



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



Constituintes Polifenólicos e Propriedades Antioxidantes da  
Polpa do Fruto da Palmeira Juçara (*Euterpe edulis*)

**Thony Arce Saavedra**

Engenheiro Agroindustrial

**Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan**

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos  
para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição.  
Área de Concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

**Campinas, 2008**  
**Brasil**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Ar21c Arce Saavedra, Thony  
Constituintes Polifenólicos e Propriedades Antioxidantes da  
Polpa do Fruto da Palmeira Juçara (*Euterpe edulis*) / Thony Arce  
Saavedra. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Jaime Amaya-Farfan  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Polifenóis. 2. Antioxidantes. 3. *Euterpe edulis*. 4. Açai.  
I. Amaya-Farfán, Jaime. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.  
(mrs/fea)

Titulo em inglês: Polyphenolic Constituents and Antioxidant Properties of the Juçara  
Palmtree (*Euterpe edulis*) Fruit Pulp

Palavras-chave em inglês (Keywords): Phenolics, Antioxidants, *Euterpe edulis*, Assai

Área de concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentação e Nutrição

Banca examinadora: Jaime Amaya-Farfan

Marcelo Alexandre Prado

Elizabeth Aparecida Ferraz Da Silva Torres

Felix Guillermo Reyes Reyes

Sussane Rath

Programa de Pós-Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan**  
**DEPAN/FEA/UNICAMP**  
**(Orientador)**

---

**Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado**  
**DCA/FEA/UNICAMP**  
**(Membro)**

---

**Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz Da Silva Torres**  
**FSP/USP**  
**(Membro)**

---

**Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes**  
**DCA/FEA/UNICAMP**  
**(Suplente interno)**

---

**Profa. Dra. Sussane Rath**  
**IQ/UNICAMP**  
**(Suplente externo)**

**Campinas, 2008**



# DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação  
às pessoas mais importantes da minha vida:

A minha esposa Lloy Mery;  
A minhas filhas Wendy Lucero e Katherin Lloy,  
presentes de Deus na minha vida



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Jaime Amaya-Farfan, orientador e amigo; a quem serei sempre grato pela dedicação com nosso trabalho, que ao longo de todo tempo soube exercer seu papel de professor com sabedoria e afeto.

A minha família, Arce e Ríos: meus pais, Genaro e Edna, e meus irmãos Segundo Nixon e Boris Jesús, meus sogros, Waldemar e Zoila e as minhas cunhadas (os), Nirmith e Hércules, Maggy e Genaro, Segundo Waldemar e Heydi, pela torcida e presença constante, pelo apoio incondicional e por permitir que isso tudo fosse possível;

Aos professores da banca examinadora, pelas correções e sugestões. Sendo estas contribuições muito valiosas para a qualidade da tese;

Ao Dr. Fausto Coral, pela gentileza em fornecer as matérias-primas deste estudo;

Ao Prof. Félix Guillermo Reyes Reyes e a Marcela Sismoto pelo apoio, e disponibilidade do Laboratório de Toxicologia, em especial para as análises de polifenóis por espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, pela confiança, por me ajudar, com simpatia e desprendimento e acreditar em meu potencial desde o início do nosso relacionamento neste processo do mestrado.

À minha inesquecível amiga Cinthia Baú Betim, pela grande ajuda durante as análises, pelo apoio e amizade até nos momentos difíceis desta jornada;

A meu querido amigo Eder Müller, pela sapiência para me dar opiniões a minhas dúvidas, sempre com boa vontade, muita alegria e competência.

A Jane Cristina de Souza minha “tradutora”, por me socorrer sempre que precisei, desde as primeiras aulas.

A Ana Cláudia, Giovanna, Carolina, Viviane, Sabrina, Thiago e Antônio, pela amizade, confiança, coleguismo e ótimo convívio de laboratório;

A Maria Susana minha querida “procuradora”, sempre disposta a ajudar no momento a quanta pessoa precisar dela.

A Carla, Francisco, Bete, Eliana, Cidina e Fátima, grandes amigos (as) funcionários (as), pela competência, alegria e constante disposição em prestar ajuda sempre que necessário;

A todos os alunos de pós-graduação com quem tive o prazer de conviver. Pelo alegre convívio e lembranças de momentos “antológicos” que levo comigo com muito carinho, e já com saudades;

Aos meus queridos irmãozinhos do mesmo teto Justo Emilio, Richard e Mario, pela amizade que compartilmos e por tornarem minha estadia mais agradável e prazerosa.

Ao Fernando, Helmo, Haroldo, Mônica, Noemi, Liz, Luz, Cecília. Lena, Thana, e todos esses brilhantes alunos peruanos que tive a oportunidade de conhecer aqui no Brasil, pela amizade e a enorme vontade de fazer pátria longe das nossas famílias.

À Direção e aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial, ao Departamento de Alimentos e Nutrição da UNICAMP, pela assistência e gentileza.

**A todos vocês, de verdade:**

**muito, muito obrigado!!!**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LEGENDAS DE ABREVIATURAS E TERMOS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xvi</b>
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	04
2.1 Objetivo Geral .....	05
2.2 Objetivos específicos .....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	06
3.1. O palmito juçara ( <i>Euterpe edulis</i> Martius).....	07
3.1.1. Características botânicas e área de ocorrência .....	07
3.1.2. O fruto .....	07
3.1.3. Processamento e consumo popular da polpa .....	08
3.2. Caracterização nutricional dos frutos do gênero <i>Euterpe</i> .....	10
3.3. Composição fitoquímica das polpas dos frutos do gênero <i>Euterpe</i>	11
3.4. Compostos fenólicos .....	14
3.5. Propriedades fisiológicas dos compostos fenólicos e seu impacto na saúde .....	18
3.5.1. Estresse oxidativo .....	18
3.5.2. Polifenóis como antioxidantes .....	19
3.6. Métodos analíticos utilizados e estado-da-arte atual.....	23
3.6.1. Identificação e Quantificação de polifenóis.....	23
3.6.2. Determinação da Atividade Antioxidante .....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1. Material .....	30
4.1.1. Fruto da juçara ( <i>Euterpe edulis</i> Mart.).....	30

4.1.2. Caracterização do fruto da juçara .....	30
4.1.3. Amostragem e preparação .....	30
4.2. Reagentes de padrões analíticos .....	31
4.3. Material e equipamento analítico .....	33
4.4. Métodos .....	34
4.4.1. Composição centesimal .....	34
4.4.2. Determinação de antocianinas totais (AT).....	34
4.4.3. Determinação de fenóis totais (FT).....	35
4.4.4. Fracionamento e purificação dos fitoquímicos .....	36
4.4.5. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	40
4.4.5.1. Método ABTS .....	40
4.4.5.2. Método de seqüestro de radicais livres DPPH* .....	42
4.4.6. Análise de resveratrol .....	43
4.4.7. Análise da mistura de antocianinas e outros flavonóides por MS .....	44
4.4.8. Análise estatística .....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
5.1. Caracterização da matéria-prima .....	47
5.1.1. Composição Centesimal .....	47
5.2. Antocianinas e fenóis totais .....	48
5.3. Distribuição porcentual das frações da polpa integral fresca da juçara .....	52
5.4. Atividade antioxidante .....	53
5.4.1. Características analíticas das curvas dos padrões .....	53
5.4.2. Características analíticas das curvas das frações .....	54
5.4.3. Determinação da atividade antioxidante .....	57
5.5. Identificação de resveratrol por HPLC .....	61
5.6. Identificação de antocianinas e outros flavonóides por MS-MS <sup>2</sup> .....	61
6. CONCLUSÕES .....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
8. ANEXOS .....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Características químicas das polpas do açaí e juçara na matéria seca .....	11
<b>Tabela 3.2</b>	Conteúdo de antocianinas e polifenóis de açaí.....	15
<b>Tabela 3.3</b>	Atividade antioxidante de compostos fenólicos determinada através do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	22
<b>Tabela 4.1</b>	Condições analíticas do ESI-MS para as frações antociânica (ES+) e de ácidos fenólicos e flavonóides (ES-) presentes na polpa integral da juçara .....	45
<b>Tabela 5.1</b>	Caracterização físico-química da polpa integral de juçara (MÉDIA $\pm$ S, =3) .....	49
<b>Tabela 5.2</b>	Concentração de fenóis totais e antocianinas totais em polpas integrais processadas de juçara (média $\pm$ S, n=3) ..	50
<b>Tabela 5.3</b>	Distribuição percentual das frações da polpa integral fresca da juçara (MÉDIA $\pm$ S, n=7) .....	54
<b>Tabela 5.4</b>	Determinação da atividade antioxidante das frações da polpa integral da juçara mediante os métodos de DPPH e ABTS .....	59
<b>Tabela 5.5</b>	Identificação de compostos na fração antociânica de juçara..	65
<b>Tabela 5.6</b>	Identificação de compostos na fração de ácidos fenólicos e flavonóides de juçara .....	66
<b>Tabela 5.7</b>	Identificação de íons e suas respectivas relações <i>m/z</i> para as antocianinas da juçara .....	67
<b>Tabela 5.8</b>	Identificação de íons e suas respectivas relações <i>m/z</i> para os ácidos fenólicos e flavonóides da juçara .....	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Palmeira de juçara com abundantes cachos de frutos .....	08
<b>Figura 3.2</b>	Despolpado dos frutos de açai .....	10
<b>Figura 3.3</b>	Estruturas de flavonóides encontrados na fruta da <i>Euterpe oleracea</i> Mart .....	13
<b>Figura 3.4</b>	Estruturas de antocianinas encontradas nas frutas da <i>Euterpe oleracea</i> Mart. e <i>Euterpe edulis</i> Mart .....	14
<b>Figura 3.5</b>	Critério estrutural para um flavonóide que não apresenta atividade antioxidante .....	17
<b>Figura 3.6</b>	Critério estrutural para um flavonóide com alta atividade antioxidante .....	17
<b>Figura 4.1</b>	Fotografia, dos frutos congelados da juçara .....	31
<b>Figura 4.2</b>	Obtenção da polpa do fruto da juçara .....	32
<b>Figura 4.3</b>	Fluxograma de separação para fracionar e purificar os fitoquímicos presentes na polpa da juçara .....	39
<b>Figura 4.4</b>	Separação das frações lipofílica e hidrofílica na polpa da juçara .....	40
<b>Figura 4.5</b>	Fracionamento e purificação dos polifenóis presentes na polpa da juçara .....	40
<b>Figura 4.6</b>	Superposição dos espectros do radical ABTS <sup>•+</sup> e a fração fenólica dissolvida em metanol .....	43
<b>Figura 5.1</b>	Reta de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais.....	49
<b>Figura 5.2</b>	Conteúdo de Antocianinas Totais e Fenóis Totais na polpa integral da juçara submetida a diferentes tratamentos .....	51
<b>Figura 5.3</b>	Curvas-padrão de Trolox, BHT e vitamina C para a determinação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH <sup>•</sup> .....	55

<b>Figura 5.4</b>	Curvas-padrão de Trolox, BHT e vitamina C para a determinação da atividade antioxidante frente ao radical ABTS <sup>•+</sup> .....	55
<b>Figura 5.5</b>	Curvas do extrato bruto metanólico (integral), fração lipofílica, fração polifenólica, fração de ácidos fenólicos e flavonóides, e fração antociânica da polpa integral da juçara para quantificar a atividade antioxidante equivalentes pelo método de captura do radical DPPH <sup>•</sup> .....	57
<b>Figura 5.6</b>	Curvas do extrato bruto metanólico (integral), fração lipofílica, fração polifenólica, fração de ácidos fenólicos e flavonóides, e fração antociânica da polpa integral da juçara para quantificar a atividade antioxidante equivalentes pelo método de captura do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	58
<b>Figura 5.7</b>	Atividade antioxidante do extrato bruto da polpa integral fresca (metanólico) e das frações lipofílica, polifenólica, antociânica e dos ácidos fenólicos e flavonóides frente ao método de seqüestro de radicais DPPH <sup>•</sup> .....	59
<b>Figura 5.8</b>	Atividade antioxidante do extrato bruto da polpa integral fresca (metanólico) e das frações lipofílica, polifenólica, antociânica e dos ácidos fenólicos e flavonóides frente ao método de seqüestro de radicais ABTS	60
<b>Figura 5.9</b>	Espectro massa-massa do íon molecular m/z 595 (cianidina-3-O-rutinosídeo) da fração antociânica da polpa da juçara.....	63
<b>Figura 5.10</b>	Espectro massa-massa do íon molecular m/z 449 (cianidina-3-O-glicosídeo) da fração antociânica da polpa de juçara	64

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b>	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	81
<b>ANEXO 2</b>	DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS	83
<b>ANEXO 3</b>	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	85
<b>ANEXO 4</b>	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	86
<b>ANEXO 5</b>	MS DA FRAÇÃO ANTOCIANICA DA JUÇARA	88
<b>ANEXO 6</b>	MS DA FRAÇÃO DOS ACIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES DA JUÇARA	89
<b>ANEXO 7</b>	ESPECTRO MASSA-MASSA DO ÍON MOLECULAR m/z 227 (RESVERATROL) DA FRAÇÃO DE ÁCIDOS FENOLICOS E FLAVONOIDES DA POLPA DA JUÇARA	90
<b>ANEXO 8</b>	ESPECTRO MASSA-MASSA DO ÍON MOLECULAR m/z 289 (CATEQUINA) DA FRAÇÃO DE ÁCIDOS FENOLICOS E FLAVONOIDES DA POLPA DA JUÇARA	91



## LEGENDAS DE ABREVIATURAS E TERMOS

<b>AA</b>	atividade antioxidante
<b>ABTS</b>	ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>AT</b>	antocianinas totais
<b>BHA</b>	butil-hidroxi-anisol
<b>BHT</b>	butil-hidroxi-tolueno
$\lambda_{\max}$	comprimento de onda de absorção máxima
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
<b>DMPD</b>	dicloridrato de N,N-Dimetil-p-fenilendiamina
<b>EAG</b>	equivalente de ácido gálico
<b>ESI</b>	ionização por eletrospray
<b>EtOH</b>	etanol
<b>eV</b>	electrovoltios
<b>FM</b>	fase móvel
<b>FT</b>	fenóis totais
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MCP</b>	placa de microcanais
<b>MS</b>	espectrometria de massa
<b>MS<sup>2</sup></b>	massa-massa
<b>m/z</b>	relação massa-carga
<b>MW</b>	peso molecular
<b>μm</b>	micromol
<b>nm</b>	nanômetro
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	íon superóxido
<b>ORAC<sub>fl</sub></b>	ensaio baseado na prova fluorescente
<b>RNS</b>	substâncias reativas de nitrogênio

<b>RO<sub>2</sub>'</b>	radical peroxila
<b>ROS</b>	substâncias reativas de oxigênio
<b>rpm</b>	rotação por minuto
<b>SOD</b>	ensaio de varredura do superóxido
<b>SPE</b>	extração em fase sólida
<b>TDC</b>	sistema de contagem de íons
<b>TEAC</b>	capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
<b>TOF</b>	tempo de vôo ortogonal
<b>Trolox</b>	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxyl acid
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>UV-Vis</b>	espectrofotometria na região ultravioleta e visível
<b>VCEAC</b>	capacidade antioxidante equivalente à vitamina C

## RESUMO

### “Constituintes Polifenólicos e Propriedades Antioxidantes da Polpa do Fruto da Palmeira Juçara (*Euterpe edulis*)”

**Introdução.** Inúmeras pesquisas têm demonstrado a importância para a saúde de um enorme conjunto de substâncias fitoquímicas contidas nos alimentos, incluindo os polifenóis, que se destacam pelas propriedades antioxidantes e moduladoras do metabolismo. O fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.) que possui grande similaridade composicional e sensorial com o açaí, tem sido apontado como uma fonte de macronutrientes e uma das mais ricas fontes de substâncias fenólicas, capaz de competir nutricional e comercialmente com um produto que se tornou quase um símbolo brasileiro.

**Objetivo.** Determinar a composição polifenólica e avaliar a capacidade antioxidante da polpa integral do fruto da juçara. **Métodos.** A composição polifenólica foi determinada mediante a técnica de fracionamento por extração em fase sólida (SPE) e espectrometria de massas, nos modos MS e MS-MS. Para a atividade antioxidante *in vitro* foram utilizados os métodos de radicais livres, baseados no descoramento de uma solução composta de radicais estáveis, ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), utilizando três padrões analíticos em cada sistema. **Resultados.** Treze antocianinas e doze outros compostos, entre ácidos fenólicos e outros flavonóides, foram identificados. O extrato metanólico da polpa fresca integral, e a fração antociânica, apresentaram expressiva capacidade antioxidante *in vitro*. **Conclusão:** A polpa integral do fruto da juçara mostrou ser uma rica fonte de substâncias polifenólicas, apresentando maior poder antioxidante que o já conhecido para o açaí.

**Palavras-chave:** polifenóis; antioxidantes; *Euterpe edulis*; juçara; açaí



## SUMMARY

**Introduction.** A large number of studies have pointed out the importance for human health of an enormous variety of phytochemicals occurring in foods because of their role as antioxidants and metabolic signalers. The fruit of the palmtree jussara (*Euterpe edulis* Mart.) shares both compositional and sensory properties with assai (*Euterpe oleracea* Mart.), and has been recently recognized as being a rich source of macronutrients and phenolic substances. This fruit is capable of nutritionally and commercially competing with assai, one of the Amazonian products that has become almost a symbol of Brazil.

**Objective.** To determine the polyphenolic composition and the antioxidant capacity of the whole extract of the jussara fruit pulp.

**Methods.** The polyphenolic composition was determined by a combination of solid phase fractionation and mass spectrometry in the MS and MS/MS modes. For the antioxidant capacity, in vitro tests were employed based on the bleaching of colored solutions containing the stable free radicals, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and three different analytical standards in each system.

**Results.** Thirteen anthocyanins and twelve other compounds, including phenolic acids and flavonoids, were identified. The methanolic extract of the whole, fresh pulp, and the anthocyanin fraction, exhibited substantial in-vitro antioxidant capacities.

**Conclusion.** The fresh jussara palmtree fruit showed to be a rich source of polyphenols and to possess greater antioxidant capacity than that already known for assai.

**Keywords:** phenolics; antioxidants; *Euterpe edulis* Mart.; jussara; assai



## **1. INTRODUÇÃO**



A América do Sul possui uma das maiores diversidades de palmeiras do mundo, sendo o palmito juçara *Euterpe edulis* Martius umas das palmeiras mais belas de toda a flora brasileira (AMBIENTEBRASIL, s/d). É uma planta nativa da Mata Atlântica, pertencente à família das palmáceas, gênero *Euterpe*, do qual fazem parte 28 espécies encontradas entre as Antilhas e a América do Sul (LORENZI, 1992).

A juçara produz frutos globosos, roxo-escuros ou pretos, com mesocarpo fino e fibro-carnoso, contendo uma única semente. (LORENZI, 2004). Eles possuem propriedades organolépticas e nutritivas similares às do açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) (PARADA, 2004).

O processamento do fruto da juçara para obtenção da polpa é uma atividade nova na região Sul Baiana, onde é consumido normalmente misturado com polpas de frutas regionais ou exóticas, de maneira similar ao uso do açaí e está sendo bastante aceito pela população regional que a considera “mais doce” que o açaí. (OCABRASIL, 2006; PARADA, 2004). Testes de degustação mostraram que, além de ter o mesmo rendimento, o suco da juçara é mais saboroso do que o de açaí (TOMAZELA, 2001).

No entanto, o fruto do açaí é hoje de grande valor econômico para os povos nativos da região Norte do Brasil, devido à variedade de preparações para o consumo popular como alimento energético, e pelo aporte em pigmentos fenólicos apreciados por sua atividade antioxidante que se associam aos efeitos benéficos à saúde humana (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; COISSON, et al., 2005).

As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelho-azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em alimentos especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico, como as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos, como detalhado por Degáspari & Waszczyński (2004).

Os fenóis, especialmente os flavonóides (HEIM et al., 2002) e os antocianos (HEIM et al., 2002; MOYER et al., 2002; SCHAUSS et al., 2006b), mostram grande capacidade de capturar radicais livres que causam o estresse oxidativo, atribuindo-lhes, por sua vez, um efeito benéfico na prevenção de enfermidades, tais como: cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (TSUDA et al., 1994; KUSKOSKI et al., 2005).

Eles possuem atividade antiinflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (ROSS et al., 2002; SÁNCHEZ-MORENO 2002; KUSKOSKI et al., 2005).

Os últimos estudos sobre a composição em flavonóides da polpa do açaí e sua atividade antioxidante, foram realizados utilizando métodos analíticos modernos como cromatografia líquida de alta eficiência-arranjo de diodos (HPLC-DAD) e cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) (BOBBIO et al., 2000; DEL POZZO-INSFRAN et al., 2004; GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a). As antocianinas foram consideradas como sendo os principais compostos que contribuem à capacidade antioxidante total (SCHAUSS et al., 2006b).

Entretanto, são escassos os estudos sobre a composição polifenólica da polpa do fruto da juçara e ainda pouco aprofundados. Existem dois estudos iniciais que relatam a presença de uma mistura das antocianinas em juçara, sendo elas a cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (IADEROZA et al., 1992; HARBORNE et al., 1994). Recentemente, Brito et al. (2007) conferiram na juçara a presença daqueles pigmentos antociânicos pelo sistema LC-MS/MS.

Portanto, com o intuito de pesquisar fontes de alimentos menos conhecidas com possíveis propriedades antioxidantes e contribuir à preservação da biodiversidade da Mata Atlântica, considerou-se de interesse estudar a polpa integral do fruto desta palmeira presente na região. Este trabalho teve como objetivo principal, determinar a composição polifenólica, mediante a técnica de fracionamento por extração em fase sólida (SPE) e espectrometria de massa (MS), além de avaliar o poder antioxidante *in vitro*, utilizando o método de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico), tanto no extrato da polpa integral fresca como nas frações fitoquímicas presentes na polpa de juçara, purificadas.

## **2. OBJETIVOS**



## 2.1 Objetivo Geral

Determinação da composição polifenólica e avaliação da capacidade antioxidante da polpa integral do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.).

## 2.2 Objetivos específicos:

- ▶ Obtenção e fracionamento e perfil dos compostos fenólicos da polpa do fruto da juçara, originária da Mata Atlântica, estado de São Paulo.
- ▶ Estudo das propriedades antioxidantes do conjunto de fenólicos *in vitro* pelo método de seqüestro de radicais livres ABTS e DPPH.
- ▶ Efeito do processamento térmico na estabilidade do total de antocianinas e fenóis da polpa fresca, pasteurizada, liofilizada e congelada.
- ▶ Identificação dos principais componentes polifenólicos mediante o uso do espectrômetro de massas, nos modos MS e MS-MS.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



### **3.1 O palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius)**

#### **3.1.1 Características botânicas e área de ocorrência**

A palmeira juçara é típica da Floresta Atlântica, cujo porte adulto geralmente varia entre 10 e 20 m de altura, com estipe de 8 a 15 cm de DAP (diâmetro à altura do peito) e apresentando no ápice um agrupamento 10 a 20 folhas pinadas, segundo Reitz et al., (1978, Apud Conte 2004); ocupando uma vasta extensão territorial, desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul no litoral brasileiro (PARADA, 2004). É uma palmeira de caule único, delgado e alto. Recebe também os nomes de içara, palmito doce, palmitero, ensarova, ripeira e sua ocorrência está na floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila densa, cerrado (LORENZI, 1992; LORENZI et al., 2004). No Rio Grande do Sul, a região entre Osório e Torres é a principal região de ocorrência da *Euterpe edulis* (FAVRETO, 2007).

