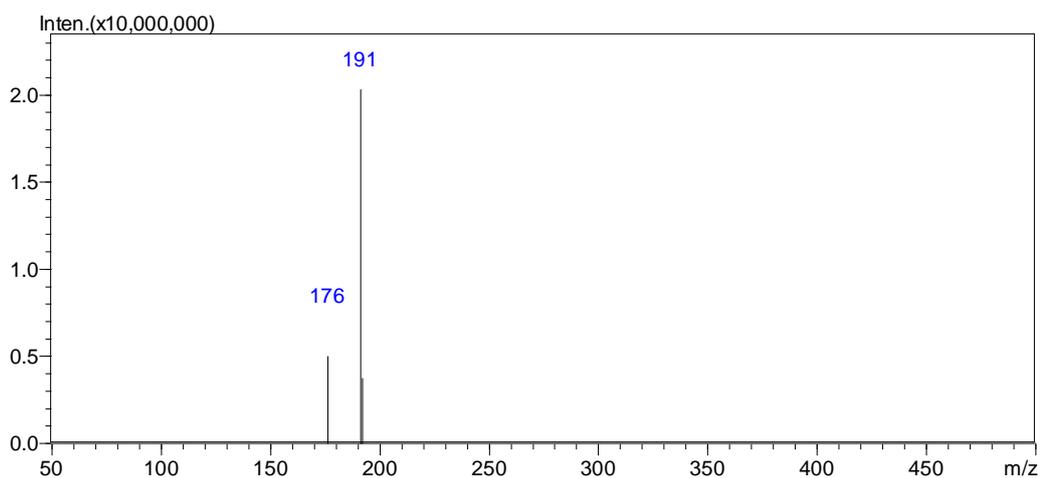


**Figura 15.** Espectro de HMBC (ampliação) da escopoletina

O EM-APCI registrado em modo negativo, da substância (**5**), apresentou íon *pseudo*-molecular [M-1] em  $m/z$  191, correspondente a fórmula molecular  $C_{10}H_8O_4$  (Figura 17).



**Figura 16.** Cromatograma da escopoletina



**Figura 17.** EM-APCI modo negativo da escopoletina

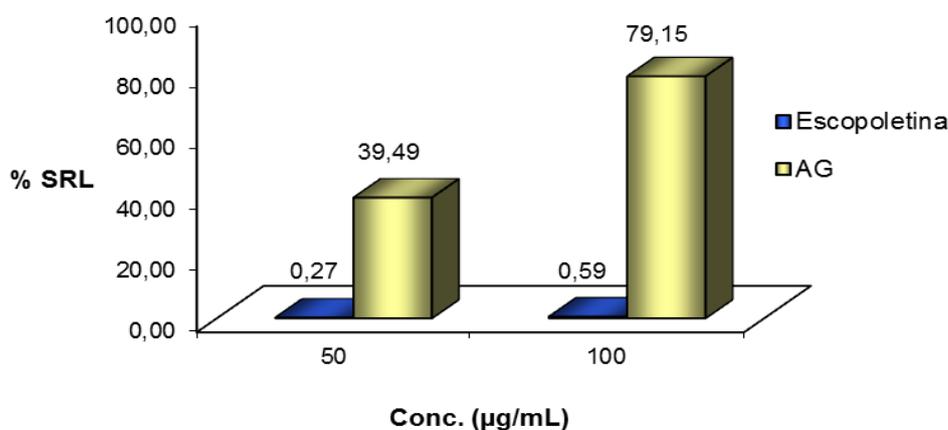
HRESIMS modo negativo também registrou pico em  $m/z$  191 [M-1] (100%). O íon molecular calculado em  $m/z$  191,0344 [M-1] e observado em  $m/z$  191,0339 [M-1] registrado pelo espectro de massas corroborou com a determinação da substância.

Os dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e HMBC, aliados ao espectro de massas, permitiu identificar a substância como sendo a escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina). Vale ressaltar que este é o primeiro relato da escopoletina em um fruto tropical da Bahia.

## Avaliação da atividade antioxidante da escopoletina

### Teste do sequestro do radical livre DPPH

Análise dos resultados do % SRL da escopoletina isolada do jenipapo, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, mostra que esta substância apresenta baixa capacidade de sequestro de radical, quando comparado com o ácido gálico nas mesmas concentrações. Verifica-se também que o % SRL é proporcional ao aumento da concentração.

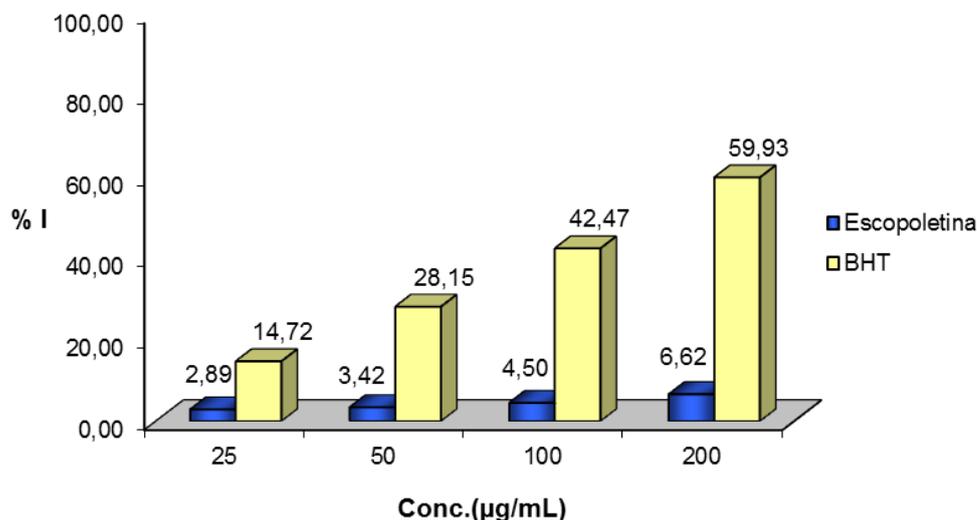


**Figura 18.** Percentual de sequestro de radical livre (% SRL) da escopoletina e do ácido gálico

O teste utilizando o radical livre DPPH mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio a este radical, assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra maior a sua atividade. Outro fator que influencia no potencial antioxidante é a estabilidade do radical formado, sendo maior nas substâncias que possuem maior capacidade de deslocar o radical pela estrutura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Desta forma, verifica-se que a escopoletina apresentou baixa atividade.

### Método da inibição da auto-oxidação do $\beta$ -caroteno

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante, pelo método da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, da escopoletina e do padrão BHT estão representados na Figura 19:



**Figura 19.** Comparação entre os % I da escopoletina isolada do jenipapo e do padrão BHT

Na avaliação do potencial oxidante pelo método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linolênico, o  $\beta$ -caroteno sofre ataque dos radicais livres do ácido linolênico, e assim perde suas duplas ligações e conseqüentemente a coloração laranja característica. A principal vantagem desse método é adicionar efetiva oxidação lipídica ao sistema (OLDONI, 2007). Assim, foi observado que a escopoletina apresentou baixa % I.

Algumas cumarinas tem demonstrado possuir atividades anticarcinogênica e anti-trombótica (YU, 2005). Poucos estudos sistemáticos tem sido relatados sobre atividade antioxidante e as correlações entre estrutura-atividade antioxidante em cumarinas. Foi relatado recentemente que a atividade sequestradora de radical DPPH em furanocumarinas está relacionada com o número de hidroxilas fenólicas presentes em suas estruturas (TORRES, 2006). Assim, a partir do extrato da raiz de *Angelicae dahuricae*, foram isoladas 11 furanocumarinas sendo que a 9-hidroxi-4-metoxipsoraleno e alloisoimperatorina exibiram potente efeito antioxidante contra o radical DPPH (PIAO, 2004).

Portanto, a escopoletina isolada do jenipapo apresentou baixa atividade nos dois métodos, visto que apresenta apenas uma hidroxila fenólica (Figura 2, página 56).

## REFERÊNCIAS

ADESINA, S. K. Constituents of *Solanum dasycarpum* Fruit. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 147, 1985.

ALVES, G. L. Identificação dos compostos voláteis importantes para o aroma de jenipapo (*Genipa americana* L.) e murici (*Byrsonima crassifolia* L. RICH) por CG-EM e CG-OSME. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, SP, 146f., 2004.

BARREIROS, A. L. B. S. Constituintes Químicos Bioativos de *Dioclea violacea*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Bahia, 286f., 2005.

CARDOSO *et al.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1465-1469, 2002.

COSTA *et al.* Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43 p. 1603-1606, 2010.

DUARTE-ALMEIDA *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

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

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 358-71, 2005.

FUZISSAKI, C. N. Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação. **Dissertação de Mestrado**, 89 f., 2009.

LAVAUT, N. E. G.; LAVAUT, J. A. G. *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización en la salud humana. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 37, n. 3, 2003.

MATOS *et al.* Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. Catigua* (MELIACEAE). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1553-1556, 2009.

OJEWOLE, J. A. O. ; ADESINA, S. K. Mechanism of the Hypotensive Effect of Scopoletin Isolated from the Fruit of *Tetrapleura tetraptera*. **Planta Medica**, v. 49, n. 9, p. 46-50, 1983.

OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, SP, 105f., 2007.

ONO *et al.* Three New Monoterpenoids from the Fruit of *Genipa Americana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 632-634, 2007.

ONO *et al.* Iridoid Glucosides from the Fruit of *Genipa Americana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1342-1344, 2005.

PIAO *et al.* Antioxidative activity of furocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 241-246, 2004.

PINTO *et al.* Volatile constituents from headspace and aqueous solution of genipap (*Genipa americana*) fruit isolated by the solid-phase extraction method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 488-491, 2006.

RAZDAN *et al.* Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2063-2069, 1987.

RENHE, I. R. T. Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.) **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, MG, 49f., 2008.

SILVA, A. P. da; LIMA, C. L. C. de; VIEITES, R. L. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, 1998.

THUONG *et al.* Antioxidant Activities of Coumarins from Korean Medicinal Plants and their Structure–Activity Relationships. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 101-106, 2010.

TORRES *et al.* Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 984-987, 2006.

UEDA S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1677-1680, 1991.

VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1421-1424, 1998.

YU *et al.* Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2009-2014, 2005.

ZHU *et al.* Unusual sesquiterpene lactones with a new carbon skeleton and new acetylenes from *Ajania przewalskii*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 228-238, 2010.

## **CAPÍTULO 5**

### **ESTUDO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *Spondias mombin* L.**

# ESTUDO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *Spondias mombin* L.

## RESUMO

*Spondias mombin* L. pertence à família Anacardiaceae, família conhecida pelas várias espécies frutíferas tais como a siriguela (*Spondias purpurea*), umbu (*Spondias tuberosa*), cajarana (*Spondias cytherea*) e umbu-cajá (*Spondias* spp.). Apesar da importância regional, ainda hoje existem poucas informações sobre a composição química destas frutas regionais. Assim, o extrato em diclorometano das sementes de *Spondias mombin* L. foi submetido a diversos fracionamentos cromatográficos permitindo o isolamento do glicerol 1,3-dioleoil-2-linoleoil, uma mistura de alquil fenóis 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-octadecenil]-benzeno e 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-docosenil]-benzeno, além de uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi baseada na análise de dados de Espectrometria de Massas e de RMN.

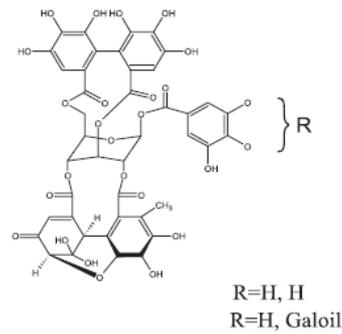
## INTRODUÇÃO

*Spondias* são plantas pertencentes à família Anacardiaceae que apresentam reconhecido potencial econômico, o que tem despertado o interesse dos pesquisadores e produtores para essas frutíferas tropicais em virtude das possibilidades de utilização de seus frutos no preparo de sucos, doces, sorvetes, vinhos e licores, além da extração de goma. *Spondias mombin* L. pertence à família Anacardiaceae, onde estão incluídas outras espécies frutíferas como a siriguela (*Spondias purpurea*), o umbu (*Spondias tuberosa*), a cajarana (*Spondias cytherea*) e o umbu-cajá (*Spondias* spp.). *Spondias mombin* L. é um fruto tropical com crescente valor no mercado, principalmente no Nordeste brasileiro, onde ocupa lugar de destaque na produção e comercialização de polpa. Assim, o aumento da demanda tem despertado o interesse pelo cultivo, porém o incipiente acervo de informações existentes impede a instalação de pomares comerciais (PINTO, 2003).

