

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Estudo químico e avaliação dos potenciais antioxidante e nutricional
de frutos de araçá-pera (*Psidium acutangulum* DC)**

ANDREZZA DA SILVA RAMOS

Manaus, novembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

ANDREZZA DA SILVA RAMOS*

**Estudo químico e avaliação dos potenciais antioxidante e nutricional
de frutos de araçá-pera (*Psidium acutangulum* DC)**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

*Bolsista FAPEAM

Manaus, novembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e encontra-se disponível em sua Biblioteca Central.

ANDREZZA DA SILVA RAMOS

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Batista Machado – Orientador
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof^a.Dr^a. Jerusa de Souza Andrade– Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura – Membro
Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Ramos, Andrezza da Silva

- 1.1 R Estudo químico e avaliação dos potenciais antioxidante e
7: nutricional de frutos de araçá-pera (*Psidium ocutangulum* DC) /
Andrezza da Silva Ramos. - Manaus, 2013.

83f. il. color.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

1. Antioxidante 2. Frutas cítricas 3. Araçá-pera(fruta) - Pesquisa
4. Fisiologia vegetal I. Machado, Marcos Batista (Orient.)
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 2007 582.883(043.3)

Dedico este trabalho à
Dra Lúcia K.O. Yuyama.

O Aprendizado e o Conhecimento já possuem, por si só, sua finalidade.

Andrezza Ramos

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcos Batista Machado pela orientação, paciência, pela oportunidade de crescimento profissional e pela amizade.

Aos Professores Sergio Massayoshi Nunomura, Afonso Duarte Leão de Souza, Jefferson da Silva da Rocha, Maria Lucia Belém e Emerson Silva Lima, Jaime Aguiar, Francisca Souza e Dra. Lúcia K.O. Yuyama que gentilmente cederam recursos materiais e instrumentais, sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

À FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas) pela bolsa concedida.

Aos meus amados pais, Antônio e Neuza, por seu amor.

Ao meu querido amigo Junio Souza de Lima, pelo incentivo e carinho.

Ao meu yvypora Reinaldo Isidro Alvarez Gonzalez por ter me acompanhado nas madrugadas de estudo.

Aos meus queridos companheiros de turma que me deram apoio psicológico e moral nos momentos difíceis, em especial ao Sidney Gomes de Azevedo por seu abraço fraterno cotidiano.

Aos colegas de laboratório: Felipe Silva Moura, Richardson Alves de Almeida, Renyer Alves da Costa, Grazielle Costa e Rodrigo Souza, por sua colaboração e paciência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os araçás são uma variação de goiabeiras, espécies frutíferas do gênero *Psidium* pertencentes à família Myrtaceae. Compreendem cerca de 150 espécies, a maioria dessas são conhecidas popularmente pelo uso de suas folhas no preparo de chás para o tratamento de problemas digestivos. Seus frutos, de sabor agradável, são muito explorados pela indústria alimentícia. Muitos frutos ainda não foram estudados sob o ponto de vista químico e nutricional. Nesse sentido, propôs-se neste trabalho estudar a composição química e nutricional de frutos de *Psidium acutangulum* DC (araçá-pera), bem como avaliar seu potencial antioxidante. Frutos de araçá-pera foram coletados, segregados em epicarpo, endocarpo+sementes, fruto inteiro e resíduo de sementes. Alíquota do fruto inteiro foi mantida *in natura* (PA2 e PA3), cujo teor do ácido L-(+)-ascórbico foi determinado por CLAE-EM como sendo $74,32 \pm 1,23$ mg/100g de fruto fresco. Os materiais vegetais liofilizados foram submetidos à extração com etanol, cujos potenciais antioxidantes frente ao radical livre DPPH foram epicarpo: $191,98 \pm 3,20$; endocarpo: $406,52 \pm 26,42$; fruto inteiro: $332,17 \pm 36,30$ e resíduos de sementes: $41,29 \pm 1,72$ g de fruto fresco/gDPPH^{*}. Esses resultados foram inversamente proporcionais aos teores de fenólicos (epicarpo: $603,61 \pm 11,77$; endocarpo: $315,13 \pm 68,49$; fruto inteiro: $481,77 \pm 22,60$ e resíduo de sementes: $785,68 \pm 86,63$ mgEAG/100g fruto) e de flavonoides totais (epicarpo: $46,1 \pm 3,4$; endocarpo: $17,1 \pm 2,6$; fruto inteiro: $25,7 \pm 4,2$ e resíduo de sementes: $82,7 \pm 3,7$ mg/100g de fruto). O extrato hidroalcoólico (P.A.) dos frutos *in natura* apresentou potenciais antioxidantes frente aos radicais livres ABTS⁺⁺ e DPPH^{*} de $7,32 \pm 0,36$ e $34,50 \pm 0,12$ µg/mL, respectivamente. Os resultados de DPPH e ABTS dos frutos *in natura* foram expressos em VCEAC (Capacidade Antioxidante por Equivalente de Vitamina C). A análise centesimal revelou teores distintos de proteínas, carboidratos e calorias para as diferentes partes dos frutos de *P. acutangulum* ($p \leq 0,05$). O teor de fibras totais do fruto inteiro foi de 4,17g/100 g, valor compatível com o encontrado em *P. guajava* (var. *mifera*, Lin.) e *P. cattleianum*, enquanto o teor de proteínas no fruto inteiro (2,36g/100g) mostrou-se maior que o determinado em goiaba branca e vermelha. Quanto aos valores de minerais determinados para esta matriz, observou-se que ferro, cobre e magnésio estão presente em quantidades semelhantes a outros frutos de *Psidium*. O teor de potássio desse fruto foi de $1,67 \pm 0,02$ g/100g de fruto, valor superior ao encontrado em frutos conhecidos por sua riqueza neste nutriente como a banana pacova (*Musa acuminata* Colla) e a castanha-do-Brasil (*Berthletia excelsa* H.B.K.). A análise por espectrometria de massas e RMN do extrato etanólico do fruto

liofilizado (PA) e de suas frações cromatográficas sugere a presença de substâncias glucosídicas (sacarose, glucose, frutose), ácidos orgânicos (ácidos cítrico e málico).

Palavras-chave: Myrtaceae, ácido ascórbico, CLAE, potencial antioxidante, análise centesimal.

ABSTRACT

The araza is a variation of guava, fruit species belonging to the family Myrtaceae. It comprises of about 150 species, most of them are popularly known for the use of their leaves in preparation of teas for treating digestive problems. Its fruits, which have pleasant taste, are very exploited by the food industry. Many fruits have not been studied from the chemical and nutritional point of view. Accordingly, the aim of work is to study the chemical and nutritional composition from fruits of *Psidium acutangulum* DC (araçá-pera), as well as to evaluate the antioxidant potentials. These fruits were collected, segregated (peel, endocarp, whole fruit, and residues of seeds) and parts were lyophilized. An amount whole fruit of G3 was kept *in natura* (PA), whose content of L-(+)-ascorbic acid was determined by HPLC-MS as being 74.32 ± 1.23 mg/100g of fresh fruit. The lyophilized plant materials were subjected to extraction with ethanol, whose potential antioxidant against free radical DPPH• was peel: 191.98 ± 3.20 , endocarp: 406.52 ± 26.42 , entire fruit: 332.17 ± 36.30 , and residues of fruits): 41.29 ± 1.72 g of fresh fruit/gDPPH•. These results were inversely proportional to the phenolic levels (peel: $603.61 \pm 11,77$, endocarp: 315.13 ± 68.49 , entire fruit: 481.77 ± 22.60 , and residues of seeds: 785.68 ± 86.63 mg of GAE/100g of fruit) and total flavonoids (peel: 46.1 ± 3.4 , endocarp: 17.1 ± 2.6 , entire fruit: 25.7 ± 4.2 , and residues of seeds 82.7 ± 3.7 mg/100g). The extract entire fruit have shown a potential antioxidant against free radicals (ABTS^{•+} and DPPH• 7.32 ± 0.36 and 34.50 ± 0.12 mg/mL, respectively). The results of ABTS^{•+} and DPPH• of *in natura* fruits were represented by VCEAC (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity). The centesimal analysis of peel, endocarp, entire fruit and residues of seeds has shown different levels of protein, carbohydrates, and calories for the fruit of *P. acutangulum*. The total fiber content in extract of entire lyophilized fruit (PA) has been 4.17g/100g, a value content was according with that found in *P. guajava* (var. *mifera*, Lin.) and *P. cattleyanum*, while the protein content in entire fruit (2.36g/100g) has been higher than the one determined in the red and white guava. As for the values of the minerals to this matrix, it was observed that iron, copper, and magnesium have been found in amounts similar to other fruits of *Psidium* ssp.. The potassium content in entire lyophilized fruit has been $1.67 \pm 0,02$ g/100g fruit, higher than the one found in fruits known for their richness in this nutrient such as plantain banana (*Musa acuminata* Colla) and Brazil nut (*Berthletia excelsa* HBK). The Mass Spectrometry and NMR analyses of ethanolic extract (PA) and its fractions have suggested

the presence of the glycosides (sucrose, glucose and fructose), organic acids (citric, and malic).

Keywords: Myrtaceae, ascorbic acid, antioxidant potential, centesimal analysis

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AA – Ácido asccórbico

ABTS+• –cátion radical livre 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico)

BT = resíduo total do branco

C = cinzas da amostra

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado

CI₅₀ - Concentração inibitória de 50% de um radical

CL – EM – Cromatografia Líquica acoplada à Espectrometria de Massas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY - Correlation spectroscopy

DHA – (*Dehidroascorbic acid*) Ácido desidroascorbico

d - dubleto

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

dt - duplo tripleto

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPPH - radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (IUPAC: ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo) tetra-acético)

EM - Espectrometria de Massas

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

ESI-MS – *Eletronspray Ionization* acoplado ao Espectrômetro de massas (*Mass Spectrometry*).