Seu principal produto é o famoso “palmito”, consumido *in natura* ou em conserva, que tem causado o desaparecimento da espécie em algumas áreas, pelo sacrifício da planta (LORENZI, 2004). O palmito foi considerado como “o melhor palmito do mundo”. O Brasil foi o maior exportador mundial de palmito enquanto as matas possuíam abundância dessa palmeira. Hoje, a preservação do palmito juçara está diretamente ligada à manutenção da biodiversidade da Mata Atlântica, toda vez que sua semente e seu fruto servem de alimento para mais de 200 espécies animais (TOMAZELA, 2001).

#### **3.1.2 O fruto**

A frutificação da *E. edulis* é em geral abundante nos meses de março a junho. Um kg de sementes contém cerca de 750 unidades, cuja germinação ocorre entre 3 e 6 meses (LORENZI, 2004). Uma planta em condições favoráveis pode produzir de 216 a 528 cachos/ha e de 6 a 8 kg de frutos por ano (CK AGRÍCOLA, s/d).

Segundo Reitz et al. (1978, Apud Conte, 2004), a produção de uma plantação de juçara supera os 300.000 frutos ha/ano, servindo de alimento para a fauna (grandes pássaros e mamíferos) durante um período de aproximadamente seis meses ao ano. Por outro lado, Favreto (2007) explica que em consórcio com bananeira pode produzir até quatro toneladas anuais de frutos por hectare.

A identificação do fruto da juçara, segundo o INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (s/d), é como segue:



**Figura 3.1** Palmeira de juçara com abundantes cachos de frutos.

- Tipo do Fruto:** Drupa  
**Estrutura:** Carnoso  
**Cor do Fruto:** Preto  
**Tamanho:** 4  
**Deiscência:** Não  
**Periodicidade:** Anual  
**Observações:** O fruto é composto por um epicarpo (casca) pouco espesso e liso.

### **3.1.3 Processamento e consumo popular da polpa**

Para produzir a polpa da juçara, basta retirar as sementes sem a necessidade de cortar a árvore, como ocorre na extração do palmito. A retirada da polpa não prejudica a germinação das sementes, que seriam devolvidas à mata, relata Tomazela (2001). Os frutos selecionados são lavados com água corrente e em seguida colocados em

recipiente, enchido com água potável até cobrir totalmente. Deixa-se descansar até a casca e a polpa começarem a soltar esfregando os frutos no dedo. Com um pilão (ou pedaço de madeira) se pressionam os frutos contra o fundo do recipiente. A polpa irá se soltar formando um caldo grosso e as sementes começarem a ficar claras. Passa-se o caldo por uma peneira bem grossa para retirar as sementes e novamente o caldo é passado por uma peneira fina para retirar a casca. Finalmente, a polpa pronta é colocada dentro de sacos plásticos (OCABRASIL, 2006).

Na região do Sul Baiano, o processamento do fruto da juçara para a obtenção da polpa é uma atividade nova, a qual é utilizada normalmente misturada com polpas de frutas regionais ou exóticas, como a graviola, cupuaçu, cacau, cajá, limão, banana, leite e cereais, de maneira similar ao uso do açaí. A polpa da juçara tem bastante aceitação pela população regional que a considera “mais doce” que o açaí (OCABRASIL, 2006; PARADA, 2004).

Segundo experiência desenvolvida no Vale do Ribeira, estado de São Paulo (PARADA, 2004), o aproveitamento dos frutos de uma plantação de juçara trouxe aumento de entre 3 e 4 vezes nos rendimentos do simples corte do palmito, o que demonstrou o grande potencial econômico da nova atividade.

Entretanto, o fruto da juçara, ao igual que o açaí, é um produto altamente perecível. O açaí tem seu tempo máximo de conservação de 12 horas, mesmo sob refrigeração. O fator responsável por esta alta perecibilidade é a elevada carga microbiana, juntamente com a degradação enzimática, responsáveis pelas alterações da cor e aparecimento do sabor azedo. Atualmente, a conservação da polpa de açaí é feita pelo processo de congelamento (ALEXANDRE et al., 2004; OCABRASIL, 2006).

Embora a produção e consumo da polpa de açaí encontrem-se generalizadas em todo Brasil e, principalmente no Sul da Bahia, o que se espera não é uma concorrência e sim, um caminho econômico aberto para o produto da juçara e um forte incentivo para a conservação ecológica da Mata Atlântica.

O Ministério de Agricultura e do Abastecimento do Brasil emitiu a Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, para regular as apresentações comerciais da polpa do açaí a

seguir: POLPA DE AÇAÍ (polpa extraída sem adição de água e sem filtração), AÇAÍ GROSSO OU ESPECIAL (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais acima de 14 %), AÇAÍ MÉDIO OU REGULAR (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais entre 11 e 14 %) e AÇAÍ FINO OU POPULAR (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais entre 8 e 11 %).



Figura 3.2. Despolpado dos frutos de açai.

### 3.2 Caracterização nutricional dos frutos do gênero *Euterpe*.

Em relação ao fruto do açai, suas propriedades nutricionais e valor calórico, são atribuídos à composição físico-química, rico em proteínas, fibras, lipídios, minerais, etc., (PARADA, 2004; ALEXANDRE et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a).

Foi determinado na polpa de açai tipo médio os conteúdos de  $10,89 \pm 0,86$ ;  $48,24 \pm 0,12$ ;  $3,04 \pm 0,24$ ;  $31,87 \pm 2,06$  e  $3,55 \pm 0,20$  % expressos em 100 g de matéria seca, de proteína, lipídeos, cinzas, fibras e açúcar respectivamente. Além disso, este fruto possui vitamina E e minerais como manganês, cobre, boro e cromo, e um elevado teor de pigmentos antocianícos, detalha Alexandre et al. (2004).

Schauss et al. (2006a), realizaram uma extensa caracterização química da polpa de açaí, incluindo a quantificação de ácidos graxos, esteróis, aminoácidos, minerais e outros nutrientes. Os ácidos graxos polinsaturados totais, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos saturados totais, revelando conteúdos de 11,1, 60,2 e 28,7 % dos ácidos graxos totais. Foram relatados que o ácido oléico (53,9 %) e o ácido palmítico (26,7 %) são os ácidos graxos predominantes. Além disso, foram encontrados 19 aminoácidos, para um conteúdo total de aminoácidos de 7,59 % do peso total da polpa liofilizada em pó.

Por outro lado, um estudo comparativo determinou as proximidades das características químicas das polpas dos frutos da juçara e do açaí (Tabela 3.1). Realizado pelo Laboratório de Análises de Tecidos Vegetais da Seção de Fisiologia do Centro de Pesquisa do Cacau – Cepec /Ceplac, 2004 (PARADA, 2004).

**Tabela 3.1** Características químicas das polpas do açaí e juçara na matéria seca.

Espécies	Características Químicas				
	PH	Proteína g/kg	Açúcares Totais g/kg	Lipídeo g/kg	Caloria Kcal/100g
Açaí	4,8 <sup>a</sup>	77,6 <sup>a</sup>	10,20 <sup>b</sup>	130,90 <sup>b</sup>	152,93
Juçara	4,7 <sup>a</sup>	67,2 <sup>b</sup>	12,08 <sup>a</sup>	137,80 <sup>a</sup>	155,74

Fonte: Ceplac/Cepec/Sefis, 2004

### 3.3 Composição fitoquímica das polpas dos frutos do gênero *Euterpe*.

Os conhecimentos sobre a composição fitoquímica e nutritiva do fruto da juçara são ainda muito limitados. Existem alguns estudos sobre os polifenóis da polpa, os quais relatam inicialmente a presença de uma mistura das antocianinas: Cianidina 3-glucosídeo e Cianidina 3-rutinosídeo, por laderoza, et al. (1992) e Harborne, et al. (1994). Em adição, laderoza et al. (1992) registraram comparativamente os seguintes conteúdos de antocianinas: 336 mg/100g de fruta para o açaí e 1347 mg/100g de fruta para a juçara.

No entanto, em estudo recente em frutas tropicais, Brito et al. (2007), quantificaram por HPLC-MS/MS as antocianinas, encontrando 290, 104, 79, 48 e 23 mg/100 g de peso fresco na juçara, guajiru, jambolão, acerola clone Il47/1 e acerola

roxinha, respectivamente. Esses autores identificaram a presença de seis antocianinas em juçara, sendo a cianidina 3-glucosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo, como sendo os principais compostos.

Bobbio et al. (2000) identificaram as antocianinas cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo presentes na polpa do açaí. Além disso, esses autores relataram um teor de antocianinas totais de 263 mg/100g casca.

Por outro lado, Gallori et al. (2004), também identificaram na polpa seca do açaí três flavonas principais: homoorientina, orientina e isovitexina (Figuras 3.3 e 3.4). Além disso, foi relatada a presença dos principais compostos antociânicos como cianidina 3-O-glucosídeo e a cianidina 3-O-rutinosídeo (SCHAUSS et al., 2006a). A quantidade total de antocianinas foi de 0,5 mg·g<sup>-1</sup> do peso da polpa seca, e dos outros flavonóides 3,5 mg·g<sup>-1</sup>, do peso seco da polpa.

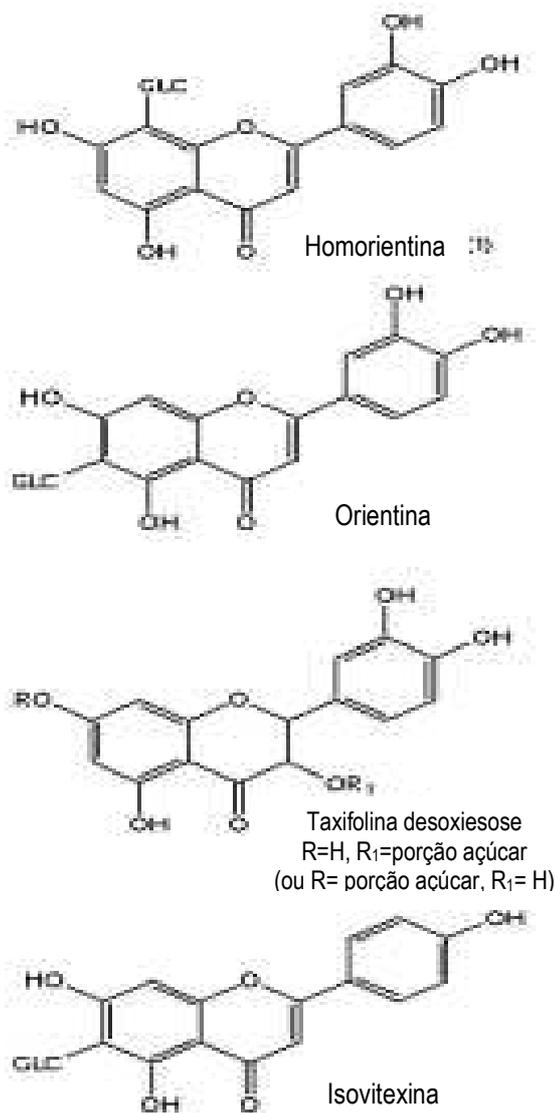
Coisson et al. (2005) confirmaram o conteúdo expressivo de cianidina 3-O-glucosídeo no suco fresco de açaí (transportado e armazenado a -20 °C), em concentração de mais de 1600 mg·kg<sup>-1</sup>, dado obtido por análise espectrofotométrica na região do UV-Vis e HPLC.

Del Pozo-Insfran et al. (2004), pesquisando também a composição fitoquímica e a estabilidade do pigmento do açaí, contra peróxido de hidrogênio, determinaram que a cianidina 3-glucosídeo (1040 mg·L<sup>-1</sup>) é a antocianina predominante. Em adição, outros 16 polifenóis foram encontrados em concentrações de 4 até 212 mg·L<sup>-1</sup> (Tabela 3.2).

Em estudo sobre a atividade dos polifenóis em apoptose de células de leucemia HL-60, Del Pozo-Insfran et al. (2006) determinaram a quantidade dos polifenóis predominantes em açaí. Estes foram: cianidina 3-glucosídeo, ácido ferúlico, epicatequina, ácido *p*-hidroxibenzoico (1120, 250, 112, 104 mg·L<sup>-1</sup> de polpa, respectivamente). Resultados que concordavam com estudo prévio de Del Pozo-Insfran et al. (2004).

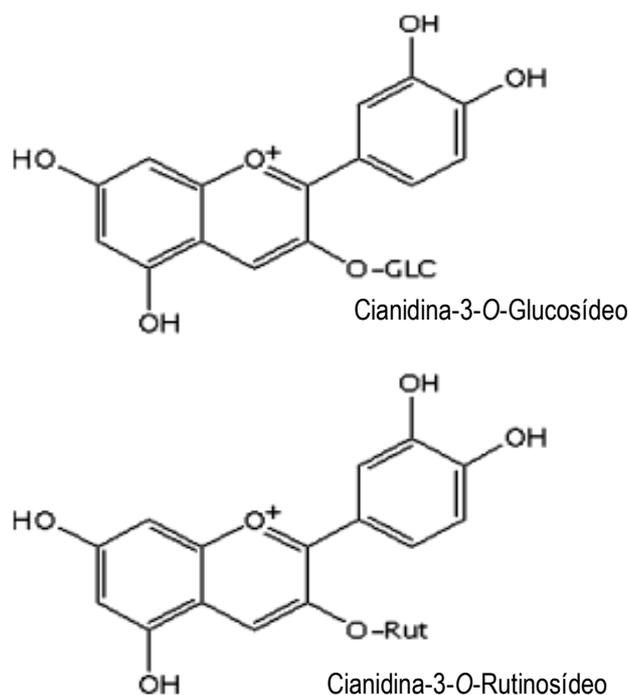
Catequina, pelargonidina 3-glucosídeo, ácido gálico, protocatequina e ácido elágico livre, estavam presentes também em até 60 mg·L<sup>-1</sup>. Já os ácidos vanílico e ácido *p*-cumárico foram encontrados em baixas concentrações (3,7 e 17,8 mg·L<sup>-1</sup>,

respectivamente). Conseqüentemente, a polpa da fruta do açaí é relatada como detentora de teores de antocianinas totais de  $1173 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e de  $960 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos fenólicos e flavonóides, quantificados por HPLC, para um total de  $5660 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenóis solúveis totais, em equivalentes de ácido gálico (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). Por sua vez, Schauss et al. (2006a) encontraram um conteúdo total de antocianinas de  $3,192 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco, na polpa liofilizada de açaí.



**Figura 3.3** Estruturas de flavonóides encontrados na fruta da *Euterpe oleracea* Mart. (GALLORI et al., 2004)

Por outro lado Pacheco-Palencia et al. (2007) determinaram a predominância das antocianinas na polpa do açaí cianidina-3-rutinosídeo ( $202 \pm 5,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e cianidina-3-glucosídeo ( $75 \pm 4,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), entanto 11 polifenólicos não antocianos foram detectados em concentrações desde 1,1 até  $55 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de polpa de açaí.



**Figura 3.4** Estruturas de antocianinas encontradas nas frutas da *Euterpe oleracea* Mart. (GALLORI et al., 2004) e *Euterpe edulis* Mart. (BRITO et al., 2007).

### 3.4 Compostos fenólicos

Os antioxidantes de maior expressão provenientes da alimentação humana são os compostos fenólicos, os quais podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas. Estas substâncias podem também apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glucosídios (HAN et al., 2007). Mais de 8000 variantes estruturais têm sido

identificados. Essas estruturas mono, di e polifenólicas podem também formar estruturas poliméricas, influenciando a sua solubilidade dos polifenóis.

A maioria de frutas e verduras em geral, em adição aos nutrientes essenciais e a uma série de micronutrientes, tais como minerais, fibras e vitaminas, aportam diversos componentes metabólicos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis. Estas estão naturalmente presentes em frutas, sendo que alguns apresentam altas concentrações de determinados grupos.

**Tabela 3.2** Conteúdo de antocianinas e polifenóis de açaí.

<b>Polifenólicos</b>	<b>Conteúdo (mg·L<sup>-1</sup> polpa fresca)</b>
Cianidina 3-glucosídeo	1040 ± 58,2
Pelargonidina 3-glucosídeo	74,4 ± 2,90
Ácido ferúlico	212 ± 5,29
(-)-epicatequina	129 ± 3,28
Ácido p-hidroxi benzoico	80,5 ± 2,00
Ácido gálico	64,5 ± 1,64
Ácido protocatequico	64,4 ± 1,64
(+)-catequina	60,8 ± 0,98
Ácido elágico	55,4 ± 1,39
Ácido vanílico	33,2 ± 1,39
Ácido p-cumárico	17,1 ± 1,23
Ácido gálico derivativo-1	47,3 ± 1,40
Ácido gálico derivativo-2	18,4 ± 0,89
Ácido gálico derivativo-3	17,3 ± 1,25
Ácido gálico derivativo-4	13,3 ± 0,96
Ácido gálico derivativo-5	3,9 ± 0,18
Ácido elágico derivativo	19,5 ± 0,40

Fonte: DEL POZO-INSFRAN et al., 2004

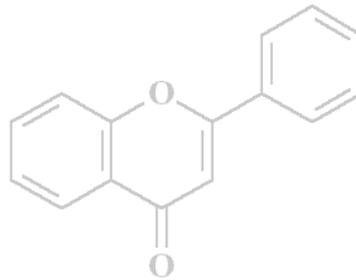
Entre as frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelho-azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em alimentos. Especialmente os derivados do ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico, dentre estes, se citam as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados), detalhado por Degáspari e Waszczynskyj (2004).

Estes compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas para fatores internos incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (AHERNE e O'BRIEN, 2002).

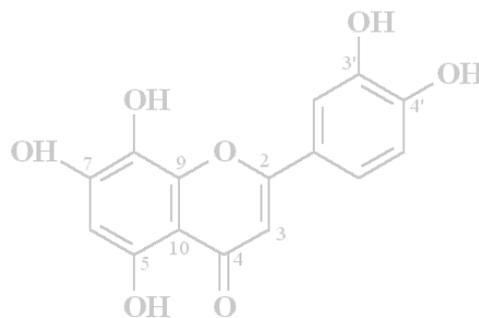
Desta forma, os componentes polifenólicos são importantes constituintes em muitas frutas e vegetais, e suas quantificações podem dar vital informação relacionada à função antioxidante, qualidade do alimento, e potencial benefício à saúde, conclui Talcott et al. (2003).

Os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido shiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioleta  $\beta$ , pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. O grupo dos flavonóides é também conhecido como polifenólicos e geralmente ocorre em plantas na forma de glucosídeos, sendo uma família de substâncias responsável pela atribuição do perfil sensorial de frutas, atribuindo-lhes o corpo característico (AHERNE e O'BRIEN, 2002).

A estrutura dos flavonóides (Figuras 3,5 e 3,6) está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou proantocianinas ou catequinas) e as antocianidinas, denominado de núcleo flavan. No caso do terceiro anel se apresentar como uma pirona ocorre formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (AHERNE e O'BRIEN, 2002).



**Figura 3.5** Critério estrutural para um flavonóide que não apresenta atividade antioxidante.



**Figura 3.6** Critério estrutural para um flavonóide com alta atividade antioxidante.

Excetuando o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonóides ocorrem em plantas sempre acompanhadas por glicídios, recebendo a denominação de glicoflavonóide. Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (AHERNE e O'BRIEN, 2002).

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, e seus espectros de cor vão do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a estes pigmentos que se encontram dispersa nos vacúolos celulares. Atualmente se conhecem 20 antocianinas, sendo que apenas 6 delas são importantes na tecnologia de alimentos: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estas antocianinas são capazes de constituir formas complexas com íons metálicos. Possuem propriedades antioxidantes e capacidade de se aderir a macromoléculas como as proteínas e os polissacarídeos.

### **3.5 Propriedades fisiológicas dos compostos fenólicos e seu impacto na saúde.**

#### **3.5.1 Estresse oxidativo**

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação oxidativa do oxigênio, sendo que diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra estes processos oxidativos que ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças, entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas de oxigênio” ou ROS. Estas substâncias também estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Por outro lado, os radicais livres também exercem efeitos benéficos quando envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HALLIWELL, 2007). Ou seja, a formação de espécies reativas de oxigênio EROS, em níveis fisiológicos, não é necessariamente lesiva; estas espécies, quando produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004).

Porem, os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímico-fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos, ou devido a fatores ambientais adversos, e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, danos profundos nos tecidos e doenças graves podem ocorrer (MOLYNEUX, 2004; HUANG et al., 2005).

O íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), supõe-se que dê origem a outras ROS, tais como os radicais peróxidos de hidrogênio, peroxinitrito e hidroxila. Em conseqüência, a capacidade do corpo humano para eliminar os  $O_2^{\cdot-}$  é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (SCHAUSS et al., 2006b).

As frutas e vegetais receberam especial atenção neste campo, porque contêm quantidades elevadas de antioxidantes conhecidos como polifenóis, vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -carateno ou licopeno (AMES et al., 1993).

### **3.5.2 Polifenóis como antioxidantes**

Uma diversidade de propriedades bioativas já foi identificada em polifenóis. Devido ao seu potencial antioxidante tanto em meio hidrofílico quanto lipofílico, o papel dos polifenóis na manutenção da homeostase redox no organismo, reduzindo o estresse oxidativo, é uma das ações mais importantes e mais citadas (HAN et al., 2007).

Os fenóis, especialmente os flavonóides (HEIM et al., 2002) e os antocianos (HEIM et al., 2002; MOYER et al., 2002; TALCOTT et al., 2003), mostram uma grande capacidade para captar radicais livres que causam o estresse oxidativo, atribuindo-lhes, por sua vez, um efeito benéfico na prevenção de enfermidades tais como: cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (TSUDA et al., 1994; KUSKOSKI et al., 2005; SINGH et al., 2008). Eles possuem atividades antiinflamatórias, antialérgicas, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (ROSS et al., 2002; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; KUSKOSKI et al., 2005).

Segundo Pietta (2000), os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), enquanto dentre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e  $\beta$ -caroteno.

Os compostos fenólicos também são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelatação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os flavonóides são a classe mais extensamente estudada de polifenóis no que diz respeito a suas atividades, antioxidante e biológica. Têm atividades antioxidantes poderosas *in vitro*, podendo limpar grande diversidade de ROS e do RNS e das espécies de cloro (DIPLOCK et al., 1998; MIRA et al., 2002).

Rice-Evans et al., (1996), Meyer et al., (1998, Apud Del Pozo-Insfran et al. 2006) têm estudado as interações antagônicas entre polifenóis individuais, e concluem que a diversidade de polifenóis antioxidantes presentes em alimentos, cria uma matriz complexa demais para fazer avaliações detalhadas. Além disso, a eficácia de um composto antioxidante é dependente da polaridade do sistema testado, da natureza do radical, e do tipo de substrato protegido pelo antioxidante.

De outro modo, a capacidade antioxidante de uma mistura não vem dada só pela soma das capacidades antioxidantes de cada um de seus componentes; também depende do microambiente em que se encontram os compostos. Os compostos interagem entre si podendo produzir efeitos sinérgicos ou inibitórios, segundo Kuskoski et al. (2005).

Os polifenóis são efetivos doadores de hidrogênio e seu potencial antioxidante está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações, assim como com a presença de elétrons doadores no anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o desapareamento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons  $\pi$  (RAMIREZ-TORTOZA et al., 2001).

Em conseqüência, para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico, é necessário que, quando utilizados em baixa concentração, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação, mediadas por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS et al., 1996).

Com relação, às determinações da atividade antioxidante dos polifenóis *in vitro* ou *in vivo*, diversas técnicas são utilizadas. Os estudos sobre a polpa de açaí até agora, são feitos em sistemas isolados ou células modelo (KUSKOSKI et al.; 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SCHAUSS et al., 2006b; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2008). A avaliação da capacidade antioxidante total é um dos métodos mais utilizados para um composto puro, mistura de compostos ou alimento complexo. Para tanto, a substância problema é desafiada por substâncias cromógenas de natureza radical como: ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e DMPD (dicloridrato de N,N-Dimetil-p-fenilendiamina). Ainda, existe o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Considerando, que as determinações da capacidade antioxidante obtidas *in vitro*, fornecem apenas uma idéia aproximada das reais propriedades das substâncias antioxidantes nas situações complexas *in vivo*.

