



LIZZIANE CYNARA VISSOTTO

**CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR
POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS**

Campinas, 2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LIZZIANE CYNARA VISSOTTO

**CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR
POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS**

Prof^ª. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Lizziane Cynara Vissotto, e orientada pela Prof^ª. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante.

Orientadora

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

V828c Vissotto, Lizziane Cynara, 1980-
Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio por polpas de frutas congeladas / Lizziane Cynara Vissotto. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Polpa de frutas. 3. Compostos bioativos. 4. Capacidade antioxidante. 5. Análise de componentes principais. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Scavenger capacity of reactive oxygen species by frozen fruit pulps

Palavras-chave em inglês:

Reactive oxygen species

Fruits pulp

Bioactive compounds

Antioxidant capacity

Principal component analysis

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Lilian Regina Barros Mariutti

Marta de Toledo Benassi

Data da defesa: 18-10-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Universidade Estadual de Campinas
Orientadora

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti
Universidade Estadual de Campinas
Membro Titular

Prof^ª. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina
Membro Titular

Dr. Renan Campos Chisté
Universidade Estadual de Campinas
Membro Suplente

Prof^ª. Dra. Veridiana Vera De Rosso
Universidade Federal de São Paulo
Membro Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais
Amoacir e Carmem, aos meus irmãos
Fabiane e Bruno, e à memória do
meu querido avô Vicente.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre iluminando os meus passos e por não permitir que as dificuldades do dia a dia interrompessem a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Amoacir e Carmem pelo amor, ensinamentos, confiança e constante incentivo, e aos meus irmãos Fabiane e Bruno pelo apoio e companheirismo. Sem vocês todo meu esforço e dedicação não teria sentido.

A prof^a. Adriane Z. Mercadante pela orientação, paciência, ensinamentos e exigência na busca de conhecimento durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Química de Alimentos e a prof^a. Neura Bragagnolo, pela amizade, companhia e ajuda sempre disponível durante o tempo que passamos juntos no decorrer deste trabalho.

Aos colegas Eliseu, Naira e Renan pela ajuda indispensável no decorrer deste trabalho, a qual contribuiu para o enriquecimento do mesmo.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

À banca examinadora pelas correções e sugestões, visando o melhoramento do trabalho final.

E a todos que de certa forma participaram e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Polpas de frutas.....	7
3.2 Compostos fenólicos.....	8
3.3 Ácido ascórbico.....	11
3.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	13
3.5 Antioxidantes.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Materiais.....	20
4.1.1 Amostras.....	20
4.1.2 Preparo das amostras.....	20
4.1.3 Reagentes, padrões e equipamentos.....	20
4.2 Métodos.....	22
4.2.1 Determinação dos compostos bioativos.....	22
4.2.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais.....	22
4.2.1.2 Determinação de flavonoides totais.....	22
4.2.1.3 Determinação de ácido ascórbico.....	22
4.2.2 Métodos de desativação das ROS.....	23
4.2.2.1 Desativação do radical peroxila (ROO [•]).....	23
4.2.2.2 Desativação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	23
4.2.2.3 Desativação do radical hidroxila ([•] OH).....	24
4.2.3 Análise estatística.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Conteúdo de compostos bioativos.....	26
5.2 Capacidade de desativação das ROS.....	30
5.3 Correlação entre a capacidade de desativação de ROS e o conteúdo de compostos bioativos.....	34
6 CONCLUSÃO.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das polpas de frutas congeladas.....	21
Tabela 2. Teores de compostos bioativos das polpas de frutas congeladas.....	27
Tabela 3. Valores de capacidade de desativação de ROS das polpas de frutas congeladas ...	31
Tabela 4. Correlação entre as variáveis obtidas nas análises efetuadas	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoico (a) e hidroxicinâmicos (b)	9
Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides (a) e estruturas das principais classes de flavonoides (b)	11
Figura 3. Oxidação do ácido L-ascórbico	12
Figura 4. Esquema demonstrando as características que possivelmente modulam a capacidade de desativar espécies reativas por flavonoides	17
Figura 5. Esquema demonstrando os sítios de ligação dos metais de transição com flavonoides	17
Figura 6. Ciclo de oxidação do ascorbato	18
Figura 7. Projeção das variáveis na análise de componentes principais obtidas a partir dos dados de capacidade de desativação de ROS e compostos bioativos das diferentes polpas de frutas congeladas	35
Figura 8. Distribuição das amostras obtidas pela análise de componentes principais, a partir dos dados de capacidade de desativação de ROS e composição de compostos bioativos das diferentes polpas de frutas congeladas analisadas. Projeção geral (a) e expansão da região circundada (b).....	36
Figura 9. Dendrograma, considerando a capacidade de desativação de diferentes ROS e os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico, das 18 polpas de frutas congeladas (L1-lote 1 e L2-lote 2).....	37

RESUMO

A diversidade de frutas frescas e/ou processadas comercializadas atualmente tem conquistado cada vez mais o mercado consumidor, com destaque para a produção de polpas de frutas congeladas, que além de permitirem o consumo de frutas durante o período não sazonal, possuem diversos compostos bioativos em sua composição. A atenção que as frutas e suas polpas vêm recebendo é devido ao crescente reconhecimento da associação direta entre o consumo de frutas e de vegetais e à prevenção de várias doenças crônico-degenerativas, as quais podem ser provocadas por espécies reativas, incluindo as espécies reativas de oxigênio. Este benefício tem sido atribuído aos compostos com capacidade antioxidante presentes em frutas e vegetais, com destaque para os compostos fenólicos e o ácido ascórbico. Considerando as observações acima e o aumento na comercialização e consumo de polpas de frutas congeladas, os objetivos deste trabalho foram: (1) determinar os teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e ácido ascórbico (AA) nos extratos aquosos de 18 polpas de frutas congeladas, (2) avaliar a capacidade de desativação de algumas espécies reativas de oxigênio (radical peroxila (ROO^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) por esses extratos, e (3) correlacionar, através de análise estatística multivariada, a capacidade antioxidante com o conteúdo de compostos bioativos. O conteúdo de CFT foi determinado pela reação de Folin-Ciocalteu e o conteúdo de FT pela reação com cloreto de alumínio, ambos determinados por espectrofotometria utilizando leitor de microplacas, o conteúdo de AA foi determinado por titulação com 2-6-diclorofenol-indofenol e a capacidade de desativação do ROO^{\bullet} , do H_2O_2 e do $^{\bullet}\text{OH}$ foi avaliada através de medidas de fluorescência ou de quimiluminescência em leitor de microplacas. Os conteúdos de compostos bioativos e os resultados da capacidade antioxidante (ROO^{\bullet} , H_2O_2 e $^{\bullet}\text{OH}$) foram avaliados e classificados por Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA). Neste trabalho foram avaliadas polpas congeladas de abacaxi, açaí, acerola, cacau, cajá, caju, coco, cupuaçu, goiaba, laranja, limão, manga, maracujá, melancia, pitanga, tamarindo, tangerina e umbu. Dentre as polpas avaliadas, foi observada uma grande variação no conteúdo de compostos fenólicos totais (de 6 (melancia) a 658 (acerola) mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/100g de polpa), de flavonoides totais (de 1 (coco e melancia) a 134 (açaí) mg de equivalente de catequina (EC)/100g de polpa) e de ácido ascórbico (de níveis não detectados a 506 (acerola) mg de ácido ascórbico (AA)/100g de polpa). A capacidade de desativação variou de 166 (coco) a 7498 (açaí) μmol equivalente ao trolox/100g de polpa para o ROO^{\bullet} ; IC_{50} de 143 (limão) a 3318 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (manga) para o H_2O_2 e IC_{50} de 3 (açaí) a 447 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (coco) para o $^{\bullet}\text{OH}$.

Os teores de CFT e AA apresentaram correlação positiva com os valores de desativação do ROO^{*} ($r = 0,82$ e $0,58$, respectivamente) e os teores de FT apresentaram correlação positiva com os resultados de desativação do ROO^{*} ($r = 0,81$) e ^{*}OH ($r = 0,97$). A ACP e AHA permitiram a separação das polpas de frutas em três grupos: o primeiro formado pela polpa de açaí, com elevado teor de FT (134 mg EC/100g de polpa) e elevada capacidade de desativação do ROO^{*}, ^{*}OH e H₂O₂; o segundo formado pela polpa de acerola, devido ao elevado teor de CFT (658 mg EAG/100g de polpa) e AA (506 mg AA/100g de polpa); e o terceiro grupo formado pelas demais polpas de frutas que não puderam ser separadas considerando apenas os teores dos compostos bioativos e a capacidade de desativação das ROS.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigênio, polpas de frutas, compostos bioativos, capacidade antioxidante, análise de componentes principais.

SUMMARY

The variety of fresh fruits and/or their processed products currently commercialized has increasingly achieved the consumer market, especially for the production of frozen fruit pulp, which also allows the consumption of fruits during their non-seasonal period, and present several bioactive compounds in their composition. The attention that this product is receiving is due to the increasing recognition of the direct association between the consumption of fruits and vegetables and prevention of various chronic degenerative diseases, which may be caused by reactive species, including reactive oxygen species. This benefit has been attributed to the presence of compounds with antioxidant capacity in fruits and vegetables, especially of phenolic compounds and ascorbic acid. Considering the above observations and the increasing commercialization and consumption of frozen fruit pulps, the objectives of this study were: (1) determination of the levels of total phenolic compounds (TPC), of total flavonoids (TF) and of ascorbic acid (AA) present in the aqueous extracts of 18 frozen fruit pulps, (2) evaluation of the scavenger capacity of reactive oxygen species (peroxyl radical (ROO[•]), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical ([•]OH) by these extracts, and (3) correlation using multivariate statistics analysis between the antioxidant capacity and the contents of bioactive compounds. The contents of total phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu reaction and of total flavonoids through the reaction with aluminium chloride, both determined spectrophotometrically in a microplate reader. The levels of ascorbic acid were determined by titration with dichlorophenol-indophenol. The capacity to scavenge ROO[•], H₂O₂ and [•]OH was assessed through measurements of fluorescence or chemiluminescence in a multiplate reader. The contents of bioactive compounds and the results of antioxidant capacity (ROO[•], H₂O₂ and [•]OH) were evaluated and classified by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). In this study frozen pulps of pineapple, açai, acerola, cacao, caja, cashew-apple, coconut, cupuaçu, guava, orange, lemon, mango, passion-fruit, watermelon, pitanga, tamarind, tangerine and umbu were analyzed. Among the pulps evaluated, a wide variation in the contents of total phenolic compounds (from 6 (watermelon) to 658 (acerola) mg galic acid equivalent (GAE)/100g), of total flavonoids (from 1 (coconut and watermelon) to 134 (açai) mg catequin equivalent (CE)/100g) and of ascorbic acid (from undetectable levels to 506 (acerola) mg of ascorbic acid (AA)/100g) were found. All frozen fruit pulp showed the capacity to scavenge the reactive oxygen species evaluated, ranging from 166 (coconut) to 7498 (açai) μmol equivalent to trolox/100 g of pulp for ROO[•]; IC₅₀ of 143 (lemon) to 3318 μg/mL (mango) for

H₂O₂ and IC₅₀ from 3 (açai) to 447 µg/mL (coconut) for •OH. The TPC and AA levels were positively correlated with the scavenging capacities of ROO• (r = 0.82 and 0.58, respectively) and the levels of TF were positively correlated with the results of scavenging ROO• (r = 0.81) and •OH (r = 0.97). The PCA and ACA allowed the separation of the 18 fruit pulps into three groups: one formed by the açai pulp with high levels of TF (134 mg CE/100g pulp) and great scavenging capacity of ROO•, •OH and H₂O₂, the second one formed by the acerola pulp, due to the high content of TPC (658 mg GAE/100g pulp) and AA (506 mg AA/100g pulp) and the third group of the remaining fruit pulps that could not be separated considering only the levels of bioactive compounds and the scavenging capacities of ROS.

Key-words: reactive oxygen species, fruit pulps, bioactive compounds, antioxidant capacity, principal component analysis, hierarchical cluster analysis

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O interesse do consumidor por uma alimentação mais saudável e o reconhecimento dos benefícios apresentados pelos compostos bioativos presentes em frutas tem levado a indústria de alimentos a buscar tecnologias que aumentem o tempo de vida útil das frutas, pois, por serem perecíveis, estas apresentam perdas significativas no período de safra. Dentre os recursos disponíveis, destaca-se a produção de polpas de frutas congeladas, as quais mantêm as características sensoriais (cor, aroma e sabor) e físico-químicas das frutas de origem, além de apresentar boa aceitação no mercado nacional e de ser uma opção para comercialização independentemente da sazonalidade. Embora o mercado de polpas de frutas congeladas não possua dados oficiais sobre a quantidade produzida e comercializada, sabe-se que o mesmo teve um crescimento razoável nos últimos anos, pois as polpas de frutas congeladas estão presentes em todos os varejos nacionais, desde as grandes redes de supermercados até as pequenas lojas de bairro.