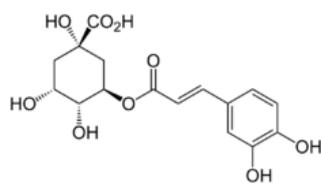
Árvore de médio a grande porte, a cajazeira é uma espécie frutífera que tem como origem a América Central. Atualmente, encontra-se amplamente disseminada em quase todos os estados do Brasil. Na Amazônia é vulgarmente conhecida por tapereba; em São Paulo, Minas Gerais, por cajazeira miúda ou cajá pequeno; nos estados do Sul, por cajá mirim. No Nordeste brasileiro é simplesmente conhecido por cajá, e ocorre espontaneamente em condições silvestre competindo com outras espécies vegetais, ou em quintais, sítios e, até mesmo, na proteção e sombreamento do cacauero. Além disso, é considerada de grande importância na recuperação de vegetação degradada, pela sua rusticidade, rapidez de crescimento e disseminação, e atração para a fauna em geral (LORENZI, 2002).

Todas as partes da árvore são empregadas na medicina tradicional de alguns países. A decocção de frutos é usada como um diurético e febrífugo, a decocção da casca e as folhas como um emético e contra disenteria, hemorróidas, bem como utilizado para a gonorréia e leucorréia. As propriedades antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e antiviral têm sido relatadas. Chás das flores e das folhas são tomados para aliviar a dor de estômago, várias condições inflamatórias e curas da ferida. Além disso, tem sido demonstrado que o extrato da planta possui derivados fenólicos com propriedades antioxidantes e anti-herpes, o qual tem sido formulado para uso no Brasil (AYOKA, 2006).

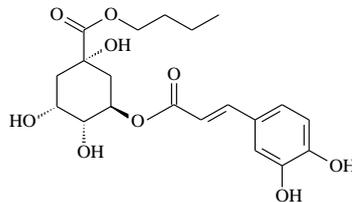
Portanto, é crescente a utilização da cajazeira na medicina popular e indústria farmacêutica. Foram isolados das folhas e caules de cajazeira, por meio de um ensaio biomonitorado, dois taninos elágicos e dois ésteres cafeoil, além do ácido clorogênico. Geranina, galloil-geranina, ácido 2-*O*-cafeoil-(+)-allohidroxicítrico e o éster butílico do ácido clorogênico mostraram acentuada atividade antiviral contra os vírus *Coxsackie* e *Herpes simplex* (CORTHOUT, 1991; CORTHOUT, 1992). Além destes foi isolado uma série de ácidos 6-alquenil-salicílico do extrato etanólico das folhas e caules de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), utilizada na medicina tradicional devido às suas propriedades antimicrobianas. Estes ácidos fenólicos apresentaram pronunciado efeito antibacteriano e moluscicida (CORTHOUT, 1994). Em outro estudo, um derivado do ácido anacárdico, SB-202742, isolado do extrato hexânico das folhas e ramos da planta apresentou propriedades inibidoras de beta-lactamases (COATES, 1994).



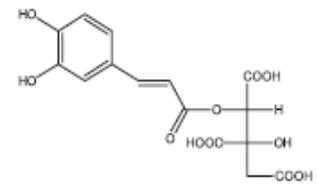
Geranina e galoil-geranina



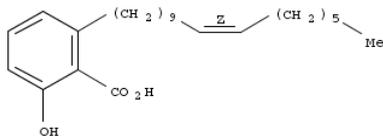
Ácido clorogênico



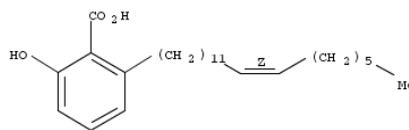
éster butílico do ácido clorogênico



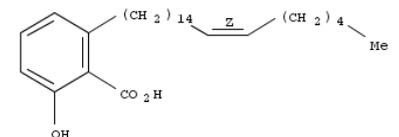
Ácido 2-O-caffeoil-(+)-allohidroxicátrico



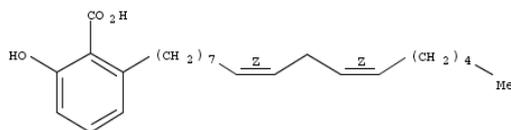
Ácido 6-(10'Z-heptadecenil)-salicílico



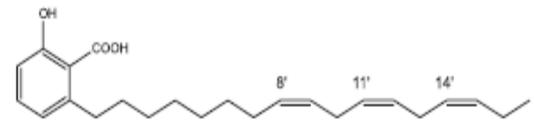
Ácido 6-(12'Z-nonadecenil)-salicílico



Ácido 6-(15'Z-heneicosenil)-salicílico



Ácido 6-(8'Z, 11'Z-heptadecadienil)-salicílico



SB 20742 (Ácido 6-(8'Z, 11'Z, 14'Z-heptadecatrienil)-salicílico)

**Figura 1.** Constituintes químicos de *S. mombin*

Pigmentos luteína e zeaxantina são boas fontes de carotenóides, os quais estão relacionados com a saúde dos olhos. Por muitos anos, o interesse nestes compostos deve-se principalmente ao fato de que eles são os pigmentos responsáveis pela cor atraente de muitas espécies e sua importância é conseqüentemente atribuída à polinização, dispersão de sementes e de sinalização em geral, aceitabilidade dos alimentos, etc. No entanto, os carotenóides são muito mais do que apenas pigmentos. Estes compostos podem nos proteger contra os efeitos nocivos dos radicais livres e têm efeitos benéficos na prevenção e/ou atenuação de doenças humanas, como doenças cardiovasculares, diversas tipos de câncer, distúrbios oculares,

eritemas induzida pela luz, etc. Dentro do grupo dos carotenóides comumente encontrados na dieta humana, o interesse nos possíveis benefícios a saúde associados à luteína e zeaxantina tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Assim, em triagem com legumes e frutas silvestres do Panamá, a cajá (*Spondias mombin*) apresentou teor de carotenóides totais de  $45,8 \pm 5,2 \mu\text{g/g}$ ; teor de  $8,6 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$  para luteína e de  $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$  para a zeaxantina (MURILLO, 2010).

Num trabalho utilizando headspace manual SPME-GC-MS para isolar e identificar os principais componentes do aroma de quatro frutas tropicais brasileiras mostrou que 34 compostos foram detectados no aroma do cajá. Os analitos identificados incluíram vários alcoóis, ésteres, compostos carbonílicos e terpenos (AUGUSTO, 2000), conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Compostos identificados no aroma de cajá após extração SPME

<b>Grupo</b>	<b>Composto</b>
Alcoóis	1-butanol
	Álcool amílico
	3-metil-2-buten-1-ol
	3-Hexen-1-ol
	1-Hexanol
Aldeído	n-Decil aldeído
Ésteres	Acetato de etila
	Butirato de metila
	Butirato de etila
	Acetato de butila
	Acetato de isoamila
	Butirato de isobutila
	Butirato de butila
	Caproato de etila
	Acetato de hexila
	Butirato de isoamila
	Benzoato de metila
	Benzoato de etila
	Butirato de hexila
Caprilato de etila	
Acetato de octila	
Cetonas	1-Penten-3-ona
Terpenos	$\alpha$ -Pineno
	Campheno
	Sabineno
	$\beta$ -Mirceno

Terpenos	Limoneno
	$\gamma$ -Terpineno
	Terpinoleno
	$\beta$ -Linalool
	Álcool Fenchil
	$\alpha$ -Terpineol
	Copaeno
	Cariophileno

### **n-Alquil fenóis**

Anacardiaceae é uma família constituída por aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies. Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardiaceae, Rhoeeae e Semecarpeae. A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus*. Nos últimos anos, a origem dos lipídios fenólicos e derivados também foi objeto de investigação; além disso, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas.

Assim, lipídeos fenólicos ou n-alquilfenóis estão amplamente distribuídos na família Anacardiaceae. Inicialmente estas substâncias foram encontradas em frutos e sementes de espécies de algumas famílias e, mais recentemente, sua ocorrência também tem sido observada em tecidos ou órgãos verdes, tais como folhas e caules (CORREIA, 2006).

Os lipídios fenólicos, também conhecidos por alquilfenóis ou ainda como fenóis de cadeia longa, e derivados são definidos como produtos naturais não-isoprênicos, que apresentam em sua estrutura grupos aromáticos e alifáticos e exibem ambos os comportamentos, hidrofílico e lipofílico. Normalmente são caracterizados pela presença de grupo fenol, ligado a uma cadeia alquílica com número ímpar de carbonos (CORREIA, 2006).

Além da variação em número e posição relativa dos grupos hidroxílicos no anel aromático, os lipídios fenólicos apresentam cadeias alquílicas com diferentes comprimentos, grau de insaturação e posição das ligações duplas. De modo geral, têm comprimento de cadeia lateral com um número ímpar de átomos de carbono, que varia de C<sub>15</sub>-C<sub>29</sub>. No entanto, os comprimentos mais comuns são C<sub>15</sub> e C<sub>17</sub>. Em cereais, ao contrário das outras fontes, misturas de lipídios fenólicos contêm uma variedade de homólogos com comprimento da cadeia lateral

variando de C<sub>15</sub>-C<sub>27</sub>. Considerando-se as posições das ligações duplas, elas ocorrem mais frequentemente em  $\Delta^8$ ,  $\Delta^{11}$  e  $\Delta^{14}$  (CORREIA, 2006).

### **Antioxidantes de origem vegetal**

Vários antioxidantes naturais já foram isolados de diferentes tipos de materiais vegetais, tais como sementes de oleaginosas, cereais, legumes, frutas, folhas, raízes, especiarias e ervas. Assim, vários compostos antioxidantes foram identificados nas sementes de citros, uva, manga, canola, girassol, primula, gergelim, sementes de linhaça, etc. No entanto, estudos relativos à atividade antioxidante das sementes de frutos tropicais e subtropicais têm sido pouco relatados (SOONG, 2004).

A indústria de alimentos gera quantidades significativas de resíduos de sementes a partir da produção de sucos, polpas congeladas e geléias de frutas. Estes resíduos podem ser utilizados como uma fonte de ingredientes para a indústria alimentícia, uma vez que sementes de muitas frutas têm alto teor de compostos fenólicos antioxidantes, fibra dietética, óleos e outros componentes. Essa prática reduziria o impacto sobre o meio ambiente (BAGETTI, 2009).

Assim, devido à falta de popularidade e da falta de aplicações comerciais, sementes de frutas não têm recebido muita atenção como fontes antioxidantes (ao contrário das sementes oleaginosas). Porém Soong e Barlow (2004) demonstraram um conteúdo significativamente mais elevado de compostos fenólicos e capacidade antioxidante total nas sementes dos frutos que em suas porções comestíveis. Os antioxidantes de origem residual poderiam ser utilizados como aditivos alimentares naturais para aumentar a estabilidade dos alimentos, evitando a oxidação lipídica. Além de sua capacidade antioxidante, compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonoides, possuem outras propriedades interessantes benéficas à saúde como atividades anticancerígena, antimicrobiana, antimutagênica e antiinflamatória, que pode ser explorada pela indústria farmacêutica (BAGETTI, 2009).

Além de compostos fenólicos, algumas sementes de frutas contêm outros compostos de importância nutricional que geralmente são subutilizados. Sementes de groselha (*Ribes nigrum*), por exemplo, contém excepcionalmente um elevado nível do desejável poliinsaturado ácido  $\gamma$ -linolênico, além do alto teor de fibra alimentar (BAGETTI, 2009).

Na literatura não foram encontrados dados relativos à composição e capacidade antioxidante de sementes de cajá e de siriguela. Além disso, a indústria de polpas gera quantidades significativas de resíduos de sementes que são descartadas sendo que poderiam

ser utilizadas para minimizar o desperdício de alimentos. Vale destacar que atualmente as sementes de cajá são um rejeito industrial ainda sem aplicação. Portanto agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico. Considerando que a caracterização de resíduos é o primeiro passo para estabelecer seu potencial de utilização, o objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade antioxidante de sementes de cajá e siriguela, bem como determinar a composição química das sementes de cajá.