No estudo sobre a atividade antioxidante de padrões fenólicos, determinada através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, realizado por Duarte-Almeida et al. (2006), a quercetina apresentou maior porcentagem de inibição, mesmo em menor concentração. Isso ocorre devido a quercetina ser um flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, sendo que duas destas estão ligadas ao anel B (anel que possui maior atividade redutora). Dentre os ácidos fenólicos analisados, apenas o ácido clorogênico apresentou baixa atividade antioxidante, resultado obtido em virtude de que este ácido posse poucas hidroxilas redutoras, Tabela 3.3.

De acordo com os resultados da tabela 3.3, a atividade dos compostos fenólicos como antioxidantes foi mais eficiente no bloqueio da formação de peróxidos (F1), tendo em conta que, quanto mais próximos os valores de F1 e F2 estiverem de 1, menor será a atividade antioxidante. A rutina e os ácidos clorogênico e elágico apresentaram baixa atividade antioxidante, principalmente na segunda etapa da cinética de oxidação (F2).

Entretanto, no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, as amostras de morango, amora e açaí, que contêm maiores concentrações de flavonóides e outros compostos fenólicos, apresentaram atividades antioxidantes elevadas, sendo que apenas a acerola, conhecida por ter altas concentrações de ácido ascórbico (ASSIS et al., 2001), apresentou atividade

pró-oxidante. No método de seqüestro de radicais livres, o extrato de acerola apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos de amora, açaí e morango (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Rosso, (2006) encontrou que a atividade anti-radical dos extratos de acerola e de açaí diminuiu à medida que o extrato bruto foi sendo purificado e, portanto, os polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico (acerola), presentes nos extratos antociânicos contribuem para a atividade anti-radical.

A polpa de açaí, que apresentou a maior porcentagem de inibição da oxidação no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, teve uma atividade inferior quando comparado à acerola e amora, empregando o método de seqüestro de radicais DPPH•. O morango apresentou a menor atividade em ambos os métodos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

**Tabela 3.3** Atividade antioxidante de compostos fenólicos determinada através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

Padrões	% I	F1	F2
Ácido clorogênico (900 $\mu$ M)	25 $\pm$ 3	0,64 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,02
Ácido elágico (1.100 $\mu$ M)	34 $\pm$ 1	0,54 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,02
Ácido gálico (1.000 $\mu$ M)	41 $\pm$ 3	0,50 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,02
Catequina (700 $\mu$ M)	34 $\pm$ 4	0,57 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,04
Quercetina (540 $\mu$ M)	42 $\pm$ 4	0,50 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,07
Rutina (1.600 $\mu$ M)	28 $\pm$ 2	0,62 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,02

Fonte: DUARTE ALMEIDA et al., 2006

%I: porcentagem de inibição; F1 e F2: bloqueio da formação de peróxidos.

Por outro lado, Schauss et al. (2006b), ao estudar a capacidade antioxidante da polpa/casca de açaí liofilizado em pó, encontrou que o açaí é extremamente potente em suas propriedades antioxidantes contra íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), avaliado mediante o ensaio de depuração do superóxido no ensaio da SOD, alcançando 1614 unidades/g. Isto significa uma alta capacidade de depuração para o radical  $O_2^{\cdot-}$ , dado que fica bastante distante dos resultados obtidos em diferentes estudos de frutas e vegetais. Também foi mostrado, ter excelente atividade contra o radical peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ), por médio do ensaio

baseado na prova florescente (ORAC<sub>fl</sub>), atingindo o total de 1026,9  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g}^{-1}$ . Dado também muito significativo quando comparado com outros produtos vegetais.

As antocianinas foram consideradas como sendo os principais compostos que contribuem à capacidade antioxidante total do açaí. O fruto da *Euterpe oleracea* está sendo reconhecido pela sua alta capacidade antioxidante *in vitro*. Em consequência, seu consumo é altamente recomendado por trazer vários benefícios para a saúde (SCHAUSS et al., 2006b).

Ainda, Del Pozo-Insfran et al. (2006), pesquisando *in vitro* os efeitos dos polifenóis do açaí sobre a antiproliferação celular e indução de apoptose em células de leucemia humana HL-60, encontraram que frações polifenólicas de 0,17-10,7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  reduzem a proliferação das células entre 56 e 86 %. Devido provavelmente à ativação da caspase-3 (apoptose). Os resultados indicaram também, a existência de interações antagônicas entre os diferentes fitoquímicos do açaí, influenciando algumas delas desfavoravelmente nas propriedades pró-apoptóticas e antiproliferativas das outras. Este estudo demonstrou que o açaí oferece uma rica fonte de polifenóis bioativos e confira a importância da investigação no sistema de alimento íntegro, quando avaliado o potencial benéfico para a saúde de compostos fitoquímicos individuais.

Por outro lado, muitos esforços têm sido envidados para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição gênica. Neste contexto, os polifenóis têm se mostrado como substâncias promissoras. Subbaramaiah et al. (1998) utilizaram o resveratrol em um experimento *in vitro*, demonstrando que este polifenol inibiu a ativação da proteína ativadora 1 (AP-1), um dos fatores de transcrição que contribuem para a sobrevivência e multiplicação de células tumorais.

Polifenóis extraídos de sementes de uva (catequinas e proantocianidinas) foram empregados em outro estudo *in vitro* com células cardíacas, aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase, GST (glutathione S-transferase) e catalase (DU et al., 2007)

Por estas razões, atualmente existe grande interesse no uso dos corantes naturais do suco do açaí como ingredientes “funcionais”. Coisson et al. (2005) avaliaram o uso do

suco do fruto do açaí como um corante natural para o iogurte. Por enquanto, os resultados obtidos mostraram que o iogurte enriquecido com suco de *Euterpe* (10 %, m/m) tem características similares a iogurtes típicos comerciais elaborados com suco de amora.

Del Pozo-Insfran et al. (2004) sugerem, que pela estabilidade das antocianinas, o açaí possa ser uma fonte de pigmentos antociânicos úteis para uma variedade de alimentos e produtos nutracêuticos.

### **3.6 Métodos analíticos utilizados e estado-da-arte atual.**

#### **3.6.1 Identificação e quantificação de polifenóis.**

Vários métodos para a determinação de compostos fenólicos já foram desenvolvidos e um grande número de revisões sobre a determinação de polifenóis publicados (MERKEN e BEECKER, 2000; DA COSTA et al., 2000; SKREDE et al., 2000; LICHTENTHÄLER, 2004; GALLORI et al., 2004; WU e PRIOR, 2005a; WU e PRIOR, 2005b; ROSSO, 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2007). Essas análises podem ser classificadas entre as que determinam o conteúdo de fenóis totais e aquelas que quantificam um grupo específico ou classe de compostos fenólicos. Os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenóis totais (WU et al., 2004; LICHTENTHÄLER, 2004; KUSKOSKI et al., 2005; SOUSA et al., 2007;). Várias técnicas cromatográficas já foram desenvolvidas para identificar e quantificar compostos fenólicos específicos. No entanto, apenas polifenóis passíveis de extração sob condições específicas podem ser estudados através dos métodos descritos (ANTOLOVICH et al., 2000, Apud BEAL, 2006).

As análises de compostos fenólicos são influenciadas pela sua estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra e tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Por essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. A solubilidade dos polifenóis é determinada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, interação de fenólicos com outros constituintes do alimento e

formação de complexos insolúveis. Os solventes mais freqüentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH et al., 2000, Apud BEAL, 2006).

A metodologia que mais se utiliza para fracionamento e separação de compostos antioxidantes, tais como os compostos fenólicos, é a extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A identificação é geralmente feita com detectores de massas.

A extração por fase sólida para o tratamento de amostras, reside no fato de que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e pré-purificação. A fase sólida retém com eficiência analitos presentes em líquidos, gases ou fluídos supercríticos, associando enorme versatilidade à técnica. A SPE é realizada como uma cromatografia em coluna, mas com pouco sorvente e seletiva para o conjunto de analitos de interesse, em relação a interferentes e matriz. (RADLER e DA SILVA, 2003).

O estudo mais recente sobre os flavonóides principais e os ácidos fenólicos presentes no açaí, foi separado por LC-MS (LICHTENTHÄLER, 2004; GALLORI et al., 2004; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). Os polifenólicos foram identificados pelo tempo de retenção, e pela comparação espectroscópica ou  $m/z$  com os padrões químicos autênticos. Com relação aos derivados polifenólicos, a sua quantificação se efetuou usando as suas respectivas formas livres.

A espectrometria de massa com ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS), é uma boa ferramenta para a análise de antocianinas porque não requer derivatização, e a carga positiva da antocianidina em valores baixos de pH permite a sua fácil detecção, usando baixas voltagens, desde que outras substâncias passíveis de interferir, não sejam ionizadas, segundo Giusti et al., (1999).

A ESI-MS usa baixa voltagem e pressão atmosférica e é muito versátil como técnica de ionização. As antocianinas são positivamente carregadas em baixo pH e são muito solúveis em água e álcool, com massas moleculares na faixa de algumas centenas

a alguns milhares de Dalton. Por exemplo, temos o caso da pelargonidina-3-glucosídeo do morango, com massa de 433 e moléculas poliaciladas, como as antocianinas aciladas da flor de *Clitoria ternatea*, que têm massa 2107, segundo relato de Terahara et al., (1990, Apud Giusti, 1999).

### 3.6.2 Determinação da Atividade Antioxidante.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante na prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; THAIPONG et al., 2006).

Considerando a sua simplicidade, uma das estratégias mais aplicadas nas medidas da capacidade antioxidante total *in vitro* para um composto, mistura ou alimento, consiste em determinar a atividade do antioxidante frente a substâncias cromógenas de natureza radical; a perda de cor ocorre de forma proporcional com a concentração (RE et al., 1999; MOYER et al. 2002; KUSKOSKI et al., 2005).

Os métodos mais comuns são os que utilizam ABTS e DPPH. Ambos apresentam excelente estabilidade em condições laboratoriais, mas também mostram diferenças nas suas capacidades. O DPPH é um radical livre que pode obter-se diretamente sem previa preparação, enquanto que o ABTS tem que ser gerado mediante uma reação que pode ser química (dióxido de manganês, persulfeto de potássio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina) ou eletroquímica.

Com o ABTS pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, ao passo que o DPPH só pode dissolver-se em meio orgânico e o DMPD, só em meio aquoso. O radical ABTS•+ tem ainda a vantagem de que seu espectro apresenta máximos de absorbância em 414, 654, 754 e 815 nm em meio alcoólico, enquanto que o DPPH apresenta um pico de absorbância em 515 nm, e o DMPD em 505 nm (KUSKOSKI et al., 2005).

O radical ABTS•+ é mais indicado para ensaios de compostos ricos em pigmentos, como é o caso dos antociânicos, por apresentar absorção máxima próxima à região

infravermelha (734 nm) reduzindo possibilidades de interferências de compostos pigmentados que absorvem na região do visível o compostos resultantes de reação secundária (KUSKOSKI et al., 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil elaboraram o comunicado Técnico 128, 2007, no qual descreve o método da captura do radical ABTS para a determinação da atividade antioxidante total em frutas, adaptado e modificado pelos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical.

Por outro lado, Duarte-Almeida et al. (2006) destacam, além do DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilidrazila, o sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Este sistema está fundamentado na determinação espectrofotométrica da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico.

De forma análoga ao sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está baseado no descoloramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando há adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (HUANG e PRIOR, 2005). Entretanto, o primeiro método determina a capacidade de um alimento, ou componente de alimento, de proteger um substrato lipídico contra a oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH• baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para outro que tem propriedades oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Mais também Kuskoki et al. (2005) explicam que, para determinar a capacidade de um antioxidante de reagir com radicais livres, o radical ABTS<sup>•+</sup> é um dos mais empregados por considerar-se de elevada sensibilidade, prático, rápido e muito estável. Para os autores, os resultados obtidos com o método DMPD (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine Dichlorohydrate), sejam eles expressos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) o VCEAC (*Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity*), no são concordantes com os obtidos mediante os ensaios da ABTS e DPPH. Os valores de DMPD são baixos, poucos reprodutíveis e em alguns casos incoerentes.

Em adição, o método de ABTS tem importantes vantagens: apresenta vários máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo o ensaio de compostos, tanto de natureza lipofílica como hidrofílica. O tempo de 1 minuto de reação, para o método ABTS, pode ser suficiente para medidas de polpas de frutos, enquanto que para o método DPPH se requer um tempo de 60 minutos, apresentando em algumas amostras diferenças significativas nos resultados, o que pode implicar na realização de estudos adicionais (KUSKOSKI et al., 2005).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**



## **4.1 Material**

### **4.1.1 Fruto da Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**

Os frutos no estágio maduro da juçara safra 2007, prontos para consumo, foram obtidos da fazenda “Theobroma Agroindústria e Comércio, Ltda.” Registro CPNJ: 068-316.579/001-, Quadro Vergueiro-Eldorado SP, Brasil, instituição devidamente credenciada pelo IBAMA. Após os frutos serem coletados, selecionados, lavados em água potável, submergidos em água sanitária e eliminado o cloro residual, os frutos foram transferidos ao laboratório e armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem processados e analisados. (Figuras 4.1 e 4.2).

### **4.1.2 Caracterização do fruto da juçara**

Os frutos foram pesados (entre 30 e 40 unidades), sendo determinada a porcentagem de polpa e caroço do fruto. Os frutos apresentaram peso médio de  $1,60 \pm 0,04\text{ g}$ , e constituídos de  $0,45 \pm 0,03\text{ g}$  de polpa e  $1,15 \pm 0,05\text{ g}$  de caroço. Estas partes representaram, respectivamente, 28 e 72 % do fruto.

Para as análises de composição centesimal da polpa integral fresca, os frutos foram descongelados e imediatamente despulpados. Nessa oportunidade, verificaram-se os valores de Brix e de pH da polpa.

### **4.1.3 Amostragem e preparação**

A amostragem foi feita aleatoriamente, em lotes de aproximadamente 1 kg. Os frutos descongelados foram em seguida manualmente despulpados. Posteriormente, a polpa foi aquecida até  $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a fim de pasteurizá-la. Em seguida, a polpa foi congelada e liofilizada, dependendo da necessidade para cada amostra em particular. Prepararam-se aproximadamente 320 g de polpa para cada amostra processada para as determinações de antocianinas e fenóis totais.

Prepararam-se as seguintes amostras de polpa integral de juçara que é a polpa extraída sem adição de água e sem filtração (MAPA, 2000): Polpa fresca (polpa a ser

utilizada no momento), Polpa congelada, polpa pasteurizada-congelada e polpa liofilizada. A Figura 4.2 amostra o procedimento seguido para obter as polpas integrais.



**Figura 4.1.** Fotografia, dos frutos congelados da juçara.

#### **4.2 Reagentes e padrões analíticos.**

Os solventes empregados para a obtenção dos extratos para antocianinas totais, fenóis totais, extração em fase sólida e para os métodos de atividade antioxidante foram de grau analítico (p.a.), assim como os utilizados na caracterização físico-química da polpa integral fresca da juçara: Metanol (Ecibra), ácido clorídrico (Synth), cloreto de potássio (Riedel), acetato de sódio (Merck), acetona (Synth), carbonato de sódio (Synth), éter de petróleo (Synth), acetato de etila (Merck) e dimetilsulfóxido (Nuclear).

Todos os solventes utilizados para separação por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) foram de grau cromatográfico: Metanol (Merck), acetonitrila (J.T. Baker), ácido *o*-fosfórico (Fluka) e ácido acético (Sigma-Aldrich).

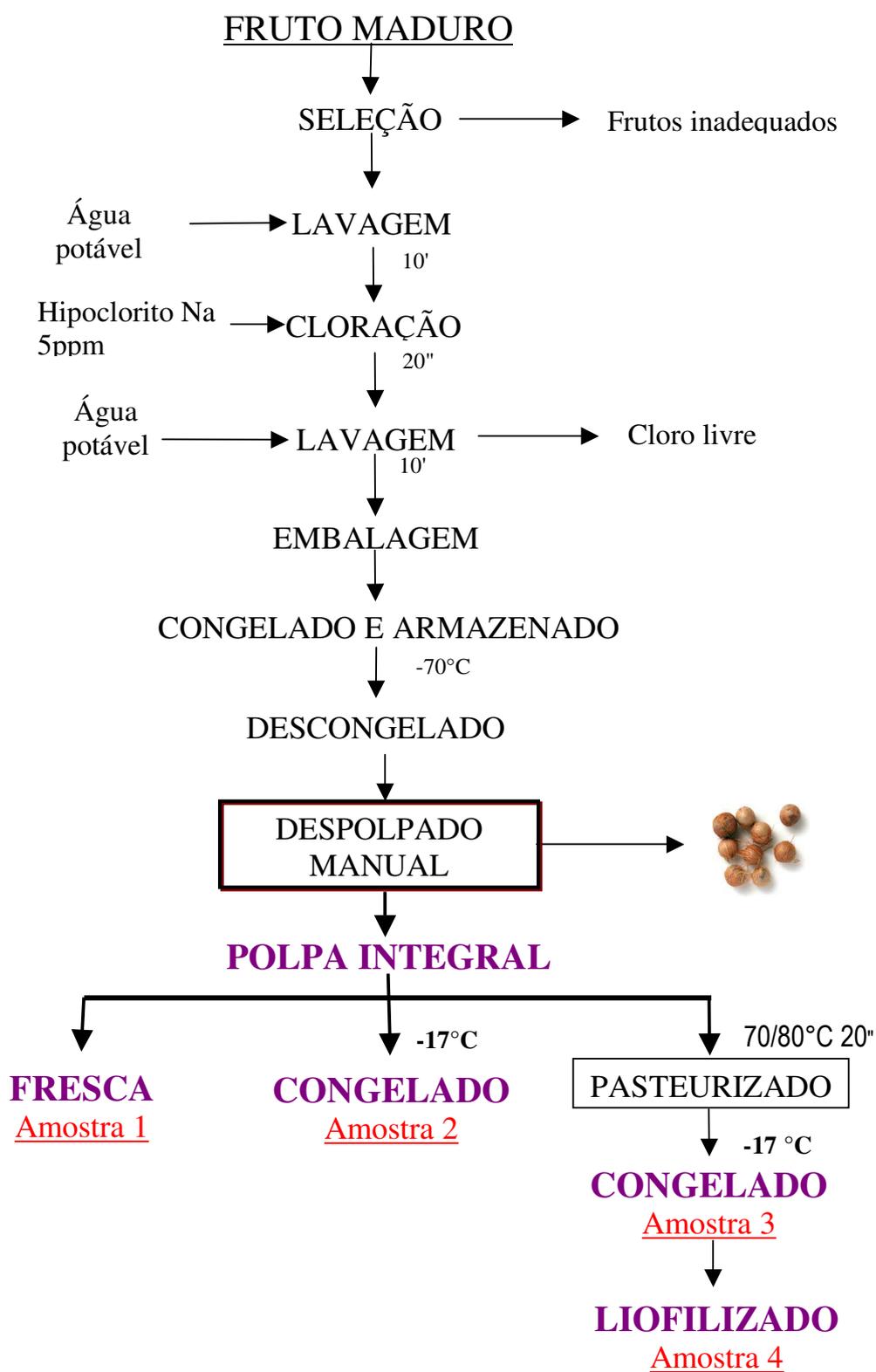


Figura 4.2. Obtenção da polpa do fruto da Juçara.

Os reagentes ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolin]-6-sulfônico, A-1888), DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-picrilidrazila, D-9132) e BHT (2,6-di-tert-butil-p-cresol) foram fornecidos pela Sigma. Os reagentes de Folin-Ciocalteu e o persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Alemanha). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, 97 %) da Fluka e Ácido L(+) ascórbico da Merck.

**Os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos:** Ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina e o resveratrol 99% foram obtidos da Sigma. Cianidina-3-glucosídeo e o ácido elágico da Fluka. Os padrões de antocianinas 3-O-glucosídeo de pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina foram adquiridos do Polyphenols Laboratories (Sandnes, Noruega).

A água foi purificada por um sistema Milli Q, e as amostras e os solventes filtrados utilizando membranas filtrantes (0,22 e 0,45 µm), da Millipore.

#### 4.3 Material e equipamento analítico

- Papel filtro Whatman # 1
- Papel filtro quantitativo (JP40 – Faixa Branca)
- Sistema Milli Q, Millipore ELGA, Reino Unido
- Extração em fase sólida: cartucho C<sub>18</sub> Sep-Pak Vac 20 cc (5 g), Waters (EUA)
- Desgaseificação das fases móveis utilizadas em HPLC: banho de ultra-som USC 700 (Unique-Brasil)
- Homogeneizado: Agitador de tubos (Phoenix-Brasil)
- Filtro de membrana PTFE 0,22 µm
- Secagem dos extratos: evaporador rotativo a vácuo (Tecnal-Brasil), acoplado a um sistema de refrigeração (mlw-Alemanha).
- Medidas potenciométricas: pH-metro HI 9321 Microprocessor, EUA
- Medidas espectrofotométricas: Espectrofotômetro Beckman-Coulter, DU 640, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, EUA
- Identificação de antocianinas, ácidos fenólicos e flavonóides: Espectrômetro de Massa Q-Tof, EUA

## 4.4 Métodos

### 4.4.1 Composição centesimal

As análises de umidade, cinzas e nitrogênio total da polpa integral fresca da juçara foram determinadas de acordo a AOAC (1995). Lipídeos totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959). As determinações foram realizadas em triplicata.

### 4.4.2 Determinação de Antocianinas Totais (AT)

Aplicou-se o método por diferencia de pH, desenvolvido por Giusti e Wrolstad (2001). Neste método, os pigmentos antociânicos são submetidos a transformações estruturais reversíveis por uma mudança no pH no meio resultando em uma dramática alteração nos espectros de absorvância (As formas coloridas dos oxônios predominantes em pH 1.0 e a forma hemiacetal incolor a pH 4,5). O método do pH-diferencial é baseado nesta reação, e permite a medida exata e rápida das antocianinas totais, mesmo na presença dos pigmentos degradados polimerizados e de outros compostos de interferência.

A partir da pesquisa sobre a determinação de antocianinas em frutas de Terci, (2004), para este estudo foram utilizados extratos previamente preparados pela maceração e imersão das polpas integrais ~5 g em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/5 polpa metanol (m/v), na ausência de luz, seguindo de filtração com papel de filtro quantitativo. O resíduo foi novamente submetido à extração, lavando com metanol acidificado, até a extração exaustiva dos pigmentos.

Após a extração das antocianinas, os extratos brutos foram combinados e concentrados utilizando evaporador rotativo a vácuo em temperatura inferior a 40 °C, até massa constante. Isto resultou em um resíduo viscoso. Em balões volumétricos de 5,0 mL, foram dissolvidos entre 58 e 70 mg do extrato seco com água desionizada.

Utilizou-se dois sistemas tampão: cloreto de potássio de pH 1,0 ( $0,025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e acetato de sódio pH 4,5 ( $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Na seqüência, 150 – 400  $\mu\text{L}$  da solução estoque dos extratos (para atingir uma absorvância na faixa de 0,100-1,200 a  $\sim 510 \text{ nm}$ ), foram adicionados, completando-se o volume com soluções tampão de pH 1,00 ou pH 4,50,

ultrasonicando e reagindo durante 15 minutos. Em seguida, a absorvância foi medida no comprimento de onda máximo de cada extrato.