Segundo estudos epidemiológicos, a associação entre a ingestão de uma dieta rica em frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas é, em parte, atribuída à capacidade antioxidante apresentada por diferentes compostos presentes em alimentos, incluindo as vitaminas (C e E), os minerais e inúmeros fitoquímicos, tais como os carotenoides e os compostos fenólicos (García-Alonso *et al.*, 2004). Pelo fato das frutas estarem entre as melhores fontes de compostos bioativos para a dieta humana, estes compostos foram identificados e quantificados em várias frutas e seus derivados, assim como a determinação da capacidade antioxidante apresentada por estes compostos, e foi observada uma alta correlação entre ambos. Porém, grande parte das pesquisas avaliou somente radicais não presentes em sistemas biológicos, tais como o ABTS e o DPPH (Kuskoski *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2008b; Barreto *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Rop *et al.*, 2010; Contreras-Calderón *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011).

Entre os compostos bioativos destacam-se os compostos fenólicos (incluindo a classe dos flavonoides), amplamente distribuídos no reino vegetal, que atuam como antioxidante através de vários mecanismos, incluindo a doação de hidrogênio e de elétrons, a regeneração de outros antioxidantes (por exemplo, da vitamina E), a quelação de íons metálicos e a inibição de enzimas envolvidas na produção de espécies reativas (Pietta, 2000; Heim *et al.*, 2002).

Outro importante composto com capacidade antioxidante é o ácido ascórbico, uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, cujas principais fontes são as frutas e os vegetais folhosos (Hernández *et al.*, 2006). Por apresentar capacidade antioxidante, esta vitamina desativa

diferentes espécies reativas, reduzindo assim, os danos celulares causados pela oxidação (Block, 1993).

Evidências epidemiológicas têm sugerido que espécies reativas produzidas em sistemas biológicos podem reagir com os diferentes componentes celulares, tais como DNA, lipídeos, proteínas, aminoácidos, carboidratos e vitaminas, causando danos estruturais e/ou funcionais (Barreiros *et al.*, 2006). Portanto, estas espécies reativas podem estar envolvidas no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imunológico e doenças neurodegenerativas (Ferrari & Torres, 2003; Scalbert *et al.*, 2005; Battino *et al.*, 2009); além de causarem a deterioração oxidativa em alimentos (Choe & Min, 2006). Entre as espécies reativas destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o radical peroxila (ROO^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) (Buonocore *et al.*, 2010).

Os métodos utilizados neste trabalho para determinar a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio utilizam espécies reativas produzidas pelo sistema biológico (ROO^{\bullet} , H_2O_2 e $^{\bullet}\text{OH}$), o que diferencia estes métodos de outros amplamente empregados, como por exemplo, aqueles que utilizam radicais livres estáveis não biológicos, tais como ABTS e DPPH.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Devido ao reconhecimento da importância dos compostos bioativos com capacidade antioxidante presentes em polpas de frutas-, o presente trabalho teve como objetivos:

- Determinar os conteúdos de compostos fenólicos totais, de flavonoides totais e de ácido ascórbico nos extratos aquosos de 18 polpas de frutas congeladas;
- Determinar a capacidade de desativação frente ao radical peroxila (ROO^*), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^*\text{OH}$) destes extratos;
- Correlacionar e classificar, através de análises estatísticas multivariadas, a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio com os conteúdos de compostos fenólicos, de flavonoides e de ácido ascórbico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polpas de frutas

As frutas constituem uma das fontes mais ricas de compostos para a alimentação humana, pois contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais, vitaminas e fibras, diversos metabólitos secundários, entre estes os compostos fenólicos (Kuskoski *et al.*, 2006).

Por serem perecíveis, as frutas deterioram em poucos dias e têm sua comercialização dificultada para grandes distâncias na forma *in natura*. Assim, a produção de polpas de frutas congeladas tornou-se uma opção para o aproveitamento integral das frutas, comercialização em locais onde não há produção e oferta por um período maior que o da safra. Além disso, a polpa de fruta congelada tem também grande importância como matéria-prima, podendo ser produzida nas épocas de safra, armazenada e posteriormente processada em doces de massa, geleias e néctares nos períodos mais propícios ou segundo a demanda do mercado consumidor. Ao mesmo tempo, as polpas de frutas congeladas também são comercializadas como ingredientes para outras indústrias que utilizam polpa como parte da formulação de iogurtes, biscoitos, bolos, sorvetes, sucos e alimentos infantis, entre outros (Bueno *et al.*, 2002). Além do interesse atual das indústrias de cosméticos por produtos a base de ingredientes naturais, que utilizam as polpas de fruta como matéria-prima nas mais diversas formulações de cremes, sabonetes, xampus, entre outros (Finetto, 2009).

A legislação brasileira define polpa de fruta como sendo um produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtida de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais provenientes da parte comestível do fruto, específico para cada um deste. Tal produto deve ser obtido de frutas frescas, sãs e maduras, com características física, química e organoléptica correspondentes às provenientes do fruto de sua origem, e não deverá conter terra, sujidade, parasitas, fragmentos de insetos e pedaços das partes não comestíveis da fruta e da planta. No rótulo da embalagem do produto deve constar a denominação “polpa”, seguido do nome da fruta de origem (MAPA, 2000).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. A produção brasileira superou 43 milhões de toneladas em 2008, sendo cerca de 53% da produção destinada ao mercado de frutas processadas e 47% ao mercado de frutas frescas. Atualmente, a produção brasileira está voltada para frutas tropicais, subtropicais e temperadas, graças a sua grande extensão territorial, solo e condições climáticas favoráveis (Xeyla, 2009).

O mercado de polpas de frutas congeladas apresenta grande potencial em função da variedade de frutas com sabores exóticos disponíveis no Brasil (Bueno *et al.*, 2002); proporcionando também, a possibilidade de comercialização de polpas de frutas pouco conhecidas, como as provenientes do Cerrado e das regiões Norte e Nordeste, que já despertam também o interesse do mercado externo (Matta *et al.*, 2005).

Com relação ao conteúdo de compostos bioativos nas frutas e nas polpas, vai depender de fatores edafoclimáticos, tais como o cultivar, o local de plantio e o grau de maturidade na época da colheita; além do histórico de processamento e da cadeia do frio, incluindo a estocagem, pois já é sabido que os teores de compostos bioativos naturais podem diminuir devido ao processamento e armazenamento (Kaur & Kapoor, 2001).

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários sintetizados por plantas, sendo essenciais para seu crescimento e reprodução, pois podem atrair organismos benéficos como polinizadores e dispersores de sementes, e atuar como agentes antioxidantes e protetores contra exposição à luz UV, a mudanças de temperatura, a patógenos e a predadores, entre outras funções (Bravo, 1998; Naczki & Shahidi, 2004, Balasundram *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011). Nos alimentos, os compostos fenólicos contribuem para a cor, sabor, aroma e estabilidade oxidativa (Naczki & Shahidi, 2004; Ângelo & Jorge, 2007).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas (Ignat *et al.*, 2011), englobando um amplo e complexo grupo de fitoquímicos com mais de 8000 estruturas conhecidas, desde moléculas simples como os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzoico e cinâmico), as cumarinas, os flavonoides e os estilbenos; até moléculas com alto grau de polimerização, incluindo os taninos (condensados e hidrolisáveis), as lignanas e as ligninas (Bravo, 1998). A diversidade estrutural deve-se ao fato desses compostos estarem ligados a grupos hidroxilas, metoxilas e podendo estar presentes na forma livre ou ligada, principalmente a açúcares, os quais podem ainda estar ou não acilados com diferentes ácidos (Heim *et al.*, 2002).

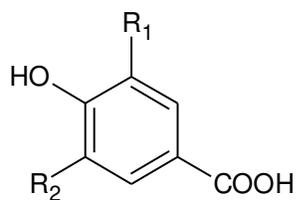
Os compostos fenólicos exibem uma variedade de propriedades fisiológicas, tais como antialérgica, antiaterogênica, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antitrombótica e efeito cardioprotetor e vasodilatador; estes efeitos benéficos estão parcialmente relacionados à capacidade antioxidante destes compostos (Benavente-Garcia *et al.*, 1997; Puupponen-Pimiä

et al., 2001). Todas estas propriedades justificam o grande número de estudos desenvolvidos para o monitoramento destes compostos em frutas e em vegetais e seus produtos processados, incluindo as polpas de frutas congeladas (García-Alonso *et al.*, 2004; Hassimotto *et al.*, 2005; Kuskoski *et al.*, 2006; Evangelista & Vieites, 2006; De Rosso & Mercadante, 2007; De Rosso *et al.*, 2008; Genovese *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008; Mezdari *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2010).

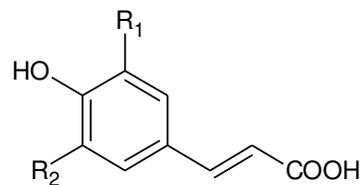
O teor de compostos fenólicos pode variar entre as diferentes espécies de frutas e vegetais, e dentro de uma mesma espécie (Balasundram *et al.*, 2006). Tais diferenças podem estar relacionadas à complexidade e diversidade de estruturas deste grupo de compostos e aos métodos de extração e análise utilizados (Bravo, 1998); podendo ainda, existir a interferência dos fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (meio ambiente, estocagem, processamento e armazenamento) (King & Young, 1999; Tomás-Barberan *et al.*, 2001).

As principais classes de compostos fenólicos da dieta humana são os ácidos fenólicos, os taninos e os flavonoides, os quais ocorrem nos alimentos em quantidades variadas (1-3 mg/Kg de alimento) (King & Young, 1999).

Os ácidos fenólicos constituem cerca de um terço dos compostos fenólicos da dieta, os quais podem estar presentes em plantas nas formas livre e ligada. Este grupo é subdividido em dois subgrupos, os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico. Os derivados do ácido hidroxibenzoico incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm como estrutura comum C₆-C₁ (Figura 1). Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃) (Figura 1), sendo os mais comuns os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico (Balasundram *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011).



Ácido gálico: R₁= R₂= OH
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: R₁= R₂= H
 Ácido protocatecuico: R₁= OH, R₂= H
 Ácido vanílico: R₁= OCH₃, R₂= H
 Ácido siríngico: R₁= R₂= OCH₃



Ácido *p*-cumárico: R₁= R₂= H
 Ácido cafeico: R₁= OH, R₂= H
 Ácido ferúlico: R₁= OCH₃, R₂= H
 Ácido sináptico: R₁= R₂= OCH₃

Figura 1. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoico (a) e hidroxicinâmicos (b).

Os taninos são compostos de peso molecular relativamente alto, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Soares, 2002). Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliidrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisados com ácidos, bases ou enzimas. Os taninos condensados (também conhecidos como proantocianidinas) são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina e não são hidrolisados por tratamento ácido (Soares, 2002; Balasundram *et al.*, 2006).

Dentro dos compostos fenólicos, a classe mais importante é a dos flavonoides, sendo conhecida atualmente uma quantidade superior a 5000 estruturas diferentes (Robards & Antolovich, 1997). Os flavonoides encontram-se presentes em frutas, flores, folhas e sementes (Ângelo & Jorge, 2007).

Os flavonoides são compostos com estrutura química formada por quinze átomos de carbono organizados na configuração $C_6-C_3-C_6$ (Figura 2), que consiste em dois anéis aromáticos, A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, C. Variações de substituição no anel C resultam em diferentes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (Figura 2). Substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (Hollman & Katan, 1999; Pietta, 2000; Balasundram *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011). Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfonação (Balasundram *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011).

Atualmente há um grande interesse na pesquisa de flavonoides devido à possibilidade de contribuir para a saúde humana, através do consumo de frutas e de vegetais (Ignat *et al.*, 2011). Embora os flavonoides geralmente sejam considerados não nutrientes, esses são importantes componentes da dieta (Behling *et al.*, 2004), sendo consumidos diariamente em concentrações que podem variar entre 50 e 800 mg/dia (Pietta, 2000) de acordo com o consumo de fontes específicas como vinho tinto, chá, frutas e derivados, grãos, nozes, sementes e vegetais (Behling *et al.*, 2004).