## PARTE EXPERIMENTAL

Os solventes de grau analítico utilizados foram: hexano, diclorometano e o álcool etílico (Quimex). O antioxidante sintético butil-hidróxi-tolueno (BHT), de procedência Acros Organics e o Tween<sup>®</sup> 80 (*Synth*<sup>®</sup>). O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil),  $\beta$ -caroteno (95% de pureza), dissulfeto de dimetila e ácido linolênico (99% de pureza) utilizados foram da marca da Sigma Aldrich e o iodo resublimado e tiosulfato de sódio de procedência Merck. As medidas de absorção foram feitas usando-se espectrofotômetro UV-Vis VARIAN, modelo Cary 50.

Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200  $\mu\text{m}$ ; sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063  $\mu\text{m}$ , ambas de procedência da Acros. Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> da Merck. As placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254/365 nm).

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro da Varian, modelo GEMINI 2000 operando a 300 MHz (<sup>1</sup>H) e 75 MHz (<sup>13</sup>C), e em espectrômetro da Bruker, operando a 250 MHz (<sup>1</sup>H), utilizando-se CDCl<sub>3</sub> como solvente deuterado com grau de pureza superior a 99,8%, da marca Aldrich<sup>®</sup>. Os sinais dos espectros foram registrados com base nos sinais do solvente empregado em relação ao TMS.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por CG-EM, empregando-se cromatógrafo da Shimadzu modelo QP2010 equipado com coluna Rtx-1MS (Crossbond 100% dimetilpolisiloxano) 30,0 m x 0,25 mm, com filme de 0,25  $\mu\text{m}$ . As condições de operação das análises cromatográficas foram as seguintes: temperatura programada da coluna foi iniciada em 100 °C, com velocidade de aquecimento 5 °C/min até 200°C, e aumentada até 280°C a 10°C/min.; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura da interface de 280 °C; temperatura da fonte de íons de 250 °C; hélio foi empregado como gás de arraste (fluxo 0,8

mL/min). Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan*; voltagem do filamento de 70 eV; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo. Os ésteres metílicos foram identificados através de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8.

### **Extração e isolamento dos constituintes químicos**

As sementes das frutas foram secas e trituradas obtendo-se 172,38 g (cajá) e 111,12 g (siriguela). O material seco e pulverizado foi submetido a três extrações consecutivas com etanol por 48 horas, seguida de concentração sob pressão reduzida. O extrato em etanol obtido foi redissolvido em EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3) e em seguida particionado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, originando as fases diclorometano e hidroetanólica. A fase diclorometano foi concentrada em rota evaporador e pesada (4,49 g da cajá e 0,79 g da siriguela).

Os extratos em diclorometano das sementes de cajá e siriguela denominado respectivamente de EDCM-SC (4,49 g) e EDCM-SS (0,79 g) foram submetidos a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) em gel de sílica 60, utilizando como fase móvel o sistema Hexano:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 22 frações de EDCM-SC e 17 frações de EDCM-SS de aproximadamente 50 mL cada e posteriormente submetidas a agrupamento após análise em CCDC.

As frações de EDCM-SC eluídas com Hexano:AcOEt (9:1) e (8:2) forneceram o triglicerídeo (2 g). As frações eluídas do extrato original com Hexano:AcOEt (7:3) (83,0 mg) foram refracionadas em CC, empregando-se misturas de Hexano:AcOEt como eluente. Assim, as subfrações eluídas com 9:1 Hexano:AcOEt levaram à obtenção de uma mistura de n-alkil fenóis (12,3 mg). As frações do extrato original eluídas com Hexano:AcOEt (5:5) originaram uma mistura (79,6 mg) constituída de β-sitosterol e estigmasterol.

### **Reação de transesterificação**

O procedimento empregado na obtenção dos ésteres metílicos do triglicerídeo consistiu no tratamento da fração (25,0 mg) com solução de metóxido de sódio (0,5 M) em metanol (2,0 mL). O isolamento dos ésteres metílicos foi realizado após adição de água destilada à mistura reacional, seguido de extração com hexano ou DCM (CORREIA, 2008).

## Reação de Tioalquilação

As substâncias contendo cadeia alquílica insaturada foram submetidas à reação de adição com dissulfeto de dimetila, utilizando iodo resublimado como catalisador. O procedimento utilizado consistiu em tratar 3,0 mg da amostra com 1,0 mL do dissulfeto de dimetila seguido da adição de 100  $\mu$ L de solução de iodo (6 mg/1000  $\mu$ L). O sistema foi purgado com nitrogênio e mantido fechado sob agitação magnética por 24-48 h em temperatura ambiente, tratando-se em seguida o sistema com 1 mL de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 5%. Posteriormente a mistura binária foi separada em funil de separação, e o solvente foi eliminado à pressão reduzida em evaporador rotatório (CORREIA, 2005).

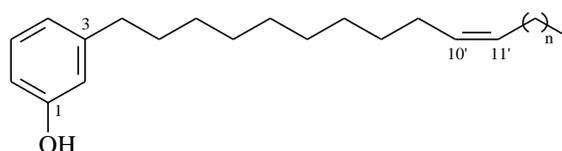
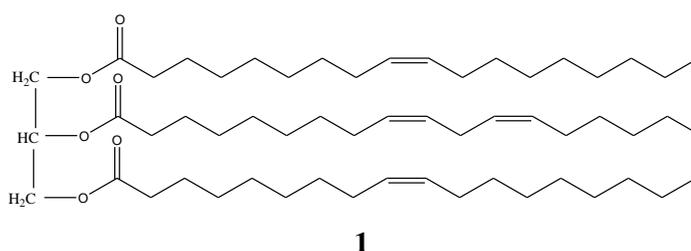
## Teste do sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)

A determinação do percentual de sequestro de radical livre foi realizada de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2 (Página 22).

As amostras foram avaliadas nas concentrações de 0,6, 1,2 e 2,4 mg/mL e o padrão ácido gálico, 5 mg/mL.

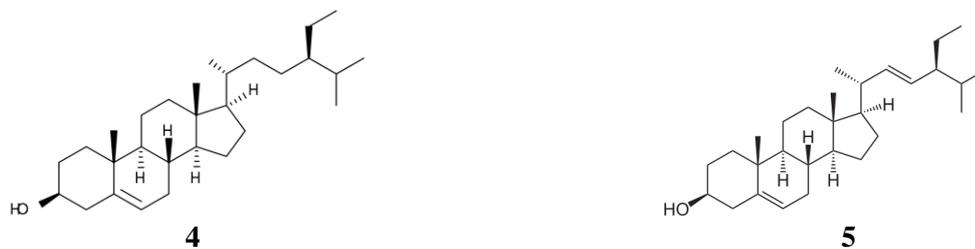
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do extrato DCM obtido das sementes de *S. mombin* foram isolados por técnicas cromatográficas o triglicerídeo **1**, os alquenil fenóis **2** e **3**, além de uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (Figura 2).



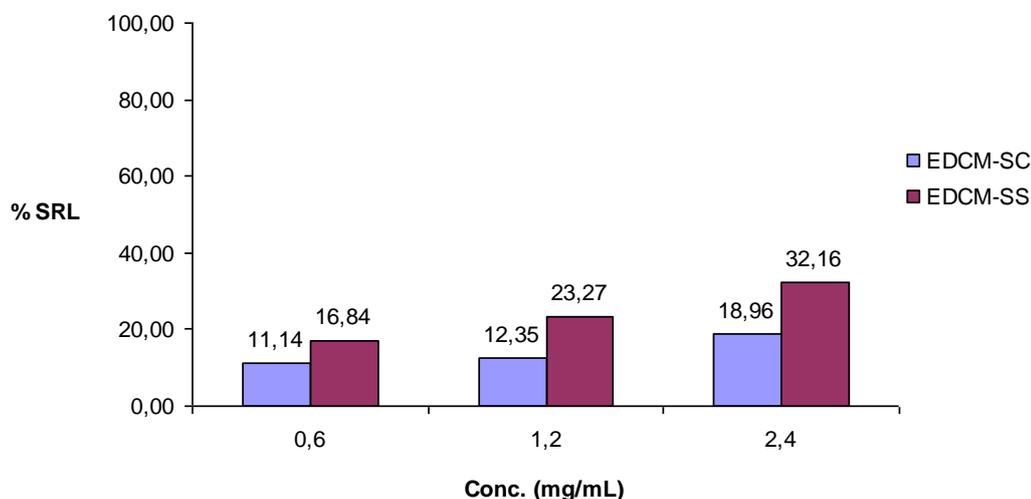
**2** n=6

**3** n=10



**Figura 2.** Substâncias isoladas das sementes de *Spondias mombin*

Analisando os resultados do % SRL verifica-se que os extratos DCM das sementes da cajá e siriguela, possuem baixa capacidade de sequestro de radical livre nas concentrações testadas.



**Figura 3.** % SRL dos extratos diclorometano das sementes de cajá e siriguela

Desta forma, a baixa capacidade de sequestrar radicais livres apresentada por esses extratos deve-se a menor concentração de compostos fenólicos presentes. Ou seja, estes extratos provavelmente não contem substâncias que apresentam capacidade de doar hidrogênio para o radical DPPH. Observa-se também um aumento do % SRL com o aumento da concentração dos extratos e, portanto o % SRL depende da concentração do extrato aplicado ao teste.

O rendimento do óleo foi obtido pela expressão:  $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do óleo/massa da amostra}) \times 100$ . Assim, os rendimentos obtidos para o óleo das sementes de *S. mombin* e *S. purpurea* foram 2,60 % e 0,71 %, respectivamente.

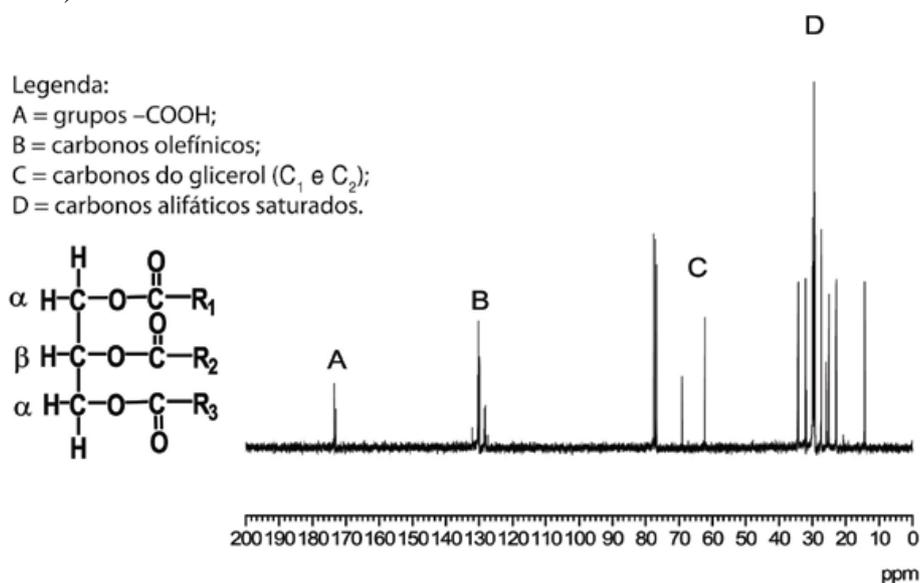
## Identificação de Triglicerídeos

Nas plantas, os triacilgliceróis constituem uma importante reserva de energia em frutas e sementes, visto que contêm consideráveis quantidades de ácidos graxos insaturados, como oléico e linoléico. Os triacilgliceróis (TG) estão presentes em diversos óleos vegetais e seus métodos de análise têm atraído bastante atenção nas últimas décadas.

Óleos vegetais são componentes importantes de nossa dieta. Assim, suas propriedades organolépticas, estabilidade oxidativa e influência no consumo humano são totalmente dependentes da composição do óleo, e por esta razão sua caracterização é muito importante (GUILLEN, 2003).

Óleos comestíveis são constituídos basicamente por triglicerídeos com diferentes padrões de substituição, comprimentos e graus de saturação das cadeias, e por outros componentes minoritários. Existem aqueles em que o grupo acil principal é o grupo oléico, linoléico ou o linolênico em proporção significativa.

RMN é uma importante ferramenta no estudo dos alimentos como óleos e gorduras, onde a RMN de  $^{13}\text{C}$  também pode ser usada no estudo de lipídeos em alimentos. Analisando o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de um óleo vegetal (Figura 4), quatro regiões bem distintas no espectro podem ser descritas:  $\delta$  173,3-172,8 ppm (A) região dos carbonos dos grupos carboxilas;  $\delta$  132,0-127,1 ppm (B), região dos carbonos olefínicos;  $\delta$  69,1-61,6 ppm, região dos carbonos do glicerol (C) [C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>]; e  $\delta$  34 ppm (D), onde estão presentes os carbonos alifáticos saturados. Quando se analisa a região dos grupos carboxílicos, os substituintes nas posições 1 e 2 do glicerol podem ser distinguidos, porque mostram intensidades diferentes (REDA, 2007).