Mediu-se a absorvância frente a um branco a ~510 e 700 nm. Depois se calculou a absorvância final a partir da expressão:

$$A = (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

A concentração de pigmentos monomérica no extrato se expressou em cianidina-3-glucosídeo.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg / 100 g)} = \frac{AxMMxFDx}{\epsilon x l} \cdot 100$$

Onde:

- A = Absorvância
- MM = massa molar
- FD = Fator de diluição
- $\epsilon$  = Absortividade molar

A concentração final das antocianinas (mg/100 g) foi calculada em base à massa de extrato e massa da amostra e o resultado foi expresso em termos de cianidina 3-glucosídeo (MM: 449,2 e  $\epsilon$ : 26900).

#### 4.4.3 Determinação de Fenóis Totais (FT)

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, que utiliza o método de Folin-Ciocalteau (SOUSA et al., 2007). Fundamenta-se em seu caráter redutor e é o mais conhecido. O reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> porém, na presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e

cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ser de natureza fenólica.

A determinação do teor de fenóis totais foi feita por meio de espectrofotometria na região do visível, a 765 nm, sobre o extrato acetônico das amostras preparadas segundo descrito por Julkunen-Tiitto (1985) e aplicado por Lichtenthäler (2005).

Aproximadamente um grama de cada amostra de polpa integral processada da juçara foi extraído em três etapas com acetona a 80% (v/v), durante um período de 20 horas. Em seguida, os extratos foram concentrados utilizando evaporador a vácuo, até um volume final de 30 – 40 mL. Imediatamente após a filtração em papel filtro quantitativo, o volume foi completado com água Milli Q em balão volumétrico de 100 mL.

100 µL do extrato foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, 2 mL de água Milli Q e 1 mL de reagente fenol Folin-Ciocalteu. Após serem misturados e agitados, os reagentes foram adicionados imediatamente 5 mL da solução de carbonato de sódio a 20% (m/v). A solução resultante foi completada com água Milli Q, até o volume final de 10 mL, e, 20 minutos mais tarde, foram feitas as leituras de absorbância a 765 nm, no espectrofotômetro UV-Vis.

As análises foram realizadas em duplicata para o branco e o padrão, triplicata para cada uma das amostras. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração, construída com padrão de ácido gálico (100 – 1300 µg/mL) e expressa como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico).

#### **4.4.4 Fracionamento e purificação dos fitoquímicos**

O fracionamento e purificação dos fitoquímicos da polpa integral da Juçara foram baseados nas características de solubilidade e afinidade, segundo a metodologia seguida por Skrede et al. (2000); Del Pozo-Insfran et al. (2004) e Del Pozo-Insfran et al. (2006). O esquema de isolamento usado para fracionar os constituintes fitoquímicos da Juçara se ilustra brevemente na Figura 4.3.

Primeiramente, os componentes lipofílicos foram separados desde os componentes hidrofílicos pela adição de éter de petróleo e acetona (1:1, v/v). Aproximadamente 15 g de polpa integral fresca foram misturados com 40 mL de acetona e filtrados sobre um funil Büchner, usando papel Whatman # 1. O resíduo foi re-extraído duas vezes com 40 mL de acetona e os filtrados agitados em funil de separação com 80 mL de éter de petróleo (Figura 4.4).

A fase superior com éter de petróleo (componentes lipofílicos) foi removida e concentrada até *secura* com nitrogênio gasoso e re-suspendido no solvente adequado para a análise da atividade antioxidante. Os componentes hidrofílicos foram recuperados por remoção da acetona, sob pressão reduzida a < 40 °C, depois a fração foi diluída num volume conhecido de água acidificada (0,1 %HCl), e foram subsequenteemente fracionados dos compostos polares usando cartuchos C<sub>18</sub> (20 cc).

Os cartuchos C<sub>18</sub> foram previamente acondicionados, para imediatamente aplicar os componentes hidrofílicos. As etapas envolvidas neste primeiro fracionamento na SPE foram as seguintes:

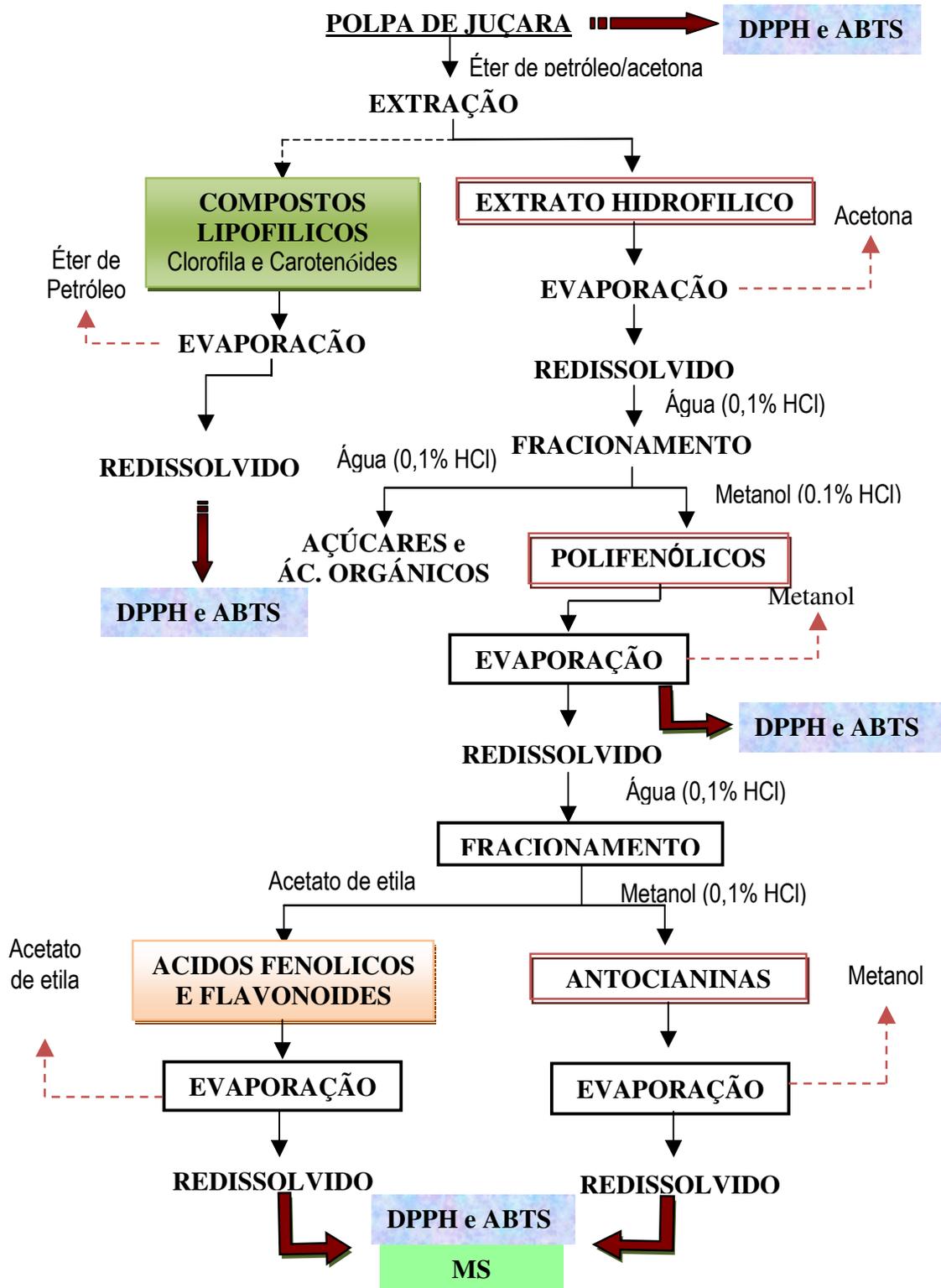
- Ativação do sorvente pela passagem de 50 mL de metanol (0,1% HCl) para condicionar a superfície do sólido, e o solvente de ativação foi removido com 50 mL de água (0,1 %HCl), líquido de composição similar à amostra;
- aplicaram-se 15 mL do extrato hidrofílico re-suspendido em água 0,1 %HCl ficando os analitos retidos na parte superior do sorvente (etapa de sorção ou retenção);
- logo se aplicarem 45 mL de água com 0,1 %HCl para remover os interferentes e parte da matriz (etapa de lavagem); onde são removidos os açúcares e ácidos orgânicos;
- finalmente a eluição dos analitos do sorvente foi feita com 15 mL de metanol (0,1 %HCl), coletando o eluato (componentes polifenólicos), para a concentração e posterior fracionamento. O metanol foi removido da fração polifenólica usando evaporador rotatório e pressão reduzida < 40 °C.

Após a fração polifenólica ser re-suspendida em solução aquosa 0,1 %HCl, se procedeu ao segundo fracionamento, usando um nov cartucho C<sub>18</sub>, que incluiu as seguintes etapas:

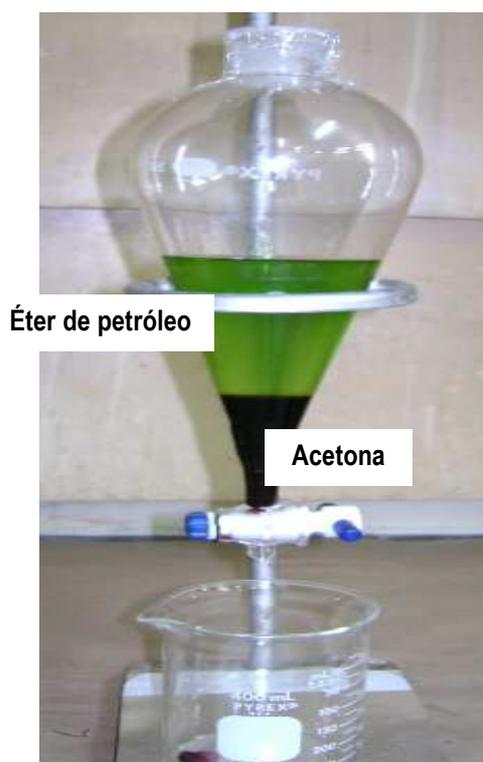
- Ativação do sorvente pela passagem de 50 mL de acetato de etila e 50 de metanol (0,1 %HCl);
- remoção dos solventes de ativação com 50 mL de água (0,1 %HCl);
- aplicação de 15 mL do extrato polifenólico onde os analitos ficaram retidos na parte superior da coluna do sorvente (Figura 4.5);
- aplicação de 45 mL de água 0,1 %HCl para remover os interferentes e parte da matriz (etapa de lavagem); com o qual foram removidos os açúcares e ácidos orgânicos residuais;
- finalmente, a primeira eluição foi feita com 15 mL de acetato de etila para remover a fração dos ácidos fenólicos e flavonóides do sorvente, e uma segunda eluição com 15 mL de metanol (0,1 %HCl) para remover as antocianinas. Cada uma destas frações foi concentrada sob vácuo a <40°C até evaporar todo o solvente. A seguir, foram re-suspendidas em metanol e armazenadas a -17 °C até análise.

As frações de interesse obtidas a partir da polpa integral de juçara são as seguintes: fração 1, de polpa inteira; fração 2, de compostos lipofílicos; fração 3, de compostos polifenólicos; fração 4, de ácidos fenólicos e flavonóides e, fração 5 de antocianinas. Frações que foram submetidos à avaliação de atividade antioxidante e cromatografia tal como se indica na Figura 4,3.

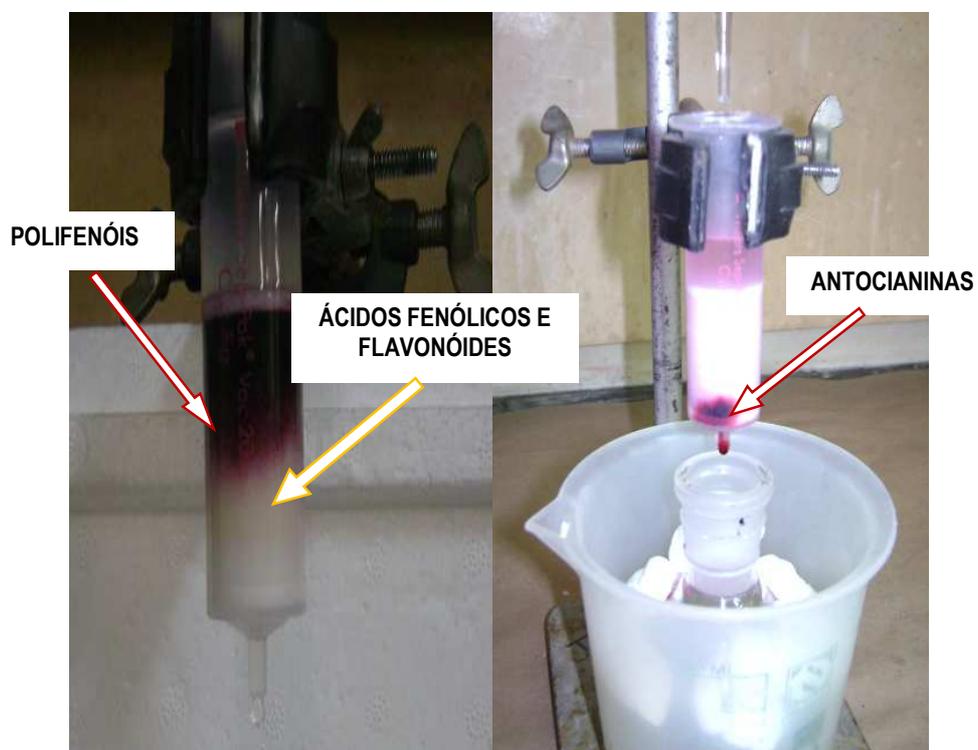
A acetona foi usada também por outros pesquisadores para extrair diretamente antocianinas de diversas fontes vegetais. Na comparação com o metanol acidificado, esta técnica para a extração de antocianinas das frutas vermelhas permite uma extração eficiente e mais reprodutível, evita problemas com pectinas, e permite uma temperatura muito mais baixa para a concentração da amostra (Costa et al. 2000).



**Figura 4.3.** Fluxograma de separação para fracionar e purificar os fitoquímicos presentes na polpa da juçara.



**Figura 4.4.** Separação das frações lipofílica e hidrofílica na polpa da juçara.



**Figura 4.5.** Fracionamento e purificação dos polifenóis presentes na polpa da juçara.

## 4.4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante

### 4.4.5.1 Método ABTS

Segundo a metodologia desenvolvida por Re et al. (1999), descrita por Kuskoski et al. (2004), o radical  $ABTS^{*+}$  se obtém mediante a reação de ABTS com persulfato de potássio. Para este ensaio se aplicou o procedimento seguido por Arnao et al. (2001) com as modificações feitas por Thaipong et al. (2006).

Se prepararem a soluções estoque de ABTS ( $7,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e persulfato de potássio ( $2,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) água destilada. O radical  $ABTS^{*+}$  se obteve pela reação de ABTS e persulfato de potássio, misturando em partes iguais e armazenado a temperatura de bancada ( $\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) num prazo de 12 h ao abrigo da luz. Formado o radical  $ABTS^{*+}$ , este foi diluído misturando 1 mL da solução  $ABTS^{*+}$  com metanol ( $\sim 35 \text{ mL}$ ), até obter um valor de absorvância 1,1 ( $\pm 0,01$ ) unidades a 734 nm, usando o espectrofotômetro. A solução fresca de  $ABTS^{*+}$  foi preparada para cada ensaio.

Para a obtenção do extrato metanólico da polpa integral fresca se misturou 1 g de polpa com 25 mL de metanol. A mistura foi colocada a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 h e centrifugada a 19118 g por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a  $-17 \text{ }^\circ\text{C}$ . As outras amostras foram obtidas do processo de fracionamento e purificação dos fitoquímicos por SPE, as quais foram re-suspendidas com metanol.

Os máximos de absorção do radical  $ABTS^{*+}$  dissolvido em metanol se observam claramente na Figura 4.6, que não coincidem com os máximos de absorção do extrato metanólico da polpa integral fresca. Isto confirma alguns relatos na literatura quando usado 734 nm como comprimento de onda para fazer as leituras, pois a partir de 720 nm, a absorvância da amostra começa a ser nula.

Num volume de  $2.850 \text{ }\mu\text{L}$  da diluição do radical  $ABTS^{*+}$  assim gerado, foi determinada a absorvância inicial (734 nm a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), para depois reagir com  $150 \text{ }\mu\text{L}$  da fração da polpa. Transcorrido 6 minutos, uma leitura posterior ( $A_{734}$ ) serviu para fazer o seguimento da diferenças de absorvâncias. A absorvância final foi lida depois de 2 h de reação na ausência de luz. Utilizou-se o álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Para a determinação da atividade antioxidante total, as amostras foram preparadas em três diluições diferentes como mínimo em triplicata (Comunicado Técnico 128, 2007 do MAPA). As curvas-padrão foram realizadas nas faixas lineares, o antioxidante sintético de referência Trolox, se ensaiaram em uma concentração de entre 50 e 700  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  em metanol, nas mesmas condições. Procedeu-se da mesma maneira com o ácido ascórbico (50-600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e com o BHT (100-340  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante em equivalentes de Trolox), VCEAC (atividade antioxidante em equivalentes de vitamina C) e BHTEAC (atividade antioxidante em equivalentes de BHT).

#### **4.4.5.2 Método de seqüestro de radicais livres DPPH\***

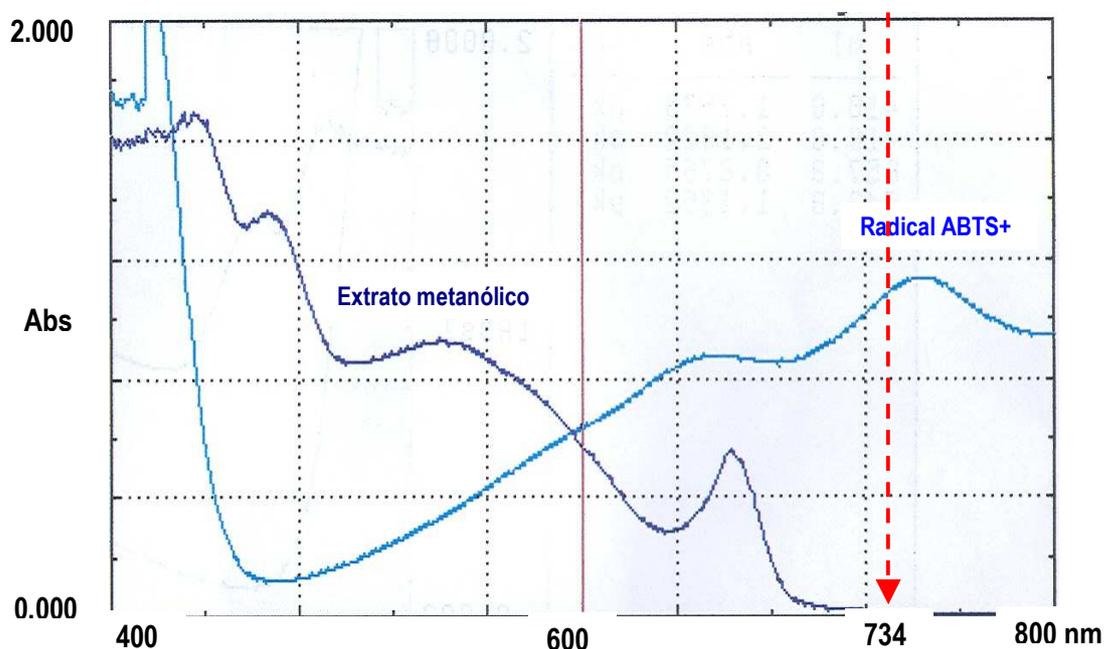
Método desenvolvido por Brand-Williams et al. (1995), baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Determinados pela redução da absorvância medida a 515 nm do radical DPPH<sup>\*</sup>, por antioxidantes. Com modificações, o método descrito por Kim et al. (2002) e aplicado por Kuskoski et al. (2005), foi ajustado para polpas de frutos, na medição da absorvância do radical DPPH<sup>\*</sup> 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (3,9 mL) dissolvido em metanol 80%, para o comprimento de onda de 517 nm.

Para o preparo do extrato metanólico da polpa integral fresca se misturou ~1 g de polpa com 20 mL de metanol 80%. A mistura foi colocada a 4 °C por 12 h e centrifugada a 19.118 g por 15 min. O extrato foi filtrado usando Whatman # 1. O resíduo foi re-extraído com ~20 mL de metanol ao 80% e os filtrados foram misturados em um balão volumétrico de 50 mL, o volume foi completado com metanol ao 80%. As outras amostras foram obtidas do processo de fracionamento e purificação dos fitoquímicos por SPE, as quais foram re-suspendidas com metanol 80 %.

Ao DPPH dissolvido em metanol 80%, se agregou 100  $\mu\text{L}$  da amostra ou padrão. A mistura se homogeneizou cuidadosamente e se colocou no escuro durante 60 minutos a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). As medidas de absorvância a 517 nm se realizaram antes de agregar a amostra ( $A_0$ ) e passados 60 minutos ( $A_t$ ). Utilizou-se o metanol 80%, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

A concentração de DPPH<sup>\*</sup> no meio da reação se calculou a partir das curvas de calibração obtida por regressão linear, tanto dos padrões como das amostras. Os

resultados foram expressos em TEAC, o seja, atividade equivalente ao Trolox ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de amostra peso fresco). Os padrões foram ensaiados nas mesmas condições, antioxidante sintético de referência Trolox a uma concentração de 100 -1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ácido ascórbico (100 - 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e com o BHT (100 - 900  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante em equivalentes de Trolox), VCEAC (atividade antioxidante em equivalentes de vitamina C) e BHTEAC (atividade antioxidante equivalente ao BHT).



**Figura 4.6.** Superposição dos espectros do radical  $\text{ABTS}^{*+}$  e a fração fenólica dissolvida em metanol.

#### 4.4.6 Análise de resveratrol

Aproximadamente 1 g de polpa integral fresca de juçara foi extraída com 20 mL de metanol. Após o extrato fora centrifugado a 16.654 g a 4°C por 5 min, o sobrenadante foi

usado para a análise cromatográfica de resveratrol, segundo as condições analíticas descrita por Shauss et al, (2006a).

A análise foi realizada por cromatografia líquida (HP 1100), equipado com bomba Varian 9012, detector UV-Vis Varian 9050, coluna Varian C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5µm) e monitorada pelo software Star Chromatography Workstation Varian (versão 4,5). A eluição foi seguida usando fase móvel A (água/acetonitrila/ácido acético; 89:9:2, v/v/v) e fase móvel B (Acetonitrila/água; 80:20, v/v). A detecção foi monitorada a 280 nm a uma vazão de 1,0 mL/min a temperatura ambiente. A fase móvel seguiu o gradiente 0%B, 0 – 10 min, 0 - 40% B, 10 - 25 min; 40 - 100%B, 25-32 min; 100% B, 32 – 35 min.

#### **4.4.7 Análise da mistura de antocianinas e outros flavonóides por MS**

Para a identificação das substâncias fenólicas na fração antociânica e na fração de ácidos fenólicos e flavonóides foi usado, o espectrômetro de Massa híbrido (quadrupólo + tempo de voo) Q-Tof, com ionização por eletrospray (ESI). Ele utiliza um analisador de massa de alta performance, do tipo quadrupólo, incorporado a um dispositivo de pré-filtro para proteção do analisador principal contra depósitos contaminantes, e um espectrômetro de massas, do tipo tempo de voo ortogonal (ToF). Uma célula de colisão do tipo hexapólo, entre os dois analisadores, foi usada para induzir fragmentação que ajudou nas investigações estruturais.

Os íons emergentes do segundo analisador foram detectados pelo detector do tipo placa de microcanais (MCP) e pelo sistema de contagem de íons (TDC). Um computador tipo PC que controla o espectrômetro, recebe e processa os dados através do software Mass Lynx NT ®.