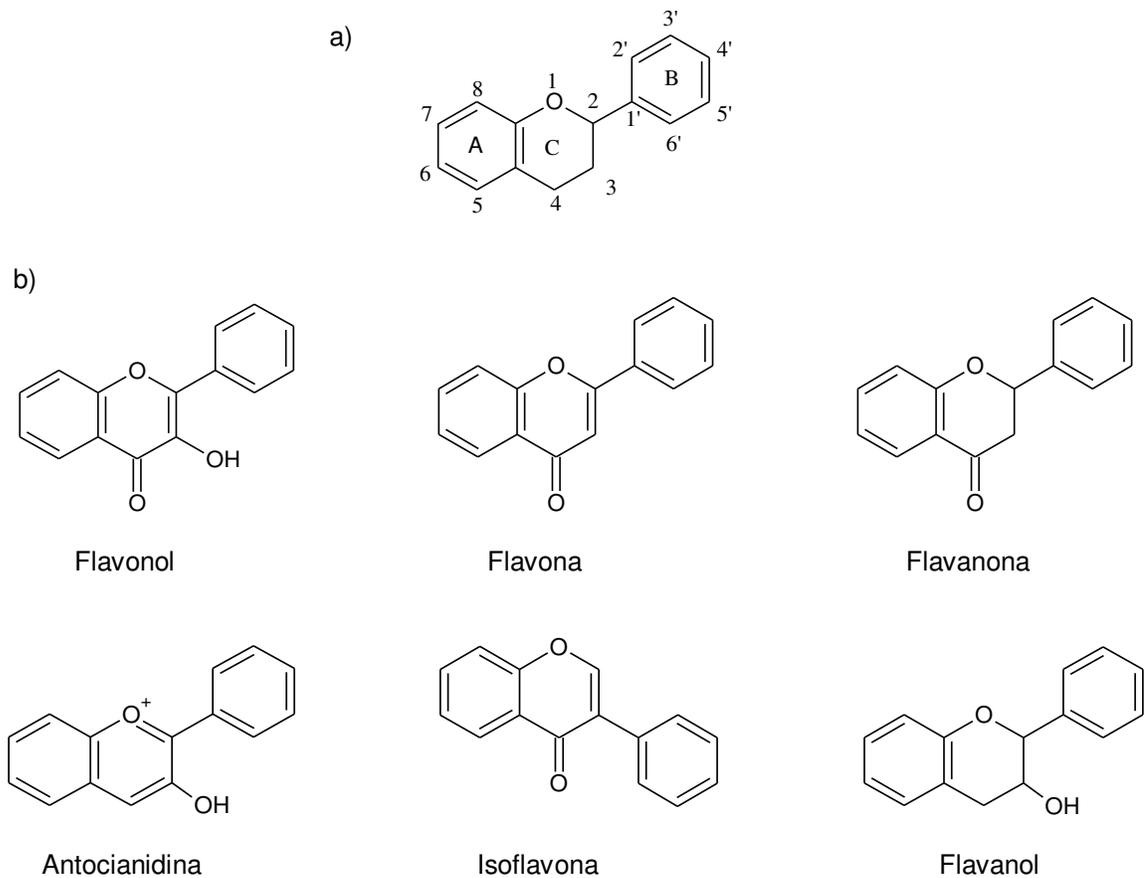


Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides (a) e estruturas das principais classes de flavonoides (b).

3.3 Ácido ascórbico

O ácido L-ascórbico (AA), conhecido também como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, naturalmente presente em alimentos, sendo encontrada na natureza na forma reduzida (ácido L-ascórbico) ou oxidada (ácido L-desidroascórbico - DHA), ambas com atividade vitamínica. A transformação do AA em DHA ocorre pela abstração de dois átomos de hidrogênio na presença de íons metálicos, oxigênio, temperatura elevada, luz ou em condição levemente alcalina (pH acima de 6), com perda parcial da atividade vitamínica. A oxidação do AA a DHA é reversível, permitindo que uma destas duas formas possa sempre ser transformada na outra, dependendo das condições do meio. Porém, a oxidação adicional do DHA gera o 2,3-ácido dicetogulônico, sem atividade vitamínica (Figura 3) (Hernández *et al.*, 2006; Barcia *et al.*, 2010).

A estabilidade do AA aumenta em pH abaixo de 4. Em alimentos, a concentração de DHA é sempre muito inferior à de AA, indicando que quantidades significativas de DHA pode ser um reflexo de oxidação durante a análise (Damodaran *et al.*, 2010).

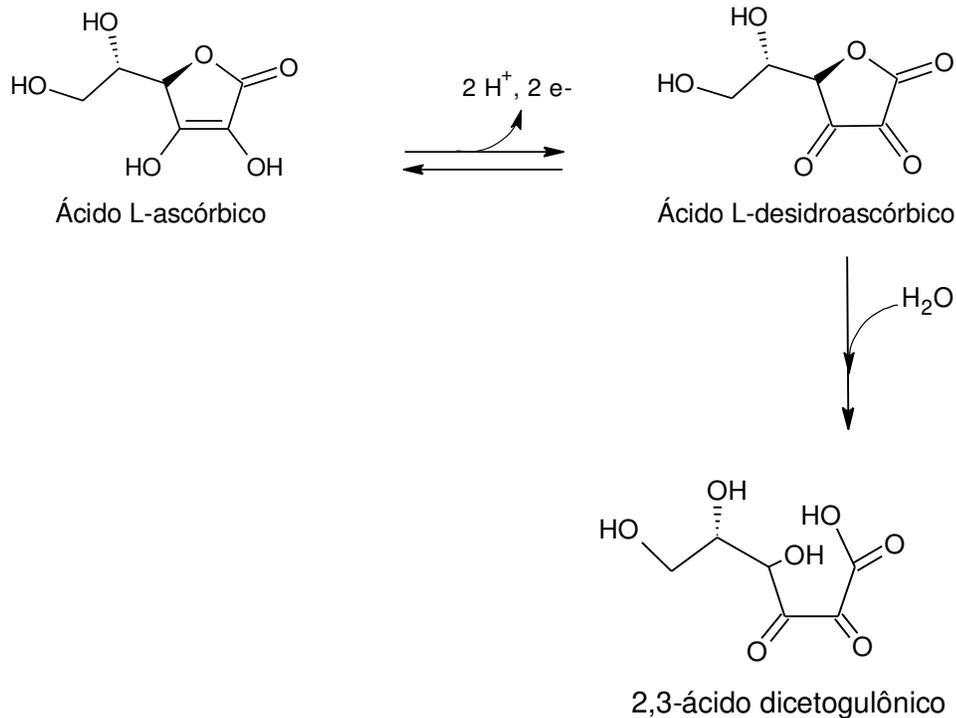


Figura 3. Oxidação do ácido L-ascórbico (Hernández *et al.*, 2006).

Como o ser humano não pode sintetizar o ácido ascórbico, este é suprido através da dieta pelas principais fontes desse composto, que são as frutas (acerola, camu-camu, caju, goiaba, manga, mamão, morango, laranja, limão e tangerina) e os vegetais (folhas verdes) (Hernández *et al.*, 2006). O teor de AA das frutas pode variar dependendo da espécie, do estágio de maturação na época da colheita, de variações genéticas, do manuseio pós-colheita, do processamento e das condições de estocagem (Barcia *et al.*, 2010).

3.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) é um termo coletivo que inclui as formas radicalares derivadas do oxigênio molecular, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HOO^{\bullet}), o radical peroxila (ROO^{\bullet}), o radical alcoxila (RO^{\bullet}) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), e algumas formas não radicalares que são agentes oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (Buonocore *et al.*, 2010).

As ROS são produtos do metabolismo celular normal, porém, podem ser geradas por fatores ambientais, como a poluição do ar, a fumaça de cigarro, a radiação e os herbicidas, entre outros (Kaur & Kapoor, 2001). Essas espécies apresentam um papel duplo, podendo atuar de modo deletério ou benéfico ao sistema biológico. Os efeitos benéficos das ROS ocorrem quando estas estão em baixas ou moderadas concentrações e envolvem papéis fisiológicos importantes na fagocitose (na defesa contra agentes infecciosos), na sinalização química de moléculas nas células, na regulação do crescimento celular, entre outros. Em contrapartida, a superprodução de ROS e a deficiência de antioxidantes resultam no estresse oxidativo, um processo deletério que pode ser um importante mediador de danos às estruturas celulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010). A ação de ROS à estrutura do DNA pode resultar na quebra da cadeia molecular, e esta cadeia ser reconectada em outra posição, alterando assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pela ação de ROS pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Além disso, a ocorrência de oxidação lipídica na membrana celular, causada por ROS, pode resultar na interferência do transporte ativo e passivo normal através da membrana ou ocasionar a ruptura desta, levando à morte celular (Barreiros *et al.*, 2006).

Os danos causados aos componentes celulares (por exemplo, o DNA) acumulam-se com o passar dos anos e contribuem para a degeneração de células somáticas e para a indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente as associadas ao envelhecimento, destacando-se o câncer, a aterosclerose, as doenças inflamatórias, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a catarata, o declínio do sistema imunológico e as disfunções cerebrais (Scalbert *et al.*, 2005; Battino *et al.*, 2009). Para o funcionamento celular normal, deve haver uma compensação entre a formação de espécies reativas e os níveis de defesas antioxidantes (Cerqueira *et al.*, 2007).

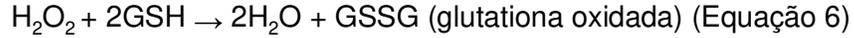
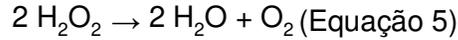
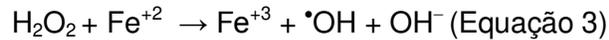
O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado enzimaticamente ou quimicamente a partir do oxigênio molecular. A adição de um elétron ao oxigênio molecular forma o $O_2^{\bullet-}$ que possui apenas um elétron não pareado e é um radical (Choe & Min, 2006). Apesar do $O_2^{\bullet-}$ apresentar baixa reatividade se comparado a outras ROS, alguns de seus metabólitos ($^{\bullet}OH$, $ONOO^-$) são altamente reativos e podem causar danos aos tecidos. No sistema fisiológico ocorre rapidamente a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ formando o H_2O_2 , reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Lu *et al.*, 2006).

Outra espécie envolvida nos processos oxidativos é o oxigênio singlete (1O_2), uma forma de oxigênio altamente reativa que pode ser formada enzimaticamente através de peroxidases, e também pode ser gerada por um processo de transferência de energia a partir de um sensibilizador (por exemplo, a clorofila e a riboflavina), onde o sensibilizador no estado excitado triplete ($^3S^*$) transfere energia para o oxigênio molecular (3O_2). A produção excessiva de 1O_2 em meio biológico pode ser prejudicial e já foi comprovado que essa espécie é responsável pela iniciação de oxidação nas células, causando danos tais como a destruição de DNA e a oxidação lipídica (Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

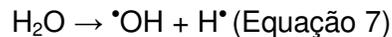
Outra espécie reativa derivada do oxigênio formado em sistemas biológicos é o radical peroxila (ROO^{\bullet}). Em geral, o ROO^{\bullet} é um forte agente oxidante, podendo ser formado pela reação direta entre o oxigênio triplete e um radical alquila (Equação 1) na oxidação de ácidos graxos insaturados. O ROO^{\bullet} é suficientemente reativo para remover hidrogênio de outro ácido graxo vizinho (RH), gerando um hidroperóxido ($ROOH$) (Equação 2) (Choe & Min, 2006).



O H_2O_2 é uma ROS que pode atuar como agente oxidante ou como agente redutor, sendo gerada através da reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ catalisada pela enzima SOD. Isoladamente o H_2O_2 é pouco reativo, porém, pode difundir-se facilmente através das membranas celulares (Barreiros *et al.*, 2006), além de estar envolvido na formação do radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) através da reação de Fenton (Equação 3) e de Harber-Weiss (Equação 4). As enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) removem o H_2O_2 das células. A catalase promove a dismutação do H_2O_2 em água e oxigênio (Equação 5). A glutaciona peroxidase catalisa a redução do H_2O_2 para formação de água com intervenção da glutaciona (GSH) (Equação 6) (Barreiros *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).