**Figura 4.** Espectro genérico de RMN de  $^{13}\text{C}$  de óleo vegetal (REDA, 2007)

Dentre os deslocamentos químicos mais característicos pode-se destacar aqueles em  $\delta \sim 34$  ppm correspondentes aos grupos  $\alpha$ -metilênicos em relação à carboxila; os grupos  $\text{CH}_2$  saturados encontram-se em  $\delta \sim 30,0-28,5$  ppm; os  $\text{CH}_2$  alílicos podem ser encontrados em  $\delta \sim 27,5$  ppm; os  $\text{CH}_2$  bis-alílicos, são observados em  $\delta \sim 26,0-25,0$  ppm; os carbonos  $\beta$ -carbonílicos são observados em  $\delta \sim 25$  ppm e as metilas podem ser observadas em  $\delta \sim 14$  ppm.

A presença de sinais em  $\delta \sim 27$  ppm, região dos carbonos alílicos externos às ligações duplas da cadeia carbônica, indica a presença dos ácidos linolênico e linoléico ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, respectivamente), característico de óleos vegetais. Os sinais em  $\delta \sim 132, 127$  e  $20$  ppm, quando presentes nos óleos vegetais, demonstram a presença exclusivamente de  $\omega$ -3 (ácido linolênico), pois somente este ácido graxo pode gerar sinais neste deslocamentos químicos (REDA, 2007).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra região característica dos sinais olefínicos, isto é, em  $\delta \sim 128$  a  $\delta \sim 131$  ppm. Amostras contendo predominantemente ácido monoenoico apresentam dois picos largos em  $\delta \sim 129,7$  e  $\delta \sim 129,9$ . A presença de sinais adicionais nas regiões de campo alto (aproximadamente  $\delta 127,9$  e  $\delta 128,1$ ) indica a presença de ácido graxo poliinsaturado (SHIAO, 1989).

Além disso, os deslocamentos químicos associados ao carbono do glicerol são úteis para análises quantitativas e qualitativas, especialmente os sinais do glicerol-2 (glic-2). Sinais de carbono 2 do glicerol são registrados entre 68 e 75 ppm, e os sinais dos carbonos 1 e 3 do glicerol, entre 61 e 66 ppm. Em moléculas simétricas, os sinais do glic-1 e glic-3 são os mesmos, diferindo assim das moléculas não simétricas (GUNSTONE, 2007).

Alguns estudos tem demonstrado que a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  de alta resolução é uma técnica que pode fornecer informações valiosas sobre a distribuição posicional do grupo acil (1,3-acil e 2-acil) de triacilgliceróis de diferentes óleos vegetais. Assim, a principal vantagem da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  é que ela permite a caracterização de óleos vegetais em termos de distribuição posicional do grupo acil enquanto que, devido à forte sobreposição dos sinais, um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não nos permite obter este tipo de informação. Além disso, o método convencional enzimático utilizado para avaliar a distribuição das cadeias de gordura na porção glicerol não é preciso (MANNINA *et al.*, 1999).

Algumas observações podem ser feitas sobre a distribuição dos principais componentes de ácidos graxos entre as posições 1,3 e posição 2 do glicerol, a partir dos resultados da região da carbonila do espectro de  $^{13}\text{C}$ . Nesse sentido, os ácidos graxos saturados são totalmente distribuídos na posição 1,3 enquanto que, os ácidos graxos

insaturados são mais abundantes na posição 2. Vale ressaltar que, entre os ácidos graxos insaturados, o ácido linoléico tem uma maior distribuição na posição 2 do que o ácido oléico (MANNINA *et al.*, 1999).

Desta forma, RMN de alta resolução tem sido aplicada para determinar a composição de ácidos graxos de triacilglicerídeos em sementes de plantas e gorduras de origem animal.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de qualquer óleo vegetal comestível apresenta no mínimo nove sinais de intensidade significativa, e em alguns casos 10; estes sinais são devido aos hidrogênios dos principais componentes, os triglicerídeos (Tabela 2) (GUILLEN<sup>b</sup>, 2003).

**Tabela 2.** Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de óleos vegetais

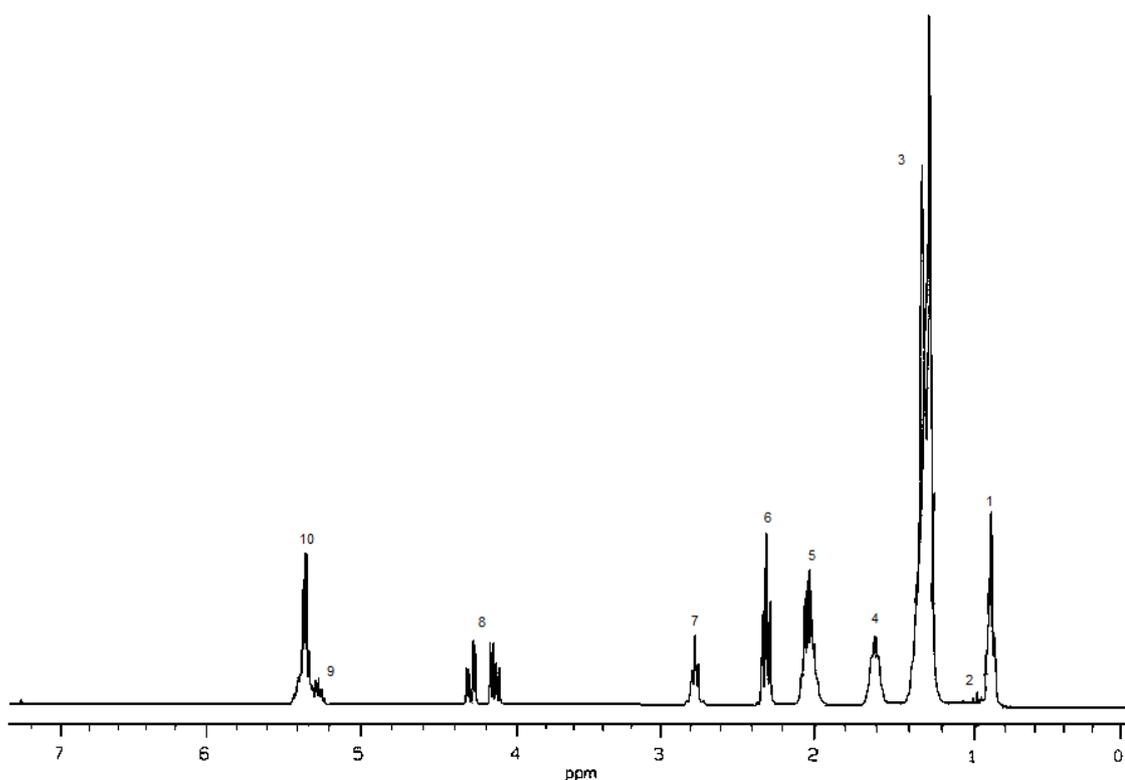
Sinal	Deslocamento químico (ppm)	Grupo funcional
1	0,83-0,93	$-\text{CH}_3$ (grupos acil saturado, oléico e linoléico)
2	0,93-1,03	$-\text{CH}_3$ (grupo acil linolênico)
3	1,22-1,42	$-(\text{CH}_2)_n$ (grupo acil)
4	1,52-1,70	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (grupo acil)
5	1,94-2,14	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (grupos acil)
6	2,23-2,36	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ (grupo acil)
7	2,70-2,84	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (grupo acil)
8	4,10-4,32	$-\text{CH}_2\text{OCOR}$ (grupo gliceril)
9	5,20-5,26	$>\text{CHOCOR}$ (grupo gliceril)
10	5,26-5,40	$-\text{CH}=\text{CH}-$ (grupo acil)

Assim, como pode ser observado na Tabela 2 e Figura 5 (página 89), os sinais referentes aos hidrogênios metílicos ( $-\text{CH}_3$ ) de grupos acil saturados, oléico e linoléico fornecem o sinal 1 entre 0,83 e 0,93 ppm. O sinal 3 é causado por hidrogênios metilênicos na posição  $\beta$  às ligações duplas ou  $\gamma$  ao grupo carbonil ( $-(\text{CH}_2)_n-$ ). Os deslocamentos químicos desses sinais dos hidrogênios metilênicos estão entre 1,22 e 1,42 ppm. Em estudos anteriores usando grupos acil palmítico, oléico, linoléico e linolênico como padrões, os sinais e deslocamentos químicos obtidos dos hidrogênios metilênicos foram os seguintes: ácido palmítico, um único sinal em 1,194 ppm; ácido oléico, um único sinal em 1,23 ppm; e ácidos linoléico e linolênico, um sinal de mesmo deslocamento químico (1,28 ppm) em ambos os casos.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos  $\beta$ -carbonílicos ( $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) aparecem entre 1,52 e 1,70 ppm (sinal 4). O sinal 5 (entre 1,94 e 2,14 ppm) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é devido aos hidrogênios  $\alpha$ -metilênicos em relação a dupla ligação ( $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), também chamados de hidrogênios alílicos. Sinal 6 é devido aos hidrogênios metilênicos na posição  $\alpha$

em relação ao grupo carbonílico (-OCO-CH<sub>2</sub>-) e aparece entre 2,23 e 2,36 ppm. O sinal 7 é devido aos hidrogênios metilênicos na posição  $\alpha$  em relação à duas ligações duplas (=CH-CH<sub>2</sub>-CH=), também chamados de hidrogênios *bis*-alílicos, e aparece entre 2,70 e 2,84 ppm; este sinal é devido aos grupos acil linoléico e linolênico.

Sinal 8, em 4,10-4,32 ppm, é devido aos hidrogênios dos carbonos 1 e 3 do grupo glicerol (-CH<sub>2</sub>OCOR), enquanto sinal 9, em 5,20-5,26 ppm, é devido ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do mesmo grupo glicerol (>CHOCOR). Este último sinal se sobrepõe ligeiramente com sinal 10, em 5,26-5,40 ppm, referente aos hidrogênios olefínicos (-CH=CH-) dos diferentes grupos acil (GUILLÉN<sup>a</sup>, 2003).



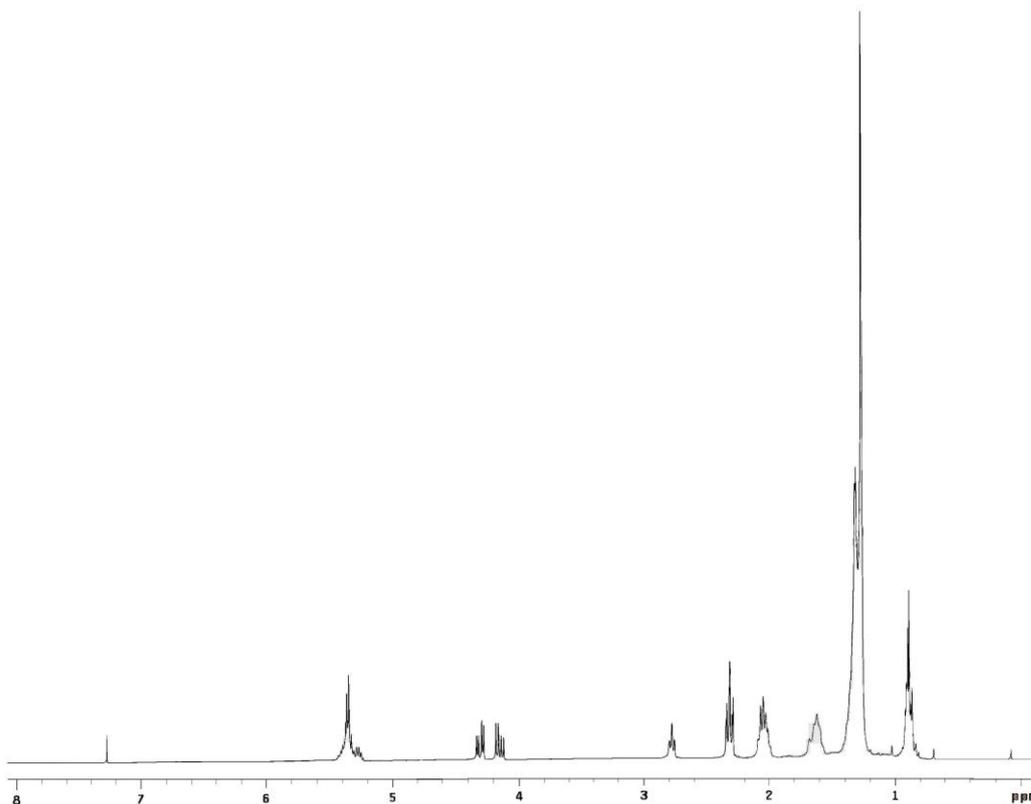
**Figura 5.** Espectro genérico de RMN de <sup>1</sup>H de óleos vegetais (GUILLÉN<sup>a</sup>, 2003).