As duas frações obtidas da SPE (antociânica e de ácidos fenólicos e flavonóides) foram diluídas em metanol (grau HPLC) 50%. Para melhorar a operação no modo positivo foi adicionada 1% de ácido fórmico na solução da fração antociânica, Ambas as amostras purificadas foram injetadas diretamente no espectrômetro de massa segundo a metodologia aplicada por Giusti et al. (1999) e Hassimotto et al. (2007).

As condições do sistema utilizadas no espectrômetro de Massa se relatam na Tabela 4.1. Quando o íon molecular da substância for detectado, seu espectro de MS<sup>2</sup> foi obtido, usando uma energia relativa de colisão de 10 – 60 eV.

#### 4.4.8 Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográficas foram apresentados como média e estimativa do desvio padrão. Os dados obtidos pelas análises de antocianinas totais e fenóis totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) monovariada e teste de Tukey, para análise das diferenças entre as médias. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa computacional Microsoft Excel. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

**Tabela 4.1** Condições analíticas do ESI-MS para as frações antociânica (ES+) e de ácidos fenólicos e flavonóides (ES-) presentes na polpa integral da juçara

Fonte	(ES+)	(ES-)
Capilar	2000 V	2000 V
Cone da amostra	25 V	30 V
Cone de extração	0,5 V	3 V
Temperatura de desolvatação	250 V	300 °C
Temperatura da fonte	100 °C	100 °C
Vazão da seringa	5 µL/min	20 µL/min
Energia do íon	3,0 V	0,0 V
Energia de colisão	10,0 V	5,0 V
<b>Fluxo do gás</b>		
Cone	0	100 L/h
Desolvatação	200 L/h	300 L/h

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 5.1 Caracterização da matéria-prima

No laboratório, foi possível estimar que 1 kg de fruto de juçara *in natura* rende aproximadamente até 280 g de polpa integral fresca, ou 28 %, seguindo o procedimento de despoldado manual.

A polpa integral fresca da juçara mostrou de 2,35 a 2,45 °Brix de sólidos solúveis, mantendo o pH entre 4,90 e 4,91. Estas variações de pH e °Brix são pequenas e provavelmente devidas ao fato de os frutos estarem no mesmo estágio de maturação, além de apresentar uniformidade na cor, tal como foi relatado por LORENZI (2004). Esta característica foi observada para todos os cachos coletados na fazenda, de onde foram extraídos os 10 kg de amostra.

### 5.1.1 Composição centesimal

Os dados de composição centesimal da polpa integral fresca de juçara (*Euterpe edulis*) estão apresentados na Tabela 5.1. De um modo geral, estes valores estão próximos dos encontrados em outros estudos da polpa de juçara e de seu congênera, o açai (*Euterpe oleraceae*).

Em particular, o teor elevado de lipídeos (44,5 %  $\pm$  2,2) da polpa de juçara se destaca em relação aos demais nutrientes. O teor de proteínas foi de 8,5 %  $\pm$  0,3 em base seca, ou seja, ligeiramente superior aos resultados divulgados pelo laboratório Ceplac/Cepec/Sefis (2004), que relataram 6,72 % de proteínas para a polpa de juçara e 7,76 %, para a de açai.

Quanto ao açai, os dados sobre composição podem variar, de autor para autor. Embora Alexandre (2004), tenha relatado conteúdos de proteína e lipídeos de 10,69 %  $\pm$  0,66 e 48,24 %  $\pm$  0,12, respectivamente, para a polpa de açai tipo médio. Schauss et al. (2006a) encontraram no açai valores inferiores de lipídeos e proteínas, 32,5 % e 8,1 % em peso seco, respectivamente.

## **5.2 Antocianinas e fenóis totais**

Considerando que os solventes de extração utilizados representam um fator decisivo na quantificação de antocianinas e de polifenóis totais, é importante ressaltar que os valores expostos na Tabela 5.2 foram obtidos mediante extração metanólica para as antocianinas totais, segundo o procedimento de Terzi (2004), e extrato cetônico para fenóis totais, seguindo o procedimento por Lichtenthaler (2004).

Os fenóis totais foram quantificados mediante a equação da curva padrão do ácido gálico obtido nas mesmas condições analíticas que as amostras,  $A = 0,0012C + 0,26$ ;  $R^2 = 0,9956$  (Figura 5.1); onde A é a absorbância e C, a concentração de ácido gálico em  $\mu\text{g/mL}$ . Os conteúdos totais de antocianinas e de fenóis se mostram na Tabela 5.2, estes são expressos em base úmida como em base seca para facilitar a comparação com os resultados de outras pesquisas.

Em geral, a polpa integral da juçara apresenta altos teores de antocianinas totais e fenóis total, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura (IADEROZA et al., 1992; BOBBIO et al., 2000; SKREDE et al., 2000; MOYER et al., 2002; LICHTENTHÄLER, 2004; TERCI, 2004; ROSSO, 2006; PANTELIDIS et al., 2007; SOUSA et al., 2007; BRITO et al. 2007).

As quantidades de antocianinas totais nas diferentes polpas integrais variaram de 1,03 % (polpa integral liofilizada) a 2,98 % (polpa integral fresca), em peso seco. As polpas fresca e congelada apresentaram o maior conteúdo de antocianinas, no entanto, as polpas, pasteurizada e liofilizada, o menor (Tabela 5.2).

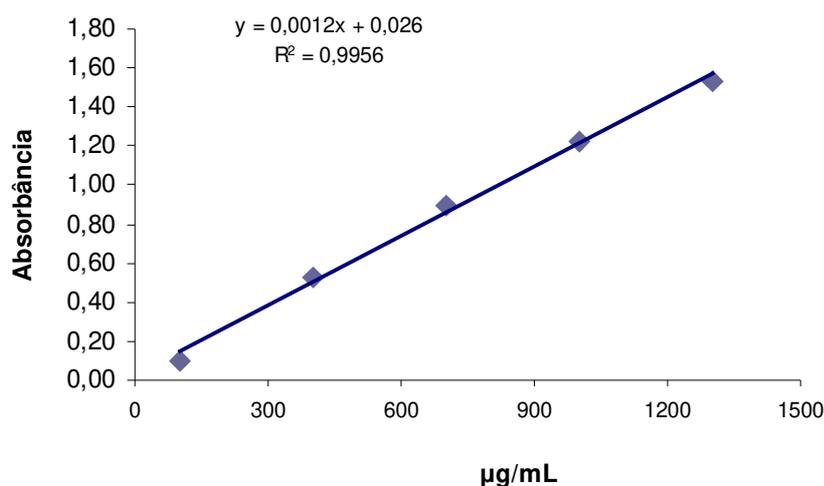
Com relação aos teores totais de compostos fenólicos, verificou-se variação de 2,83 % (polpa integral pasteurizada) a 5,97 % (polpa integral fresca), em peso seco. Estes resultados são promissórios para a juçara quando considerarmos que para ser considerada boa fonte de compostos fenólicos, um produto alimentício deve conter de 1,15 a 3,61 % destes fitoquímicos (Cantos et al., 2002).

**Tabela 5.1** Caracterização físico-química da polpa integral de juçara (MÉDIA ± S, n=3)

Análise <sup>1</sup>	Composição da polpa do fruto da juçara
Umidade %	68,8 ± 0,2
Proteína <sup>1,2</sup> %	8,5 ± 0,3
Lipídeos <sup>1</sup> %	44,5 ± 2,2
Cinzas <sup>1</sup> %	2,3 ± 0,2
pH	4,90 ± 0,01
Brix	2,4 ± 0,05

<sup>1</sup> em g/100g de matéria seca<sup>2</sup> N x 6,25

## Reta padrão de ácido gálico

**Figura 5.1.** Reta de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais.

Na Figura 5.2 se mostra o conteúdo de antocianinas totais e fenóis totais das diferentes polpas integrais, sendo estes significativamente diferentes. Entretanto, os conteúdos continuam sendo altos quando comparados com os resultados de outros frutos avaliados com os mesmos métodos. Os conteúdos de antocianinas totais, por exemplo, relatados para amora, uva e açaí, foram de  $41,8 \pm 1,8$ ;  $30,9 \pm 0,1$ ;  $22,8 \pm 0,8$  mg/100g de polpa fresca comercial, respectivamente (KUSKOSKI et al., 2005). Por outro lado,

laderoza et al. (1992) relataram comparativamente os conteúdos de antocianinas para o açaí e juçara, encontrando 336 mg/100g e 1347 mg/100g de fruta, respectivamente.

Terci (2004) determinou as antocianinas de amora, jaboticaba, jambolão e uva, pelo método de Fuleki e Francis (do pH diferencial), relatando os seguintes valores: 291, 314, 386 e 227 mg/100g, respectivamente. Evidencia-se que a juçara é consideravelmente mais rica do que o jambolão, que foi o produto mais rico da lista.

**Tabela 5.2** Concentração de fenóis totais e antocianinas totais em polpas integrais processadas de juçara (média  $\pm$  S, n=3)

Polpa integral	Fenóis Totais		Antocianinas Totais	
	g/100g/EAG		g/100g	
Fresca	1,86 $\pm$ 0,02	5,97 $\pm$ 0,07*	0,93 $\pm$ 0,02	2,98 $\pm$ 0,05*
Congelada	1,09 $\pm$ 0,01	3,27 $\pm$ 0,03*	0,90 $\pm$ 0,02	2,58 $\pm$ 0,06*
Pasteurizada	1,06 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,02*	0,57 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,02*
Liofilizada	3,55 $\pm$ 0,04	3,66 $\pm$ 0,06*	0,99 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,03*

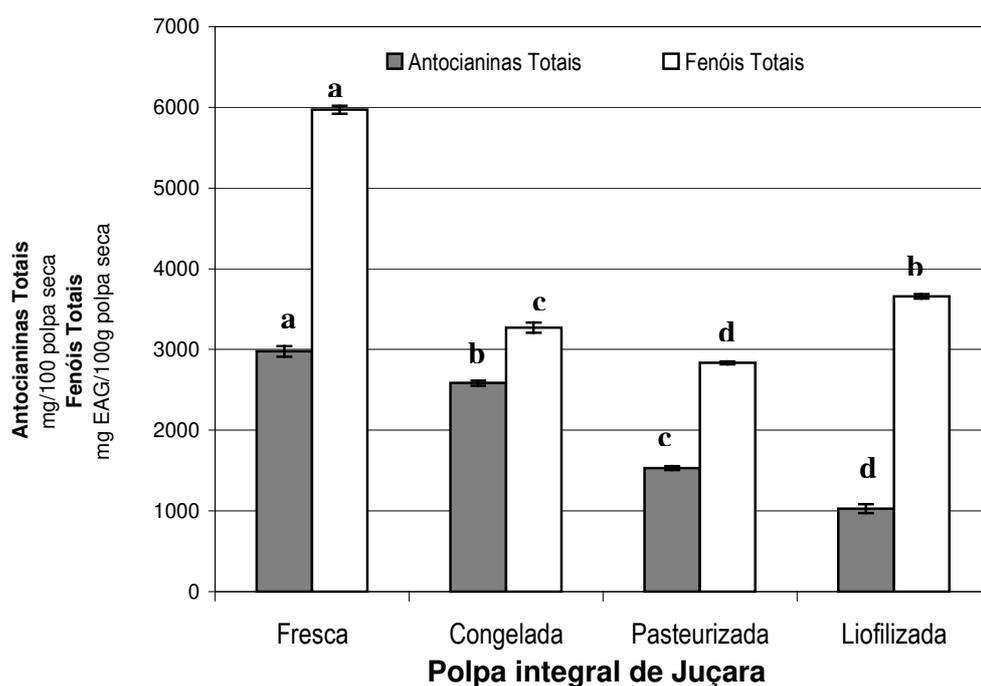
EAG = Equivalente de ácido gálico

\* Resultados expressados em matéria seca

Brito et al. (2007), em trabalho recente sobre juçara e outras frutas tropicais (guajiru, jambolão, acerola-clone Il47/1 e acerola roxinha) quantificaram as antocianinas utilizando método cromatográfico de análise com detector MS/MS. Esses autores relataram que a polpa de juçara contém apenas 290 mg/100 g de peso fresco, ou 2.956 em base seca, o qual está de acordo com o nosso achado de 2.980 mg/100 g de polpa fresca, em base seca. Os dados de laderoza et al. (1992) para juçara estão então abaixo do esperado, provavelmente por subestimação devida à técnica de cromatografia em papel por eles utilizada e quiçá por perdas ocasionadas durante o manuseio.

Em relação aos fenóis totais de açaí, existem também diversos trabalhos, mostrando que os teores dessa espécie são geralmente inferiores aos obtidos no presente trabalho com juçara, como mostram os conteúdos de fenóis totais relatados por Kuskoski et al. (2005) para amora, uva e açaí que foram: 118,9  $\pm$  2,1; 117,1  $\pm$  0,6; 136,8  $\pm$  0,4 mg/100g polpa fresca comercial, respectivamente. Entretanto, Rosso (2006) determinou fenóis totais que foram próximos aos de juçara, 3.300 e 3.783 mg EAG/ 100 g em acerola e açaí respectivamente.

Outros pesquisadores relatam conteúdos para o açaí que não permitem comparação com os dados do presente trabalho. Lichtenthäler (2004), por exemplo, relata um valor de 463 mg/L de antocianina total e 4.600 mg/L de fenóis totais em açaí grosso. Por sua vez, Del Pozo-Insfran et al. (2006) relataram conteúdos também de difícil comparação com os dados desta dissertação, de 1.173 mg/L de antocianinas e 5.660 mg/L de fenóis totais, também quantificados por HPLC.



**Figura 5.2.** Conteúdo de Antocianinas Totais e Fenóis Totais na polpa integral de juçara submetida a diferentes tratamentos. Letras iguais indicam a ausência de diferença significativa, com 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na presente pesquisa, foi realizada a comparação entre as polpas integrais, observando-se que em termos de antocianinas e fenóis totais, a polpa fresca é de 1,6 a 3,2 vezes, mais rica, do que a polpa liofilizada. Esse resultado indica que, mesmo quando o manuseio da polpa não envolve processamento térmico propriamente dito, a exposição do produto ao oxigênio do ar pode se tornar importante fator na retenção do poder antioxidante.

A visível diferença na coloração entre estas polpas integrais reflete já perda dos compostos fenólicos, entre elas as antocianinas que são responsáveis pela cor da polpa e do fruto. O escurecimento e a diminuição da cor vermelha podem ser atribuídos à oxidação e degradação térmica das antocianinas e os fenóis, efeito similar também foi observado por Alexandre (2004) quando a polpa de açaí foi pasteurizada.

Por outro lado, Skrede et al. (2000) observaram perdas expressivas de antocianinas e polifenóis ocorridas em uva-do-mato (*blueberries*) quando foram processadas em sucos e concentrados. A instabilidade dos componentes estaria sujeita à severidade da operação, principalmente a trituração e despectinização, operações que supostamente ativam a polifenoloxidase.

As antocianinas são moléculas relativamente instáveis, e suas cores são dependentes do pH, temperatura, luz e da presença de metais, detalham STRACK et al. (1993, Apud Costa et al., 2000). É sabido que eventual interação entre o ácido ascórbico em vias de oxidação e as antocianinas pode resultar na destruição destas últimas (ELBE e SCHWARTZ, 1996).

Possivelmente são aqueles fatores expostos que originarão a queda dos conteúdos de antocianinas e fenóis, ressaltando que as antocianinas tiveram uma queda constante até liofilizado. Isto devido provavelmente às condições do tratamento inicial (despolpado, pasteurizado e resfriado). Um congelado imediato a  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$  não foi suficiente para inibir aqueles efeitos indesejáveis.

### **5.3 Distribuição porcentual das frações da polpa integral fresca da juçara**

Durante os dois fracionamentos das fases de extração em fase sólida, as antocianinas foram sorvidas fortemente na fase estacionária ( $\text{C}_{18}$ , octadesilsilano grupamento ativo principal), isto atribuída às hidroxilas não substituídas (Costa et al., 2000). Desta forma, primeiramente foram eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como os açúcares e os ácidos orgânicos e depois em um segundo fracionamento, os ácidos fenólicos e outros flavonóides; finalmente foram obtidos os pigmentos antocianínicos tal como se observa na Figura 4,5. Procedimentos que foram

desenvolvidas e adaptadas inicialmente por Ordasz-Galindo et al., (1999) e Skrede et al. (2000). Cada um dos eluentes foi monitorado por espectrofotometria entre 200 a 600 nm para conferir a pureza das frações.

As antocianinas são solúveis em solventes polares, e são extraídas geralmente dos materiais da planta com metanol que contem quantidades pequenas de ácido clorídrico ou fórmico. O ácido abaixa o pH da solução e impede a degradação dos pigmentos não acilados da antocianina. No entanto, as quantidades pequenas de ácido podem causar a hidrólise parcial ou total da parte acilada das antocianinas. Revilla et al., (1998, Apud Costa, 2000) demonstraram que os solventes que contêm até 0,12 mol/L do ácido clorídrico causam hidrólises parcial da antocianina acilada. Para o processo de SPE da polpa integral de juçara se utilizou metanol e água, acidificada com ácido clorídrico ao 0,1% (0,012 mol/L).

Na Tabela 5.3 se observa o resultado obtido do processo de fracionamento e purificação da polpa integral fresca de juçara detalhado no fluxograma da Figura 4.3. Das frações fenólicas purificadas obtidas finalmente, o extrato antociânico representa uma quantidade maior (3,5 %  $\pm$  0,6 do total da polpa fresca), entanto a fração dos ácidos fenólicos e flavonóides um 0,6 %  $\pm$  0,2. Um valor significativo também resulta a quantidade do extrato lipofílico (3,2 %  $\pm$  0,9).

## **5.4 Atividade antioxidante**

### **5.4.1 Características analíticas das curvas dos padrões**

Ao se determinar atividade antioxidante usando o método de captura dos radicais livres ABTS<sup>•+</sup> e DPPH para, as diferentes frações obtidas pelo processo de fracionamento e purificação dos fenólicos presentes na polpa integral fresca da juçara, para isso foram avaliados inicialmente os padrões analíticos (Trolox, BHT e vitamina C), até estabelecer as respectivas faixas lineares das curvas analíticas (Figuras 5.3 e 5.4).

Quando o radical DPPH é reduzido, a cor do cromóforo muda de púrpura para amarelo transparente com decréscimo da absorbância. Para o radical ABTS, a cor do produto da reação muda de verde-azul para incolor.

**Tabela 5.3** Distribuição percentual das frações da polpa integral fresca da juçara (MÉDIA  $\pm$  S, n=7)

<b>Fração</b>	<b>Porcentagem</b>
Extrato lipofílico	3,2 $\pm$ 0,9
Extrato hidrofílico	21,0 $\pm$ 7,0
Extrato fenólico	5,0 $\pm$ 2,0
Extrato de ácidos fenólicos e flavonóides	0,6 $\pm$ 0,2
Extrato antociânico	3,5 $\pm$ 0,6

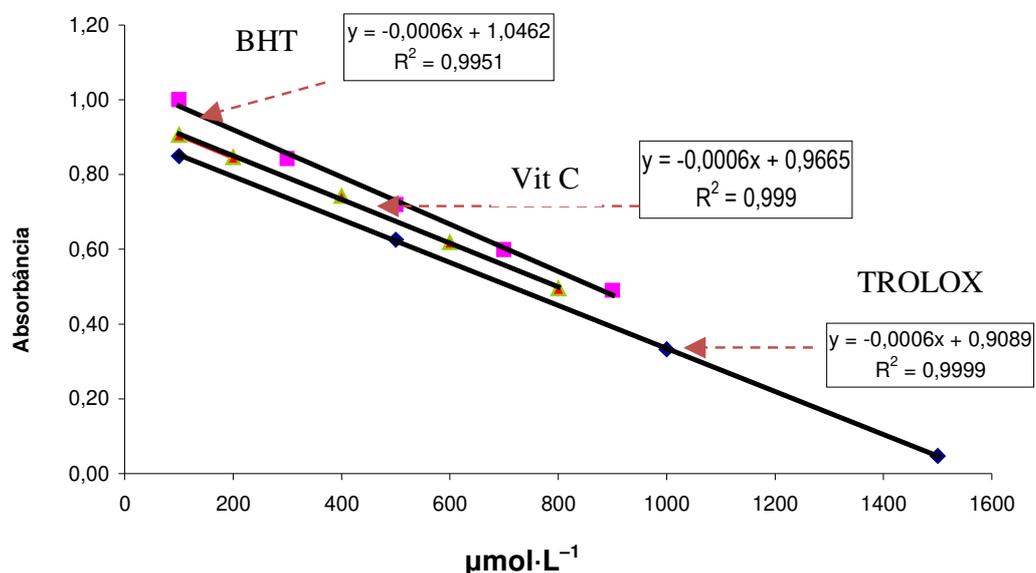
Observam-se nestas figuras diferenças nas respostas dos padrões nos dois diferentes sistemas para determinar a atividade antioxidante, obtendo-se linhas com inclinações e faixas de linearidade quase idênticas no método de DPPH, enquanto que, as inclinações e as faixas de linearidade diferentes, pelo método do ABTS foram diferentes entre os padrões. No caso do sistema ABTS, a vitamina C e o BHT têm a mesma inclinação (0,0018), enquanto que o Trolox mostra menor inclinação, conseqüentemente menor poder antioxidante (Figura 5.4).

Para os dados plotados na Figura 5.3, e utilizando as condições de linearidade das curvas, podemos dizer que para uma mesma concentração do padrão analítico, o Trolox tem maior capacidade de capturar radicais livres DPPH expressa pela menor absorbância obtida, porém, mostrando maior atividade antioxidante que a vitamina C e, esta por sua vez, maior atividade que o BHT.

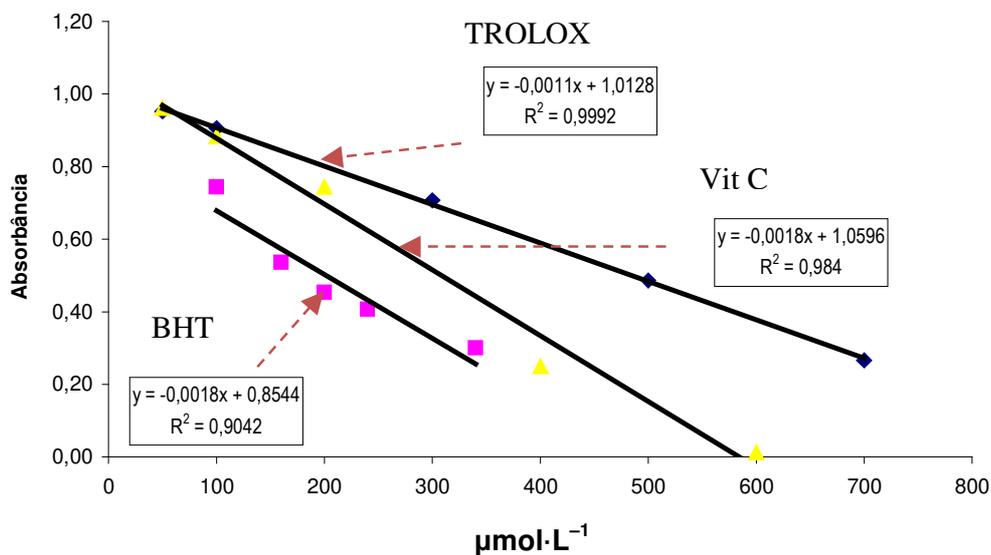
Na Figura 5.4, pode ser visto que ocorre uma inversão da capacidade do Trolox, com relação à do BHT. Tais diferenças podem ser resultado da forma diferente em que os padrões e, provavelmente as espécies antioxidantes presentes na matriz dos alimentos, interagem com as espécies radicais.