F – fração (de A a M)

J - Constante de acoplamento

m = massa da tomada da amostra

m - multiplete

m/z - razão massa carga

[M-H]⁻ - íon molecular no modo negativo de ionização

[M+H]⁺ - íon molecular no modo positivo de ionização

MHz - Mega-Hertz

MPA – ácido metafosfórico ou *m*-fosfórico (m-phosphoric acid)

δ - deslocamento químico

P = teor de proteína

Q-TOF – Quadrupolo – time of flight

RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear do núcleo de ^{13}C

RT = resíduo total da amostra

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear do núcleo de ^1H

rpm - rotações por minuto

s- singleto

sl- singleto largo

sp.- espécie

spp. - Algumas espécies

t - tripleto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore e frutos de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> Mc.Vaugh) (Foto: http://www.folhavoria.com.br , 27/09/2012).	20
Figura 2. Árvore e frutos de araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i> Mc.Vaugh) (Fonte: http://www.folhavoria.com.br , 27/09/2012).	21
Figura 3. Reação de oxidação do AA a ácido desidroascórbico e de hidrólise deste a ácido 2,3–dicetogulônico (Heldt, 2004).	29
Figura 4. Flores de <i>P. guajava</i> e <i>P. fridrichsthalianum</i> (Fonte: Ramos, A.S. e Machado, M.B.).	30
Figura 5. Árvore e fruto de araçá-do-campo (<i>Psidium guineenses</i> SW) (Cardim, R.).	31
Figura 6. Goiaba-da-costa-rica (<i>P. fridrichsthalianum</i> (Berg) Niedenzu) (Foto:Cardim, R.)	31
Figura 7. Araçá amarelo (<i>P. cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> Hort.) araçá vermelho (<i>P.cattleianum</i>). (Fonte: http://www.tradewindsfruit.com/order_fruit_5.htm .20/12/11).	32
Figura 8. Araçá-pera (<i>Psidium acutangulum</i> DC) em estágio de maturação (Fotos: Jardim, E.)	33
Figura 9. Frutos de <i>Psidium acutangulum</i> DC (araçá-pera). (Foto: Ramos, A.).....	36
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H de PA (DMSO- <i>d</i> ₆).....	55
Figura 11. Espectro de RMN de ¹³ C de PA (DMSO- <i>d</i> ₆).....	56
Figura 12. Espectro gCOSY ¹ H- ¹ H de CG3 com ampliação (D ₂ O, 11,7 T).	57
Figura 13. Espectro TOCSY ¹ H- ¹ H de CG3 (D ₂ O).....	57
Figura 14. Estrutura da sacarose.....	58
Figura 15. Espectro de massas de PA obtido por CLAE-EM-ESI (-/+).Gradiente 5-100% (ACN/Tampão).	60
Figura 16. Espectrograma de massas do extrato etanólico do fruto liofilizado PA . Análise feita em modo gradiente de 5 a 100% em ACN. Coluna C18, 2,6 X 100mm, fluxo de 0,3mL/minuto.	61
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C de PA: sinais de carbonos carboxílicos das estruturas (8) e (9) (500MHz, DMSO <i>d</i> ₆ , δ 39,51).....	61
Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C de PA: sinais de carbonos carbinólicos e metínico das estruturas (8) e (9) (500MHz, DMSO <i>d</i> ₆ , δ 39,51).	62
Figura 19. Espectrômetro de massas obtidos a partir de PA, <i>m/z</i> 191[M-H] ⁻ observado no modo negativo e positivo <i>m/z</i> 215 [M+Na] ⁺ . Fase móvel:20% metanol, 10 minutos, modo isocrático. Coluna C18, 2,6x100mm, fluxo:0,3mL/minuto.	62
Figura 21. Cromatograma obtido por CLAE-EM: A) Solução padrão de AA (40 µg/mL), B) araçá-pera <i>in natura</i> , C) extrato de araçá-pera com adição de padrão de AA (40 µg/mL).....	65
Figura 22. Espectrograma de massas : A) Solução padrão de AA (40 µg/mL), B) extrato de araçá-pera <i>in natura</i> , C) extrato de araçá-pera com adição de padrão de AA (40 µg/mL).....	66
Figura 23. Curva de calibração de AA empregando-se EM como detector.....	66
Figura 24. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM observados no range 175: A) <i>P.acutangulum</i> liofilizado (G3), B) araçá-pera (<i>P.acutangulum</i>), C) goiaba-da-costa-rica (<i>P.fridrichsthalianum</i>), D) goiaba vermelha (<i>P.guajava</i>).	67
Figura 25. Espectrogramas de massas observados a partir dos cromatogramas da Figura19 A) <i>P.acutangulum</i> liofilizado (G3b), B) araçá-pera (<i>P.acutangulum</i>), C) goiaba-da-costa-rica (<i>P.fridrichsthalianum</i>), D) goiaba vermelha (<i>P.guajava</i>).	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento de massa dos frutos de <i>P. acutangulum</i> DC após liofilização.....	37
Tabela 2. Lista de identificação de extratos e análises realizadas.	39
Tabela 3. Análise Centesimal e Nutricional de diferentes partes dos frutos de araçá-pera liofilizados.	50
Tabela 4. Concentração de elementos (macro e micro) minerais nas diferentes partes dos frutos de araçá-pera liofilizados, faixa linear e comprimento de onda (λ) nos quais foram identificados.	51
Tabela 5. Fenóis totais (FenT), flavonoides totais (FlanT), e atividade antioxidante em extratos de frutos liofilizados de <i>Psidium acutangulum</i>	53
Tabela 6. Correlação de Pearson (r) entre fenólicos/flavonoides totais, vitamina C e capacidade antioxidante (fruto fresco) de <i>P.acutangulum</i> DC.....	53
Tabela 7 Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a capacidade antioxidante e teor de ácido ascórbico em frutos de <i>Psidium spp. (in natura)</i>	54
Tabela 8. Valores de IC ₅₀ (por DPPH) e VCEAC (por DPPH e ABTS), de frutos in natura <i>Psidium spp.</i>	54
Tabela 9. Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H de CG3 (1) e sacarose (δ , J em Hz).....	58
Tabela 10. Constituintes químicos identificados por RMN de ¹³ C e RMN de ¹ H observados no extrato etanólico (PA) dos frutos de <i>P.acutangulum</i> DC liofilizados.....	63
Tabela 11. Valores do teor de AA±Desvio Padrão, Resolução para o pico de AA analisado em <i>P.acutangulum</i> (P.A.), <i>P. friedrichsthalianum</i> (P.F.) e <i>P.guajava</i> (P.G.) e Limites de Detecção e Quantificação de AA.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Constituintes químicos identificados ou isolados em frutos e folhas de espécies de Myrtaceae.	22
Quadro 2 Estruturas químicas das substancias identificadas no extrato etanólico (PA) dos frutos liofilizados de <i>P.acutangulum</i> DC.....	64

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparo dos extratos para análise do potencial antioxidante de frutos de <i>Psidium spp.</i>	38
Esquema 2. Metodologia de extração e análise para quantificação de ácido ascórbico em matrizes de <i>Psidium spp.</i>	40
Esquema 3. Obtenção das Frações (FA-FM) e CG3 a partir de PA.	46
Esquema 5. Mutarrotação da molécula de glucose (Heldt, 2004).	59

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Myrtaceae	20
3.2 <i>Psidium</i>	30
3.3.1 <i>Psidium acutangulum</i> DC	32
4 METODOLOGIA	35
4.1 Materiais, reagentes e equipamentos	35
4.2 Levantamento bibliográfico	36
4.3 Coleta e identificação dos frutos de <i>P. acutangulum</i>	36
4.4 Obtenção das amostras liofilizadas	36
4.5 Obtenção dos extratos etanólicos do material liofilizado e dos extratos hidroalcoólicos dos frutos <i>in natura</i> de <i>P. acutangulum</i> , <i>P. guajava</i> e <i>P. friedrichsthalianum</i> para ensaio antioxidante <i>in vitro</i> para determinação do potencial antioxidante	37
4.6 Obtenção do extrato etanólico PA (fruto inteiro) para determinação dos constituintes químicos dos frutos de <i>P. acutangulum</i>	38
4.7 Extração de ácido ascórbico das matrizes do fruto de araçá-pera liofilizado e dos frutos <i>in natura</i> de <i>P. acutangulum</i> , <i>P. friedrichsthalianum</i> e <i>P. guajava</i>	39
4.8 Análise da composição centesimal dos frutos liofilizados.....	40
4.8.1 Umidade.....	40
4.8.2 Cinzas	41
4.8.3 Teor de Lipídios	41
4.8.4 Teor de Nitrogênios Totais.....	41
4.8.5 Fibras totais	42
4.8.6 Carboidratos	42
4.8.7 Calorias	42
4.8.8 Determinação dos teores de minerais:	42
5 Avaliação do Potencial Antioxidante por consumo de DPPH [•] e ABTS ^{•+} , das diferentes partes do fruto e de frutos <i>in natura</i> de <i>Psidium</i>	43
5.1 Análise do potencial antioxidante por consumo de DPPH [•]	43
5.2 Ensaio Frente ao radical livre ABTS ^{•+}	44
5.3 Determinação de fenólicos/flavonoides totais.....	44
5.4 Análise estatística.....	45

6	Determinação dos constituintes contidos no extrato PA	45
6.1	Fracionamento do extrato etanólico PA.....	45
6.2	Análise das frações obtidas por cromatografia por exclusão em gel	46
7	Análise das frações por RMN ¹³ C e ¹ H e por EMAR-ESI(+/-).....	47
8	Análise quantitativa de ácido ascórbico (AA) no fruto liofilizado e no fruto <i>in natura</i> por CLAE-EM	47
8.1	Construção da curva de calibração do padrão de ácido L-(+)-ascórbico	47
8.2	Parâmetros cromatográficos.....	48
9.1	Composição centesimal dos frutos de <i>Psidium acutangulum</i> DC.....	49
9.2	Potencial antioxidante do extrato dos extratos etanólicos das diferentes partes de <i>P. acutangulum</i> liofilizado e dos extratos hidroalcoólicos dos frutos de <i>Psidium</i> sp. <i>in natura</i>	51
9.3	Determinação dos constituintes químicos presentes no extrato etanólico de frutos de <i>Psidium acutangulum</i> DC.....	55
9.1	Determinação de ácido L(+)-ascórbico no fruto liofilizado e em frutos de <i>Psidium</i> spp <i>in natura</i>	65
8	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A busca por melhor qualidade de vida e pelo aumento na expectativa da mesma tem motivado a população na busca por fontes saudáveis de alimentos. A elevação dos custos com tratamentos médicos e a possibilidade de longevidade são também razões para mudança dos hábitos alimentares visando não apenas a saciedade da fome, mas também a melhoria na saúde com a redução de riscos de doenças patológicas (Dembitsky *et al.*, 2011); (Roberfroid, 2000). A flora amazônica é rica em espécies frutíferas que constituem uma importante fonte de alimento saudável, as quais são consumidas para diferentes fins, como a castanheira (*Bertholletia excelsa* H.&B), cujo ouriço é utilizado no artesanato, a casca como chá para tratar problemas intestinais, o fruto como fonte de proteína; o açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.), o buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), o tucumã (*Astrocaryum tucuma* Martius) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), cujas polpas já possuem grande importância industrial para a região amazônica (Shanley e Medina, 2005). Nessa rica biodiversidade, destaca-se neste trabalho a família Myrtaceae, com grande variabilidade de gêneros que fornecem frutos exóticos (Ribeiro e Silva, 1999), os quais são fontes de alimentos ricos em substâncias capazes de proporcionar uma alimentação saudável, como o camu-camu [*Myrciaria dúbia* (HBK) McVaugh], o araçá-boi (*Eugeniastipitata* McVaugh) e o araçá (*Psidium guineenses* var. *arasahum*), espécies ricas em vitamina C e carotenoides (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Zanatta *et al.*, 2005). Contudo, os estudos envolvendo a composição química e as propriedades biológicas de frutos exóticos tropicais ainda são escassos em comparação aos estudos envolvendo matrizes oriundas de regiões temperadas (Genovese *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2011; Dembitsky *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2011).