### **Identificação dos Triglicerídeos presentes em *S. mombin***

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H de EDCM-SC (2-6) em conjunto com experimentos DEPT 135° apresentaram sinais para 57 átomos de carbono e 102 átomos de hidrogênio permitiram propor a fórmula molecular C<sub>57</sub>H<sub>102</sub>O<sub>6</sub>.

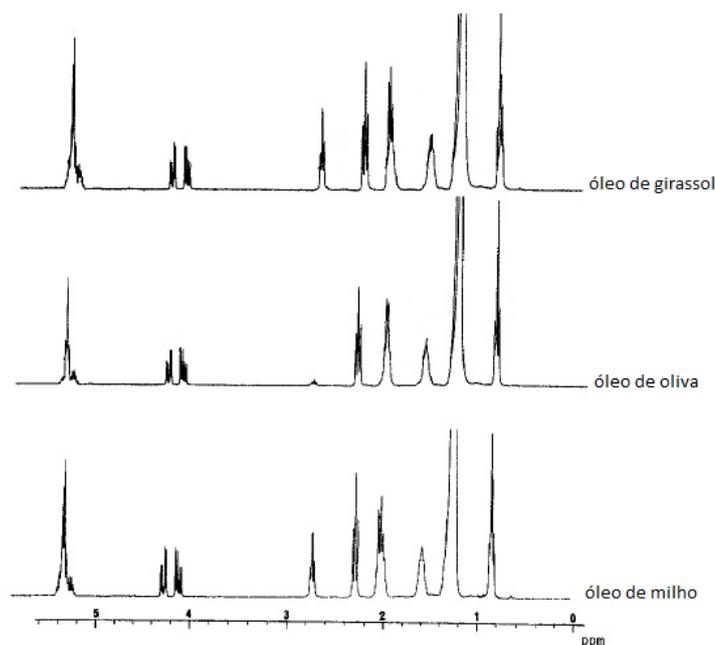
Análise detalhada do espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 6, página 90; Tabela 3, página 94) permitiu concluir que esta substância era um triacilglicerídeo devido a presença do tripleto em 0,89 ppm referentes aos hidrogênios metílicos; sinal em 1,23 ppm referentes aos hidrogênios

dos grupos metilênicos ( $\beta$ -olefínicos ou  $\gamma$ -carbonílicos); sinal em 1,62 ppm referente aos hidrogênios metilênicos  $\beta$ -carbonílicos; sinal em 2,05 ppm, referente aos hidrogênios alílicos; sinal em 2,32 ppm referente aos hidrogênios metilênicos  $\alpha$ -carbonílicos; sinal em 2,77 ppm correspondente aos hidrogênios *bis*-alílicos; sinal em 4,23 ppm correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol (C1 e C3); sinal em 5,26 ppm correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do glicerol; e o sinal em 5,35 ppm correspondente aos hidrogênios olefínicos.



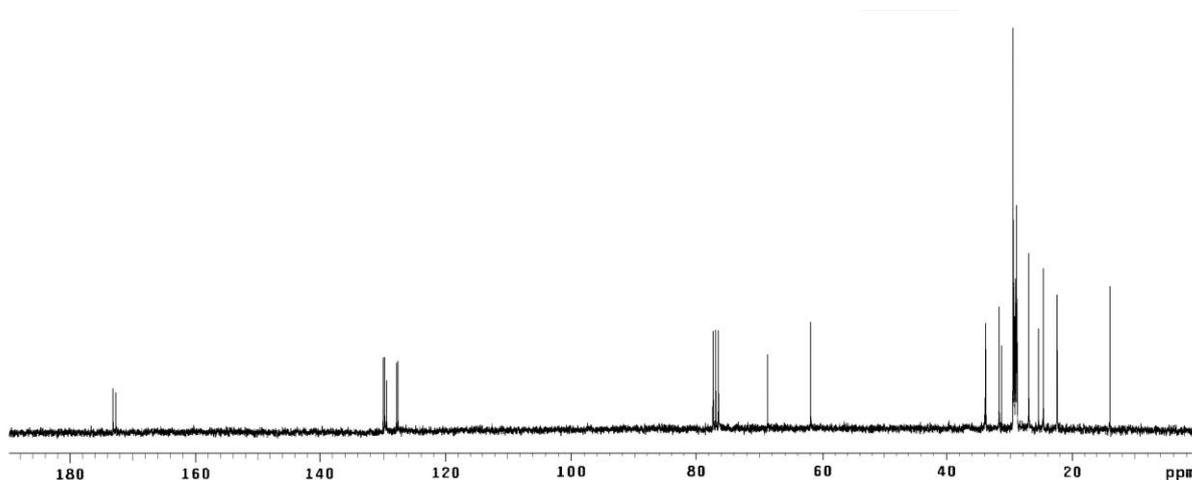
**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triglicerídeo isolado [(300 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ]

Comparando o espectro de  $^1\text{H}$  do triglicerídeo isolado das sementes de cajá com os espectros do óleo de girassol, óleo de oliva e do óleo de milho (Figura 7), verifica-se que apresentam perfis muito semelhantes principalmente com os óleos de girassol e milho.

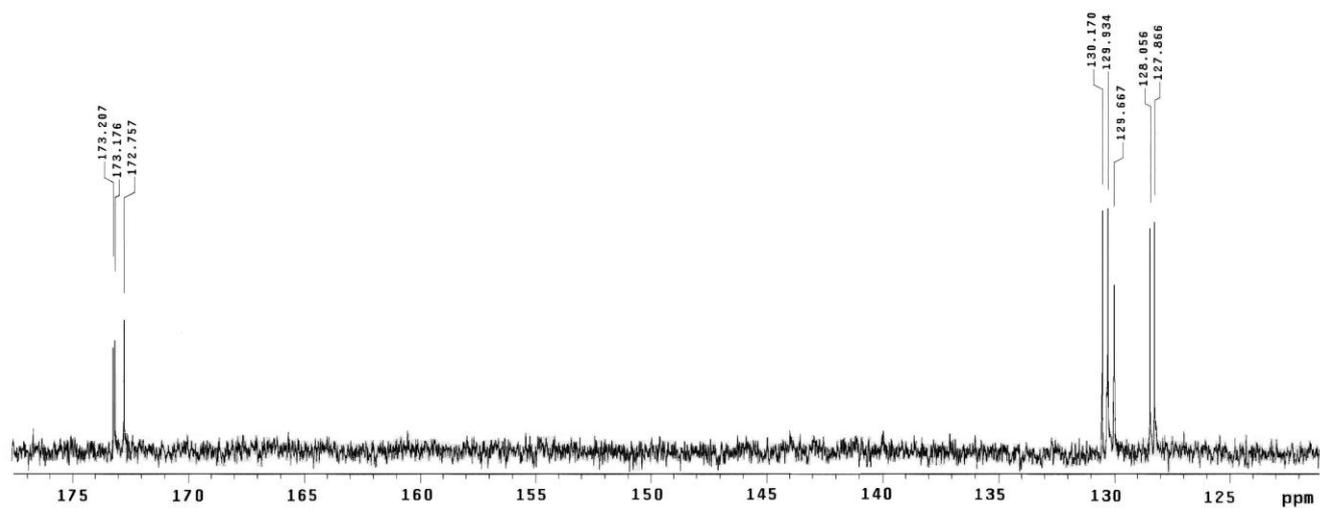


**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de três óleos vegetais (Shiao, 1989)

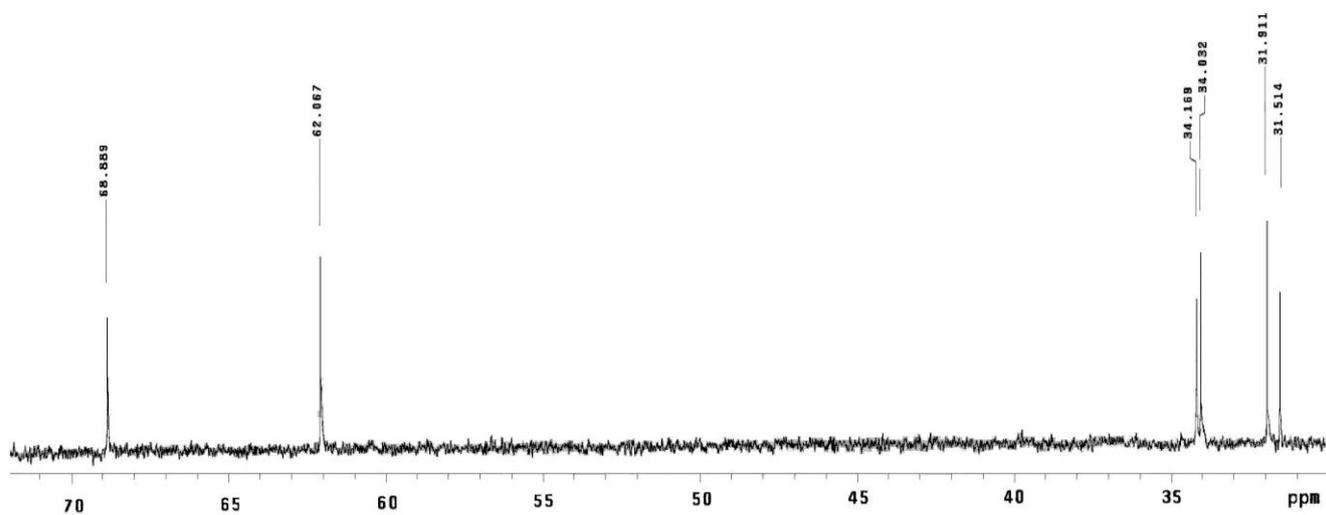
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 8, página 91; Tabela 3, página 94) aliado ao experimento DEPT  $135^\circ$  (Figura 12, página 93) mostraram sinais para carbonos carboxílicos em  $\delta$  173,2 e 172,8; olefínicos em  $\delta$  130,2, 129,9, 129,7 e, em 128,1, 127,9, indicando a presença de ácido graxo poliinsaturado e os carbonos C1 e C2 do glicerol ( $\delta$  68,9 e 62,1). Deslocamentos químicos em  $\delta$  34,2 e 34,0 correspondem aos grupos  $\alpha$ -metilênicos em relação à carboxila; os grupos  $\text{CH}_2$  saturados encontram-se em 31,9-22,5 ppm; os  $\text{CH}_2$  alílicos externos à  $\text{C}=\text{C}$ , estão em  $\delta$  27,2 ppm; os  $\text{CH}_2$  olefínicos internos, são observados em  $\delta$  25,6 ppm; os carbonos  $\beta$ -carbonílicos são observados em  $\delta$  24,9 ppm e as metilas foram observadas em  $\delta$  14,0 e 14,1 ppm.