#### **5.4.2 Características analíticas das curvas das frações**

Para determinar a distribuição dos componentes antioxidantes na polpa integral da juçara, o fracionamento dos fitoquímicos foi baseado nas características de solubilidade e afinidade.



**Figura 5.3** Curvas-padrão de Trolox, BHT e vitamina C para a determinação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH



**Figura 5.4** Curvas-padrão de Trolox, BHT e vitamina C para a determinação da atividade antioxidante frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>

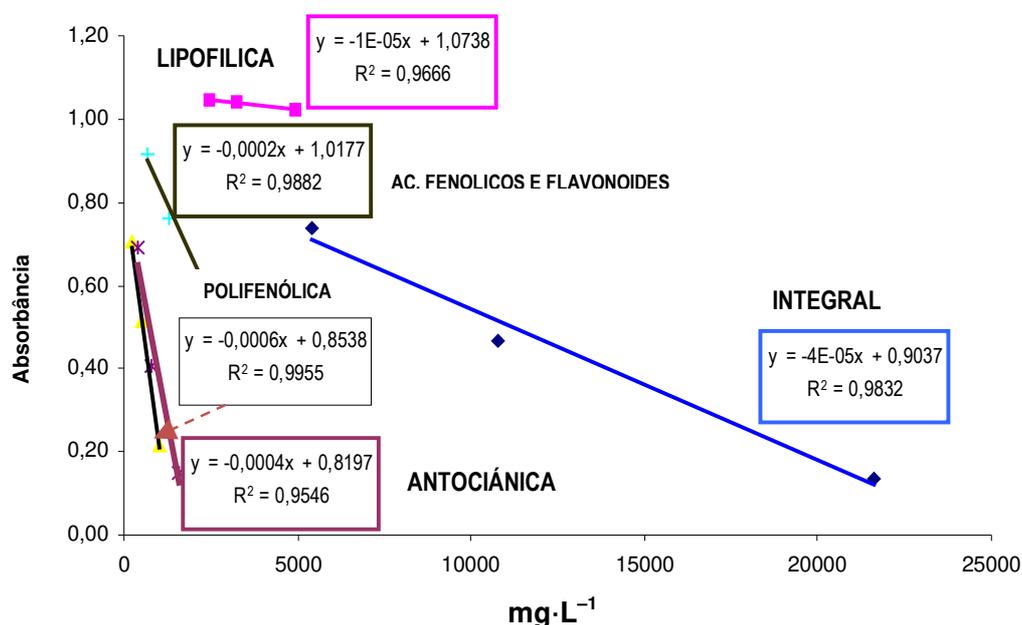
A efeitos de uma maior aproximação na determinação das equivalências da atividade antioxidante, foi construída também curvas das diferentes frações da polpa integral de juçara (Figuras 5.5 e 5.6). Pela análise das inclinações se podem observar em ambos os métodos, que a captura dos radicais livres (DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>) acontece em velocidades distintas. Essencialmente, todas as frações conseguem diminuir a absorvância inicial do radical livre, porém cada fração aparentemente possui substâncias com competências diferentes de atuar na antioxidação.

As substâncias presentes no extrato hidrofílico demonstraram possuir maior afinidade seqüestradora dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> do que aquelas presentes no extrato lipofílico (Figuras 5.5 e 5.6). Isto foi constatado quando o extrato hidrofílico foi fracionado, separando-se a fração contendo os polifenóis e as antocianinas (dos açúcares e ácidos orgânicos; Material e Métodos, Figura 4.3). Uma vez separadas as antocianinas dos demais compostos fenólicos e outros flavonóides, encontrou-se que a maior atividade residia com as antocianinas, de forma semelhante àquela expressa na fração mãe dos polifenóis, na qual as antocianinas se encontravam misturadas com os ácidos fenólicos e demais flavonóides (fração denominada de “polifenólicos”).

Pode se dizer que, embora os dois estágios de fracionamento tenham resultado na purificação parcial das substâncias antioxidantes, o poder ou capacidade funcional das substâncias não parece ter sido alterado, o qual poderia significar que não existe efeito sinérgico, nem antagônico entre os diferentes componentes com características antioxidantes da polpa do fruto de juçara.

Em conseqüência, a fração resultante da primeira purificação (polifenólicos) e a resultante da segunda purificação (antocianinas) apresentaram, maior atividade anti-radical frente ao ABTS<sup>•+</sup> e ao DPPH<sup>•</sup> do que o respectivo extrato bruto (metanólico mãe) e o resíduo extraído com acetato de etila (ácidos fenólicos e outros flavonóides). Esta análise sugere que a fração das antocianinas contribui particularmente e mais efetivamente para a ação seqüestradora de radicais livres.

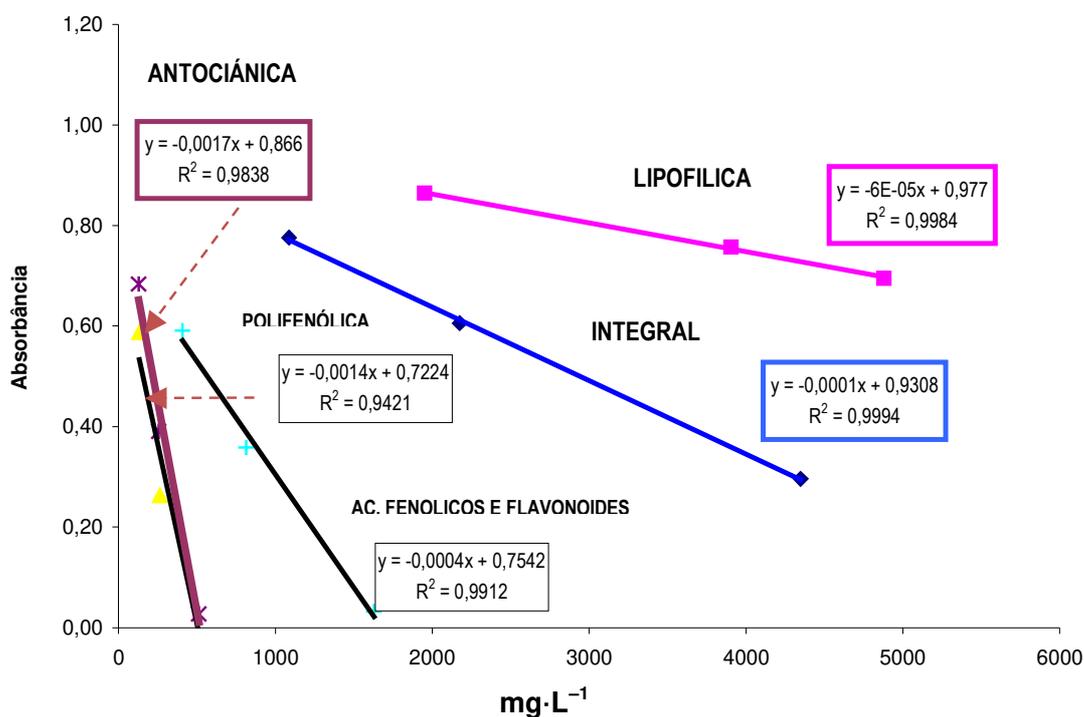
Em quanto à pequena capacidade antioxidante do extrato lipofílico, esta pode ser devida à presença de carotenóides encontradas no açaí ( $\beta$ -caroteno, luteína e  $\alpha$ -caroteno) (DE ROSSO et al., 2005) e possivelmente outras substâncias como os tocoferóis.



**Figura 5.5** Curvas do extrato bruto metanólico (integral), fração lipofílica, fração polifenólica, fração de ácidos fenólicos e flavonóides, e fração antociânica da polpa integral da juçara para quantificar a atividade antioxidante equivalentes pelo método de captura do radical DPPH.

### 5.4.3 Determinação da atividade antioxidante

Na Tabela 5.4 se apresentam os valores das atividades antioxidante do extrato metanólico da polpa integral da juçara (fresca) e das diferentes frações obtidas pelo processo de EFS. Os dados conservaram a mesma ordem de prelação quando são expressas as atividades antioxidantes, em relação aos respectivos padrões analíticos (Trolox-BHT-VC equivalente/g de polpa fresca), tanto pelo método DPPH como pelo ABTS. Isto sugere que as condições experimentais utilizadas em ambos os métodos foram coerentemente ajustadas, inclusive ou fator tempo de reação; 60 min para DPPH e 120 min para ABTS.



**Figura 5.6** Curvas do extrato bruto metanólico (integral), fração lipofílica, fração polifenólica, fração de ácidos fenólicos e flavonóides, e fração antociânica da polpa integral da juçara para quantificar a atividade antioxidante equivalentes pelo método de captura do radical  $ABTS^+$

A avaliação do extrato fresco e suas frações mostraram (Figuras 5.7 e 5.8), que as frações polifenólica e antociânica eram as de maior poder antioxidante. A fração lipofílica demonstrou baixa atividade antioxidante ( $\leq 1,0 \mu\text{mol Trolox-BHT-VC}$  equivalente/g de polpa fresca).

Não existem dados na literatura sobre a atividade antioxidante da polpa da juçara. Kuskosky et al. (2005) trabalharam com preparações comerciais de polpa de açaí, obviamente diluídas, obtendo valores de TEAC e VCEAC (em DPPH) de  $8,3 \mu\text{mol/g}$  e  $108,5 \text{ mg}/100\text{g}$ , respectivamente, o que corresponde a uma atividade da polpa da juçara como sendo ao menos 8 vezes maior do que a do açaí, pelo TEAC e 12,7 vezes pelo VCEAC. Embora não tenhamos efetuado comparação laboratorial entre as duas polpas para determinar os possíveis fatores de diluição, supõe-se que não se possa fazer diluição maior do que 10X da polpa e terminar com um produto sensorialmente aceitável.

Duarte-Almeida et al. (2006) também determinaram a atividade antioxidante da polpa de açaí, encontrando o valor de 23  $\mu\text{mol}$  BHT equivalentes/g de polpa de açaí (em DPPH), confirmando, portanto, que o poder antioxidante da polpa da juçara é aproximadamente 4X superior ao do açaí.

Entre as frações ensaiadas pelo sistema ABTS, a fração antociânica apresentara atividade antioxidante mais de 100 vezes superior à atividade do Trolox.

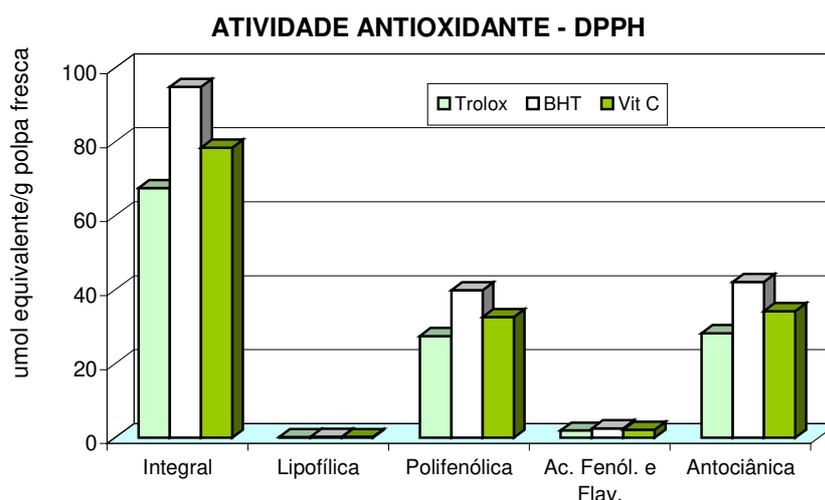
**Tabela 5.4** Determinação da atividade antioxidante das frações da polpa integral da juçara mediante os métodos de DPPH e ABTS

Frações	DPPH			ABTS		
	TEAC <sup>a</sup>	BHTEAC <sup>b</sup>	VCEAC <sup>c</sup>	TEAC <sup>a</sup>	BHTEAC <sup>b</sup>	VCEAC <sup>c</sup>
Integral	67,5	94,8	78,4	106,8	48,7	64,8
Antociânica	28,2	42,1	34,2	70,3	30,8	40,1
Polifenólica	27,5	39,8	32,6	64,4	24,6	29,7
Ac. Fenól. e Flav.	1,9	2,6	2,1	4,9	2,0	2,4
Lipofílica	0,2	0,3	0,2	1,0	0,5	0,6

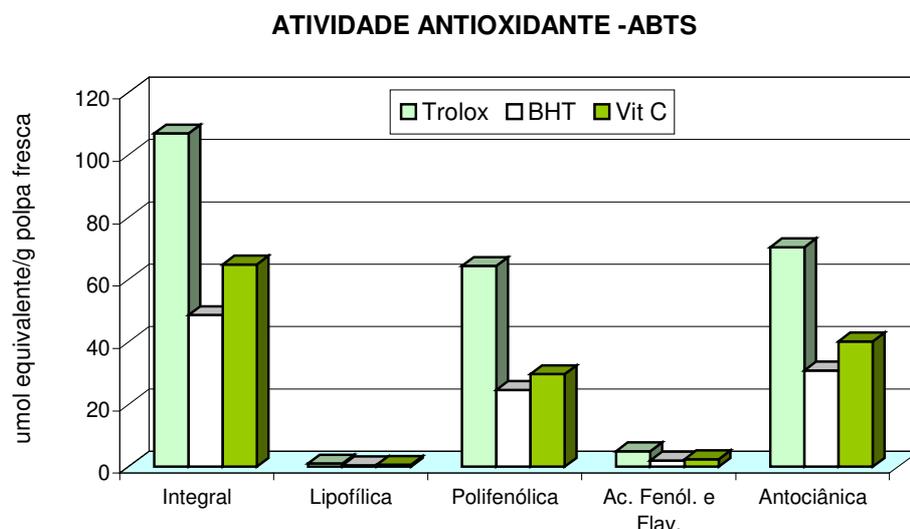
<sup>a</sup> TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox ( $\mu\text{mol}$  TE/g polpa fresca)

<sup>b</sup> BHTEAC: atividade antioxidante equivalente ao BHT ( $\mu\text{mol}$  BHT/g polpa fresca)

<sup>c</sup> VCEAC: atividade antioxidante equivalente à vitamina ( $\mu\text{mol}$  VCE/g polpa fresca)



**Figura 5.7** Atividade antioxidante do extrato bruto da polpa integral fresca (metanólico) e das frações lipofílica, polifenólica, antociânica e dos ácidos fenólicos e flavonóides frente ao método de seqüestro de radicais DPPH



**Figura 5.8** Atividade antioxidante do extrato bruto da polpa integral fresca (metanólico) e das frações lipofílica, polifenólica, antociânica e dos ácidos fenólicos e flavonóides frente ao método de seqüestro de radicais ABTS<sup>•+</sup>

As frações ricas em antocianos são as que apresentam maior capacidade antioxidante. As antocianinas apresentam estrutura química adequada para atuar como antioxidante, pois podem doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres. A maior atividade antioxidante está correlacionada com a presença de grupos hidroxílicos nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade aos radicais formados (CAO et al., 1997).

O potencial antioxidante individual dos compostos presentes em um extrato nem sempre corresponde à capacidade antioxidante total do extrato, uma vez que pode ocorrer efeito sinérgico entre as diversas substâncias e, como conseqüência, a capacidade antioxidante final pode ser maior do que a soma das contribuições dos diferentes componentes do extrato (JIA et al., 1998; SAUCIER e WATERHOUSE, 1999). Isto também foi constatado quando se comparou a atividade antioxidante das frações com a AAT da polpa integral fresca da juçara (Figuras 5.7 e 5.8).

As propriedades biológicas das antocianinas têm sido atribuídas principalmente à sua função antioxidante, e a outras características das moléculas individuais (WANG et al., 1997; SATUÉ-GARCIA et al., 1997). Os mecanismos da função antioxidante das

antocianinas não estão bem estabelecidos, embora haja indícios do envolvimento reações de doação de hidrogênio e quelação de metais e proteínas ligadas (SATUÉ-GARCIA et al., 1997). Deve ser levada em consideração a possibilidade de que cada componente fenólico pode contribuir de forma e proporção diferente e que os compostos interagem entre si, podendo produzir-se efeitos sinérgicos ou antagônicos.

### 5.5 Identificação de resveratrol por HPLC

A determinação de resveratrol em vinhos vem sendo estudada mais intensamente nos últimos anos. O isômero *trans*-resveratrol tem reconhecido atividades biológicas, e algumas delas são de uso terapêutico, tais como ação antiinflamatória, inibição da enzima lipoxigenase e ação anticarcinogênica *in vitro* (SAUTTER et al., 2005). O resveratrol foi encontrado inicialmente na casca de uva e relatado como portador de propriedades quimiopreventivas contra o câncer (JANG et al., 1997; ULRICH et al., 2005).

Schauss et al. (2006b), relataram a presença de *trans*-resveratrol no açaí, embora em baixa concentração (1,1 µg/g de polpa liofilizada). Os próprios autores fizeram a ressalva de que a quantidade fosse provavelmente baixa demais para mostrar efeito quimiopreventivo. No extrato bruto de juçara, seguindo as mesmas condições analíticas de Schauss et al. (2006b), não foi possível observar a presença de resveratrol. Entretanto, na análise qualitativa pelo espectrômetro de massas, foi identificado o sinal específico do resveratrol na fração dos ácidos fenólicos e flavonóides (Anexo 7).

### 5.6 Identificação de antocianinas e outros flavonóides por MS-MS<sup>2</sup>

Utilizando a espectrometria de massas para identificar as antocianinas de juçara, apenas um trabalho foi encontrado na literatura (Brito et al., 2007), sendo que não houve qualquer menção dos flavonóides e demais fenólicos. Os Anexos 6 e 7 mostram os espectros de massas das frações de antocianinas e fenólicos mais flavonóides. Para as antocianinas, os fragmentos produzidos no eletrospray foram identificados na faixa de massa/carga de 200 a 800 (Anexo 6), enquanto que para os ácidos fenólicos e flavonóides, os fragmentos se localizaram na faixa de 110 a 500 *m/z* (Anexo 7).

Na Tabela 5.5 se encontram as antocianinas identificadas pelo íon molecular e pela fragmentação MS/MS. Os principais sinais do espectro foram o da cianidina-3-rutinosídeo ( $m/z$  595) (Figura 5,9) e cianidina-3-O-glucosídeo ( $m/z$  449) (Figura 5,10). A fragmentação subsequente (MS/MS; Figura 5,9) do íon-fragmento principal ( $m/z$  595) rendeu dois íons: um em  $m/z$  449 (cianidina-3-glucosídeo), que resultou da perda de uma parte do ramnosídeo, e outro de  $m/z$  287 (cianidina), que resultou da perda de um resíduo de glicose (HASSIMOTO et al., 2007). Esses compostos coincidem com aqueles relatados por Brito et al. (2007). Trabalhos anteriores (Iadersona et al., 1992; Harborne, 1994), embora também relatem estes dois compostos, são imprecisos quanto à metodologia utilizada ou foram resultados obtidos por técnicas antiquadas (Harborne et al., 1994).

A Tabela 5.5 resume os treze derivados de cianidinas, delphinidinas, petunidinas, pelargonidinas e peonidinas e malvidina, que foram identificados pela técnica de ionização, ou seja, os compostos identificados pelos íons moleculares e seus respectivos fragmentos identificados pela relação massa-carga ( $m/z$ ) (GIUSTI et al., 1999; WU et al., 2004b; WU e PRIOR, 2005; GALLORI et al., 2004; HASSIMOTO et al., 2007; SCHAUSS et al. 2006<sup>a</sup>; BRITO et al., 2007).

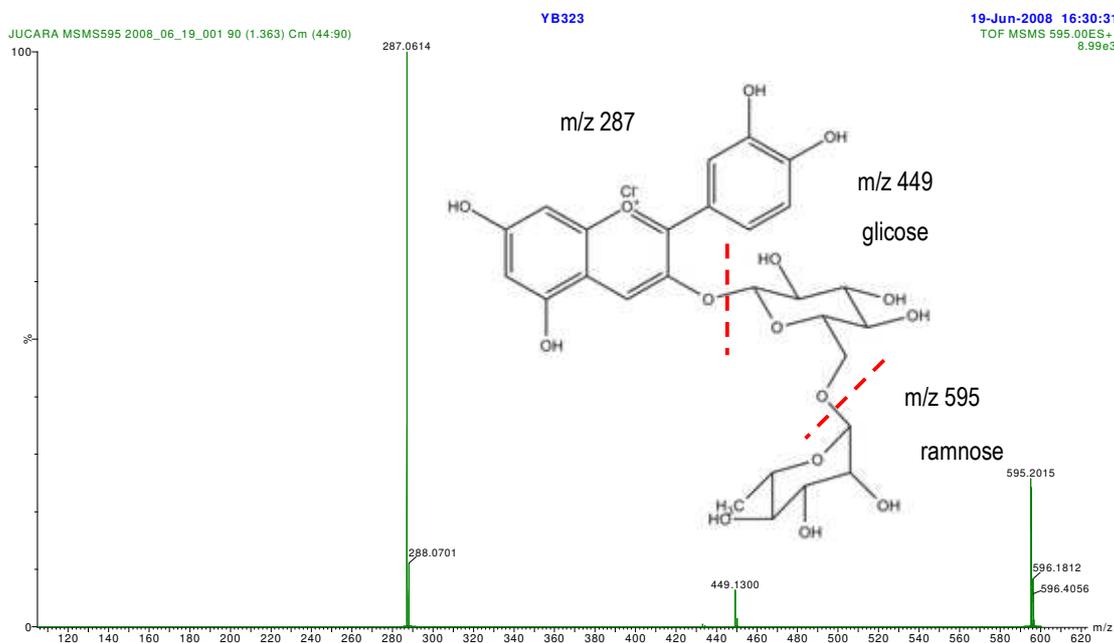
Dos demais sinais do espectro-massa se obtiveram os valores  $m/z$  que, após serem submetidos às correspondentes análises massa-massa e verificando as fórmulas moleculares para obterem-se os perfis isotópicos e possibilitando a identificação dos pigmentos listados na Tabela 5.5.

Além dos critérios acima, foi levado em conta também o perfil isotópico gerado pelo *software* para cada fórmula, chegando-se à comprovação da identidade, segundo os fragmentos manualmente reconhecidos no espectro MS. Para tanto, foi considerada apenas a relação massa-carga do isótopo principal, gerando-se assim a Tabela 5.7. É pertinente ressaltar que em dita tabela, a comparação dos íons experimentais dos dois últimos compostos (petunidina-3-glucosídeo e malvidina-3-glucosídeo) com o perfil teórico produziu erros além do limite aceitável de 10 ppm, ficando, portanto dentro de um grau de incerteza.