Na família Myrtaceae está incluído o gênero *Psidium*, ao qual pertencem os araçazeiros. A maioria dos compostos isolados a partir de frutos de *Psidium* apresenta atividades biológicas como a diminuição do efeito oxidante, o combate aos radicais livres e efeito antidiabético. Suas propriedades terapêuticas e preventivas de processos oxidativos e inflamatórios podem justificar o uso popular dessas matrizes na melhora da qualidade de vida da população (Chen e Yen, 2007; De Souza Schmidt Gonçalves, Lajolo e Genovese, 2010). Dentre os araçás, destaca-se o fruto da espécie amazônica araçá-pera (*Psidium acutangulum* DC), cuja quantificação do teor de ácido ascórbico por CLAE-EM, a determinação dos constituintes químicos por RMN e EM, bem como a avaliação dos potenciais antioxidante e nutricional ainda são desconhecidos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a composição química de frutos de *Psidium acutangulum* DC (araçá-pera), Myrtaceae, bem como avaliar os potenciais antioxidante e nutricional.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição centesimal nutricional das diferentes partes liofilizadas desse fruto (teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, fibras, carboidratos e calorias totais);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das diferentes partes do fruto e do extrato hidroalcoólico *in natura* do fruto inteiro;
- Caracterizar a composição química do extrato etanólico dos frutos de *Psidium acutangulum* DC;
- Determinar o teor de ácido ascórbico nos frutos *in natura* e liofilizados dessa matriz.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Myrtaceae

As espécies de Myrtaceae são em geral árvores ou arbustos, raramente subarbustos. No Brasil, estima-se a existência de 1.000 espécies pertencentes a 26 gêneros nativos e nove introduzidos, constituindo uma das maiores famílias da flora brasileira. São encontrados cerca de 140 gêneros e 3.000 a 4000 espécies divididas em duas subfamílias Myrtoideae e Leptospermoideae, ocorrentes principalmente nas regiões tropical e subtropical da América do Sul (Ribeiro e Silva, 1999; Wilson *et al.*, 2001)

Na composição química desta família encontram-se ainda fenóis simples, estilbenos, lignanas e ligninas, terpenos, flavonoides, ácidos elágico e gálico, além de saponinas e taninos para algumas espécies. Essas substâncias pertencentes a diferentes classes metabólicas possuem funções biológicas importantes, tais como: antibiótica, pesticidas naturais e sinalizadores para o estabelecimento da simbiose (Heldt, 2004) (Quadro 1).

Os frutos das espécies amazônicas ocupam um lugar de destaque na alimentação da população local. Muitos desses frutos possuem elevado teor de açúcares, proteínas, vitaminas, fibras e sais minerais (Franco, 2004). Os frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc.Vaugh) (Figura 1) são ricos em carotenoides, antocianinas e vitamina C ($1,88\pm 0,43\text{g}/100\text{g}$ de fruto fresco) significativamente superior a outros frutos amazônicos e exógenos a esse bioma, como a acerola (*Malpighia emarginata*, Malpighiaceae) com um teor de vitamina C de $1.357\pm 10\text{ mg}/100\text{ g}$ de fruto fresco (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Zanatta *et al.*, 2005; Rufino *et al.*, 2010)



Figura 1.Árvore e frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc.Vaugh) (Foto: <http://www.folhavoria.com.br>, 27/09/2012).

Estudos fitoquímicos da polpa de frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc.Vaugh) e araçá-boi (*Eugenia stipitata*) (Figura 2), utilizando-se a técnica *headspace* seguida da análise por CG-EM, resultaram na identificação de mais de vinte componentes voláteis nas amostras

desses frutos, dentre eles estão D-germacreno, *cis*- β -ocimeno, α -pineno e β -pineno, D-limoneno, α -fencheno, canfeno, β -mirceno, α -filandreno, γ -terpineno, eucaliptol, *p*-cimeno, terpinoleno, fencol, β -cariofileno, 4-terpineol, sendo 98% de terpenos. Frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) foram caracterizados por um complexo padrão de sesquiterpenos (Franco e Shibamoto, 2000).

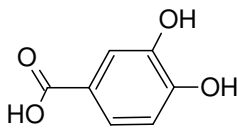
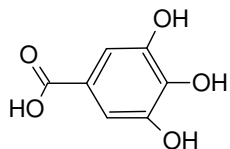
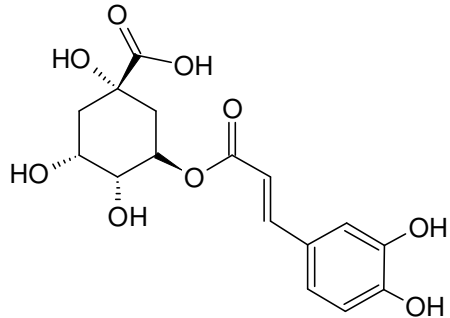
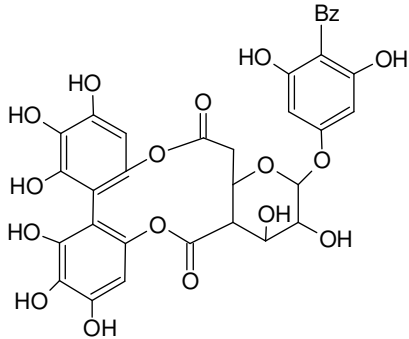
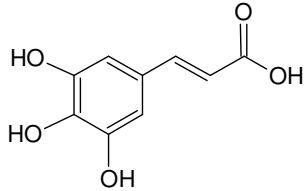
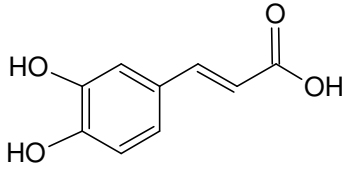
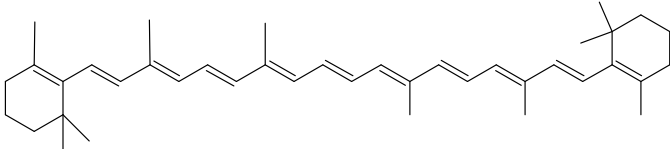


Figura 2.Árvore e frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc.Vaugh) (Fonte: <http://www.folhavoria.com.br>, 27/09/2012).

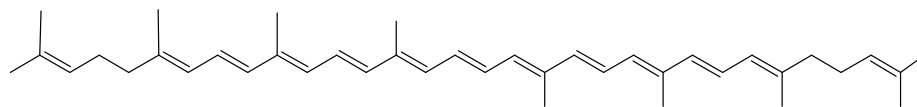
Carotenoides, que incluem os carotenos, as xantofilas e o licopeno, comuns em espécies frutíferas, são responsáveis pela coloração de muitos frutos, flores e raízes. Estão presentes na polpa vermelha da goiaba (*P. guajava*) e são responsáveis pelo tom amarelo e vermelho das cascas dos araçás (Figura 7) e também são excelentes antioxidantes atuando no combate a doenças como câncer de próstata e arteriosclerose (Ghosh *et al.*, 2010).

Reynertson e colaboradores (2008) quantificaram por métodos cromatográficos e espectrométricos (CLAE-DAD) as substâncias: cianidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo, ácido elágico, kaempferol, miricetina, quercetina, quercitrina e rutina (Quadro 1) a partir de extratos metanólicos de frutos liofilizados de algumas espécies de Myrtaceae. O potencial antioxidante desses extratos também foi testado frente ao radical livre DPPH \cdot para *Myrciaria* [*M. cauliflora* ($19,4 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$), *M. dubia* ($57,2 \pm 5,61 \mu\text{g/mL}$), *M. vexator* ($38,6 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$)], *Syzygium* [*S.cumini* ($389,0 \pm 36,0 \mu\text{g/mL}$), *S. curranii* ($33,4 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$), *S. jambos* ($92,0 \pm 8,24 \mu\text{g/mL}$), *S. javanicum* ($81,4 \pm 6,24 \mu\text{g/mL}$), *S. malaccense* ($269,0 \pm 7,66 \mu\text{g/mL}$), *S. samarangense* ($77,5 \pm 4,19 \mu\text{g/mL}$) e *S. samarangense* var.Taiwan pink)], além de *Eugenia* [*E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. lushnathiana* e *E. reinwardtiana* ($157,0 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$)], espécies com constituintes considerados inativos (Reynertson *et al.*, 2008).

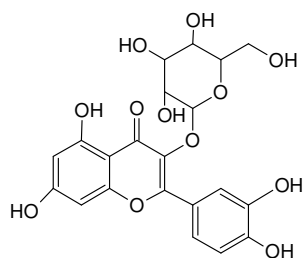
Quadro 1. Constituintes químicos identificados ou isolados em frutos e folhas de espécies de Myrtaceae.