O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) apresenta uma alta reatividade, tornando-o um radical muito perigoso com um tempo de meia vida curto, de aproximadamente 10^{-9} s. Assim, quando é produzido reage perto do seu local de formação (Valko *et al.*, 2007). O $\cdot\text{OH}$ é formado principalmente pela interação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e metais de transição através das reações de Fenton e Harber-Weiss citadas anteriormente. No entanto, a reação de Harber-Weiss ocorre muito lentamente em condições fisiológicas, por isso, a reação de Fenton é considerada a reação predominante em sistemas biológicos. O $\cdot\text{OH}$ também pode ser gerado a partir da homólise da água por exposição à radiação ionizante (Equação 7) (Lu *et al.*, 2006; Choe & Min, 2006; Valko *et al.*, 2007). Os mecanismos de reações em que o $\cdot\text{OH}$ participa podem ser de adição às duplas ligações conjugadas e de remoção de hidrogênio. Um exemplo com importância biológica de remoção de hidrogênio pelo $\cdot\text{OH}$ é a sua capacidade para desencadear a oxidação lipídica. Já as reações do $\cdot\text{OH}$ com compostos aromáticos ocorrem normalmente por adição do radical (Barreiros *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).



3.5 Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em relação àquelas de um substrato oxidável, previne ou retarda significativamente o processo oxidativo, iniciado por um pró-oxidante. O termo substrato oxidável engloba quase todos os componentes encontrados em alimentos e em tecidos vivos, tais como proteínas, lipídeos, vitaminas, carboidratos e DNA (Halliwell *et al.*, 1995). Pró-oxidantes (ou espécies reativas) são substâncias endógenas ou exógenas que podem causar danos por meio de oxidação das moléculas-alvo (Cerqueira *et al.*, 2007).

O organismo possui uma série de defesas antioxidantes, classificadas em antioxidantes enzimáticos que incluem as enzimas superóxido dismutase, a glutathiona peroxidase e a catalase, e os antioxidantes não enzimáticos que são o ácido ascórbico, o α -tocoferol (vitamina

E), a glutathiona, as proteínas extracelulares (transferrina, ferritina, albumina), os carotenoides e os compostos fenólicos (incluindo a classe dos flavonoides), entre outros (Valko *et al.*, 2007; Reuter *et al.*, 2010).

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, sendo que alguns antioxidantes podem exibir mais de um mecanismo. Os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de hidrogênio ou de elétrons às espécies reativas, convertendo estas espécies em produtos termodinamicamente estáveis (Ângelo & Jorge, 2007). Já os antioxidantes secundários, atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos de ação tais como, a quelação de metais, a decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radiculares, a absorção da radiação ultravioleta ou a desativação de oxigênio singlete (Ângelo & Jorge, 2007).

Os compostos antioxidantes (naturais ou sintéticos) também são utilizados como conservantes em alimentos, prevenindo ou retardando a decomposição oxidativa dos mesmos. Nos últimos anos, os antioxidantes naturais provenientes de alimentos e de outros materiais biológicos estão atraindo considerável interesse devido à suposta segurança e efeitos terapêuticos (Kaur & Kapoor, 2001).

A atividade dos compostos antioxidantes depende de suas estruturas e pode ser determinada por uma série de fatores, como a biodisponibilidade, a reatividade como agente doador de hidrogênio ou de elétrons, o potencial de oxidação do antioxidante, a taxa de reação com o radical a ser desativado, a capacidade de quelar metais de transição, a baixa reatividade e a alta estabilidade do radical derivado do antioxidante e a solubilidade e a interação com as membranas (Barreiros *et al.*, 2006; Bisby *et al.*, 2008).

Entre os antioxidantes presentes em frutas e vegetais, os mais ativos e abundantes são os compostos fenólicos (incluindo a classe dos flavonoides). Esses agem através de vários mecanismos, incluindo a desativação de espécies reativas, a regeneração de outros antioxidantes da dieta (por exemplo, da vitamina E), a quelação de íons metálicos e a inibição de enzimas envolvidas na produção de ROS (por exemplo, as peroxidases) (Pietta, 2000; Heim *et al.*, 2002).

Em relação à estrutura dos flavonoides, é possível notar três características importantes para modular a capacidade de desativação de espécies reativas (Figura 4): (1) a estrutura do σ -di-hidroxil (catecol) no anel B, (2) a ligação dupla entre o C-2 e C-3 do anel C em conjugação com a carbonila do C-4 e (3) a presença dos grupos hidroxilas nas posições C-5 e C-7 do anel A. Essas características conferem maior estabilidade ao radical de flavonoide gerado,

possivelmente pela habilidade em deslocar o elétron desemparelhado (Rice-Evans *et al.*, 1997; Benavente-Garcia *et al.*, 1997; Heim *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2002). No entanto, alterações no arranjo dos grupos hidroxilas diminuem a capacidade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1997).

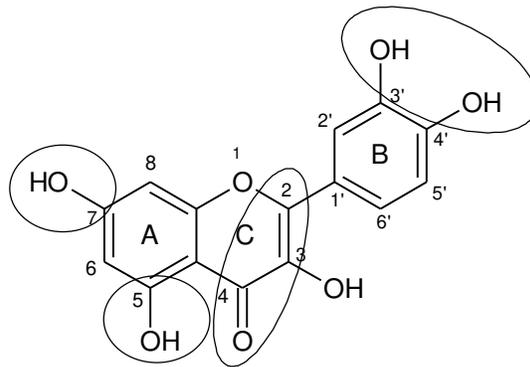


Figura 4. Esquema demonstrando as características que possivelmente modulam a capacidade de desativar espécies reativas por flavonoides.

A ação de flavonoides na remoção de metais de transição em meio biológico também é fundamental para a proteção antioxidante, visto que os metais catalisam as reações de Fenton e de Harber-Weiss (Barreiros *et al.*, 2006). Os locais propostos para a ligação de metais de transição na estrutura dos flavonoides são a fração catecol (anel B), os grupos hidroxila no C-3 e carbonila no C-4 (anel C), e os grupos carbonila no C-4 (anel C) e hidroxila no C-5 (anel A) (Figura 5) (Rice-Evans *et al.*, 1997; Pietta, 2000).

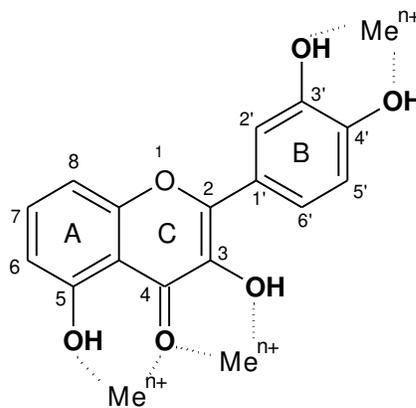


Figura 5. Esquema demonstrando os sítios de ligação dos metais de transição com flavonoides (Pietta, 2000).

Outro importante antioxidante é o ácido ascórbico, que age como desativador de espécies reativas. Em sistemas biológicos, o ácido ascórbico é encontrado na forma de ascorbato (Asc^-), que é a forma que atua como antioxidante ao doar hidrogênio ou elétrons às espécies reativas, resultando na formação do radical ânion semidesidroascorbato ($\text{Asc}^{\bullet-}$) ou ascorbila, que é pouco reativo (Vasconcelos *et al.*, 2007). Esse radical pode ser reconvertido a ascorbato ou originar uma molécula de desidroascorbato e ser regenerada a ascorbato através de um sistema enzimático ou ser oxidada irreversivelmente gerando oxalato e treonato (Figura 6) (Barreiros *et al.*, 2006). O ascorbato pode atuar na membrana celular diretamente, impedindo a iniciação da oxidação lipídica, ou indiretamente pela regeneração da vitamina E (Vasconcelos *et al.*, 2007).

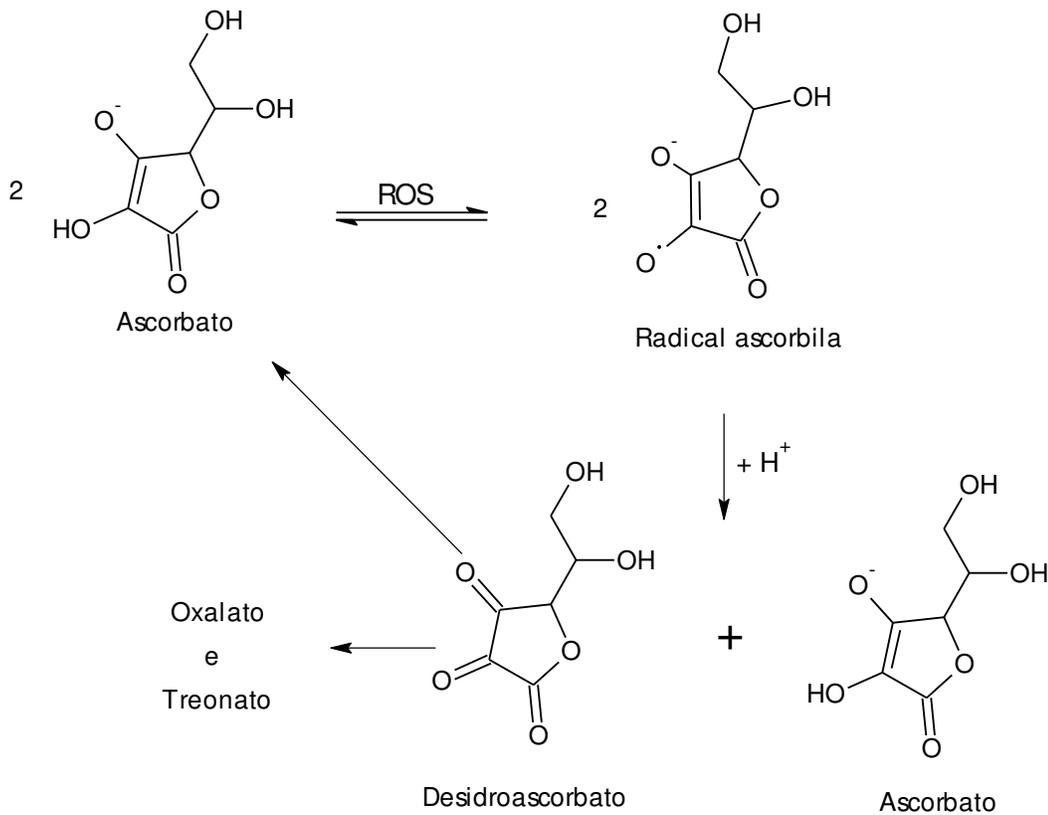


Figura 6. Ciclo de oxidação do ascorbato (Barreiros *et al.*, 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Amostras

As polpas de frutas congeladas foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas - São Paulo (Brasil), todas do mesmo fabricante, e comercializadas em embalagem plástica transparente de 100g e dentro do prazo de validade. Para cada polpa de fruta congelada foram adquiridas quatro embalagens de 100 g de cada lote, sendo no total dois lotes. Após a aquisição, as amostras foram conservadas a - 80 °C até o início das análises.

Na tabela 1 estão listados os nomes científicos e a origem das 18 frutas das quais foram utilizadas polpas congeladas para a realização deste trabalho, bem como a descrição da composição das polpas contidas no rótulo do produto.

4.1.2 Preparo das amostras

Cada amostra foi obtida pela mistura de quatro embalagens de 100 g de polpa proveniente do mesmo lote, a qual foi diluída com água na proporção de 100 g de polpa para 250 mL de água Milli-Q, de acordo com recomendações do fabricante. Esta mistura foi então homogeneizada por 1 min em liquidificador doméstico e submetida à centrifugação a 6450 g por 20 min a 20 °C. O sobrenadante (extrato aquoso) foi coletado e utilizado para a realização de todas as análises em triplicata.

4.1.3 Reagentes, padrões e equipamentos

Os reagentes Folin-Ciocalteu, catequina, ácido gálico, 2,2'-azobis(2-amidinopropano)-di-hidroclorato (AAPH), ácido ascórbico, lucigenina, fluoresceína, luminol e hidroximetilaminometano (TRIS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox) foi adquirido da Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha). O fosfato monossódico, fosfato dissódico, peróxido de hidrogênio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, nitrito de sódio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O 2-6-diclorofenol-indofenol (DCFI) foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil). O carbonato de sódio foi adquirido da Ecibra (São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Descrição das polpas de frutas congeladas.