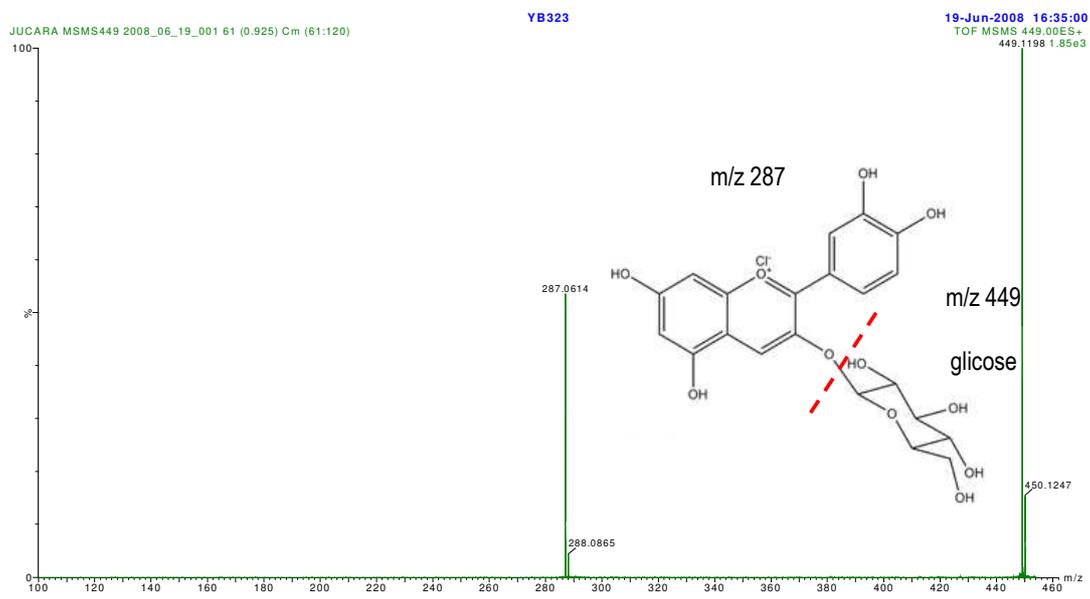
Com relação ao espectro da fração de ácidos fenólicos e flavonóides (Anexo 6), seguiu-se um procedimento análogo ao descrito acima para as antocianinas, exceto que o equipamento foi ajustado no modo negativo  $[M]^-$ , como foi descrito na seção experimental. Entre ácidos fenólicos e flavonóides, foram identificados 12 compostos na polpa de juçara comparados com os fragmentos ( $m/z$ ) obtidos em outras pesquisas (GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al. 2006a), além de três compostos não conhecidos, como registrado na Tabela 5.6. Foi visto que os compostos desconhecidos em juçara  $m/z$  391 e 413, também foram detectados em açaí por Schauss et al. (2006a).

Na Tabela 5.8, onde se identificam os íons, dos onze compostos propostos, pode se afirmar que quatro deles estão presentes e são: ácido protocatecúico, apigenina-6-C-glucosídeo, (+)-catequina  $x-H_2O$  e resveratrol, tendo em vista a magnitude do erro.

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito da proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para quantificar a presença daquelas substâncias fenólicas utilizando cromatografia líquida.



**Figura 5.9** Espectro massa-massa do íon molecular  $m/z$  595 (cianidina-3-O-rutinosídeo) da fração antocianínica da polpa de juçara



**Figura 5.10** Espectro massa-massa do íon molecular m/z 449 (cianidina-3-O-glicosídeo) da fração antocianina da polpa de juçara

**Tabela 5.5** Identificação de compostos na fração antocianica de juçara

<b>Antocianina</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Colisão e<sup>-</sup>V</b>	<b>MS/MS (m/z)</b>
Cianidina 3-sambubiosídeo-5-ramnosídeo	727	30	581/433/287
Delfinidina 3-rutinosídeo	611	30	465/303
Peonidina 3-rutinosídeo	609	20	463/301
Cianidina 3-O-rutinosídeo	595	20	449/287
Pelargonidina 3-rutinosídeo	579	10	433/271
Malvidina 3-galactosídeo	493	20	331
Petunidina 3-glucosídeo	479	20	317
Delfinidina 3-glucosídeo	465	10	303
Peonidina 3-glucosídeo	463	10	301
Cianidina 3-O-glucosídeo	449	10	287
Cianidina 3-ramnosídeo	433	20	287
Pelargonidina 3-glicosídeo	433	20	271
Cianidina 3-arabinosídeo	419	20	287

**Tabela 5.6** Identificação de compostos na fração de ácidos fenólicos e flavonóides da juçara

Ácidos fenólicos/Flavonóides	[M] <sup>-</sup>	colisão e <sup>-</sup> V	MS/MS (m/z)
Ácido elágico	301	25	165
Ácido gálico	169	15	125/97
Ácido ferúlico	193	20	178/134
Ácido vanílico	167	15	152/108
Ácido protocatequico	153	15	109
Miricetina	317	20	179/151
Quercetina	301	25	165
Luteolina	285	20	175/151/133
Isovitexin/Apigenina-6-C-glucosídeo	432	15	271/151
Taxifolin deoxyhexose	449	15	269/151
Catequina	289	15	245/205/179
Resveratrol	227	20	185/143
Desconhecido	391	15	289/221/143
Desconhecido	413	15	369/311/125
Desconhecido	353	20	317/191

**Tabela 5.7** Identificação de íons e suas respectivas relações  $m/z$  para as antocianinas da juçara

Composto	Fórmula	$m/z$ isótopo ( $m/z$ exp). (erro, ppm)
Cianidina 3-O- glucosídeo	$C_{21}H_{21}O_{11}Cl$	449,1084
		449,1096 (-2,67)
Cianidina 3-O- rutinosídeo	$C_{27}H_{31}O_{15}Cl$	595,1663
		595,1661 (0,34)
Cianidina-3-sambubiosídeo	$C_{26}H_{29}O_{15}(CF_3COOH)$	581,1506
		581,1512 (-1,03)
Cianidina-3-rhamnosídeo	$C_{21}H_{21}O_{10}$	433,1135
		433,1132 (0,69)
Peonidina-3-glucosídeo	$C_{22}H_{23}O_{11}Cl$	463,124
		463,1201 (8,42)
Petunidina-3-glucosídeo	$C_{22}H_{23}O_{12}Cl$	479,119
		479,2787 (-333,32)
Malvidina-3-glucosídeo	$C_{23}H_{25}O_{12}Cl$	493,1346
		493,2381 (-209,88)

<sup>1</sup>  $m/z$  do isótopo<sup>2</sup>  $m/z$  experimental<sup>3</sup> error entre  $m/z$  do isotópico e experimental (ppm)

**Tabela 5.8** Identificação de íons e suas respectivas relações *m/z* para os ácidos fenólicos e flavonóides da juçara

Composto	Fórmula	<i>m/z</i> isótopo <sup>1</sup> <i>m/z</i> exp. <sup>2</sup> (erro, ppm) <sup>3</sup>
Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	301,0348 300,9984 (120,92)
Ácido gálico	(HO) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	169,0137 168,9975 (95,85)
Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0501 193,0556 (-28,49)
Ácido vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167,0344 167,0372 (-16,76)
Protocatechuic acid/3,4-Dihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0188 153,0199 (-7,19)
Miricetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	317,0298 317,0522 (-70,66)
Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,0348 301,0003 (114,60)
Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,0399 285,0602 (-71,22)
Isovitexin/Apigenina-6-C-glucosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431,0978 431,0965 (3,02)
(+)-Catequina hidratada	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> · xH <sub>2</sub> O	289,0712 289,0734 (-7,61)
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	227,0708 227,0722 (-6,17)

<sup>1</sup>*m/z* do isótopo<sup>2</sup>*m/z* experimental<sup>3</sup>error entre *m/z* do isotópico e experimental (ppm)

## **6. CONCLUSÕES**



Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, chega-se às seguintes conclusões:

Os conteúdos de antocianinas e fenóis totais da polpa de juçara são elevados, encontrando-se em concentrações superiores aos do açaí, o que significa que esse fruto é uma fonte excepcionalmente rica em compostos polifenólicos.

A atividade antioxidante da polpa fresca, determinada *in vitro* por dois métodos, utilizando três padrões analíticos em cada um dos métodos, foi também superior à do açaí.

Pela inclinação das curvas das atividades individuais das frações foi possível observar que as frações são mais ativas do que as misturas. Porém, o fracionamento do extrato bruto mostrou que a somatória do poder individual das três frações estudadas (uma lipofílica, uma antociânica, e outra de ácidos fenólicos e flavonóides) não alcançou o poder antioxidante do extrato metanólico bruto da polpa fresca. As causas dessa diferença podem ser diversas, incluindo perdas na extração-separação, oxidação durante o processo e possível efeito sinérgico entre todas elas.

O tratamento térmico, mesmo sendo de desidratação por liofilização de um produto rico em compostos fenólicos, resultou em perdas destes compostos, principalmente das antocianinas. É provável que, tanto o tratamento térmico como a exposição ao calor e a substituição do meio líquido pelo ar, aumente a exposição ao oxigênio, assim como a velocidade de reação.

Treze antocianinas foram identificadas por espectrometria de massa-massa na fração antociânica, que corresponde a 3,54% da polpa integral fresca de juçara.

Quinze compostos presentes na fração de flavonóides não-antociânica (que perfaz 0,63% da polpa integral fresca) foram identificados por espectrometria de massas, e incluíam o resveratrol e outros.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- (1) AHERNE, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition. New York**: v. 18,n. 1, p. 75-81, **2002**.
- (2) ALEXANDRE, D.; Cunha, R. L.; Hubinger, M. D.; Conservação do Açaí pela Tecnologia de Obstáculos. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(1): 114-119, jan.-mar. **2004**.
- (3) AMES, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA 90 (17): 7915-7922, **1993**.
- (4) AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 16 ed. Arlington: AOAC, **1995**.
- (5) ARCE, T.; Risso, E.M.; Diez, A.C.C.N.; Amaya-Farfan, J. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos da polpa do fruto da palmeira juçara (*euterpe edulis*). 6<sup>o</sup> Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, SP, 4-7 de Novembro de **2007**.
- (6) ARNAO, M. B.; Cano, A.; Acosta, M.; The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem.** 73, 239-244, **2001**.
- (7) ASSIS, S.A.; Lima, D.C.; Oliveira, O.M.M.F: Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chem.**, v. 74, p. 133-137, **2001**.
- (8) BALDI, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F.; Casetta, B.: HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. **J. Agric. Food Chem.**, 43,2104-2109, **1995**.
- (9) BARZILAI A. & Yamamoto K. I.: DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair** (3); 1109-1115. **2004**
- (10) BEAL, B.H. Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) 2006. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, **2006**.
- (11) BLIGH, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, n.8, p.911-917, **1959**.
- (12) BOBBIO, F. O.; Druzian, J. I.; Abrão, P. A.; Bobbio P. A.; Fadelli, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciê. Tecnol. Aliment.** v. 20 n.3 Campinas set./dez **2000**.
- (13) BRAND-WILLAMS, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v, 28, p. 25-30, **1995**.
- (14) BRITO, E. D. S., Araújo, M. C. P.; Elesbão, A. R.; Carkeet, C.; Clevidence, B. A., Novotny, J. A.: Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **J. Agric. Food Chem**, 55, 9389–9394, **2007**.

- (15) CANTOS, E.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.: Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (20): 5691-5696, **2002**.
- (16) CAO, G.; Sofic, E.; Prior, R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radical of Biology and Medicine**, 22, 749-760, **1997**.
- (17) CKAGRICOLA. Disponível em: <http://www.ckagrícola.com/ckagrícola/produtos.asp>. Acesso em: 6 jun. **2008**.
- (18) COÏSSON, J. D.; Travaglia, F.; Piana, G.; Capasso, M.; Arlorio M.: *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Res. Int.** 38, 893-897. **2005**.
- (19) CONTE, R.: Estrutura genética de populações de *Euterpe oleracea* Mart submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Piracicaba,. Dissertação (Dr.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. **2004**.
- (20) COSTA, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A.: Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **J. Chrom. A**, 881, () 403-410, **2000**.
- (21) DEGÁSPARI, C. H., Waszczynskyj, Nina.: Propriedades Antioxidantes de compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./ **2004**.
- (22) DEL POZO-INSFRAN, D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T.: Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.**, 52, 1539-1545, **2004**.
- (23) DEL POZO-INSFRAN, D.; Perceval, S. S.; Talcott, S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **J. Agric. Food Chem**, 54,1222-1229, **2006**.
- (24) DE ROSSO, V. V.; Zanatta, C. F.; Silva, S. R.; Mercadante, A. Z. Carotenoids in tropical fruits from Brazil - acerola, camu-camu and açai. In Proceedings of International Carotenoid Symposium, 2005, Edinburg.
- (25) DIMAS, F. F.; Rigo, S. M.: Influência do tamanho dos frutos do palmitheiro *Euterpe edulis* Mart. na germinação das sementes e crescimento das mudas. **Ciê. Florest.**, , v.8, n.1, p. 35-41,**1998**.
- (26) DIPLOCK, A. T.; Charleux, J. L.; Crozier-Willi, G.; Kok, F. J.; Rice-Evans, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W.; Vina-Ribes, J.: Functional food science and defence against reactive oxidative species. **Brit. J. Nutr.**, 80 (Suppl. 1): S77-S112,**1998**.
- (27) DU, Y.; Guo, H.; Lou, H.: Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. **J. Agric. Food Chem.**; 55:1695-1701, **2007**.

- (28) DUARTE-ALMEIDA, J. M.; Dos Santos, R. J.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -Caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2): 446-452, abr-jun. **2006**.
- (29) ELBE, J.H. von; Schwartz, S.J., **Colorants** (p. 689). *In: Food Chemistry*. O. T. Fennema, 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc.: New York. pp. 651-722, **1996**.
- (30) ESPIN, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H. García-Viguera, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 1588-1592, **2000**.
- (31) FAVRETO, R.: Curso de Produção e Manejo de Palmeira Juçara no litoral norte do Rio Grande do Sul. **Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária**. Abr **2007**.
- (32) GALLORI, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Barbosa, W. L. R.; Vincieri, F. F. Polyphenolics Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia.**, 59, June (No. 11/12). **2004**
- (33) GIUSTI, M. M.; Rodriguez-Saona, L. E.; Griffin D.; Wrolstad, R. E.: Electrospray and tandem mass spectroscopy as tool for anthocyanin characterization. **J. Agric. Food Chem.**, 47, 4657-4664, **1999**.
- (34) GIUSTI, M.M.; Wrolstad, R. E. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. *In: Current Protocols in Food Anal. Chem.*, Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York, **2001**.
- (35) HALLIWELL B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**; 35(5) 1147-1150, **2007**.
- (36) HAN X.; Shen T.; Lou H.: Dietary polyphenols and their biological significance. **Int. J. Mol. Sci.**; 8:950-988, **2007**.
- (37) HARBORNE, J. B.; Saito, N.; Detoni, C. H.; Anthocyanins of *Cephaelis*, *Cynomorium*, *Euterpe*, *Lavatera* and *Pinanga*. **Biochem. Systematics Ecol.**, 22 (8): 835-836 dec. **1994**.
- (38) HASSIMOTTO, N. M. A.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M.: Identification and characterization of anthocyanins from wild mulberry (*Morus Nigra* L.) growing in Brazil. **Food Sci. Tech. Int.**; 13(1): 17-25, **2007**.
- (39) HEIM, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, 13, 572-584, **2002**.
- (40) HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, **2005**.
- (41) IADEROZA, M.; Baldini, V.L.S.; Dos Santos Draetta I., Bovi, M.L.A.; Anthocyanins from fruits of açaí (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis*, Mart). **Trop. Sci.** 32: 41-46. **1992**.

- (42) IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais: *Euterpe edulis* Mart. Data de publicação Indefinida. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=26> Acesso em: 10/06/2008.
- (43) JIA, Z. S.; Zhou, B.; Yang, L.; Wu, L. M.; Liu, Z. L.: Antioxidant synergism of tea polyphenols and  $\alpha$ -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. **Journal Chemistry Society**, 2, 911-915. 1998.
- (44) JANG, M. S.; Cai, E. N.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W.; Fong, H. H. S.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. 275, 218-220. 1997.
- (45) JULKUNEN-TIITTO, R.: Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.** 33: 213-217. 1985.
- (46) KIM, D-O.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; Lee, C. Y.: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.** 50: 3713-3717. 2002.
- (47) KUSKOSKI, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Fett, R. Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4): 691-693, out.-dez. 2004.
- (48) KUSKOSKI, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.
- (49) LICHTENTHÄLER, R.; Optimisation of the Total Oxidant Scavenging Capacity Assay and Application on *Euterpe Oleracea* Mart. (Açaí) Pulps and Seeds. Thesis - Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie – Universität Bonn, 2004.
- (50) LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa. Ed. Plantarum.** 352p. 1992.
- (51) LORENZI, H.; Moreira de Souza, H.; Tadeu de Medeiros, J.; Coelho de Cerqueira, L. S.; Ferreira, E.: Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA.** 2004.
- (52) MERKEN, H. M. E BEECKER, G.R.: Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **American Chemical Society.** Vol.48, No. 3, 2000.
- (53) BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. **Diário Oficial da União**, 10 jan. 2000.

- (54) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup> **Comunicado Técnico**, 128., Julho, 2007.
- (55) MIRA, L.; Fernandez, M. T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M. H.; Jennings, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radical Res**36, 1199–1208. 2002.
- (56) MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.
- (57) MOYER, R. A.; Hummer, K. E.; Finn, C.E.; Frei, B.; Wrolstad, E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 519-525, 2002.
- (58) OCABRASIL. Extração de polpa de Jussara. [www.ocabrasil.org.br](http://www.ocabrasil.org.br). Acesso em 22.08. 2006.
- (59) ORDAZ-GALINDO, A.; Wesche-Ebeling, P.; Wrolstad, R. E.: Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. **Food Chem.** 65, 201, 1999.
- (60) PACHECO-PALENCIA, L. A.; Hawken, P.; Talcott, S. T.: Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Res. Int.** 40, 620–628, 2007.
- (61) PACHECO-PALENCIA, L. A.; Mertens-Talcott, S.; Talcott, S. T.: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of Phytochemical Enriched Oil from Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.** Published on Web 06/04/2008.
- (62) PANTELIDIS, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A.; Diamantidis, Gr.: Antioxidant capacity, phenol, anthocyanins and ascorbic acid contents in raspberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry** 102, 777-783, 2007.
- (63) PARADA, M. G. C.; Sousa, W.; Serôdio, M. H.: Comparação Nutricional da Polpa dos Frutos de Juçara e de Açaí. [www.ceplac.gov.br](http://www.ceplac.gov.br) , 2004.
- (64) PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.
- (65) RADLER, D. A. N. F.; Da Silva, S. N. D.: **Cromatografia**. Princípios básicos e técnicas afins. Editora Interciência. Rio de Janeiro – 2003
- (66) RAMIREZ-TORTOZA, C.; Andersen, O. M.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Wood, S. G.; Duthie, S. J.; Collins, A. R. and Duthie, G. G. (2001), Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. **Free Rad. Biol. Med.**, Vol. 31, No. 9, pp. 1033–1037, 2001.

- (67) RE, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.**, 26, 9/10, 1231-1237, **1999**.
- (68) RICE-EVANS, C. A.; Miller, N. J.; Papaganda, G.: Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Rad. Biol. Med.**, 20, 933-956, **1996**.
- (69) ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA (PhD Thesis). **2000**.
- (70) ROSS, J. A.; Kasum, C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metallic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, 22, 19-34, **2002**.
- (71) ROSSO, Veridiana Vera de. **Composição de carotenóides e antocianinas em acerola. Estabilidade e atividade antioxidante em sistemas-modelo de extratos antociânicos de acerola e de açaí -- Unicamp, SP: [s.n.], 2006**.
- (72) SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria.**, ene-feb, 29-40, **2002**.
- (73) SATUÉ-GARCIA, M. T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N.: Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. **J. Agric. Food Chem.**, 45, 3362-3367, **1997**.
- (74) SAUTTER, C. K.; Denardin, S.; Alves, A. O.; Mallmann, C. A.; Penna, N. G.; Hecktheuer, L. H.: Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, 25(3): 437-442, jul-set. **2005**.
- (75) SAUCIER, C. T. e Waterhouse, A. L.: Synergetic activity of catechin and other antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4491-4494. **1999**.
- (76) SCHAUSS, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. P. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **J. Agric. Food Chem.** **2006a**, Published on Web 10/07/06.
- (77) SCHAUSS, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Huang, D.; Owen, J.; Agarwal, A.; Jensen, D. S.; Hart, A. N.; Shambrom, E.: Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **J. Agric. Food Chem.** **2006b**, Published on Web 10/07/06.
- (78) SINGH, M.: Arseneault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V.; Ramassamy, C.: Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. **J. Agric. Food Chem.**, Published on Web 06/17/2008

- (79) SKREDE, G.; Wrolstad, R. E.; Durst, R. W.: Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **J. Food sci.**, Vol. 65, No. 2, **2000**
- (80) SOUSA, C. M.; Rocha, H.; Magela, G.; Cruz, M.; Da Costa C. L. S.; Sérvulo, A; Cavalcanate, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Breitner, P.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.: Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol.30,No. 2, 351-355, **2007**
- (81) SUBBARAMAIAH, K.; Chung, W. J.; Michaluart, P.; Telang, N.; Tanabe, T.; Inoue, H.; Jang, M.; Pezzuto, J. M.; Dannenberg, A. J.: Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.**; 273: 21875-21882. **1998**.
- (82) TALCOTT, S. T.; Percival, S. S.; Pittet- Moore, J.; Celoria, C.: Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem.**, 51,935 – 941, **2003**.
- (83) TERCI, D. B. L.: Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP. **2004**.
- (84) THAIPONG, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins B. D.: Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comp. Anal.** 19, 669–675, **2006**.
- (85) TOMAZELA, J. M.: Suco de Juçara é Receita para Salvar Palmeiras. **O Estado de São Paulo** - 18 de junho de **2001**- Ciência e Meio Ambiente.
- (86) TSUDA, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Noriobu, S.;Choi, S.W.;Kawakishi, S., Osawa, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanindin 3-O-β-D glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.**, 42, 2407-2410, **1994**.
- (87) ULRICH, S., Wolter, F., Stein, J.: Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. **Mol. Nutr. Food Res.** 49, 452-461. **2005**.
- (88) WANG, H.; Cao, G.; Prior, R. L.: Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, 45, 304-309, **1997**.
- (89) WU, X.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L.: Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.** 52, 4026–4037. **2004a**.
- (90) WU, X.; Gu, L.; Prior, R. L.; McKay, S.: Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. **J. Agric. Food Chem.** 52, 7846–7856. **2004b**.
- (91) WU, X. e PRIOR, R. L.: Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 2589-2599, **2005a**.