 <p>ácido protocatecuico (Okuda, Hatano e Yazaki, 1984)</p>	 <p>ácido gálico (Okuda, Hatano e Yazaki, 1984)</p>
 <p>ácido clorogênico (Liang, Qian e Yao, 2005)</p>	 <p>guavina B (Okuda, Hatano e Yazaki, 1984)</p>
 <p>ácido cafeico (Liang, Qian e Yao, 2005)</p>	 <p>ácido ferúlico (Zhu <i>et al.</i>, 1997)</p>
 <p>β-caroteno (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004)</p>	

Continuação do Quadro 1

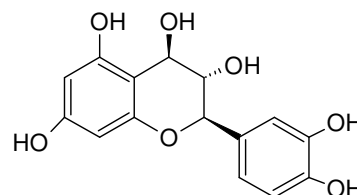


licopeno (Franco e Shibamoto, 2000)



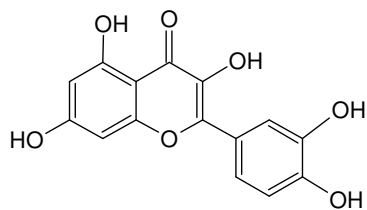
quercetina 3-β-D-glucosídeo

(Liang, Qian e Yao, 2005)

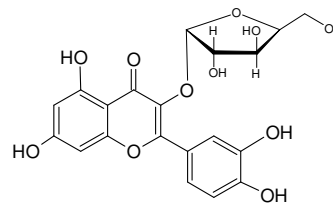


Leucocianidina

(Bieglmeyer *et al.*, 2011)



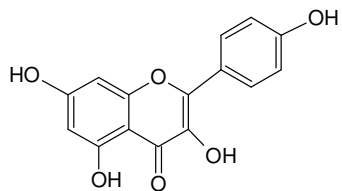
quercetina (Reynertson *et al.*, 2008)



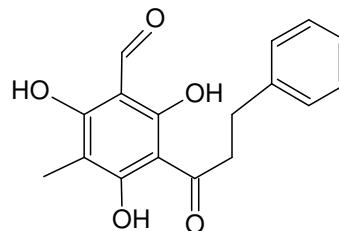
quercetina-3-α-L-arabinofuranosídeo

(Liang, Qian e Yao, 2005)

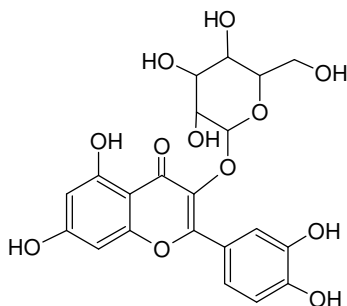
Continuação do Quadro 1



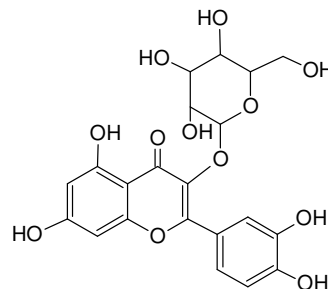
kaempferol (Reynertson *et al.*, 2008)



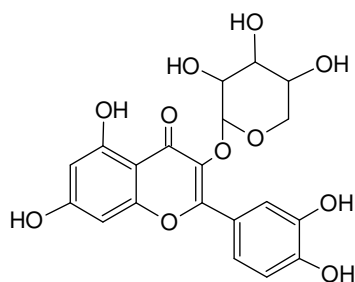
3'-formil-2',4',6'-tri-hidroxi-dihidrochalcona-metildihidrochalcona (Miles *et al.*, 1991a; b)



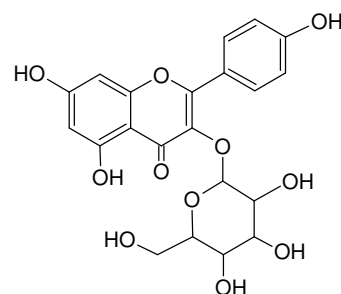
quercetina-3-β-D-glucosídeo (Liang, Qian e Yao, 2005)



quercetina 3-β-D-glucosídeo (Reynertson *et al.*, 2008)

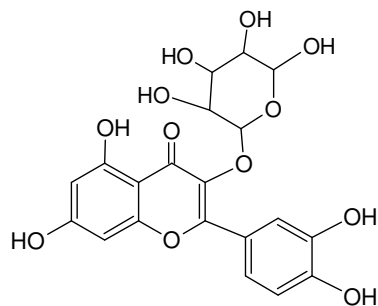


guajaverina (Prabu, Gnanamani e Sadulla, 2006)

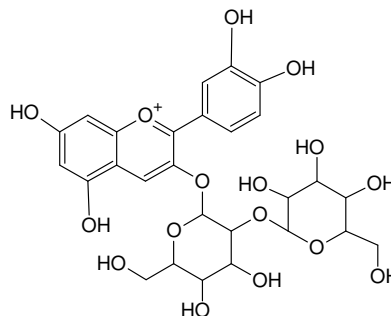


kaempferol-3-glucosídeo (Reynertson *et al.*, 2008)

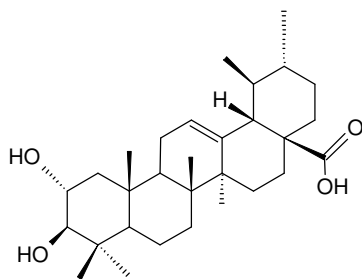
Continuação do Quadro 1



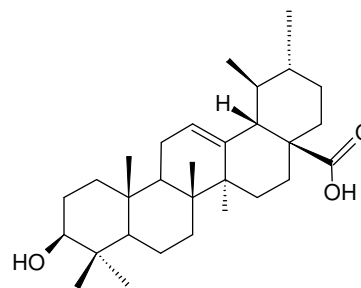
quercitrina (Reynertson *et al.*, 2008)



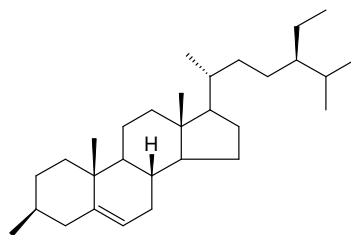
mecocianina (Liang, Qian e Yao, 2005)



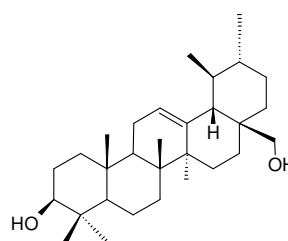
ácido 2- α -hidroxiursólico (Begum, Hassan e Siddiqui, 2002)



ácido ursólico (Begum, Hassan e Siddiqui, 2002)

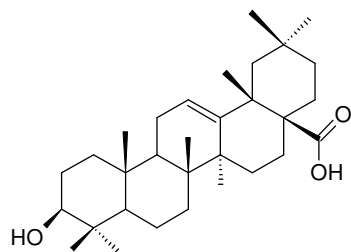


β -sitosterol (Begum *et al.*, 2002)

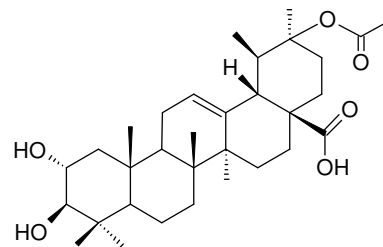


uvaol (Begum *et al.*, 2004)

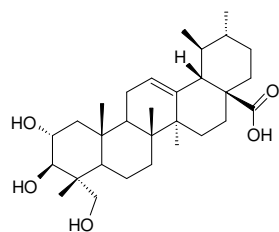
Continuação do Quadro 1



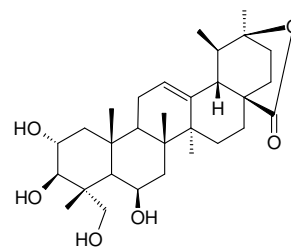
ácido oleanólico (Begum, Siddiqui Bina e Hassan Syed, 2002)



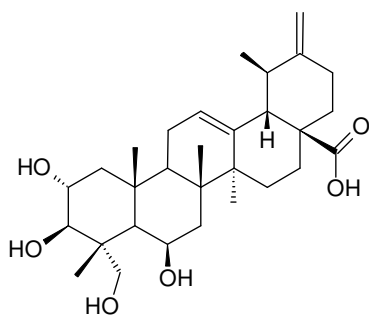
ácido guavanoico (Begum *et al.*, 2004)



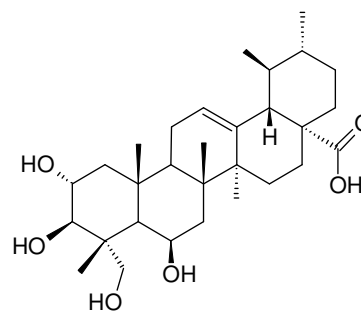
ácido guavacumárico (Begum, Hassan e Siddiqui, 2002)



guajavolido (Begum *et al.*, 2004)

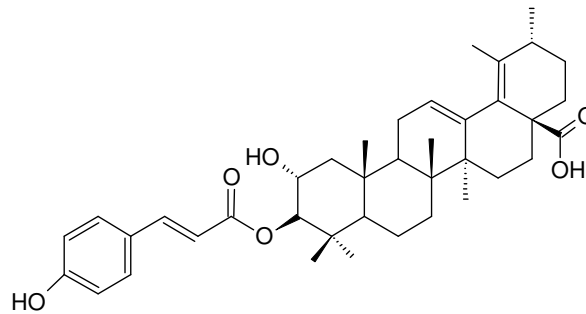


ácido guavenoico (Begum, Siddiqui Bina e Hassan Syed, 2002)

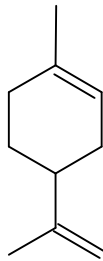


ácido asiático (Begum, Siddiqui e Hassan, 2002)

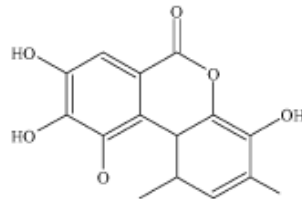
Continuação do Quadro 1



ácido jacumarico (Salib e Michael, 2004)

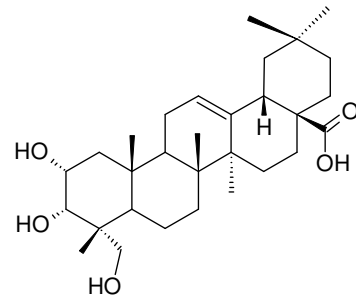


limoneno (Franco e Shibamoto, 2000)

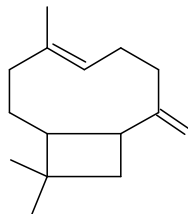


ácido elágico

(De Souza Schmidt
Goncalves, Lajolo e Genovese,
2010)

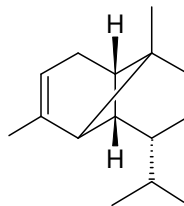


ácido arjunólico (Salib e Michael,
2004)



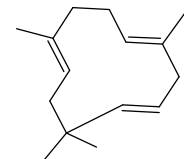
β -cariofileno

(Franco e Shibamoto, 2000)