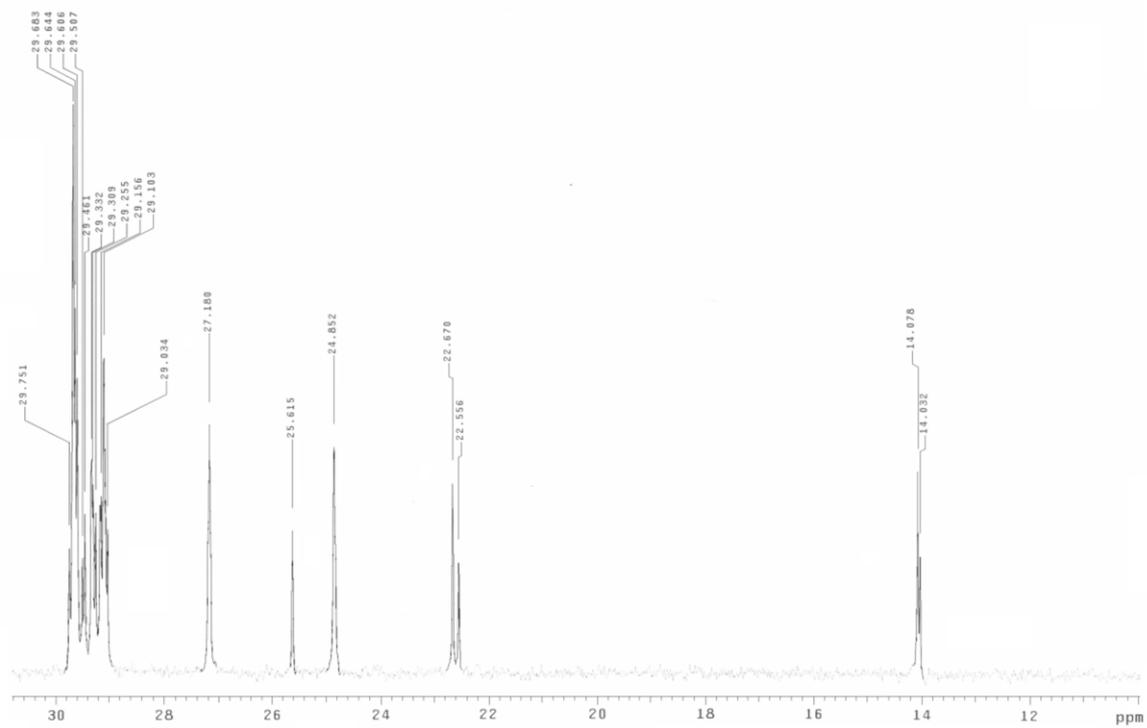
**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triglicerídeo isolado [(75 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ]



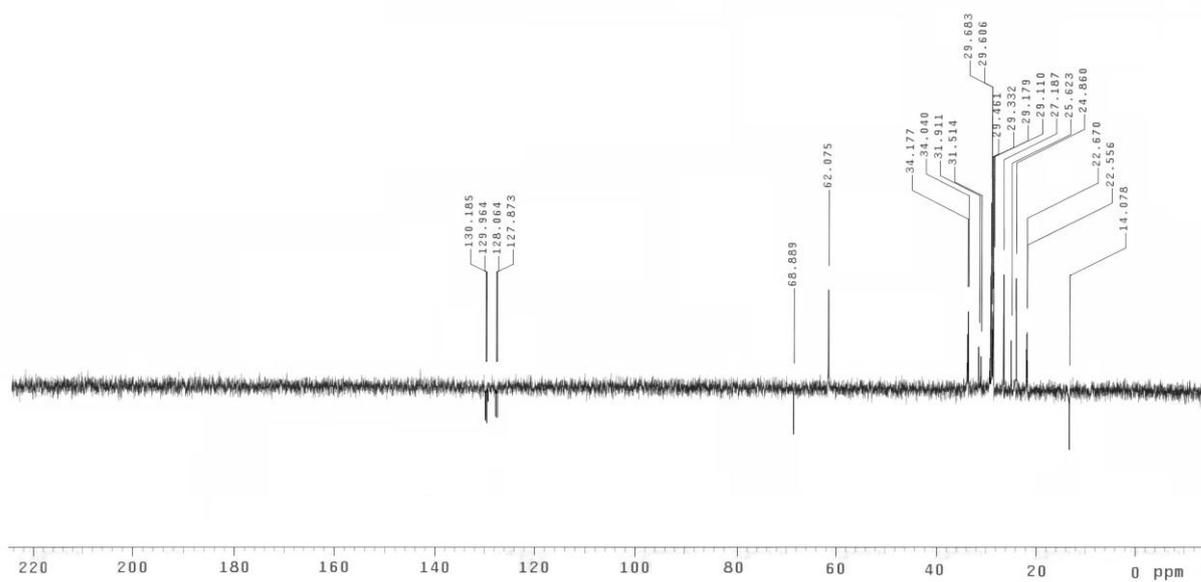
**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triglicerídeo (ampliação) [(75 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triglicerídeo (ampliação) [(75 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 11.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do triglicérido (ampliação) [(75 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

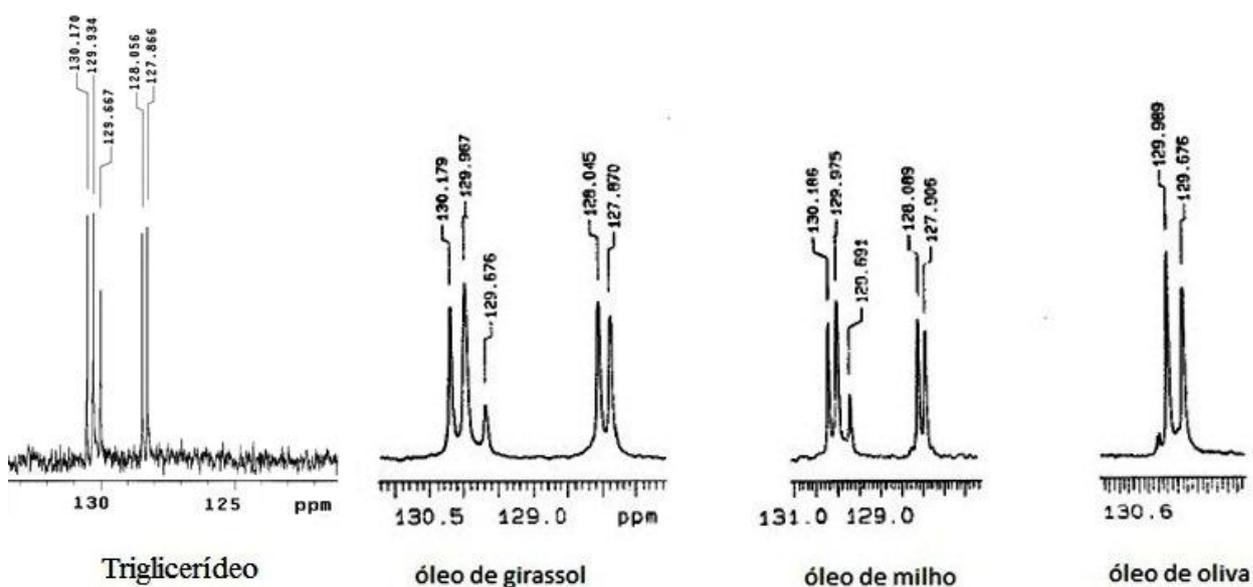


**Figura 12.** Experimento DEPT 135° do triglicérido isolado [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

**Tabela 3.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\delta$  (ppm)],  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\delta$  (ppm)] do triglicerídeo

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	173,2
	-	172,8
2	2,32	34,0
	2,32	34,2
3	1,62	24,9
	1,62	24,9
4	1,29	29,1
	1,29	29,0
5	1,29	29,2
	1,29	29,2
6	1,29	29,1
	1,29	29,1
7	1,29	29,7
	1,29	29,6
8	2,05	27,2
	2,05	27,2
9	5,35	129,7
	5,35	129,9
10	5,35	129,9
	5,35	128,1
11	2,05	27,2
	2,77	25,6
12	1,29	29,8
	5,35	127,9
13	1,29	29,4
	5,35	130,2
14	1,29	29,6
	2,05	27,2
15	1,29	29,3
	1,29	29,3
16	1,29	31,9
	1,29	31,6
17	1,29	22,7
	1,29	22,6
18	0,89	14,1
	0,89	14,0
CHO	5,26	68,9
CH <sub>2</sub> O	4,23	62,1

A Figura 13 mostra os deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos do triglicerídeo e dos óleos de girassol, milho e oliva. O óleo de oliva contém predominantemente ácido monoenólico, pois apresenta dois sinais em  $\delta$  129,67 e  $\delta$  129,97. A presença de sinais adicionais em  $\delta$  127,9 e  $\delta$  128,1 indica a presença de ácido graxo insaturado, como é o caso dos óleos de girassol e milho. Assim, pode afirmar que o triglicerídeo isolado apresenta qualidade comparável aos óleos de girassol e milho.



**Figura 13.** Deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos dos óleos vegetais

Desta forma, através da análise destes dados e comparação com dados da literatura foi possível identificar a substância como sendo um triacilglicerol misto do tipo ABA, denominado glicerol 1,3-dioleoil-2-linoleoil (OLO) (JIE, 1995).

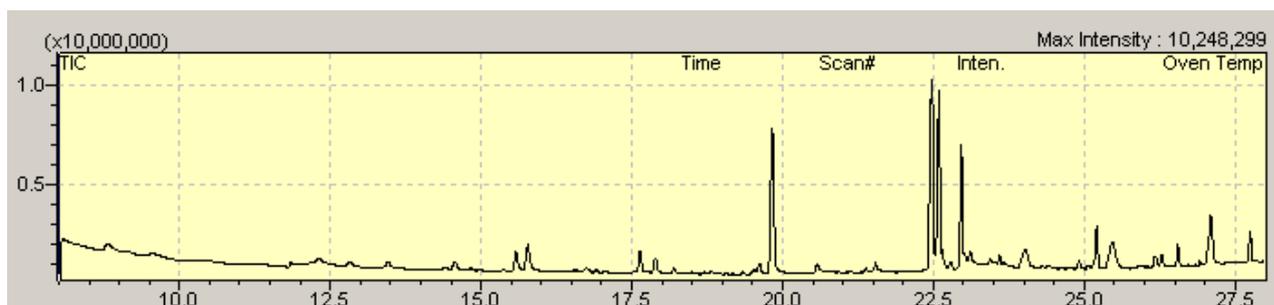
### **Obtenção e identificação dos ésteres metílicos de *S. mombin***

Após derivatização do triglicerídeo por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos correspondentes, estes foram analisados por CG-EM. No cromatograma (Figura 15, página 96) foram registrados cinco picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  270,  $m/z$  294,  $m/z$  296,  $m/z$  298 e  $m/z$  466 fragmentos são correspondentes ao hexadecanoato de metila, 8,11-octadecadienoato de metila, 9-octadecenoato de metila, octadecanoato de metila e ao triacontanoato de metila, respectivamente. Estes resultados

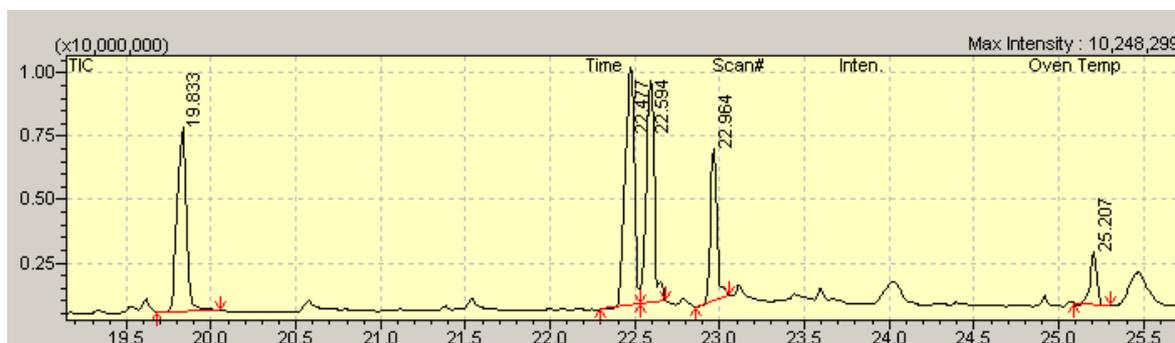
permitem sugerir que os compostos da mistura se encontram esterificados, principalmente com os ácidos palmítico (hexadecanóico), linoléico (9,12-octadecadienóico), oléico (9-octadecenoico), esteárico (octadecanóico) e melíssico (triacontanóico).

**Tabela 4.** Determinação da composição em ácidos graxos no triglicerídeo

Pico	% Área ± DP	Tempo de retenção	Fórmula molecular	Nome	Estrutura
1	25,795± 1,520	19,834	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Hexadecanoato de metila	$\text{MeO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{Me}$
2	31,660±0,580	22,479	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	8,11-Octadecadienoato de metila	$\text{MeO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{Me}$
3	24,415±1,407	22,596	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	9-Octadecenoato de metila	$\text{MeO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{Me}$
4	13,870±0,226	22,965	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Octadecanoato de metila	$\text{MeO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{Me}$
5	4,255±0,460	25,208	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub> O <sub>2</sub>	Triacotanoato de metila	$\text{MeO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{28}-\text{Me}$



**Figura 14.** Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos



**Figura 15.** Expansão do cromatograma dos ésteres metílicos obtidos

Vale ressaltar que a identificação dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8 com similaridade maior que 90%, com exceção do triacontanoato de metila cuja similaridade foi de 73%. Assim, admite-se que a provável composição do triglicerídeo isolado das sementes de *S. mombin* seja da mistura destes ésteres.