- (92) WU, X. e PRIOR, R. L.: Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 3101–3113. **2005b.**

**ANEXOS**



**ANEXO 1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL****DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DE POLPAS INTEGRAIS DA JUÇARA**

Polpas	Amostra/Triplicata	Umidade			Média ± S, n=3
		Pi(g)	Pf(g)	(%)	
Fresca	1	2,0962	0,6491	69,03	68,8 ± 0,2
	2	2,0970	0,6574	68,65	
	3	2,0824	0,6510	68,74	
Congelada	1	1,0094	0,3331	67,00	65,1 ± 2,4
	2	1,0083	0,3424	66,04	
	3	1,0042	0,3776	62,40	
Pasteurizada	1	1,0124	0,3812	62,35	62,5 ± 0,4
	2	1,0013	0,3789	62,16	
	3	1,0464	0,3884	62,88	
Liofilizada	1	0,5090	0,4927	3,20	3,5 ± 0,6
	2	0,5022	0,4865	3,13	
	3	0,5140	0,4923	4,22	

**DETERMINAÇÃO DE CINZA DA POLPA INTEGRAL FRESCA DA JUÇARA**

Triplicata	Umidade			Cinzas			Média ± S, n=3
	Pi(g)	Pf(g)	(%)	(g)	(%bu)	(%bs)	
1	2,0165	0,8074	59,96	0,0163	0,81	2,05	2,3 ± 0,2
2	2,0319	0,7801	61,61	0,0187	0,92	2,34	
3	2,0260	0,8063	60,20	0,0196	0,97	2,45	

**DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA DA POLPA INTEGRAL FRESCA DA JUÇARA**

Triplicata	Umidade			Proteína			média ± S, n=3
	Pi (g)	Pf (g)	(%)	Pam (g)	(% bu)	(% bs)	
1	2,0962	0,6491	69,03	0,2040	2,75	8,82	8,5 ± 0,3
2	2,0970	0,6574	68,65	0,2070	2,54	8,14	
3	2,0824	0,6510	68,74	0,2050	2,67	8,56	

## DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS DA POLPA INTEGRAL FRESCA DA JUÇARA

Triplicata	Umidade			Lipídeos					Média ± S, n=3
	Pi (g)	Pf (g)	(%)	Pam (g)	ST (g)	(g)	(% bu)	(% bs)	
1	1,5201	0,5027	66,93	1,6327	0,5496	0,0156	14,19	42,15	44,5 ± 2,2
2	1,5294	0,5137	66,41	1,5043	0,5064	0,0153	15,11	44,87	
3	1,5250	0,5236	65,67	1,6047	0,5402	0,0169	15,64	46,46	

## LEITURAS NO pH-METRO DA POLPA INTEGRAL FRESCA DA JUÇARA

Triplicata	pH	Média	DP	Média ± S, n=3
1	4,90	4,9	0,01	4,90 ± 0,01
2	4,90			
3	4,91			

## LEITURAS DO °BRIX DA POLPA INTEGRAL FRESCA DA JUÇARA

Triplicata	°Brix	Média	DP	Média ± S, n=3
1	2,40	2,4	0,05	2,4 ± 0,05
2	2,45			
3	2,35			

**ANEXO 2. DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS****ANTOCIANINAS TOTAIS DA POLPA INTEGRAL FRESCA DE JUÇARA  
(mg/100g polpa seca)**

Amostra (g)	Extrato		Solução Estoque		FD	Triplicata	γ pH1		γ pH4,5		Abs	AT		Média ± S n=3	
	Total (mg)	Amostra (mg)	mg/mL	uL			512	700	512	700		bu	bs		
5,0030	1166,4	58,30	11,66	150	33,3	1	1,0441	0,0366	0,2275	0,0598	0,8398	934,7	2996,5	2977,8 ± 49	
						2	1,0552	0,0424	0,2553	0,0615		0,8190	911,5		2922,3
						3	1,0500	0,0420	0,2248	0,0617		0,8449	940,4		3014,7

Fator ; 8,35

FD ; Fator de diluição

γ ; comprimento de onda

**ANTOCIANINAS TOTAIS DA POLPA INTEGRAL CONGELADA DE JUÇARA  
(mg/100g polpa seca)**

Amostra (g)	Extrato		Solução Estoque		FD	Triplicata	γ pH1		γ pH4,5		Abs	AT		Média ± S n=3	
	Total (mg)	Amostra (mg)	mg/mL	uL			513	700	513	700		bu	bs		
5,0086	2862,9	67,9	13,6	400,0	12,5	1	1,2333	0,0059	0,1875	0,0098	1,0497	922,3	2646,1	2584,4 ± 63,7	
						2	1,2089	0,0059	0,2191	0,0153		0,9992	877,9		2518,8
						3	<b>512</b>	<b>700</b>	<b>512</b>	<b>700</b>		1,0268	902,1		2588,4
1,2146	0,0061	0,1987	0,0170												

ANTOCIANINAS TOTAIS DA POLPA INTEGRAL PASTEURIZADA DE JUÇARA  
(mg/100g polpa seca)

Amostra (g)	Extrato		Solução Estoque		FD	Triplicata	γ pH1		γ pH4,5		Abs	AT		Média ± S n=3
	Total (mg)	Amostra (mg)	mg/mL	uL			513	700	513	700		bu	bs	
5,0030	2598,5	69,2	13,8	350,0	14,3	1	0,8373	0,0152	0,1929	0,0211	0,6503	582,2	1550,9	1530,0 ± 17,9
						2	0,8245	0,0148	0,2007	0,0269	0,6359	569,3	1516,6	
						3	<b>514</b>	<b>700</b>	<b>514</b>	<b>700</b>				
							0,8258	0,0133	0,1967	0,0236	0,6394	572,4	1525,0	

ANTOCIANINAS TOTAIS DA POLPA INTEGRAL LIOFILIZADA DE JUÇARA  
(mg/100g polpa seca)

Amostra (g)	Extrato		Solução Estoque		FD	Triplicata	γ pH1		γ pH4,5		Abs	AT		Média ± S n=3
	Total (mg)	Amostra (mg)	mg/mL	uL			513	700	513	700		bu	bs	
3,0023	2992,0	70,2	14,0	300,0	16,7	1	0,6947	0,0515	0,2125	0,0576	0,4883	964,6	999,8	1030,0 ± 26,8
							<b>514</b>	<b>700</b>	<b>514</b>	<b>700</b>				
						2	0,7131	0,0502	0,2132	0,0589	0,5086	1004,7	1041,4	
						3	0,7004	0,0362	0,2092	0,0577	0,5127	1012,8	1049,8	

**ANEXO 3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS**

FENOIS TOTAIS DAS POLPAS INTEGRAIS DE JUÇARA  
(mg EAG/100g polpa seca)

Polpas	Amostra (g)	Solução Estoque		Triplicata	Abs	FT			Média ± S n=3
		mg/mL	uL			ug/mL	bu	bs	
<b>Fresca</b>	2,0188	20,19	100	1	0,4799	378,3	1873,6	6006,7	5971,4 ± 65,7
				2	0,4803	378,6	1875,3	6012,0	
				3	0,4715	371,3	1839,0	5895,6	
<b>Congelada</b>	2,0568	20,57	100	1	0,2977	226,4	1100,8	3297,2	3271,7 ± 34,2
				2	0,2967	225,6	1096,8	3285,1	
				3	0,2924	222,0	1079,3	3232,9	
<b>Pasteurizada</b>	2,0043	20,04	100	1	0,2795	211,3	1054,0	2807,8	2834,4 ± 23,4
				2	0,2827	213,9	1067,3	2843,3	
				3	0,2835	214,6	1070,6	2852,1	
<b>Liofilizada</b>	1,0184	10,18	100	1	0,4632	364,3	3577,5	3699,7	3659,5 ± 56,9
				2	0,4537	356,4	3499,8	3619,3	
				3	0,4616	363,0	3564,4	3686,2	

## ANEXO 4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – DPPH

POLPA/EXTRATO		PADRÕES					
		TROLOX		BHT		VIT C	
		A=-0,0006C+0,9089		A=-0,0006C+1,0462		A=-0,0006C+0,9665	
		µmol	Abs	µmol	Abs	µmol	Abs
<b>Fresca</b>	A=-0,00004C+0,9037	700	0,4889	800	0,5662	700	0,5465
mg/l		10370		8437,5		8930	
ATT (µmol equivalente/g polpa fresca)		<b>67,50</b>		<b>94,81</b>		<b>78,39</b>	
<b>Lipofílica</b> A=-0,00001C+1,0738		58490		50760		52730	
mg/l							
Extrato Total g	0,269						
Amostra g	15,6852						
ATT (µmol equivalente/g polpa fresca)		<b>0,21</b>		<b>0,27</b>		<b>0,23</b>	
<b>Hidrofílica</b> A=-0,0006C+0,8538		608,17		479,33		512,17	
mg/l							
Extrato Total g	0,3744						
Amostra g	15,6852						
ATT (µmol equivalente/g polpa fresca)		<b>27,47</b>		<b>39,84</b>		<b>32,62</b>	
<b>Fenólica</b> A=-0,0002C+1,0177		2644,00		2257,50		2356,00	
mg/l							
Extrato Total g	0,0651						
Amostra g	9,0408						
ATT (µmol equivalente/g polpa fresca)		<b>1,91</b>		<b>2,55</b>		<b>2,14</b>	
<b>Antociânica</b> A=-0,0004C+0,8197		827,00		633,75		683,00	
mg/l							
Extrato Total g	0,3016						
Amostra g	9,0408						
ATT (µmol equivalente/g polpa fresca)		<b>28,24</b>		<b>42,11</b>		<b>34,19</b>	

C= Concentração

A= Absorbância (Abs)

ATT = Atividade antioxidante Total

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - ABTS

POLPA/EXTRATO		PADRÕES					
		TROLOX		BHT		VIT C	
		A=-0,0011C+1,0128		A=-0,0018C+0,8544		A=-0,0018C+1,0596	
		μmol	Abs	μmol	Abs	μmol	Abs
<b>Fresca</b>	A=-0,0001C+0,9308	500	0,4628	300	0,3144	500	0,1596
mg/l		4680		6164		7712	
ATT (μmol equivalente/g polpa fresca)		<b>106,84</b>		<b>48,67</b>		<b>64,83</b>	
<b>Lipofílica</b> A=-0,00006C+0,977		8570		11043,33		13623,33	
mg/l							
Extrato Total g	0,269						
Amostra g	15,6852						
ATT (μmol equivalente/g polpa fresca)		<b>1,00</b>		<b>0,47</b>		<b>0,63</b>	
<b>Hidrofílica</b> A=-0,0014C+0,7224		185,43		291,43		402,00	
mg/l							
Extrato Total g	0,3744						
Amostra g	15,6852						
ATT (μmol equivalente/g polpa fresca)		<b>64,36</b>		<b>24,57</b>		<b>29,69</b>	
<b>Fenólica</b> A=-0,0004C+0,7542		728,50		1099,50		1486,50	
mg/l							
Extrato Total g	0,0651						
Amostra g	9,0408						
ATT (μmol equivalente/g polpa fresca)		<b>4,94</b>		<b>1,96</b>		<b>2,42</b>	
<b>Antociânica</b> A=-0,0017C+0,866		237,18		324,47		415,53	
mg/l							
Extrato Total g	0,3016						
Amostra g	9,0408						
ATT (μmol equivalente/g polpa fresca)		<b>70,33</b>		<b>30,84</b>		<b>40,14</b>	



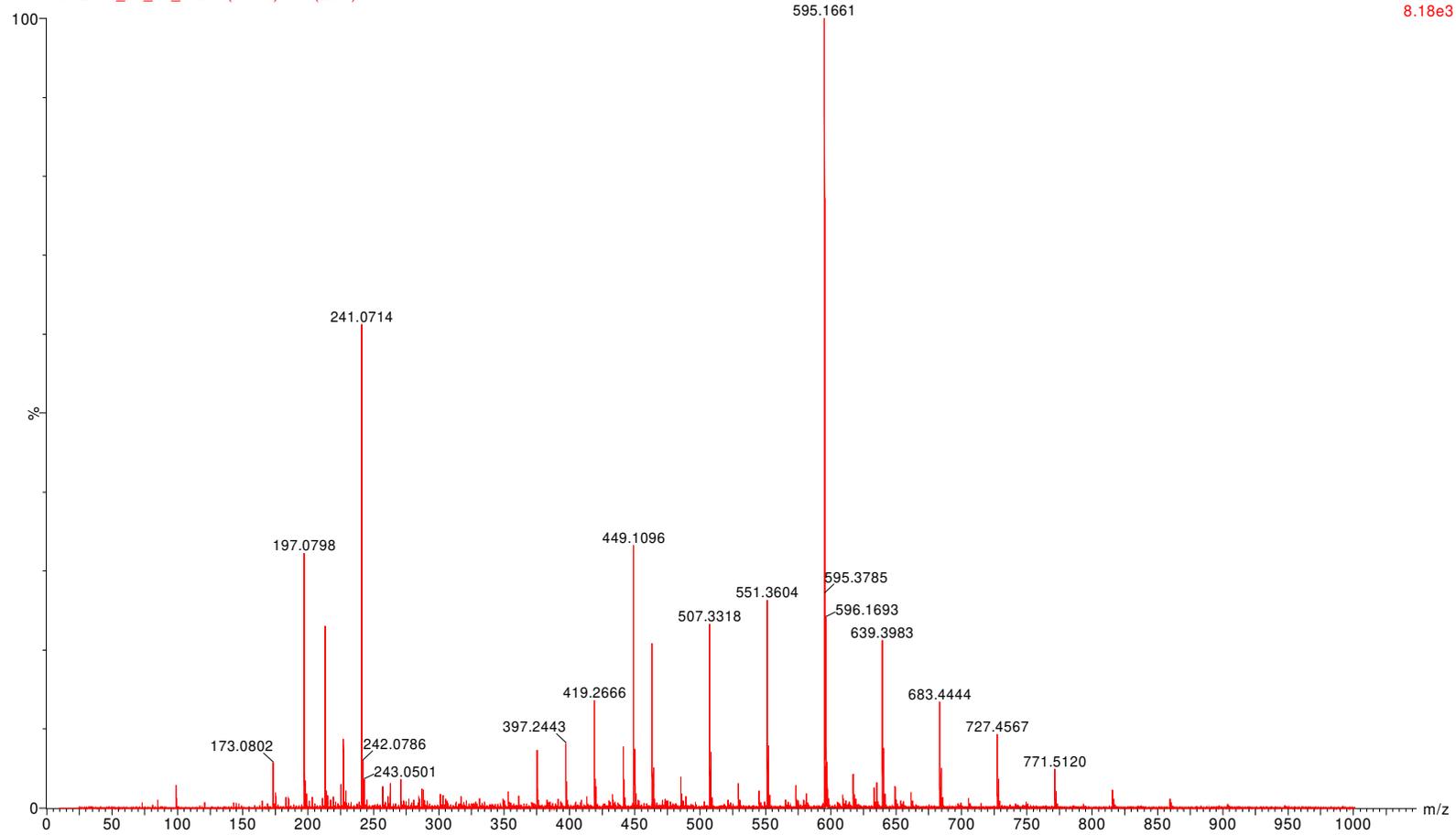
ANEXO 5.

YB323

19-Jun-2008 11:50:17

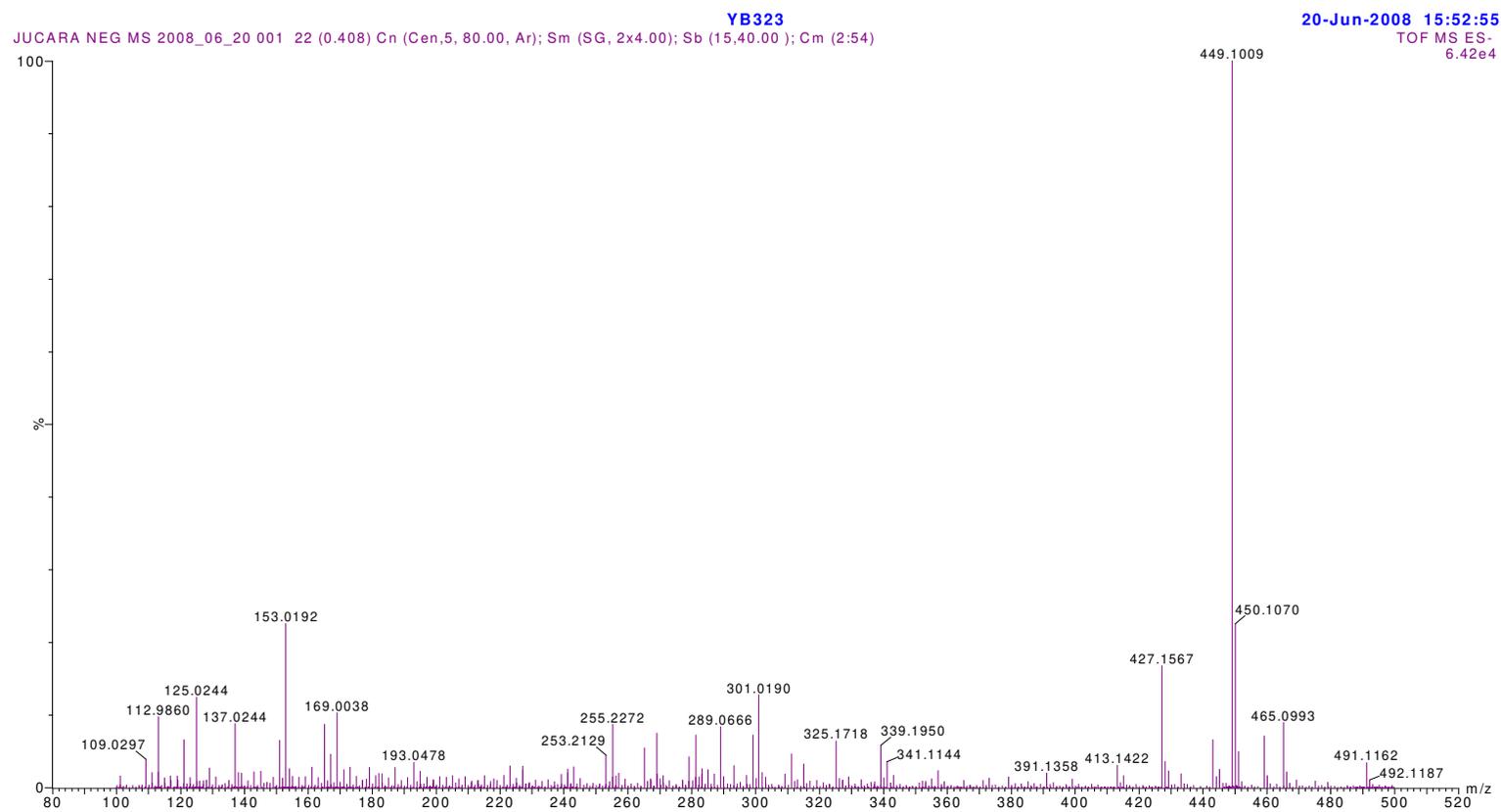
TOF MS ES+  
8.18e3

JUCARA 2008\_06\_19\_002 5 (0.093) Cm (2:54)



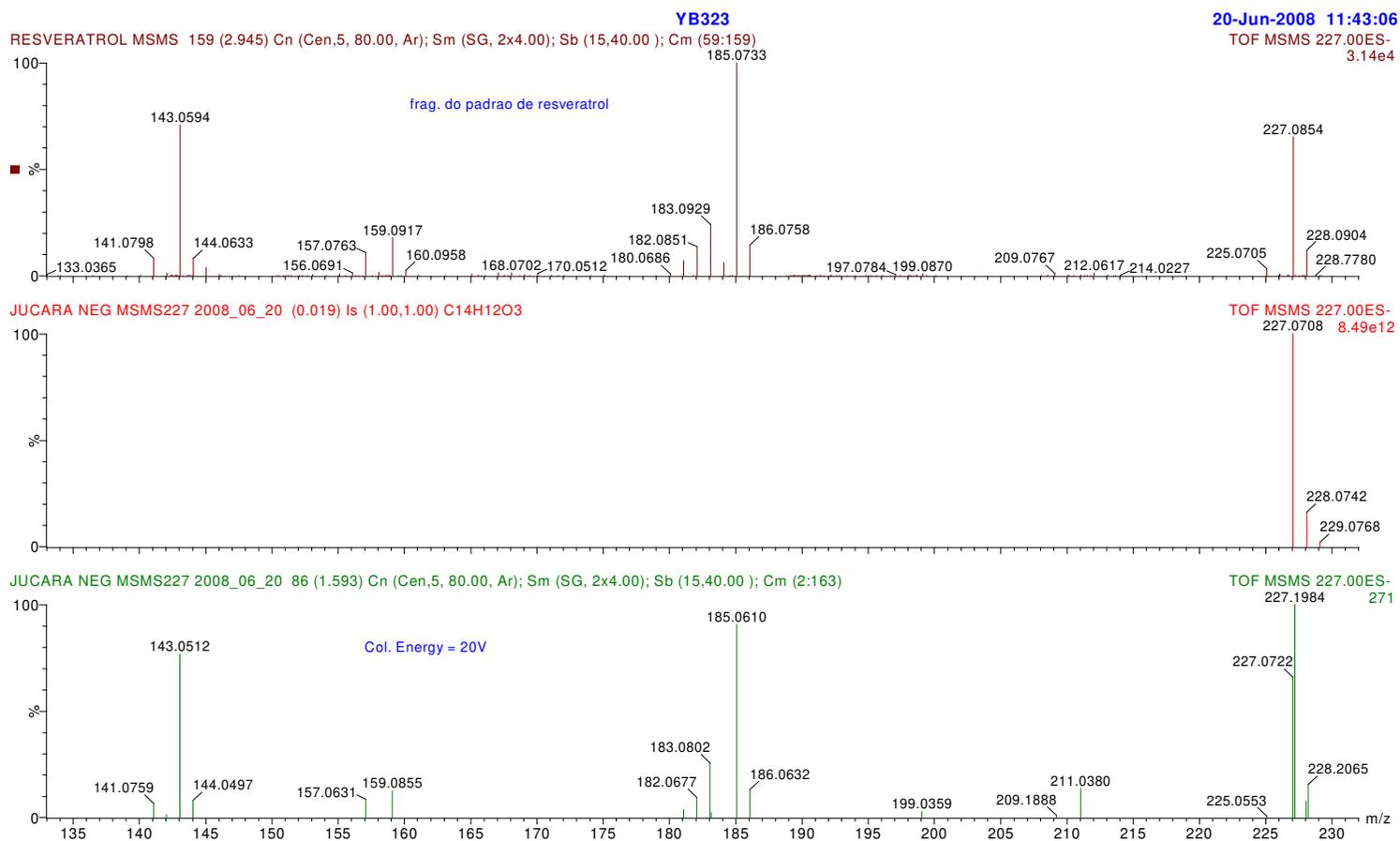
MS da fração antociânica da juçara

## ANEXO 6



MS da fração dos ácidos fenólicos e flavonóides da juçara

## ANEXO 7



Espectro massa-massa do íon molecular  $m/z$  227 (RESVERATROL) da fração de ácidos fenólicos e flavonóides da polpa da juçara

## ANEXO 8

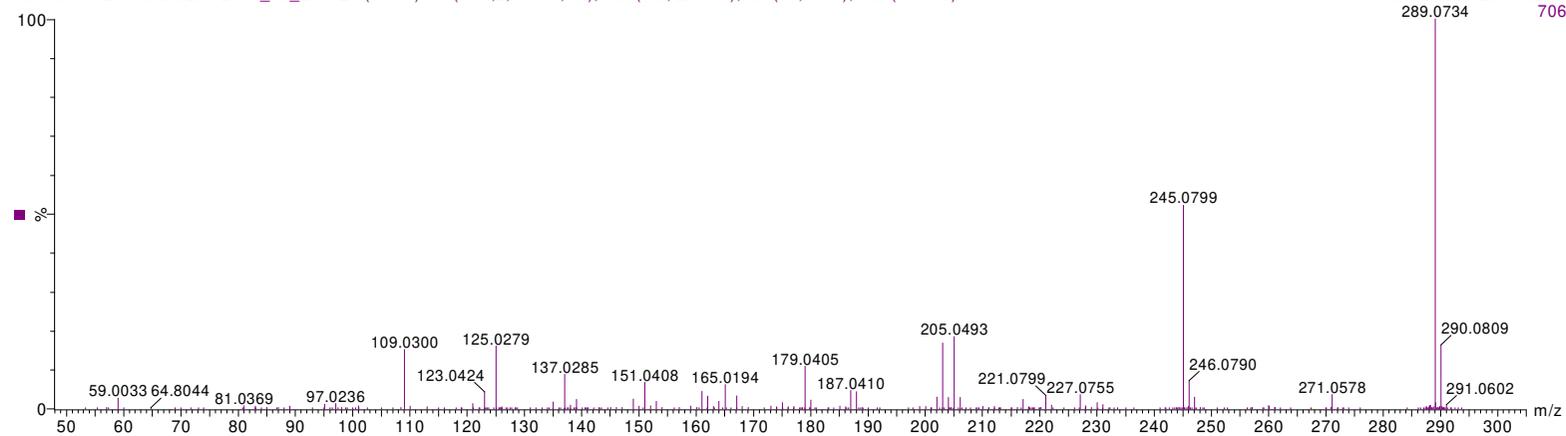
YB323

JUCARA NEG MSMS289 2008\_06\_20 (0.009) Is (1.00,1.00) C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

20-Jun-2008 14:32:39

TOF MSMS 289.00ES-  
289.0712 8.33e12

JUCARA NEG MSMS289 2008\_06\_20 124 (1.117) Cn (Cen,2, 80.00, Ar); Sm (SG, 2x4.00); Sb (15,5.00 ); Cm (77:167)

TOF MSMS 289.00ES-  
289.0734 706

Espectro massa-massa do íon molecular m/z 289 (CATEQUINA) da fração de ácidos fenólicos e flavonóides da polpa de juçara