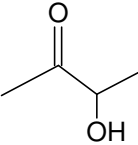
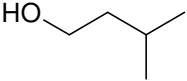
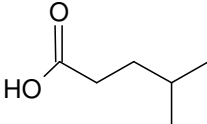
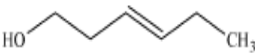
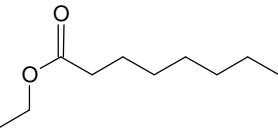
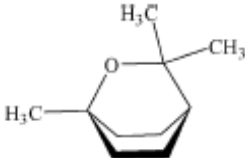
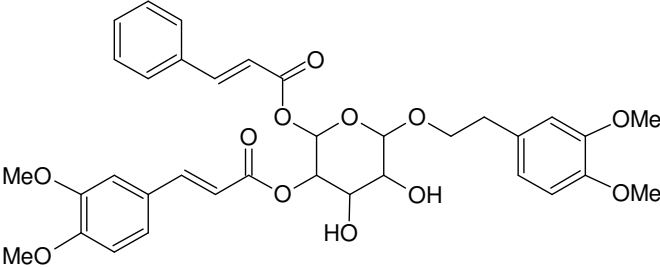


copaeno

(Pino Jorge, Marbot e Bello,
2002)



α -humuleno (Jordan *et al.*, 2003)

Continuação do Quadro 1		
 <p>3-hidroxi-2-butanona (Stevens, Brekke e Stern, 1970)</p>	 <p>3-metil-1-butanol (Stevens, Brekke e Stern, 1970)</p>	 <p>ácido 3-metilbutanoico (Stevens, Brekke e Stern, 1970)</p>
 <p>(Z)-3-hexen-1-ol (Stevens, Brekke e Stern, 1970)</p>	 <p>etil octanoato (Stevens, Brekke e Stern, 1970)</p>	 <p>Eucaliptol (Franco e Shibamoto, 2000)</p>
 <p>1-O-3,4-dimetoxi-feniletil-4-O-3,4-dimetoxi cinamoil-6-O-cinamoil-β-D-glucopiranosídeo (Salib e Michael, 2004)</p>		

Estudos químicos com frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc.Vaugh) (De Souza Schmidt Gonçalves, Lajolo e Genovese, 2010; Peralta-Bohorquez *et al.*, 2010) e outro trabalho com araçá-do-campo (*Psidium guineense* Swartz) (Peralta-Bohorquez *et al.*, 2010) apresentaram componentes fenólicos, flavonoídicos (quercetina e kaempferol), ácidos

orgânicos (ácido elágico) e vitaminas (A, C e E) em sua composição responsáveis pela atividade anti-inflamatória, antioxidante e hipocolesterolêmica desses frutos.

A principal característica dos frutos da família Myrtaceae é seu alto teor de compostos fenólicos e de vitamina C, excelentes antioxidantes que auxiliam na neutralização dos radicais livres. O consumo de vitamina C na dieta diminui os efeitos danosos dos radicais livres responsáveis por danos causados em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Genovese *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados (Figura 3) são os melhores exemplos do grupo de removedores de oxigênio porque atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis. O ácido ascórbico pode atuar também como sinergista na regeneração de antioxidantes primários. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Bianchi e Antunes, 1999).

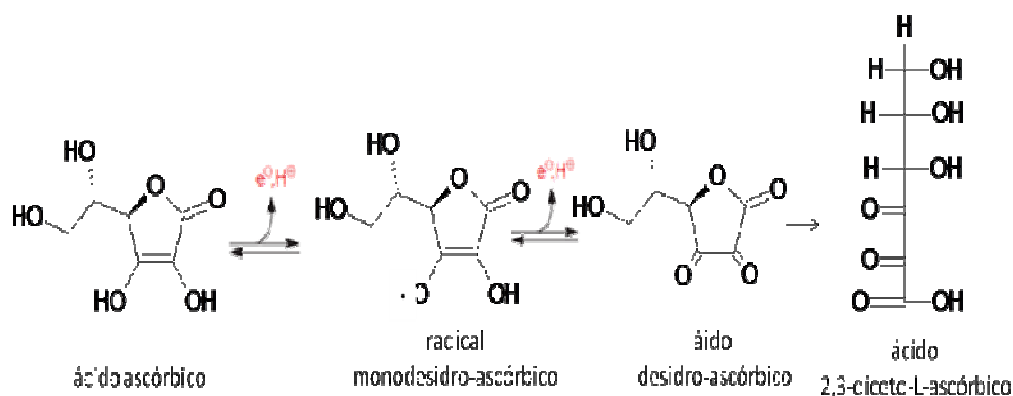


Figura 3. Reação de oxidação do AA a ácido desidroascórbico e de hidrólise deste a ácido 2,3-dicetogulônico (Heldt, 2004).

Outras espécies de *Psidium* possuem potencial semelhante, como as espécies que serão descritas a seguir.

3.2 *Psidium*

Espécies de *Psidium* spp. caracterizam-se por apresentarem folhas simples e opostas, elípticas, flores solitárias, axilares ou em pequenos racemos, cujo botão varia de 4mm a 15mm; o cálice possui morfologia variável e as pétalas alternadas e de cor branca ou amarelada (Falcão *et al.*, 1992) (Figura 4).



Figura 4. Flores de *P. guajava* e *P. fridrichsthalianum* (Fonte: Ramos, A.S. e Machado, M.B.).

Encontram-se mais de 150 espécies dentre as quais, a mais difundida, no gênero, e de importância econômica, tendo em vista ser uma espécie de frutos comestíveis, muito explorada pela indústria alimentícia e farmacológica, é a espécie vegetal *Psidium guajava* (goiabeira). Países da América do Sul, como Brasil, Colômbia e Venezuela são produtores de goiaba (*Psidium guajava*), espécie muito apreciada por causa de seu fruto de sabor agradável e rico em nutrientes e componentes funcionais como vitaminas A e C, e minerais (ferro, cálcio e fósforo) e devido à grande variedade de produtos que podem ser desenvolvidos pela indústria alimentícia. Esta espécie já foi alvo de diversos estudos químicos (Kiyoshima *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2010). Espécies deste gênero também são conhecidas como araçazeiros, espécies nativas de *Psidium*, dentre as quais se destacam araçá (*P. guineenses* SW) (Figura 5), araçá-amarelo (*P. cattleyanum* var. *Lucidum*) (Figura 7), goiaba-da-costa-rica (*P. fridrichsthalianum* (Berg) Niedenzu) (Fig.6) e araçá-pera (*P. acutangulum* DC) (Figura 8) por serem espécies cujos frutos, assim como a goiaba, podem ser consumidos *in natura* e apresentam potencial para a exploração comercial (Wille *et al.*, 2004; Corrêa, 2010). Esses araçás são pouco conhecidos pela população brasileira, mas apresentam características comuns ao gênero tornando-as com potencial para uso medicinal e industrial. Nos frutos de araçá-do-campo (*Psidium guineenses* SW), foram determinados teores de potássio, cálcio, magnésio, ferro e fósforo mais elevados que os de frutos mais comumente consumidos pela população brasileira, como maçã, pêssigo, pera, morango e abacaxi (Ferreira *et al.*, 2011).



Figura 5.Árvore e fruto de araçá-do-campo (*Psidium guineenses* SW) (Cardim, R.).

Os componentes voláteis de frutos de *Psidium guineenses* Swartz foram isolados utilizando-se a técnica *headspace* (HS-SPME). O mesmo estudo resultou na identificação dos componentes majoritários (hexanoato de etila, α -cariofileno e selin-11-en-4 β -ol) por cromatografia gasosa (CG-DIC e CG-EM) (Peralta-Bohorquez *et al.*, 2010).

A goiaba-da-costa-rica (*P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu) (Figura 6) apresenta um teor de proteína tão significativo quanto o da goiaba (*P. guajava*). A polpa deste fruto apresenta valores de umidade (83,15%), proteínas (0,78-0,88%), carboidratos (5,75-6,75%), gorduras (0,39-0,52%), fibras (7,90%) e cinzas (0,80%), além de ser rica em minerais como ferro, cálcio, que exercem diversas funções importantes, atuando como cofatores de enzimas, destacando-se ainda sua importante função como fatores nutricionais (Rebouças, Gentil e Ferreira, 2008). Estudos por CG-EM do extrato metanólico dos frutos da goiaba-da-costa-rica identificaram a presença de cento e setenta e três constituintes voláteis, sendo a maioria pertencente à classe dos terpenos: (E)- β -cariofileno, α -terpineol, α -pineno, α -selineno, β -selineno, δ -cadineno, 4,11-selinadieno e α -copaeno (Pino, Marbot e Vasquez, 2002).



Figura 6. Goiaba-da-costa-rica (*P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu) (Foto:Cardim, R.)

Um estudo visando à caracterização química de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*) e araçá amarelo (*P. cattleianum* Var. *lucidum* Hort.) possibilitou caracterizar compostos fenólicos de seus frutos por CLAE–DAD. Foram determinadas antocianina, cianidina, quercetina glicosilada (hiperosídeo e isoquercetrina) nos extratos das polpas desses frutos (Biegelmeyer *et al.*, 2011). Os extratos desses frutos apresentam um elevado poder antioxidante foram 156 e 177 $\mu\text{M/g}$ de equivalente Trolox para o vermelho e amarelo, respectivamente.



Figura 7. Araçá amarelo (*P. cattleianum* var. *lucidum* Hort.) araçá vermelho (*P.cattleianum*). (Fonte: http://www.tradewindsfruit.com/order_fruit_5.htm.20/12/11).

Gonçalves e colaboradores (2010) analisaram a composição química e potencial antioxidante/antidiabético de frutos de Myrtaceae e obtiveram resultados positivos para araçá-do-campo (*Psidium guineenses*) e araçá vermelho (*P. cattleyanum*) que demonstraram conter componentes fenólicos, flavonoídicos (quercetina e kaempferol), ácido elágico, α -amilase e α -glucosidase inibidores para o controle da hiperglicemia e diabetes tipo 2. Os óleos voláteis de frutos de *Psidium cattleianum* (araçá vermelho) e *P. cattleianum* var. *lucidum* (araçá amarelo) foram quantificados por CG-EM. A análise dos óleos essenciais desses araçás evidenciou o β -cariofileno como principal constituinte químico em ambos os óleos essenciais.

Os resultados destes estudos realizados com matrizes de *Psidium* spp. demonstram a importância desse gênero em relação à presença de compostos que podem agir como antioxidantes e sua contribuição nutricional. No entanto, ainda pouco se conhece sobre o valor químico e nutricional do araçá-pera que poderia ser também explorado como fonte de alimento.