Fruta	Nome Científico	Origem	Composição das Polpas
Abacaxi	<i>Ananas comosus (L.) Merrill</i>	América Central/Nordeste do Brasil	abacaxi integral
Açaí	<i>Euterpe oleracea Mart</i>	Norte do Brasil	açaí e água
Acerola	<i>Malpighia emarginata DC</i>	Antilhas	acerola integral
Cacau	<i>Theobroma cacao L.</i>	Alto do Amazonas	cacau integral
Cajá	<i>Spondias lutea L.</i>	Norte e Nordeste Brasileiro	cajá integral
Caju	<i>Anacardium occidentale L.</i>	Litoral Nordestino	caju integral
Coco	<i>Cocos nucifera L.</i>	Arquipélagos do Oceano Pacífico	coco integral
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum Schum</i>	Floresta Amazônica	cupuaçu integral
Goiaba	<i>Psidium guajava L.</i>	América Central	goiaba integral
Laranja	<i>Citrus sinensis Osbeck</i>	Sudeste Asiático	laranja integral
Limão	<i>Citrus spp.</i>	Sudeste Asiático	limão integral
Manga	<i>Mangifera indica L.</i>	Índia	manga integral
Maracujá	<i>Passiflora edulis Sims</i>	Nordeste Brasileiro	maracujá integral
Melancia	<i>Citrullus vulgaris Schrad</i>	Índia	melancia integral
Pitanga	<i>Eugenia uniflora L.</i>	Brasil	pitanga integral
Tamarindo	<i>Tamarindus indica L.</i>	Índia	tamarindo integral
Tangerina	<i>Citrus reticulata Blanco</i>	Sudeste Asiático	tangerina integral
Umbu	<i>Spondias tuberosa Arr. Cam</i>	Nordeste Brasileiro	umbu integral

Um leitor de microplacas Synergy Mx (Bio-Tek, Vermont, EUA), com detecção de UV/vis, fluorescência e luminescência, foi usado para analisar a capacidade de desativação das ROS, assim como para determinar os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Foi utilizada também uma centrífuga refrigerada CR21 (Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge, Japão).

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação dos compostos bioativos

4.2.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu, com leitura da absorbância a 765 nm, seguindo o método descrito por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações. Neste método a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico em meio básico se reduz ao oxidar os compostos das amostras, originando óxidos azuis de wolframio (W_8O_{23}) e molibdênio (Mo_8O_{23}) (Kuskoski *et al.*, 2006). A mistura reacional teve um volume final de 300 μ L, sendo composto pelos seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, amostra em diferentes concentrações e carbonato de sódio (7%). A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica com ácido gálico na faixa de concentrações de 12,5 a 150 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de polpa de fruta.

4.2.1.2 Determinação de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado segundo Zhishen *et al.* (1999) com algumas modificações, por meio da reação com 22,5 mmol/L (concentração final) de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) na presença de 21,7 mmol/L (concentração final) de nitrito de sódio ($NaNO_2$), seguido de leitura da absorbância a 510 nm. A mistura reacional foi conduzida em um volume final de 300 μ L, tendo os seguintes reagentes: $NaNO_2$ (5%), $AlCl_3$ (10%), amostras em diferentes concentrações e hidróxido de sódio (1 M). A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica com catequina nas concentrações de 12,5 a 200 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina (EC)/100 g de polpa de fruta.

4.2.1.3 Determinação de ácido ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado usando o método de Tillmans (Instituto Adolfo Lutz, 2004). Este método baseia-se na redução de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa, e sua forma reduzida é incolor. O ponto final da titulação foi detectado pela viragem da solução de incolor para rosa, quando a primeira gota de solução de DCFI foi introduzida no sistema, com todo o ácido ascórbico já consumido. Para cada amostra foi utilizada uma quantidade diferente de extrato, à qual foram adicionados 50 mL de ácido oxálico 1% e mantida por 15 minutos ao

abrigo da luz. Em seguida foi titulada com DCFI 0,2%. A quantificação de ácido ascórbico foi realizada pela comparação com padrão de AA (50 mg/100 mL), titulado no dia da análise. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido ascórbico (AA)/100 g de polpa de fruta.

4.2.2 Métodos de desativação das ROS

4.2.2.1 Desativação do radical peroxila (ROO^{*})

A capacidade de desativação do ROO^{*} foi determinada pelo monitoramento do decaimento da fluorescência, devido à oxidação da fluoresceína, de acordo com o método descrito por Rodrigues *et al.* (2012). O ROO^{*} foi gerado por decomposição térmica do 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-idrocloro (AAPH) a 37 °C. A mistura reacional teve um volume final de 200 µL, tendo os seguintes reagentes: AAPH (19 mM), fluoresceína (61,2 mM) e amostras em diferentes concentrações, diluídas em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). A fluorescência foi monitorada com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm, sob forma de cinética, com intervalos de 1 min, até a redução do valor da fluorescência a 0,5% da fluorescência inicial. Os resultados para as polpas foram expressos em µmol equivalente ao trolox, obtidos a partir de uma curva analítica com trolox (12 – 94 µM). Esta curva foi construída com os valores de *net* área sob a curva (AUC) no eixo y e concentração no eixo x. A *Net* AUC foi obtida pela diferença entre a AUC de cada concentração de trolox e a AUC de tampão fosfato 75 mM (7,4) (branco).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2007), o método de desativação do ROO^{*} possui limite de detecção de 2 µM e limite de quantificação de 7 µM.

4.2.2.2 Desativação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A capacidade de desativação do H₂O₂ foi determinada pelo monitoramento da quimiluminescência durante a oxidação da lucigenina induzida pelo H₂O₂, de acordo com o método descrito por Gomes *et al.* (2007). A mistura reacional foi conduzida em um volume final de 300 µL, tendo os seguintes reagentes: lucigenina (0,8mM), H₂O₂ (1%) e amostras em diferentes concentrações, diluídas em tampão TRIS 50 mM (pH 7,4). A análise foi realizada a 37 °C, com medição de quimiluminescência após um período de 10 min de incubação. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como IC₅₀ (concentração em µg/mL de extrato que inibe 50% da oxidação da lucigenina pelo H₂O₂).

4.2.2.3 Desativação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)

A capacidade de desativação do $\cdot\text{OH}$ foi medida por quimiluminescência, através do monitoramento da oxidação do luminol induzida pelo $\cdot\text{OH}$, de acordo com o método descrito por Gomes *et al.* (2006). O radical hidroxila foi gerado pela reação de Fenton (FeCl_2 -EDTA- H_2O_2). A mistura reacional teve um volume final de 250 μL , com os seguintes reagentes: luminol (20 μM), amostras em diferentes concentrações, diluídas em tampão carbonato (pH 10), FeCl_2 em EDTA (25 μM e 100 μM) e H_2O_2 (3,5 μM). As leituras de luminescência foram executadas a 37 °C após um período de 5 min de incubação. O ácido gálico foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como IC_{50} (concentração em $\mu\text{g/mL}$ de extrato que inibe 50% da oxidação do luminol pelo $\cdot\text{OH}$).

4.2.3 Análise estatística

Os resultados da caracterização das polpas de frutas congeladas (compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico), assim como os resultados de capacidade antioxidante ($\text{ROO}\cdot$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$) foram avaliados e correlacionados por análise estatística multivariada através da Análise de Componentes Principais (ACP) e classificados por Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA), utilizando o programa Statistica 6.0. Na ACP, todos os dados foram denominados de variáveis ativas para a derivação das componentes principais. A AHA foi obtida considerando as variáveis ativas da ACP e as polpas de frutas congeladas foram agrupadas pelo agrupamento não ponderado aos pares utilizando a distância Euclidiana como coeficiente de similaridade. Para a realização das análises de ACP e AHA, foram considerados como zero os valores de ácido ascórbico nos extratos de polpas em que este composto não foi detectado pelo método utilizado; enquanto que para os extratos das polpas de melancia e de coco que não atingiram IC_{50} nas concentrações máximas analisadas para o método de desativação do H_2O_2 , foi calculado o valor estimado pelo ajuste da curva de concentração *versus* a porcentagem de inibição. Para facilitar a discussão e visualização dos resultados dos métodos de desativação do H_2O_2 e do $\cdot\text{OH}$ que foram expressos em IC_{50} , estes foram tratados e expressos como o inverso de IC_{50} ($1/\text{IC}_{50}$), pois desta forma, quanto maior o valor, maior a eficiência de desativação destas ROS pelo extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conteúdo de compostos bioativos

De acordo com os teores de compostos bioativos apresentados na tabela 2, as polpas de frutas puderam ser organizadas na seguinte ordem decrescente:

- para o conteúdo de CFT (acerola > açai > caju > goiaba > cupuaçu > pitanga > laranja > tamarindo > cajá > tangerina > manga > cacau > abacaxi > maracujá > umbu > coco > limão > melancia);
- para o conteúdo de FT (açai > cupuaçu > acerola > goiaba > tamarindo > cajá > cacau > laranja > pitanga > maracujá > tangerina > manga > umbu > abacaxi > caju > limão > coco > melancia); e
- para o conteúdo de AA (acerola > caju > laranja > tangerina > goiaba > manga > pitanga > coco > maracujá > abacaxi > cajá > cupuaçu > limão > tamarindo > açai > cacau > melancia > umbu).

Entre as diferentes polpas de frutas congeladas analisadas foi observada uma grande variação nos teores de compostos fenólicos totais (de 6 (melancia) a 658 (acerola) mg EAG/100g de polpa), de flavonoides totais (de 1 (coco e melancia) a 134 (açai) mg EC/100g de polpa) e de ácido ascórbico (de níveis não detectados a 506 (acerola) mg AA/100g de polpa).

Dentre as polpas de frutas analisadas, a polpa de acerola foi a que apresentou o maior conteúdo de CFT (658 mg EAG/100g) e de AA (506 mg AA/100g). Estes valores ficaram dentro da faixa encontrada por Mezdari *et al.* (2008) (de 452 a 751 mg EAG/100g e 478 a 904 mg AA/100g, respectivamente) para polpas de acerola. O teor de FT obtido para a polpa de acerola foi de 28 mg EC/100g, o que pode ser considerado intermediário quando comparado com as demais polpas de frutas estudadas no presente trabalho.

Tabela 2. Teores de compostos bioativos das polpas de frutas congeladas.

Polpas	Compostos fenólicos totais (mg EAG/100g)	Flavonoides totais (mg EC/100g)	Ácido ascórbico (mg/100g)
Abacaxi	27 ± 0,5 (2%)	5 ± 2 (35%)	6 ± 3 (49%)
Açaí	251 ± 64 (26%)	134 ± 44 (33%)	ND
Acerola	658 ± 179 (27%)	28 ± 11 (40%)	506 ± 54 (11%)
Cacau	29 ± 5 (17%)	10 ± 3 (27%)	ND
Cajá	51 ± 4 (7%)	11 ± 3 (24%)	1 ± 0 (28%)
Caju	95 ± 13 (14%)	4 ± 0,5 (11%)	167 ± 24 (14%)
Coco	10 ± 4 (45%)	1 ± 1 (78%)	7 ± 3 (42%)
Cupuaçu	80 ± 1 (1%)	29 ± 2 (6%)	1 ± 0 (0%)
Goiaba	88 ± 39 (45%)	25 ± 4 (16%)	29 ± 3 (9%)
Laranja	66 ± 4 (7%)	10 ± 2 (18%)	62 ± 9 (15%)
Limão	8 ± 2 (18%)	2 ± 0,5 (21%)	1 ± 0 (0%)
Manga	38 ± 6 (15%)	6 ± 1 (21%)	18 ± 1 (6%)
Maracujá	26 ± 2 (6%)	10 ± 2 (20%)	7 ± 4 (59%)
Melancia	6 ± 0 (0,5%)	1 ± 0 (5%)	ND
Pitanga	73 ± 5 (7%)	10 ± 0,5 (6%)	12 ± 4 (31%)
Tamarindo	56 ± 2 (3%)	24 ± 3 (11%)	1 ± 0 (0%)
Tangerina	46 ± 15 (33%)	9 ± 0 (1%)	58 ± 9 (15%)
Umbu	20 ± 11 (56%)	6 ± 0,5 (9%)	ND

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (desvio padrão relativo) de dois lotes, analisado em triplicata (n=6); EAG – equivalente de ácido gálico; EC – equivalente de catequina; ND = não detectado pelo método utilizado.