**Tabela 5.** Composição em ácidos graxos do triglicerídeo isolado das sementes de *S. mombin*

Ácido graxo	% ± DP
Palmítico, C16:0	25,795± 1,520
Linoléico, C18:2	31,660±0,580
Oléico, C18:1	24,415±1,407
Esteárico, C18:0	13,870±0,226
Melíssico, C30:0	4,255±0,460
Ácidos graxos insaturados	56,08
Ácido graxos saturados	43,92
Total identificado	100

DP: desvio padrão

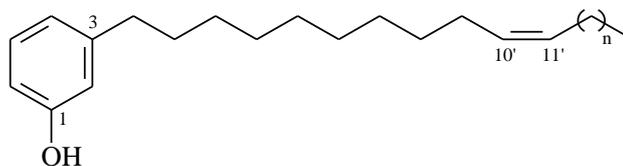
Desta forma, o óleo apresentou como componente majoritário dos triglicerídeos, o ácido linoléico (C18:2; 31,66 ± 0,58%). Os ácidos graxos insaturados e saturados somaram 56,08 e 43,92%, respectivamente.

### **n-Alquil fenóis**

Os n-alkil fenóis fazem parte de um grupo de produtos naturais relativamente pouco conhecido, e que podem ser comparados estruturalmente com ácidos carboxílicos de cadeia longa, onde no lugar do grupo carboxílico do ácido existe um anel aromático. Essas substâncias geralmente ocorrem como misturas homólogas que variam principalmente no número e posição das insaturações, com certo predomínio de cadeia alquílica com 15 ou 17 átomos de carbono. Essa predominância está de acordo com o número de carbonos dos ácidos graxos de maior ocorrência no reino vegetal que variam de 16 a 18 átomos de carbono.

Além da variação no número e posição relativa de hidroxilas, os n-alkil fenóis apresentam cadeias alquílicas com diferentes comprimentos, grau de insaturação e posição da ligação dupla. A maior ocorrência está relacionada aos derivados com 15 e 17 átomos de carbono na cadeia lateral contendo uma, duas ou três insaturações. Pode-se concluir, através de estudos, que as posições mais frequentes da ligação dupla são as C-8, C-11 e C-14.

## Identificação da mistura de n-alkil fenóis 2 e 3



2 n=6

3 n=10

1-hidroxi-3-[(Z)-10'-octadecenil]-benzeno

1-hidroxi-3-[(Z)-10'-docosenil]-benzeno

A determinação estrutural da mistura de alquil fenóis isolada de *Spondias mombin* foi estabelecida através da análise dos dados obtidos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , aliados aos dados do espectro de massas.

O EM-ESI registrado em modo negativo apresentou íons *pseudo*-moleculares [M-1] em  $m/z$  343 e 399 (Figura 17, página 99). Estes dados aliados a dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  permitiram propor as fórmulas moleculares  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}$  e  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$  para as duas substâncias.

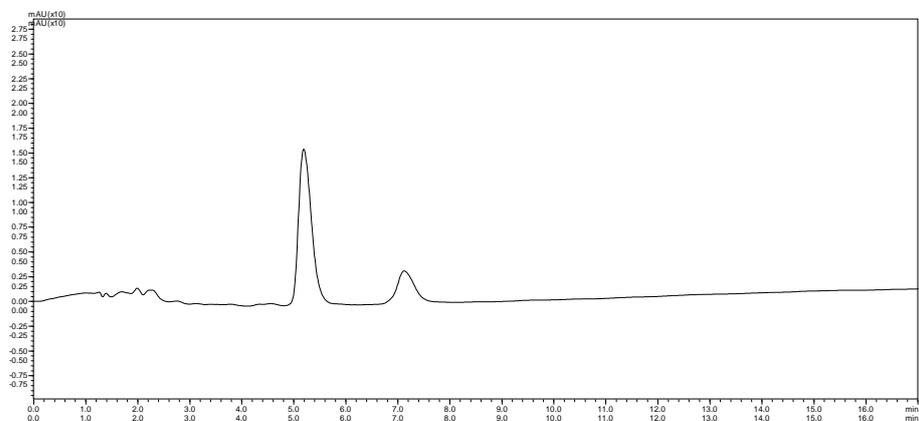
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18, página 100) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos, cuja integração correspondia a quatro hidrogênios, sugerindo a presença de anel aromático dissustituído. No entanto, a multiplicidade dos sinais não pode esclarecer o padrão de substituição do anel.

O padrão de substituição do anel foi sugerido através da comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com dados descritos na literatura, considerando-se o efeito dos diferentes substituintes no deslocamento químico do carbono. Desta forma, apesar da similaridade entre os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel, no isômero *meta* dissustituído, ao contrário do *orto* dissustituído, o carbono C-3 não sofre proteção do grupo hidroxila em *orto* absorvendo assim em  $\delta$  144,9.

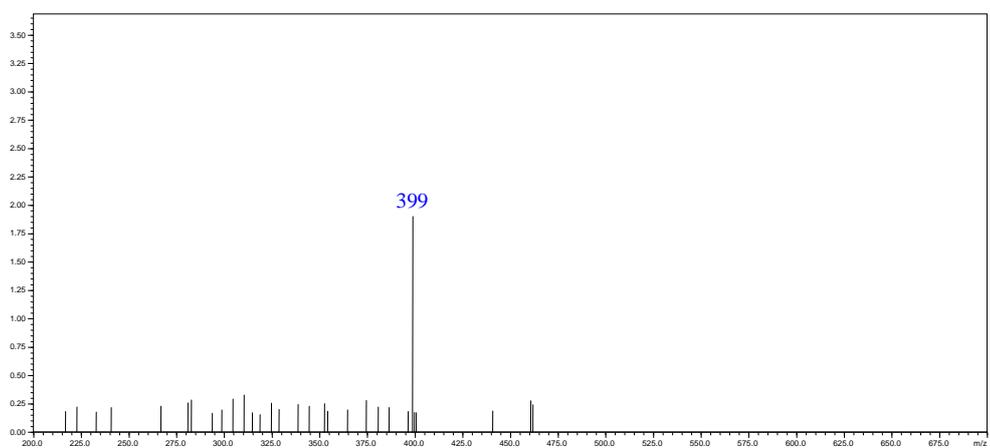
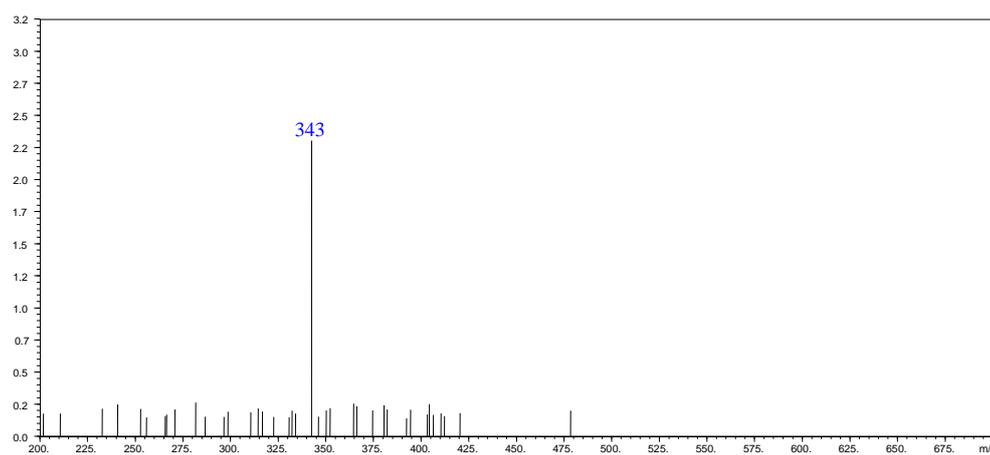
A presença do sinal em  $\delta$  5,35, integrando para dois hidrogênios, foi indicativo de hidrogênios olefínicos sendo que as constantes de acoplamento ( $J = 4,75$  Hz) sugeriram uma configuração Z entre eles. Esses dados juntamente com os sinais de hidrogênios entre  $\delta$  0,90-2,50 sugeriram a presença da cadeia alquênica como o outro substituinte do anel aromático dissustituído (Figura 19, página 101).

A análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  confirmou a presença de um anel dissustituído, através dos sinais relativos a apenas dois carbonos quaternários na região de aromáticos em  $\delta$  155,4 e  $\delta$  144,9. Os sinais dos carbonos metínicos foram consequentemente, atribuídos ao anel

aromático considerando o efeito da cadeia alquílica e do grupo hidroxílico no deslocamento químico.



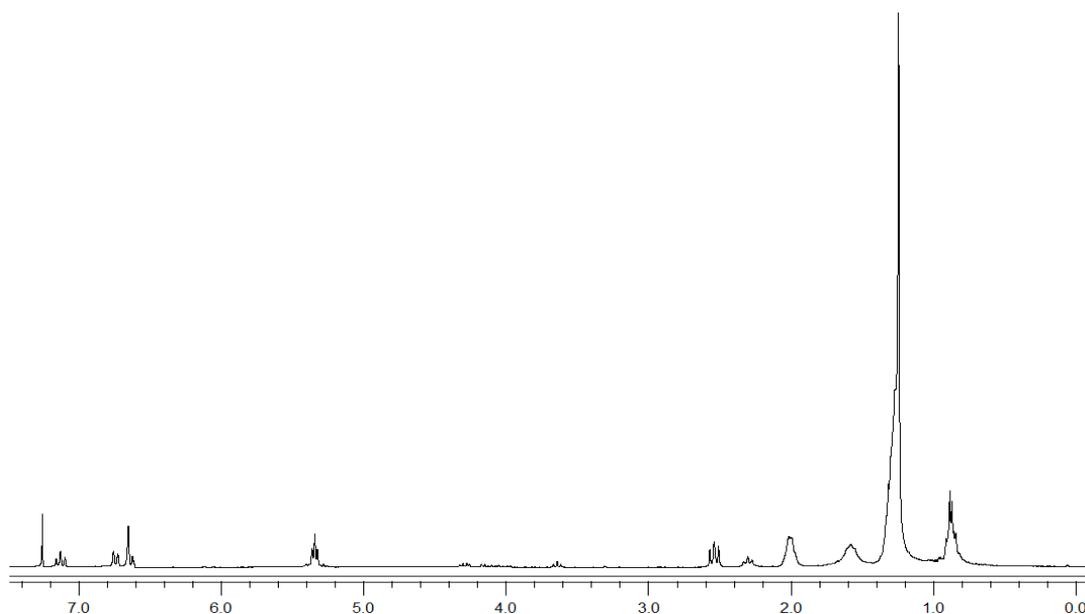
**Figura 16.** Cromatograma da mistura de n-álquil fenóis ( $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$ )



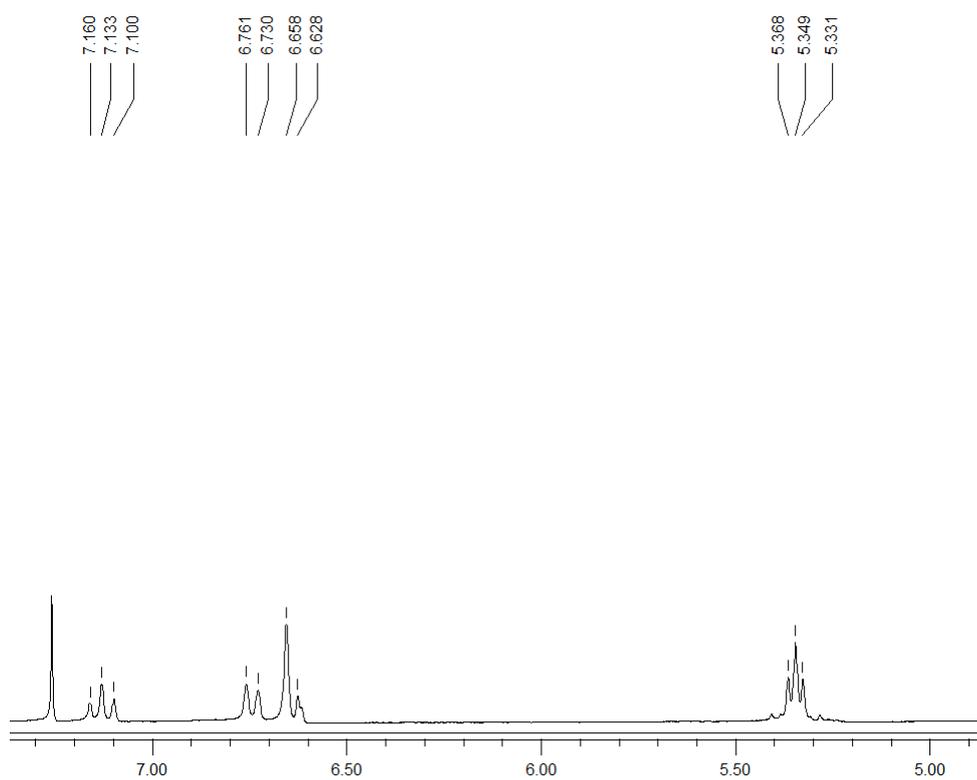
**Figura 17.** EM-ESI (modo negativo) dos n-álquil fenóis