3.3.1 *Psidium acutangulum* DC

Psidium acutangulum DC (araçá-pera) é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, uma árvore pequena de aproximadamente 8 metros de altura (Fig.8). Sua frutificação ocorre de outubro a dezembro, seus frutos quando maduros são amarelos de polpa esbranquiçada (Fig.7) (Falcão *et al.*, 1992). As folhas são impressas e onduladas nas margens, emprestando um aspecto elegante à planta. É uma espécie amazônica com ocorrência de cinco variações (Franzon *et al.*, 2009):

- *Psidium acutangulum* var. *acidum* DC 1828
- *Psidium acutangulum* var. *crassirame* O. Berg 1857
- *Psidium acutangulum* var. *oblongata* Mattos 1989
- *Psidium acutangulum* var. *oblongatum* Mattos 1989
- *Psidium acutangulum* var. *tenuirama* O. Berg 1857



Figura 8. Araçá-pera (*Psidium acutangulum* DC) em estágio de maturação (Fotos: Jardim, E.)

O araçá-pera (*P.acutangulum* DC) é uma espécie frutífera encontrada em forma silvestre ou cultivada na região Amazônica. Também conhecido como araçá-goiaba e araçá-do-Pará, é difundido na América do Sul. Seus frutos são em forma de baga globosa (Figura 8) e de sabor ácido, mas agradável, chegam a pesar mais de 200 gramas (Falcão *et al.*, 1992).

De polpa suculenta e carnosa, com cerca de cinco centímetros de altura e cinco centímetros de diâmetro, o araçá-pera (*Psidium acutangulum* DC), como foi determinado por método colorimétrico (2,4-dinitrofenilhidrazina) por Andrade e colaboradores (1993) também é uma ótima fonte de vitamina C (389,34 mg/100g de polpa integral). Assim como as espécies *Myrciaria dubia* (camu-camu) e *Eugenia stipitata* (araçá-boi). O araçá-pera possui boas características para industrialização por ser uma fonte de vitamina C e baixo pH (Andrade, Aragão e Ferreira, 1993). Poucos são os estudos sobre o valor nutricional e químico dos frutos dessa espécie. Dentre os estudos químicos envolvendo determinação e quantificação de constituintes químicos dessa espécie de *Psidium* destacam-se a análise de óleo essencial e

extrato metanólico de ramos finos, o estudo físico-químico determinando os teores de açúcares totais e fenólicos totais dos frutos *in natura* e o estudo da fenologia da espécie (Falcão *et al.*, 1992; Andrade, Aragão e Ferreira, 1993). Estudos químicos a partir de extratos de folhas desta espécie resultaram no isolamento de dois flavonoides pertencentes ao grupo das chalconas. Estas moléculas apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana contra *Xanthomonas campestris* (Miles, Del Medeiros e Chittawong, 1990; Miles *et al.*, 1991b). Foi constatada a presença de α -pineno (14,8%), 1,8-cineol (12,9%) e β -pineno (10,1%), componentes voláteis também encontradas em outras espécies de *Psidium* tanto em folhas como em seus frutos (Da Silva *et al.*, 2003).

Neste sentido, tecnologias modernas, capazes de promover a obtenção de resultados rápidos e confiáveis em relação à detecção da presença de metabólitos de interesse como os flavonoides (kaempferol, guaijaverina e miricetina), terpenoides (ácido ursólico e ácido guavanoico) e vitaminas (A, C e E) tem sido amplamente utilizadas. O hifenamento da cromatografia a diferentes técnicas espectrométricas é uma das principais inovações que vem exercendo um crescente e importante papel nas últimas décadas na investigação do perfil metabolômico de matrizes vegetais complexas como frutos (Silva *et al.*, 2000; Tang, Xiao e Wang, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido um dos métodos mais empregados, devido à capacidade de separação das colunas cromatográficas empregadas, alta sensibilidade, robustez e rapidez. Sendo assim, muito vantajosa na análise de substâncias sensíveis à degradação e de baixo peso molecular. A utilização de métodos como a CLAE acoplada a EM pode facilitar este tipo de análise de compostos mais polares, pois o método de separação por CLAE é muito sensível e rápido quando acoplado a uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI), EM é a técnica analítica mais sensível para determinação de compostos químicos pela razão m/z dessas moléculas ionizadas. Um detector de massas moleculares com ESI promove a ionização protonando ou desprotonando moléculas e permite a detecção de adutos formados ao longo da ionização (Crews, Rodrigues e Jaspars, 1998).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais, reagentes e equipamentos

Padrão de DPPH, ABTS, ácido gálico ($C_7H_6O_5$), quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$), e ácido L-(+)-ascórbico (AA) ($C_6H_8O_6$) (pureza 99,0-100,05%) da Sigma (St. Louis, MO, USA). Ácido metafosfórico (MPA) (pureza 99,99%) da Prolabo (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). Solvents deuterados ($CDCl_3$, $DMSO-d_6$, e D_2O) ($\geq 99.9\%$ D) da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL, Massachusetts, USA) bem como padrões internos para deslocamento químico de RMN de ^{13}C , e resíduos de solventes para RMN de 1H . Metanol grau espectrométrico (EM) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Perssulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), sulfato de potássio (K_2SO_4), sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), bissulfato de potássio ($KHSO_4$), sulfato de cobre penta-hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), etilenodiaminatetraaceticodissódico (Na_2EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), ácido bórico (H_3BO_3), ácido acético ($C_2H_4O_2$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fórmico (CH_2O_2), ácido clorídrico (HCl), vermelho de metila ($C_{15}H_{15}N_3O_2$), verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (City, State, Country). Dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, metanol, clorofórmio ($CHCl_3$) e acetona (C_3H_6O) foram obtidos da Tedia (Fairfield, OH, USA). As enzimas alfa-amilase termo-estável, protease e amiloglucosidase foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes e solventes foram de grau analítico. A água destilada e deionizada foi produzida nos laboratórios (Millipore Milli-RO plus, MA, EUA).

Uma solução de estoque padrão de AA (1 mg / mL) foi preparada de fresco em cada dia de análise. As soluções-padrão de trabalho foram solubilizadas em água com 1% de MPA, e foram diluídas conforme necessário para obter concentrações finais de 1, 5, 20, 40, 60, 80, 100, e 120 $\mu g / ml$.

Os equipamentos utilizados no preparo das amostras e extratos e nas análises foram: liofilizador Edwards®; liquidificador industrial; freezer à $-80^\circ C$; moinho de pedra Edwards®; espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV/Vis Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra); leitor de microplacas Thermoplate® (TP-Reader, Thermoplate, Itália); espectrômetro de alta resolução Bruker®; espectrômetro Varian, Inova 500; cromatógrafo da Thermo® com injetor automático e bomba quaternária; espectrômetro de

massas da Thermo, com detector triplo-quadrupolo, equipado com ionizador por eletrospray operando nos modos positivo (+) e negativo (-); computador equipado com software XCalibur® para aquisição dos dados espectrométricos.

4.2 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado empregando-se as plataformas de pesquisa SciFinder® versão Web, Web of Science® e Scopus. A aquisição de cópias dos artigos selecionados foi feita por meio do Portal de periódicos da CAPES ou Scielo, bem como pelo uso *sites* de busca livres para artigos de domínio público.

4.3 Coleta e identificação dos frutos de *P. acutangulum*

Amostras do fruto de araçá-pera foram coletadas a partir de cinco indivíduos de *Psidium acutangulum* DC em um sítio localizado no km 7 da BR174, no município de Manaus, estado do Amazonas (AM), Brasil, no período matutino (entre 8:00 e 9:00 horas) em fevereiro de 2012 e no Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Manaus, AM (UFAM), em setembro de 2013. Frutos de *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu e *P. guajava* L. também foram coletados a partir de um indivíduo em setembro de 2013 em Manaus, AM. As três espécies vegetais foram previamente identificadas pela botânica Msc. Maria Anália Duarte de Souza, cujos *vouchers* para *P. acutangulum* (nº 254586) e *P. friedrichsthalianum* (nº 254585) foram depositados no herbário do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.



Figura 9. Frutos de *Psidium acutangulum* DC (araçá-pera). (Foto: Ramos, A.)

4.4 Obtenção das amostras liofilizadas

Os frutos coletados em 2012 foram despolidos e liofilizados em liofilizador da Edwards® no Laboratório de Nutrição e Físico-química de Alimentos (LNFqA/ CPCS/ CSAS/ INPA) sob a orientação da Dra. Francisca Souza e do Eng. Jaime Aguiar. Parte do material foi separada em dois subgrupos: casca+polpa externa sem sementes e polpa interna com sementes. Essas três partes foram imediatamente armazenados a $-80\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, e

em seguida liofilizadas por três dias. O final da liofilização, após três dias, foi determinado visualmente e pela textura seca do material (que pode variar dependendo do teor de umidade do fruto). Após esse período, estes foram homogeneizados em liquidificador e peneirados, cujo resíduo a partir da polpa interna com semente foi separado e homogeneizado em moinho de pedra, resultando em um novo subgrupo (resíduo de sementes). Os pós amarelos obtidos a partir do fruto inteiro e dos três subgrupos foram armazenadas a $-80\pm 1^\circ\text{C}$ ao abrigo da luz em frascos âmbar.

Os frutos sadios de *P. acutangulum*, *P. friedrichsthalianum* e *P. guajava*, coletados em 2013, foram lavados com água destilada e armazenados a $-80\pm 1^\circ\text{C}$ até a realização dos ensaios antioxidantes e de quantificação do ácido ascórbico por CLAE-EM.

Tabela 1. Rendimento de massa dos frutos de *P. acutangulum* DC após liofilização.

Divisão por Partes	Amostra Úmida (g)		Amostra Seca (g)	
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
	Coletas			
epicarpo	972,74	*	147,02	209,20
polpa sem casca	418,06	*	112,65	75,97
fruto inteiro	*	2637,4	*	527,48
resíduo de Semente	*	*	*	142,95

*Material não obtido.

4.5 Obtenção dos extratos etanólicos do material liofilizado e dos extratos hidroalcoólicos dos frutos *in natura* de *P. acutangulum*, *P. guajava* e *P. friedrichsthalianum* para ensaio antioxidante *in vitro* para determinação do potencial antioxidante

Uma porção de quinze gramas de cada parte do fruto foi extraída em duplicata com 150 mL da solução extratora (etanol e ácido fórmico a 0,1% (v/v)). Cada mistura foi levada em banho de ultrassom por 15 minutos, em seguida, filtrada e reservadas em frasco âmbar identificadas como PAa (epicarpo), PAb (endocarpo) e PAc (resíduos de sementes).