O teor de compostos fenólicos totais presente na polpa de açaí (251 mg EAG/100g) ficou dentro da faixa encontrada por Santos *et al.* (2008), que analisaram onze polpas de açaí de diferentes marcas usando o método de Folin-Denis (182,95 a 598,55 mg ácido tânico/100g), porém foi menor que 424,9 mg EAG/100g, relatado por Ribeiro *et al.* (2010). Por outro lado, Kuskoski *et al.* (2006) detectaram conteúdo menor de CFT (136,80 mg EAG/100g). Não foi detectado AA pelo método usado, o que já era esperado de acordo com a literatura (De Rosso & Mercadante, 2007). Em relação ao teor de flavonoides totais, obteve-se 134 mg EC /100g, demonstrando que esta polpa é uma boa fonte de flavonoides, pois já é conhecido que as antocianinas, pertencentes ao grupo dos flavonoides, são responsáveis pela cor característica

da fruta de açaí (De Rosso *et al.*, 2008). Apesar de Ribeiro *et al.* (2010) terem relatado menores teores de flavonoides totais (55,9 mg EC/100g), a polpa de açaí apresentou atividade antimutagênica e antígenotóxica em camundongos tratados com o antitumoral doxorubicina, e que esta proteção foi mais eficiente no protocolo subagudo. Além disso, a proteção da polpa de açaí foi atribuída aos seus constituintes.

Neste trabalho, o teor de compostos fenólicos totais detectado na polpa de caju (95 mg EAG/100g) foi menor que o valor reportado por Melo *et al.* (2008a) (357,85 mg EC/100g); porém, estes valores foram calculados considerando ácido gálico e catequina, respectivamente como padrões, o que pode demonstrar uma reatividade diferente da catequina frente ao reagente de Folin-Ciocalteu, em relação ao ácido gálico. Foi encontrado um baixo teor de flavonoides, 4 mg EC/100g, em comparação com o teor de CFT, deixando claro que os flavonoides não são os principais compostos fenólicos presentes nesta polpa. Por outro lado, a polpa de caju mostrou-se boa fonte de ácido ascórbico, com um valor de 167 mg AA/100g, maior que o valor encontrado por Assunção & Mercadante (2003) (102,36 mg AA/100g).

Kuskoski *et al.* (2006) relataram um teor de CFT em polpa de goiaba (83 mg EAG/100g) muito próximo ao encontrado no presente trabalho (88 mg EAG/100g). Por outro lado, Melo *et al.* (2008a) obtiveram valor maior, de 101,75 mg EC/100g. O teor de AA de 29 mg AA/100g está dentro da faixa relatada por Evangelista & Vieites (2006), de 4,57 a 58,04 mg AA/100g, obtidos de polpa de goiaba de diferentes marcas e analisadas em diferentes tempos de armazenamento.

O conteúdo de CFT da polpa de cupuaçu foi de 80 mg EAG/100g, sendo maior que os valores reportados na literatura para a polpa desta mesma fruta, de acordo com Kuskoski *et al.* (2006) (20,50 mg EAG/100g) e com Santos *et al.* (2010) (51,85 a 74,90 mg ácido tânico/100g). O teor de FT (29 mg EC/100g) da polpa de cupuaçu foi próximo ao encontrado nas polpas de acerola e de goiaba, porém, a polpa de cupuaçu apresentou um baixo conteúdo de AA (1 mg AA/100g), quando comparado a outras polpas ricas neste composto (acerola, caju e laranja) (Tabela 2).

A polpa de abacaxi apresentou 27 mg EAG/100g de CFT, valor similar ao teor reportado por Kuskoski *et al.* (2006) (21,70 mg EAG/100g). Por outro lado, Melo *et al.* (2008a) encontraram teor maior, de 78,79 mg EC/100g para a polpa desta mesma fruta. O teor de AA de 6 mg AA/100g ficou próximo aos valores reportados por Dantas *et al.* (2010), de 4,4 a 5,28 mg AA/100g, para polpas de abacaxi de diferentes marcas. O valor de FT de 5 mg EC/100g foi similar aos teores encontrados na polpa de umbu e manga (Tabela 2).

Os valores de CFT de polpa de maracujá encontrados por Genovese *et al.* (2008) (74 mg EAG/100g) e por Melo *et al.* (2008a) (77,06 mg EC/100g) foram maiores que o obtido neste trabalho (26 mg EAG/100g), enquanto Kuskoski *et al.* (2006) relataram valor menor (20 mg EAG/100g). Em polpa de maracujá, Genovese *et al.* (2008) reportaram menor teor de AA (4,30 mg AA/100g), em relação ao valor obtido neste trabalho, que é de 7 mg AA/100g, enquanto que Valente *et al.* (2011) relataram um teor de 12,2 mg AA/100g na fruta fresca de maracujá.

Os teores de CFT e de AA obtidos por Genovese *et al.* (2008) para a polpa de umbu foram de 34 mg EAG/100g e de 2,5 mg AA/100g respectivamente, sendo maiores que os valores encontrados neste trabalho (20 mg EAG/100g e AA não detectado, respectivamente).

Nas polpas de pitanga, de tangerina, de cajá e de manga (Tabela 2), Melo *et al.* (2008a) encontraram teores maiores de CFT, de 150,31 mg EC/100g, 73,19 mg EC/100g, 91,37 mg EC/100g e 70,76 mg EC/100g, respectivamente, do que os detectados no presente trabalho.

Em relação às polpas congeladas de laranja, de tamarindo, de cacau, de coco, de limão e de melancia, não foram encontrados dados na literatura referentes aos seus teores de CFT, FT e AA. Porém, comparando os teores destes compostos nessas polpas analisadas (Tabela 2) com os dados da literatura relatados para as respectivas frutas, verificou-se sempre maiores teores de CFT e AA nas frutas frescas, como por exemplo, CFT em limão 61,47 mg EAG/100g, laranja 77,23 mg EAG/100g, melancia de 18 a 24 mg EAG/100g (Fu *et al.*, 2011), CFT em laranja de 138 a 157 mg EAG/100g, melancia 15 mg EAG/100g (Isabelle *et al.*, 2010), teores de AA em laranja de 32,85 a 34,53 mg AA/100g e melancia 3,91 mg AA/100g (Isabelle *et al.*, 2010), e teores de AA em laranja de 36,1 mg AA/100g, limão 49,6 mg AA/100g, coco 0,9 mg AA/100g e melancia de 3,7 mg AA/100g (Leong *et al.*, 2002). Estes resultados indicam que além das diferenças referentes a alguns fatores edafoclimáticos, tais como cultivar, local de plantio e grau de maturidade na época de colheita, o processamento e as condições de estocagem também podem explicar os menores conteúdos de compostos bioativos presentes nas polpas de frutas.

Cabe destacar os conteúdos de CFT obtidos no presente trabalho são similares aos valores reportados por outros autores em polpas de frutas congeladas (Kuskoski *et al.*, 2006; Evangelista & Vieites, 2006; Santos *et al.*, 2008; Genovese *et al.*, 2008; Mezdari *et al.*, 2008; Dantas *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010), exceto para os teores encontrados por Melo *et al.* (2008a), onde foi utilizado catequina como padrão. Esta diferença pode ser atribuída à reatividade diferente do ácido gálico e da catequina, utilizado no presente e demais estudos, frente ao reagente de Folin-Ciocalteu.

Em geral, observa-se uma variação bem grande nos valores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico entre as diferentes polpas de frutas, além dos menores valores obtidos nas polpas em relação às respectivas frutas. Como esperado, estes fatos confirmam que tanto os fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (meio ambiente, estocagem, processamento e armazenamento) podem levar à variabilidade na composição tanto das frutas como de seus produtos processados, incluindo as polpas de frutas congeladas (King & Young, 1999; Tomás-Barberán *et al.*, 2001; Balasundram *et al.*, 2006).

5.2 Capacidade de desativação das ROS

A capacidade de desativação das ROS por 18 polpas de frutas congeladas estudadas neste trabalho está apresentada na Tabela 3.

É importante destacar que, os métodos utilizados neste trabalho para determinar a capacidade de desativação de ROS (ROO^\bullet , H_2O_2 e $^\bullet\text{OH}$) utilizam espécies reativas produzidas em sistema biológico, diferentemente de outros métodos amplamente empregados, que utilizam radicais livres estáveis não biológicos para determinar a capacidade antioxidante (por exemplo, ABTS e DPPH). Outro importante fator a ser levado em consideração no estudo da capacidade antioxidante de compostos bioativos é o mecanismo de desativação das espécies reativas analisadas. O ROO^\bullet , por exemplo, é desativado provavelmente pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio; já o provável mecanismo de desativação do H_2O_2 é pela adição desta espécie reativa ao sistema de ligações duplas conjugadas. Enquanto que os mecanismos de reações em que o $^\bullet\text{OH}$ participa podem ser de adição às ligações duplas conjugadas e de transferência de átomos de hidrogênio. Dentre os compostos bioativos estudados neste trabalho (CFT, FT e AA), todos apresentam característica estrutural necessária para desativar essas espécies reativas (ROO^\bullet , H_2O_2 e $^\bullet\text{OH}$).

Tabela 3. Valores de capacidade de desativação de ROS das polpas de frutas congeladas.

Polpa	ROO ^{•1} ($\mu\text{mol trolox}/100\text{g}$)	H ₂ O ₂ ² (IC ₅₀ = $\mu\text{g}/\text{mL}$)	[•] OH ² (IC ₅₀ = $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Abacaxi	626 ± 254 (41%)	1631 ± 74 (5%)	187 ± 66 (35%)
Açaí	7498 ± 2509 (33%)	259 ± 102 (39%)	3 ± 1 (36%)
Acerola	6773 ± 74 (1%)	531 ± 126 (24%)	45 ± 4 (10%)
Cacau	859 ± 109 (13%)	2049 ± 250 (12%)	150 ± 48 (32%)
Cajá	883 ± 190 (22%)	526 ± 50 (10%)	116 ± 27 (23%)
Caju	1568 ± 383 (24%)	2049 ± 1038 (51%)	207 ± 13 (6%)
Coco	166 ± 43 (26%)	13847 ± 1664 ³ (12%)	447 ± 74 (16%)
Cupuaçu	1935 ± 144 (7%)	700 ± 81 (12%)	37 ± 15 (41%)
Goiaba	1575 ± 249 (16%)	1454 ± 148 (10%)	65 ± 19 (29%)
Laranja	1678 ± 52 (3%)	1552 ± 402 (26%)	164 ± 43 (26%)
Limão	240 ± 3 (1%)	143 ± 2 (1%)	206 ± 23 (11%)
Manga	635 ± 50 (8%)	3318 ± 88 (3%)	415 ± 11 (3%)
Maracujá	923 ± 125 (14%)	390 ± 49 (12%)	205 ± 4 (2%)
Melancia	173 ± 24 (14%)	16864 ± 2819 ⁴ (17%)	313 ± 34 (11%)
Pitanga	953 ± 166 (17%)	467 ± 20 (4%)	89 ± 9 (10%)
Tamarindo	1164 ± 132 (11%)	572 ± 14 (2%)	75 ± 5 (7%)
Tangerina	1940 ± 487 (25%)	1366 ± 301 (22%)	139 ± 14 (10%)
Umbu	486 ± 58 (12%)	418 ± 86 (21%)	206 ± 19 (9%)

Os valores correspondem à média ± desvio padrão (desvio padrão relativo) de dois lotes, analisado em triplicata (n=6). ¹equivalente ao trolox; ²concentração que inibe 50% da oxidação da sonda; ³na concentração máxima de 13847 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultou na inibição de 20%; ⁴na concentração máxima de 16864 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultou na inibição de 27%.

Em geral, as polpas de frutas estudadas apresentaram níveis variados na capacidade de desativação frente às ROS analisadas. No presente estudo, os valores de capacidade de desativação do H₂O₂ e [•]OH foram expressos em IC₅₀ (concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$, que inibe 50% da oxidação da sonda); portanto, quanto menor o valor maior a eficiência de desativação das ROS estudadas.

Essa variação nos níveis de capacidade antioxidante das diferentes polpas de frutas está muito provavelmente relacionada aos conteúdos, tanto quantitativo como qualitativo, dos compostos bioativos presentes nestas polpas. De fato, também foi observada uma grande

variação nos conteúdos de compostos bioativos (CFT, FT e AA) das polpas de frutas estudadas (Tabela 2).

A polpa de açaí foi a mais eficiente na desativação do ROO[•] e [•]OH, enquanto que a polpa de limão apresentou a melhor capacidade antioxidante frente ao H₂O₂. Já as polpas de coco e melancia foram as que apresentaram menor eficiência em desativar todas as ROS avaliadas, não sendo capazes de atingir os valores de IC₅₀ para a desativação do H₂O₂ nas concentrações mais altas testadas, atingindo porcentagem de inibição em torno de 20% e 27%, respectivamente.