**Tabela 6.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)],  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da mistura de alquil fenóis

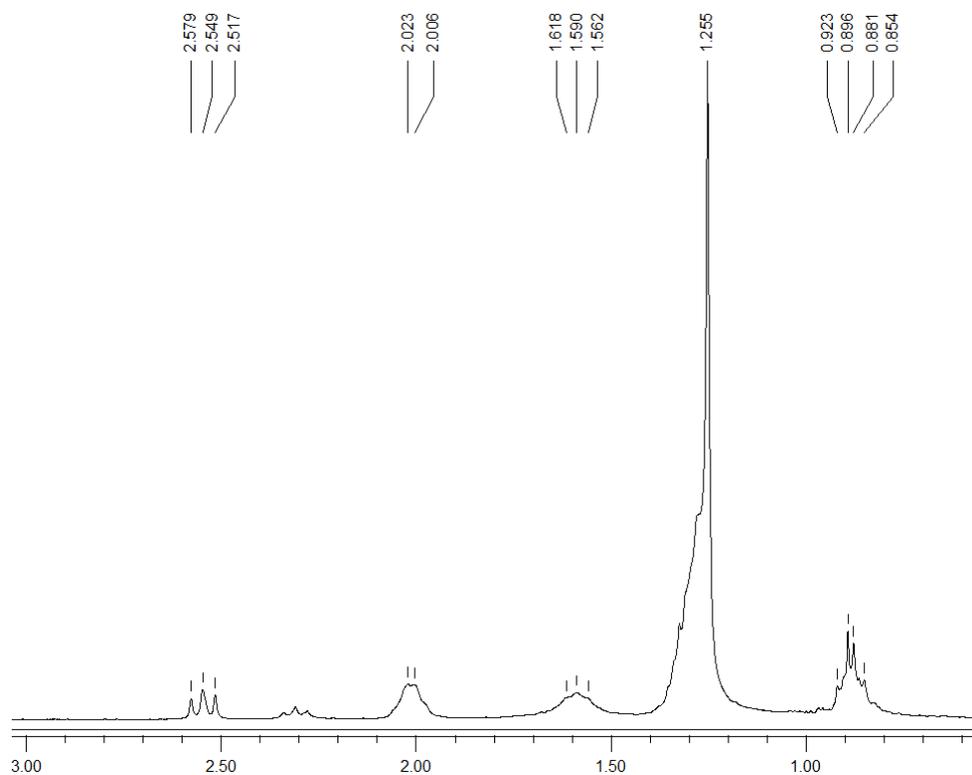
Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	155,4
2	6,63-6,66 m	112,4
3	-	144,9
4	6,75 d (J=7,7)	120,9
5	7,13 t	129,4
6	6,63-6,66 m	115,3
1'	2,55 t (J=7,5)	35,8
2'	1,59 m	31,3
3'- 8' 13'- 19'	1,26 s	29,3-29,7
9' e 12'	2,02 m	27,2 e 26,9
10' e 11'	5,35	129,9 e 129,9
20'	1,26 m	31,9
21'	1,26 m	22,1
22'	0,90 m	13,9



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **2** e **3** [(250MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

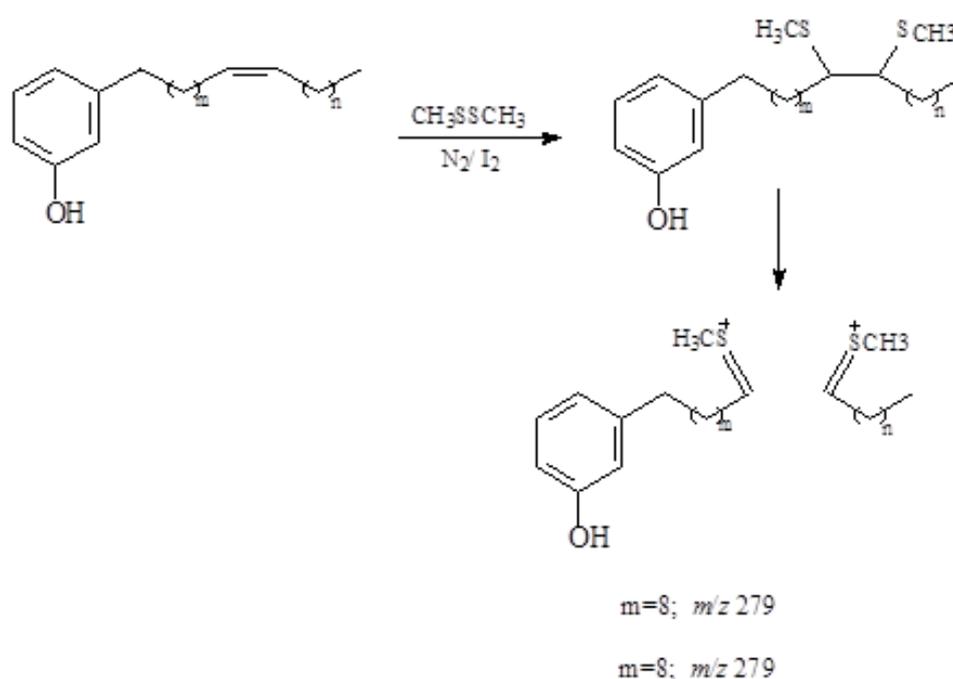


**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **2** e **3** (ampliação) [(250 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

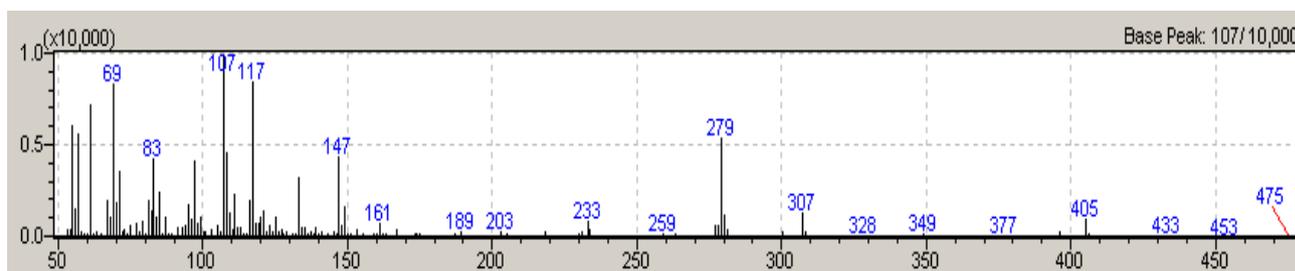


**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **2** e **3** (ampliação) [(250 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

Através da análise dos sinais obtidos no espectro de massas, referentes aos dois íons moleculares, foi possível detectar a presença de duas substâncias. O tamanho das cadeias alquênlicas das substâncias, constituídas por 19 e 22 carbonos, foi determinada também a partir da análise dos fragmentos do EM. A posição da ligação dupla na cadeia lateral foi estabelecida a partir da análise do EM do derivado  $\alpha,\beta$ -bis(tiometil)-alquilado sintetizado através da reação de tioalquilação (Figura 22). O espectro de massas mostrou o fragmento em  $m/z$  279 ( $C_{17}H_{27}OS$ ) o que permitiu o posicionamento da insaturação na mesma posição em ambos os compostos. A Figura 21 esquematiza a fragmentação desses derivados.



**Figura 21.** Obtenção do derivado  $\alpha,\beta$ -bis-(tiometílico) e fragmento (EM-IE) compatível com ligação dupla entre  $C_{10}$  -  $C_{11}$ .



**Figura 22.** Espectro de massas dos derivados tioalquilados das substâncias 2 e 3

Assim, a família Anacardiaceae tem sido a principal fonte de alquil fenóis, sendo estes considerados marcadores químicos. Cerca de 25% dos gêneros dessa família são considerados tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. Há relatos de que a dermatite de contato provocada por estas plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídeos fenólicos. Tendo em vista a toxicidade destes compostos, a presença de n-alkil fenóis no óleo vegetal torna-se um problema, visto que isso impede que o óleo possa ser utilizado como comestível. Assim, torna-se necessário a realização de estudos para remoção destas substâncias nos óleos. Atualmente, as sementes de cajá são um rejeito industrial ainda sem aplicação.

### **Identificação da mistura de esteróides**

Através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da mistura de **4** e **5** e comparação com dados da literatura foi possível identificar a mistura como sendo  $\beta$ -sitosterol (estigmast-5-en-3-ol) e estigmasterol (estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol), cuja fórmulas moleculares são  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  (MM = 414) e  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$  (MM = 412), respectivamente.

### **CONCLUSÃO**

As sementes de *Spondias mombin* L. (cajá) apresentaram rendimento em óleo de 2,60 %, sendo o ácido linoléico o constituinte principal dos triacilgliceróis, determinado como éster metílico ( $31,66 \pm 0,58\%$ ). Apesar da identificação do triacilglicerol predominante, realizada de acordo com comparação com dados da literatura (JIE, 1995), os ésteres obtidos através da transesterificação apontam como constituintes cinco compostos esterificados, principalmente com os ácidos palmítico (hexadecanóico), linoléico (9,12-octadecadienóico), oléico (9-octadecenóico), esteárico (octadecanóico) e melíssico (triacontanóico).

As substâncias isoladas neste estudo foram o glicerol 1,3-dioleoil-2-linoleoil, 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-octadecenil]-benzeno e 1-hidroxi-3-[(Z)-10'-docosenil]-benzeno, além da mistura do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

## REFERÊNCIAS

AYOKA *et al.* Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 166-175, 2006.

AUGUSTO *et al.* Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 117-127, 2000.

BAGETTI *et al.* Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, 2009.

COATES *et al.* SB-202742, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654-657, 1994.

CORREIA *et al.* Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2056-2059, 2008.

CORREIA *et al.* Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

CORREIA, S. J. Estudo químico das cascas de duas espécies de Tapirira. **Dissertação de Mestrado**, 140f., 1999.

CORREIA, S. J. Flavonóides, Terpenóides e Novos Hidrobenzofuranóides Bioativos das Folhas de Tapirira guianensis. **Tese de Doutorado**, 308f., 2005.

CORTHOUD *et al.* Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-1130, 1991.

CORTHOUD *et al.* Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1979-1981, 1992.

CORTHOUD *et al.* Antibacterial and Molluscicidal Phenolic Acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n.5, p. 460-463, 1994.

GUILLÉN<sup>a</sup>, M. D.; RUIZ, A. Edible oils: discrimination by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 338-346, 2003.

GUILLÉN<sup>b</sup>, M. D.; RUIZ, A. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 502-507, 2003.

GUNSTONE, F. D. <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of fatty acids and derivatives.  
**www.lipidlibrary.co.uk**.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.1, 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

JIE, M. S. F. L. K.; LAM, C. C. <sup>13</sup>C-NMR studies of polyunsaturated triacylglycerols of type AAA and mixed triacylglycerols containing saturated, acetylenic and ethylenic acyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 78, p. 1-13, 1995.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, v. 1, 4<sup>a</sup> Ed., 2002.

MANNINA *et al.* Concentration dependence of <sup>13</sup>C NMR spectra of triglycerides: implications for the NMR analysis of olive oils. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 886-890, 2000.

MANNINA *et al.* Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a <sup>13</sup>C NMR study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 103, p. 47-55, 1999.

MOTTRAM, H. R.; WOODBURY, S. E.; EVERSLED, R. P. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 1240-1252, 1997.

MURILLO, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; PORTUGAL, F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. **Food Chemistry**, v. 122, p. 167-172, 2010.

PINTO *et al.* Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa de Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p.1059-1066, 2003.

REDA *et al.* Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 672-676, 2005.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. A Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 na análise de óleos vegetais termo-oxidados. **Revista Analytica**, n. 31, 2007.

SHIAO, T.-Y.; SHIAO, M.-S. Determination of fatty acid compositions of triacylglycerols by high resolution NMR spectroscopy. **Botanic Bulletin Academia Sinica**, v. 30, p.191-199, 1989.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411-417, 2004.