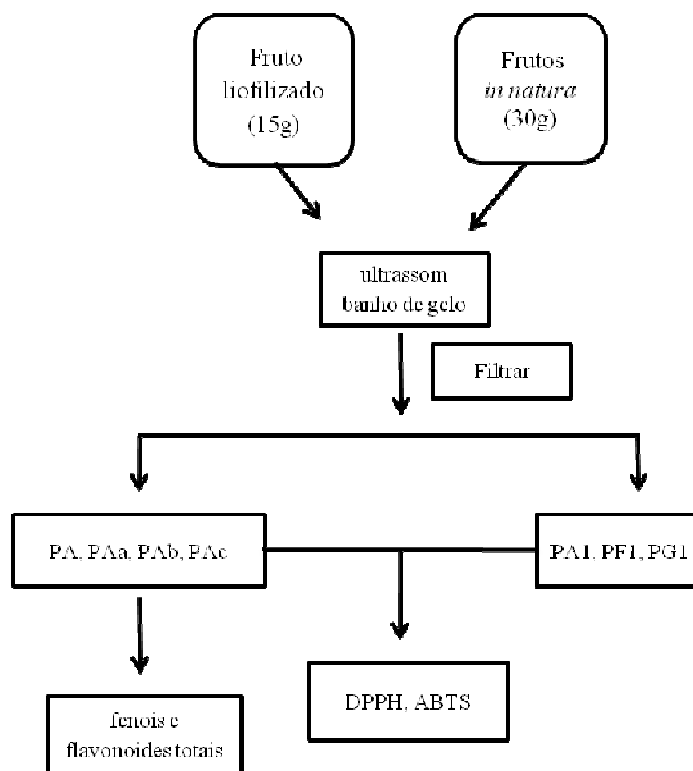
Os frutos *in natura* foram extraídos segundo metodologia descrita por Rufino e colaboradores (2010) com modificações. Alíquotas de 30 gramas dos frutos *in natura* de cada espécie a ser avaliada: *P. acutangulum* DC, *P. friedrichsthalianum* e *P. guajava* L., as amostras foram transferidas para liquidificador e homogeneizadas por 5 minutos com solução extratora hidroalcoólica composta por metanol e água destilada (1:1); em seguida, foi submetida a banho de ultrassom por 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugação por

15 minutos em 4.000 rpm. A solução resultante de cada extração foi reservada em frasco âmbar identificadas como PA1, PF1 e PG1, respectivamente, em geladeira a 5°C até o momento do ensaio antioxidante.

4.6 Obtenção do extrato etanólico PA (fruto inteiro) para determinação dos constituintes químicos dos frutos de *P.acutangulum*

Preparou-se um extrato etanólico em maior massa (Esquema 1) para a análise de cromatografia por exclusão em gel: 500 gramas de fruto inteiro liofilizado foi submetido a três extrações com 5L de etanol, assistido por ultrassom (por 15 minutos cada repetição) seguido de repouso, em frasco âmbar, em banho de gelo durante 30 minutos. Depois de dois dias, a solução resultante foi filtrada e obteve-se um sólido branco (CG3) insolúvel em metanol e etanol. A solução filtrada foi concentrada em rotaevaporador a 40°C, e resultou no extrato etanólico PA (fruto inteiro).

Esquema 1. Preparo dos extratos para análise do potencial antioxidante de frutos de *Psidium* spp.



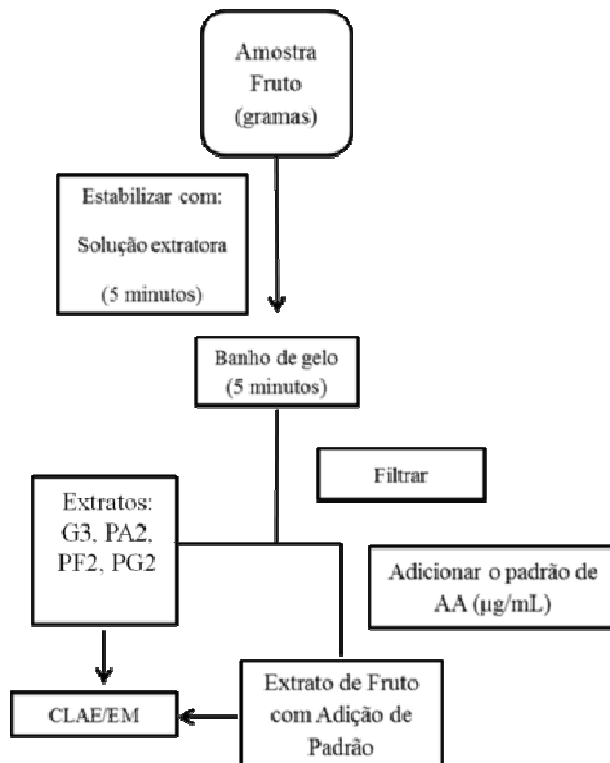
4.7 Extração de ácido ascórbico das matrizes do fruto de araçá-pera liofilizado e dos frutos *in natura* de *P. acutangulum*, *P. friedrichsthalianum* e *P. guajava*

A extração de AA do fruto inteiro liofilizado (0,50 g) e no fruto fresco (20 g) foi feita utilizando 50mL de solução extratora (pH 3,0) composta por ácido acético 8% (v/v), 1mM EDTA, 0,3N H₂SO₄, ácido *m*-fosfórico (MPA) 3% (v/v) em triplicata, em banho de gelo (Esquema 2), utilizando-se um liquidificador comercial, baseando-se no método de extração de Franke e colaboradores (2004). Para verificar a reprodutibilidade e eficiência do método, o mesmo foi empregado na extração de AA de outras duas espécies de *P. guajava* L. e *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu. A extração foi feita em triplicata. Os extratos foram identificados como PA2 e PA3 (extrato ácido do material liofilizado), e os extratos dos frutos *in natura*, adotaram-se as iniciais dos nomes científicos (PA2 e PA3, PG2 e PG3, e PF2 e PF3). Segue abaixo a tabela com identificação dos extratos e respectivas análises.

Tabela 2. Lista de identificação de extratos e análises realizadas.

Espécie	Código	Parte do fruto	Processo	Análises
<i>P. acutangulum</i>	PA	fruto inteiro		RMN, CLAE-EM, DPPH, MC*
	PAa	casca e polpa externa sem sementes	liofilização	RMN, DPPH, MC*
	PAb	polpa interna com sementes		RMN, DPPH, MC*
	PAc	resíduo de sementes		RMN, DPPH, ABTS, MC*
	PA1			DPPH, ABTS
	PA2	fruto inteiro	<i>in natura</i>	CLAE-EM
<i>P. friedrichsthalianum</i>	PF1			DPPH, ABTS
	PF2	fruto inteiro	<i>in natura</i>	CLAE-EM
<i>P. guajava</i>	PG1			DPPH, ABTS
	PG2	fruto inteiro	<i>in natura</i>	CLAE-EM

Esquema 2. Metodologia de extração e análise para quantificação de ácido ascórbico em matrizes de *Psidium* spp.



4.8 Análise da composição centesimal dos frutos liofilizados

As análises físico-químicas dos grupos liofilizados foram realizadas em triplicata seguindo protocolo do LNFqA sob a responsabilidade da Dra. Francisca Souza e do Eng. Jaime Aguiar, baseando-se nos métodos da AOAC (2005) para umidade e cinzas (940,26), lipídeos (933,05), proteínas (920,152) e AOAC (1980) para determinação de minerais.

4.8.1 Umidade

Foi determinado pelo método de secagem das amostras até peso constante, em estufa a 105 °C. O resultado foi obtido pela diferença entre a massa inicial (MI) e a massa final seca (MS):

$$U = \frac{(MS-MI) \times 100\%}{MI}$$

Resultados dos cálculos da Análise da Composição Centesimal das Diferentes Partes do Fruto Liofilizado Equação para conversão dos valores em massa seca (MS) para teores em massa úmida (MU): $(MS \times U)/100 = MU$

4.8.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas após completa carbonização em bico de Bunsen e calcinadas em mufla a 550 °C, até a obtenção de um resíduo com coloração branca acinzentada. A diferença entre MI e MF forneceu o teor de cinzas: $\% \text{Cinzas} = (Mf - Mi) \times 100\%$

4.8.3 Teor de Lipídios

A determinação de lipídios foi feita seguindo o método de Bligh-Dyer (Bligh e Dyer, 1959), a amostra foi centrifugada em clorofórmio, metanol e água destilada, seguida de filtração, secagem do solvente em estufa a 100°C; esfriou-se em dessecador e pesou-se a massa resultante.

$$\text{Lipídios Totais} = \frac{\text{peso dos lipídios (g)} \times 4 \times 100}{\text{peso da amostra (g)}}$$

4.8.4 Teor de Nitrogênios Totais

O processo consiste em deslocar o nitrogênio presente na amostra, transformando-o, juntamente com o ácido sulfúrico, em sulfato de amônia. Em seguida, deste sal obtido, desloca-se o nitrogênio na forma de amônia, recebendo-o em uma solução de ácido bórico. Através de método titulométrico, determina-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra. Este método subdivide-se em três etapas. São elas:

- I. Digestão;
- II. Destilação;
- III. Titulação.

$$\text{Cálculos: Nitrogênio \%} : (V \times 0,9506 / P) \times 100$$

V = volume gasto de H₂SO₄

Fator do ácido =0,9506

P = nº gramas da amostra

Este resultado multiplica-se por 6,25 e nos dará a quantidade da proteína da amostra.

$$\text{Proteína} = N\% \times 6,25$$

4.8.5 Fibras totais

O teor de fibra alimentar total foi determinado pelo método enzimático gravimétrico da AOAC (985.29).

$$\text{Fibra alimentar total} = (\text{RT-P-C-BT}) \times 100 / m$$

4.8.6 Carboidratos

Os carboidratos totais (livre de nitrogênio) foram determinados pela diferença entre a massa seca total (100%) e a soma das porcentagens, determinadas de proteína, lipídios, cinzas e umidade (Taco, 2011). A fração livre de nitrogênio representa a concentração de carboidratos totais, excluindo-se a fibra alimentar.

$$\text{Carboidratos Totais} = 100\% - (\% \text{Umidade} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Lipídios} + \% \text{Cinzas})$$

$$\text{Carboidratos Metabolizados} = 100\% - (\% \text{Umidade} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Lipídios} + \% \text{Cinzas} + \text{Fibras Totais})$$

4.8.7 Calorias

A energia alimentar foi expressa em Kilocalorias (Kcal). O valor energético foi calculado a partir dos teores em proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando-se o coeficiente que leva em consideração o calor de combustão para cada um desses grupos de compostos. Foi utilizado o coeficiente 4, 4 e 9 (Kcal), para proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente (Taco, 2011).

$$\text{Kcal} = (4x \text{ g proteínas} + 4x \text{ g carboidratos} + 9x \text{ g lipídios}) \text{ kcal/g}$$

4.8.8 Determinação dos teores de minerais:

Os minerais presentes nas amostras foram determinados quantitativamente para o Ca, Mg, Zn, Mn, Fe, Na e K. As análises foram feitas em duplicata baseando-se no método da AOAC (1980). As amostras foram calcinadas a 500°C durante 10-12h, até que se constatasse a decomposição de toda a matéria orgânica. As cinzas obtidas foram solubilizadas em ácido clorídrico 1:1 (v/v) e transferidas para balões volumétricos, completando-se o volume de 100mL com água deionizada. As leituras de absorbância de cada mineral foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica Varian Modelo 3030.