De acordo com dados da literatura, Hogan *et al.* (2010) relataram valor de ORAC (oxygen radical absorbance capacity) de 258.900 µmol/100g de pó liofilizado de açaí; enquanto Rufino *et al.* (2010) obtiveram valor de 1510 µmol/100g, utilizando o radical ABTS, para a fruta de açaí.

Na polpa de acerola analisada por Mezadri *et al.* (2008), usando o método ORAC, foram encontrados valores na faixa de 3458 a 5883 µmol/100g, sendo estes menores que o obtido no presente trabalho (6773 µmol/100g para o ROO[•]) para a mesma polpa. Enquanto que aplicando os métodos de ABTS e de DPPH, os mesmos autores obtiveram valores de 3695 a 6476 µmol/100g e de 3831 a 8511 µmol/100g, respectivamente.

A polpa de goiaba apresentou valor relevante na desativação de ROO[•] (1575 µmol/100g) e de [•]OH (IC₅₀ de 65 µg/mL), no entanto, o resultado para o H₂O₂ (IC₅₀ de 1454 µg/mL) foi considerado intermediário se comparado às demais polpas de frutas analisadas. Isabelle *et al.* (2010) reportaram valor bem próximo ao deste trabalho para análise realizada na fruta de goiaba utilizando o método ORAC (1306 µmol/100g). A polpa de cupuaçu apresentou resultados semelhantes à polpa de goiaba, sendo, muito eficiente para desativar o ROO[•] (1935 µmol/100g) e o [•]OH (IC₅₀ de 37 µg/mL), mas intermediária para desativar o H₂O₂ (IC₅₀ de 700 µg/mL). Este fato pode ser explicado principalmente pelos conteúdos de CFT e FT (Tabela 2) encontrados nestas polpas, devido às características estruturais que favorece a doação de hidrogênio às espécies reativas.

As polpas de laranja e tangerina também apresentaram resultados semelhantes na desativação frente às ROS analisadas. Ambas com valores altos na capacidade de desativação do ROO[•] (laranja de 1678 µmol/100g e tangerina de 1940 µmol/100g) e valores intermediários de IC₅₀ para H₂O₂ (laranja de 1552 µg/mL e tangerina de 1366 µg/mL) e [•]OH (laranja de 164 µg/mL e tangerina de 139 µg/mL), quando comparados às demais polpas. Estes resultados estão relacionados aos conteúdos similares de CFT, FT e AA apresentados por essas polpas (Tabela 2). De acordo com Isabelle *et al.* (2010), a fruta de laranja apresenta capacidade

antioxidante de 2194 a 2619 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ para o método ORAC, valor maior que o encontrado para a respectiva polpa, o que já é esperado, pois com o processamento da fruta a tendência é que ocorra diminuição dos teores dos compostos presentes.

A polpa de caju apresentou valor de 1568 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ para desativação do ROO^\bullet e também apresentou teor elevado de AA (167 mg AA/100g), demonstrando que um dos mecanismos de desativação de espécies reativas deste composto é provavelmente pela doação de hidrogênio. Este composto também demonstrou ser eficiente na desativação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (1120 $\mu\text{mol}/100\text{g}$), como reportado por Rufino *et al.* (2010). No entanto, a polpa de caju apresentou baixa eficiência em relação à desativação do H_2O_2 (IC_{50} de 2049 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e do $^\bullet\text{OH}$ (IC_{50} de 207 $\mu\text{g}/\text{mL}$) quando comparados à polpa de açaí.

Observando os valores de capacidade de desativação de ROS pela polpa de limão, esta apresentou eficiência baixa em desativar o ROO^\bullet (240 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) e o $^\bullet\text{OH}$ (IC_{50} de 206 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em relação às demais polpas analisadas. No entanto, foi a polpa mais eficiente para desativação do H_2O_2 (IC_{50} de 143 $\mu\text{g}/\text{mL}$), apesar desta polpa não ter apresentado altos teores dos compostos bioativos estudados. Este comportamento pode ser atribuído à presença na polpa de algum composto não analisado neste trabalho e que possua polaridade semelhante aos compostos estudados neste trabalho e capacidade antioxidante.

A capacidade de desativação do H_2O_2 e do $^\bullet\text{OH}$ das polpas de maracujá e umbu foram similares (Tabela 3), enquanto que para a desativação do ROO^\bullet a polpa de maracujá apresentou valor de 923 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ e a polpa de umbu de 486 $\mu\text{mol}/100\text{g}$. De acordo com Isabelle *et al.* (2010), o valor de ORAC da fruta de maracujá é 1582 $\mu\text{mol}/100\text{g}$, enquanto Rufino *et al.* (2010) encontraram valor de 630 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ em umbu, utilizando o método de ABTS para análise.

Como mencionado anteriormente, as polpas de coco e de melancia foram as que apresentaram menor eficiência frente às ROS analisadas (Tabela 3), não chegando a atingir o IC_{50} nas concentrações máximas analisadas para a desativação do H_2O_2 . No estudo realizado por Isabelle *et al.* (2010) também foi encontrado valor baixo (194 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) para o método ORAC em análise feita na fruta de melancia quando comparada as demais frutas.

Os valores de capacidade de desativação do ROO^\bullet , do H_2O_2 e ao $^\bullet\text{OH}$ obtidos para as polpas de abacaxi, de manga, de cacau, de pitanga, de cajá e de tamarindo (Tabela 3) podem ser considerados intermediários frente às demais polpas analisadas. Observando a Tabela 2, estas mesmas polpas também apresentaram teores intermediários dos compostos bioativos estudados, o que pode explicar os valores intermediários de capacidade antioxidante destas polpas em comparação com as demais polpas de frutas analisadas.

5.3 Correlação entre a capacidade de desativação de ROS e o conteúdo de compostos bioativos

A análise dos componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento hierárquico (AHA) foram utilizadas para agrupar e classificar as 18 polpas de frutas congeladas, permitindo assim, avaliar a correlação existente entre a capacidade de desativação das ROS específicas (ROO^* , H_2O_2 e $^*\text{OH}$) com os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico.

Como pode ser observado na Figura 7, os dois componentes principais (CP1 e CP2) foram responsáveis por 85% da variância total. De acordo com a ACP, verificou-se uma correlação positiva entre a capacidade de desativação do ROO^* e os conteúdos de CFT ($r = 0,82$), de FT ($r = 0,81$) e de AA ($r = 0,58$) (Figura 7 e Tabela 4), demonstrando que os teores de compostos fenólicos totais, entre eles os flavonoides totais, apresentaram a maior contribuição para a desativação do ROO^* , que é provavelmente devido ao fato desta ROS ser principalmente desativada pela transferência de hidrogênio e estes compostos serem excelentes doadores de hidrogênio para esta espécie reativa.

Similarmente, a correlação entre a capacidade de desativação do $^*\text{OH}$ e os compostos bioativos foi alta e positiva com o conteúdo de FT ($r = 0,97$), enquanto que a correlação com o conteúdo de CFT foi menor ($r = 0,31$) (Figura 7 e Tabela 4). No caso da correlação entre a capacidade de desativação do H_2O_2 e os componentes bioativos, a ACP indicou uma melhor contribuição do conteúdo de FT ($r = 0,37$), mas com uma contribuição menor dos teores de CFT ($r = 0,12$) (Figura 7 e Tabela 4). Estes resultados indicam que o mecanismo mais provável de desativação do H_2O_2 e do $^*\text{OH}$ é pela adição destas espécies reativas ao sistema de ligações duplas conjugadas, que é maior na estrutura dos flavonoides do que nos demais compostos fenólicos e no ácido ascórbico. O mecanismo de desativação do $^*\text{OH}$ também pode ser pela transferência de hidrogênio, fato indicado pela correlação com os teores de CFT.

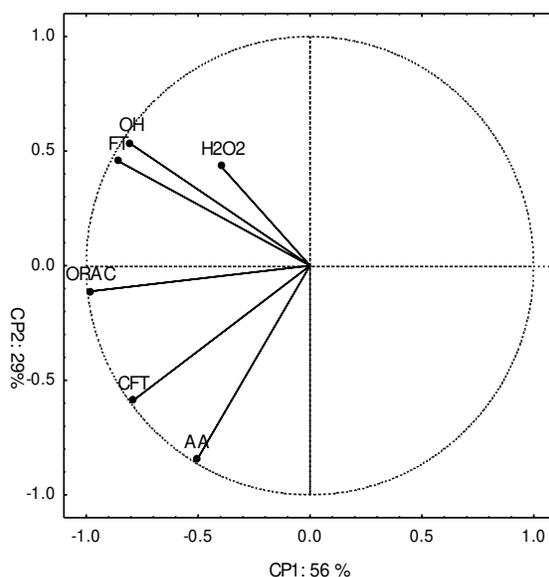


Figura 7. Projeção das variáveis na análise de componentes principais obtidas a partir dos dados de capacidade de desativação de ROS e compostos bioativos das diferentes polpas de frutas congeladas.

Tabela 4. Correlação entre as variáveis obtidas nas análises efetuadas.

Variável	CFT	FT	AA	ORAC	H ₂ O ₂	•OH
CFT	1,00	0,40	0,89	0,82	0,16	0,31
FT	0,40	1,00	0,02	0,81	0,37	0,97
AA	0,89	0,02	1,00	0,58	-0,06	-0,07
ORAC	0,82	0,81	0,58	1,00	0,26	0,75
H₂O₂	0,12	0,37	-0,06	0,26	1,00	0,39
•OH	0,31	0,97	-0,07	0,75	0,39	1,00

No estudo de Wang *et al.* (1996) com 12 frutas diferentes, também foi encontrada elevada correlação entre os valores da capacidade antioxidante, determinada através do método ORAC, e os teores de compostos fenólicos. Estes autores ainda relataram que a contribuição do ácido ascórbico para desativação do ROO• foi menor, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho.

A ACP (Figura 8) permitiu a separação das polpas de frutas congeladas em três grupos de acordo com as características de capacidade de desativação do ROO^{*}, H₂O₂ e ^{*}OH e com os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico. O primeiro grupo é formado pela polpa de açaí, com elevado teor de FT (134 mg EC/100g de polpa) e maior desativação do ROO^{*} e ^{*}OH; no segundo grupo encontra-se a polpa de acerola, devido ao elevado teor de CFT (658 mg EAG/100g de polpa) e AA (506 mg AA/100g de polpa); e o terceiro grupo formado pelas demais polpas de frutas que não puderam ser separadas considerando apenas os teores de compostos bioativos e a capacidade de desativação das ROS estudadas. Dentro do terceiro grupo pode-se observar que as polpas de limão e caju tiveram uma leve separação das demais polpas deste grupo apesar de estarem muito próximas, isto ocorreu provavelmente devido à elevada eficiência de desativar o H₂O₂ com IC₅₀ de 143 µg/mL pela polpa de limão, e pelo elevado conteúdo de AA de 167 mg AA/100g de polpa apresentado pela polpa de caju.

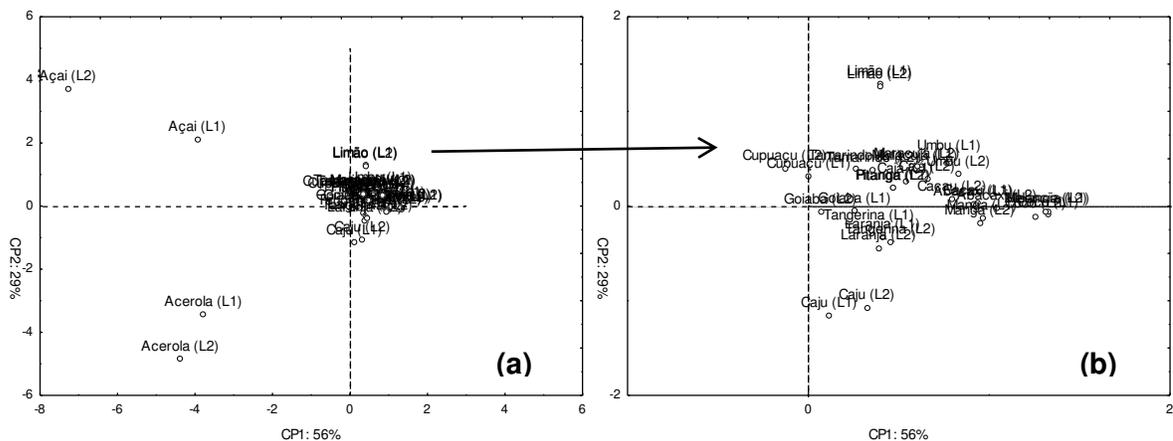


Figura 8. Distribuição das amostras obtidas pela análise de componentes principais, a partir dos dados de capacidade de desativação de ROS e composição de compostos bioativos das diferentes polpas de frutas congeladas analisadas. Projeção geral (a) e expansão da região circundada (b).

No dendrograma (Figura 9), pode ser observado a separação dos três grupos formados, bem como, o agrupamento bem próximo dos dois lotes de cada polpa analisada, demonstrando que as características estudadas (determinação de compostos bioativos e capacidade de desativação de ROS) neste trabalho para as 18 polpas de frutas congeladas, teve resultados similares para dos dois lotes de cada polpa.

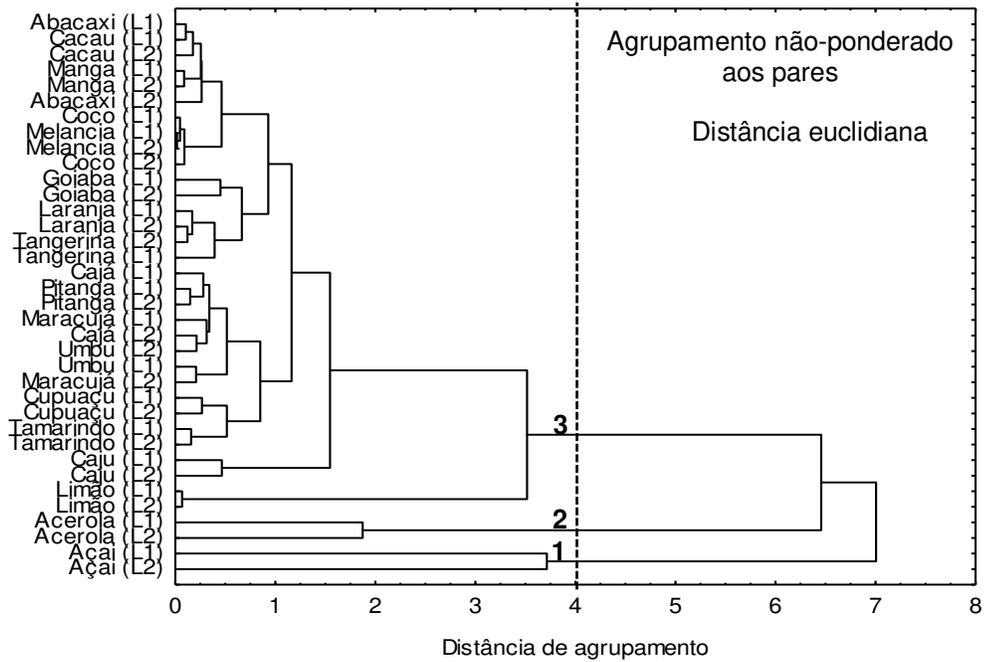


Figura 9. Dendrograma, considerando a capacidade de desativação de diferentes ROS e os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ácido ascórbico, das 18 polpas de frutas congeladas (L1-lote 1 e L2-lote 2).

Ao comparar a distribuição obtida para as polpas estudadas neste trabalho com os dados reportados por Canuto *et al.* (2010), em estudo realizado com diferentes frutas, pode-se observar uma distribuição similar, em que o açaí ficou em um grupo, a acerola em outro grupo e as demais frutas em outro grupo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as polpas de frutas congeladas apresentam compostos bioativos capazes de desativar, *in vitro*, espécies reativas de oxigênio de importância biológica, nomeadamente ROO^\bullet , H_2O_2 e $^\bullet\text{OH}$.

Em geral, a capacidade de desativar ROO^\bullet , H_2O_2 e $^\bullet\text{OH}$, bem como as concentrações de compostos bioativos variaram grandemente entre as 18 diferentes polpas de frutas. Em relação ao conteúdo de compostos bioativos, os teores de compostos fenólicos variaram de 6 a 658 mg EAG/100g, os de flavonoides totais de 1 a 134 mg EC/100g e os de ácido ascórbico de não detectado a 506 mg AA/100g. A polpa de acerola apresentou os maiores teores de compostos fenólicos totais e de ácido ascórbico, enquanto na polpa de açaí foi encontrado o maior teor de flavonoides totais. Entre as polpas analisadas, a polpa de açaí foi a que apresentou a melhor eficiência na desativação frente às ROS estudadas. Destacou-se também a polpa de acerola para a desativação do ROO^\bullet , a polpa de limão para a desativação do H_2O_2 e as polpas de acerola e de cupuaçu para a desativação do $^\bullet\text{OH}$.

Este estudo confirma a alta correlação entre a capacidade de desativação do ROO^\bullet e os compostos fenólicos, em especial a classe dos flavonoides. Além disso, os resultados indicam que o grupo dos flavonoides também apresenta uma alta capacidade de desativação do $^\bullet\text{OH}$, porém menor eficiência na desativação do H_2O_2 . Por outro lado, o ácido ascórbico parece ter pouca contribuição ou até mesmo correlação negativa frente à desativação das ROS estudadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ângelo, P. M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 66, 232-240, 2007.
- Assunção, R. B.; Mercadante, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, 16, 647-657, 2003.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Sammam, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99, 191-203, 2006.
- Barcia, M. T.; Jacques, A. C.; Pertuzatti, P. B.; Zambiasi, R. C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Ciências Agrárias**, 31, 381-390, 2010.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.
- Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20, 1856-1861, 2009.
- Battino, M.; Beekwilder, J.; Denoyes-Rothan, B.; Laimer, M.; McDougall, G. J.; Mezzetti, B. Bioactive compounds in berries relevant to human health. **Nutrition Reviews**, 67, 145-150, 2009.
- Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. p. Flavonoide quercitina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição**, 15, 285-292, 2004.
- Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuño, A.; Del Rio, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 4505-4515, 1997.
- Bisby, R. H.; Brooke, R.; Navaratnam, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, 108, 1002-1007, 2008.
- Block, G. Vitamin C, cancer and aging. **Age**, 16, 558, 1993.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 11, 317-333, 1998.
- Bueno, S. M.; Lopes, M. R.; Graciano, R. A. S.; Fernandes, E. C. B.; Garcia-Cruz, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 61, 121-126, 2002.

- Buonocore, G.; Perrone, S.; Tataranno, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, 15, 186-190, 2010.
- Canuto, G. A. B.; Xavier, A. A. O.; Neves, L. C.; Benassi, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutas da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 32, 1196-1205, 2010.
- Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, 30, 441-449, 2007.
- Choe, E.; Min, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46, 1-22, 2006.
- Contreras-Calderón, J.; Calderón-Jaimes, L.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, 44, 2047-2053, 2011.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. Química de alimentos de Fennema. 4 ed. – Porto Alegre: **Artmed**, 900p, 2010.
- Dantas, R. L.; Rocha, A. P. T.; Araújo, A. S.; Rodrigues, M. S. A.; Maranhão, T. X. L. Perfil da qualidade de polpas de frutas comercializadas na cidade de Campina Grande/PB. **Revista Verde**, 5, 61-66, 2010.
- De Rosso, V. V.; Hillebrand, S.; Montilla, E. C.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 291-299, 2008.
- De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. **Food Chemistry**, 103, 935-943, 2007.
- Evangelista, R. M.; Vieites, R. L. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba congelada comercializada na cidade de São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 13, 76-81, 2006.
- Ferrari, C. K. B.; Torres, E. A. F. S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 57, 251-260, 2003.
- Finetto, M. Frutas da beleza. **Revista Frutas e Derivados**, 13, 27-29, 2009.
- Fu, L.; Xu, B-T.; Xu, X-R.; Gan, R-Y.; Zhang, Y.; Xia, E-Q.; Li, H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, 129, 345-350, 2011.
- García-Alonso, M.; Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, 84, 13-18, 2004.

- Genovese, M. I.; Pinto, M. S.; Gonçalves, A. E. S. S.; Lajolo, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, 14, 207-214, 2008.
- Gomes, A.; Costa D.; Lima, J. L. F. C.; Fernandes, E. Antioxidant activity of β -blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? **Bioorgani & Medicinal Chemistry**, 14, 4568-4577, 2006.
- Gomes, A.; Fernandes, E.; Silva, A. M.; Santos, C. M. M.; Pinto, D. C. G. A.; Cavaleiro, J. A. S.; Lima, J. L. F. C. 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 6027-6036, 2007.
- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Lölliger, J.; Aruoma, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, 33, 601-617, 1995.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radical in biology and medicine. **New York: Oxford University Press Inc**, 2007.
- Hassimotto, N. M. A.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 2928-2935, 2005.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 13, 572-584, 2002.
- Hernández, Y.; Gloria Lobo, M.; González, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, 96, 654-664, 2006.
- Hogan, S.; Chung, H.; Zhang, L.; Li, J.; Lee, Y.; Dai, Y.; Zhou, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, 118, 208-214, 2010.
- Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, 37, 937-942, 1999.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126, 1821-1835, 2011.
- Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 4 Ed. São Paulo, 652-654, 2004.
- Isabelle, M.; Lee, B. L.; Lim, M. T.; Koh, W-P.; Huang, D.; Ong, C. N. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. **Food Chemistry**, 123, 77-84, 2010.
- Kaur, C.; Kapoor, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, 36, 703-725, 2001.

- King, A.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, 99, 213-218, 1999.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Morales, M. T.; Fett, R. Frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, 36, 1283-1287, 2006.
- Leong, L. P.; Shui, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, 76, 69-75, 2002.
- Lu, C.; Song, G.; Lin, J. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. **Trends in Analytical Chemistry**, 25, 985-995, 2006.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Instrução Normativa n.01 de 07 de janeiro de 2000. Aprovar o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identificação e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, 10 de janeiro, 2000.
- Marín, F. R.; Frutos, M. J.; Pérez-Alvarez, J. A.; Martínez-Sánchez, F.; Del Rio, J. A. Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. **Studies in Natural Products Chemistry**, 26, 741-778, 2002.
- Matta, V. M.; Junior, M. F.; Cabral, L. M. C.; Furtado, A. A. L. Polpa de fruta congelada. **Embrapa**, Informação Tecnológica, 2005.
- Medina, A. L.; Haas, L. I. R.; Chaves, F. C.; Salvador, M.; Zambiasi, R. C.; Silva, W. P.; Nora, L.; Rombaldi, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, 18, 916-922, 2011.
- Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Araújo, C. R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentação e Nutrição**, 19, 67-72, 2008^a.
- Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Nascimento, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44, 193-201, 2008^b.
- Mezadri, T.; Villano, D.; Fernández-Pachón, M. S.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 282-290, 2008.
- Naczka, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, 1054, 95-111, 2004.
- Pietta, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63, 1035-1042, 2000.

- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, 90, 494-507, 2001.
- Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, 49, 1603-1616, 2010.
- Ribeiro, J. C.; Antunes, L. M. G.; Aissa, A. F.; Darin, J. D'arc C.; De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, 695, 22-28, 2010.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, n. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2 152-159, 1997.
- Robards, K.; Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids – A review. **The Analyst**, 122, 11-34, 1997.
- Rodrigues, E.; Mariutti, L. R. B.; Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: application to carotenoids and struturae-activity relationship. **Food Chemistry**, 135, 2103-2111, 2012.
- Rop, O.; Reznicek, V.; Valsikova, M.; Jurikova, T.; Mlcek, J.; Kramarova, D. Antioxidant properties of european cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). **Molecules**, 15, 4467-4477, 2010.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 121, 996-1002, 2010.
- Santos, G. M.; Maia, G. A.; Sousa, P. H. M.; Costa, J. M. C.; Figueiredo, R. W.; Prado, G. m. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai. **Archivos Latino Americanos de Nutricion**, 58, 187-192,2008.
- Santos, G. M.; Maia, G. A.; Sousa, P. H. M.; Figueiredo, R. W.; Costa, J. M. C.; Fonseca, A. V. V. Atividade antioxidante e correlação com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência Rural**, 40, 1636-1642, 2010.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, 45, 287-306, 2005.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144-158, 1965.

- Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, 15, 71-81, 2002.
- Tomás-Barberan, F.; Espín, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of Science and Food Agriculture**, 81, 853-876, 2001.
- Valente, A.; Albuquerque, T. G.; Sanches-Silva, A.; Costa, H. S. Ascorbic acid content in exotic fruits: a contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International**, 2011.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biolog**, 3944-84, 2007.
- Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30, 1323-1338, 2007.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 701-705, 1996.
- Keyla, R. (2009). Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Disponível em <www.ecodebate.com.br>. Acesso em: 06 abr. 2011.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64, 555-559, 1999.