Os teores acima obtidos na análise da composição centesimal foram convertidos em mg/100g de fruto fresco.

5 Avaliação do Potencial Antioxidante por consumo de DPPH e ABTS⁺, das diferentes partes do fruto e de frutos *in natura* de *Psidium*

5.1 Análise do potencial antioxidante por consumo de DPPH

Os extratos etanólicos obtidos a partir das diferentes partes do fruto liofilizado PAA, PAB, PAC e PA (10mg) e os extratos dos frutos *in natura* P.A.1, P.F.1 e P.G.1 (100µL) foram usados para avaliar a capacidade antioxidante pelo método frente ao radical livre DPPH• de acordo com o método de Brandwilliams e colaboradores (1995), com modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. As medidas foram feitas no comprimento de onda 492 nm.

Uma alíquota de 30 µL dos extratos etanólicos foi diluída em diferentes concentrações em etanol. Em seguida são adicionados 270 mL de DPPH• (0,5µM) e após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, à proteção da luz. O controle consistiu da amostra diluída apenas em etanol sem DPPH•. O cálculo da % de inibição foi feito de acordo com a Equação abaixo:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (\text{Absorbância}/\text{média da absorbância do controle}) \times 100$$

As análises foram feitas em triplicata e os resultados de CI₅₀ expressos em µg/mL, mas foram adaptadas para representação g/g DPPH• empregando-se a equação abaixo para comparação com resultados descritos na literatura (Rufino, 2010).

$$[(\% \text{ de Inibição da amostra} \times \text{massa de extrato (g) referente a 1g fruto fresco}) \times 1\text{g de DPPH}]/50\% \text{ da massa de DPPH}$$

5.2 Ensaio Frente ao radical livre ABTS^{•+}

O ensaio frente ao radical livre ABTS^{•+} foi baseado no método desenvolvido por Re e colaboradores (1999) com modificações. O ABTS^{•+} foi preparado pela reação de uma absorção de ABTS^{•+} 0,8 M com persulfato de potássio 5mM e deixou-se a mistura ao abrigo da luz a temperatura ambiente (25°C) por 12 horas antes do uso (Re *et al.*, 1999). A solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol e lida a absorbância de $0,9 \pm 0,1$ em 620nm. Foram pesadas alíquotas de 10mg das duplicatas de PAc, solubilizados em 1 mL de DMSO e, em seguida, diluído para uma concentração a 1mg/mL; retirou-se uma alíquota de 100µL de cada amostra e fez-se diluições sucessivas na ordem de 1:1 (v/v) em DMSO, na placa, obtendo-se concentrações entre 100µg/mL a 0,78µg/mL. Em seguida, adicionou-se 270µL da solução de ABTS^{•+} (0,8 M) em todos, deixou-se reagir por 15 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi feita em um comprimento de onda de 492 nm. As análises foram feitas em triplicata para cada duplicata de PAc utilizando-se apenas DMSO e ABTS^{•+} como solução controle. O cálculo da percentagem de inibição foi feito de acordo com a Equação :

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (\text{Absorbância}/\text{média da absorbância do controle}) \times 100$$

A concentração final foi expressa em µg de compostos antioxidantes /ml de extrato.

5.3 Determinação de fenólicos/flavonoides totais

O teor de fenólicos totais foi estimado através de um ensaio colorimétrico com base em procedimentos descritos por (Molyneux, 2004) com modificações. Basicamente, 20 µL de cada extrato obtido das diferentes partes do fruto liofilizado de foram diluídos com 50µL de de água ultra-pura, em seguida, foram adicionados 50µL de reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 mg /mL). Após 8 minutos, em repouso ao abrigo da luz, a 20°C, 240 µL de carbonato de sódio (0,4%) foram adicionados à mistura. Em seguida, a microplaca contendo as amostras foi mantida novamente ao abrigo da luz durante 3 minutos. A absorbância foi lida a 620nm. O ácido gálico (0,5 µg/mL) foi utilizado para a construção da curva padrão. Os resultados das triplicatas foram expressos em miligrama de ácido gálico (AG) por grama de fruto fresco.

O teor de flavonoides foi determinado por um método colorimétrico (Jia, Tang e Wu, 1999) com modificações. Foram diluídos 10mg das amostras do fruto liofilizado em 1mL de DMSO e 30µL de cada foram misturados com 6,0µL de uma solução a 10% AlCl₃. Depois de mudar a sua cor, 6,0µL de acetato de potássio (1M) foram adicionados. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, 168 µL de água foram adicionados. As microplacas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 492 nm. O

padrão de quercetina (0,5 mg/mL diluído em etanol) foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em miligrama de compostos flavonoídicos presentes na amostra por 100g de fruto fresco.

5.4 Análise estatística

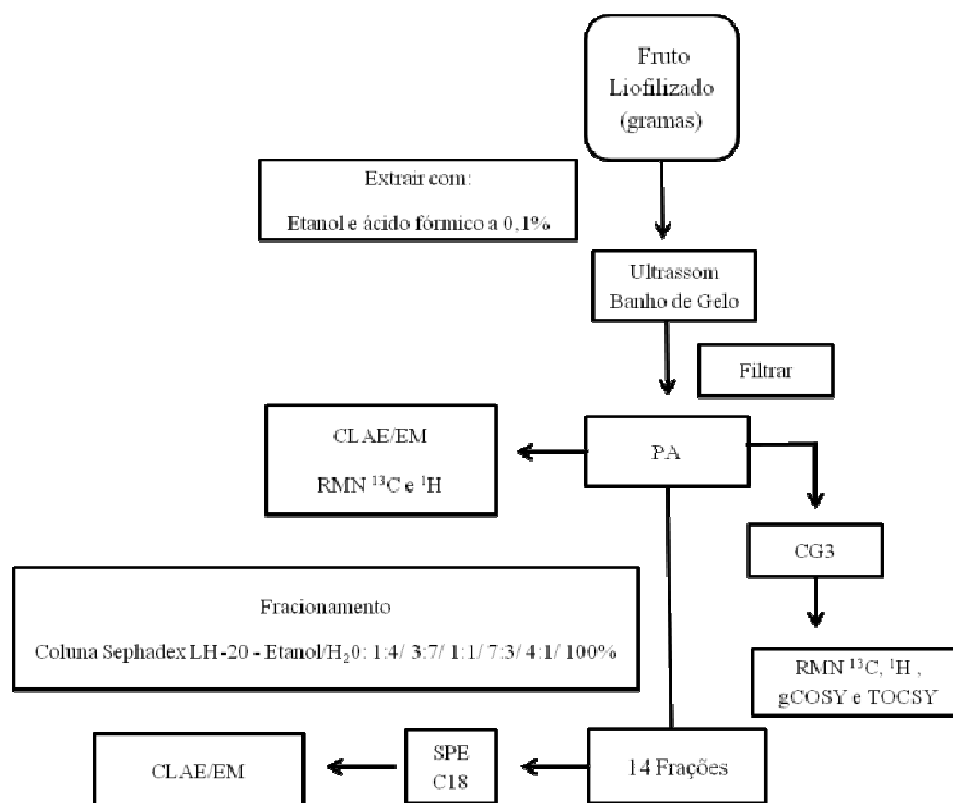
As análises estatísticas dos dados provenientes das análises da composição centesimal e dos potenciais antioxidante foram realizadas empregando-se o software Minitab™ 13. Avaliou-se a distribuição de dados empregando-se o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A comparação múltipla de dados, cuja distribuição é normal, foi realizada empregando-se uma análise paramétrica do tipo ANOVA (Análise de Variância) com um nível de significância de 5 ou 10% e empregando o teste Tukey. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para em 1% a 5% de probabilidade usando o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis.

6 Determinação dos constituintes contidos no extrato PA

6.1 Fracionamento do extrato etanólico PA

Sete gramas (7g) de PA foram dissolvidos, em quantidade suficiente de fase móvel, então aplicada suavemente no topo da coluna até a penetração completa na fase estacionária (Sephadex LH-20). Em seguida procedeu-se a eluição em um sistema EtOH/H₂O nas proporções de 1:4; 3:7; 1:1; 7:3; 4:1 (v/v) e 100% EtOH (Esquema 3). As 13 frações (FA a FM) foram coletadas manualmente, transferidas para balões âmbar e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C até volumes próximos a dez mililitros. O volume final de cada fração foi submetido à extração em fase sólida (SPE) empregando uma coluna empacotada com sílica modificada com C18, para possibilitar a retenção dos compostos fenólicos e eliminação de interferente.

Esquema 3. Obtenção das Frações (FA-FM) e CG3 a partir de PA.



6.2 Análise das frações obtidas por cromatografia por exclusão em gel

Após processo de filtração, uma alíquota de cada fração foi solubilizada em metanol, em seguida analisada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com injetor automático e uma bomba quaternária acoplado a um espectrômetro de massas da Thermo®, TQS (San Jose, CA, USA), ionizador por eletrospray operando nos modos positivo (+) e negativo (-), software XCalibur® para aquisição dos dados. As análises foram realizadas em uma coluna cromatográfica Kinetex, 2,6 µm, C18 100x4,6mm, Allcrom® com pré-coluna de mesma fase interna. Foram empregados os sistemas binários metanol (A) e água (B) (gradiente de 24%, isocrático, 5 min; 24-100%,5-10 min.): B: 5-100% (v / v) Metanol, 0-13 min; D – K: 20-100%(v / v), 13 min, PA: 0 -5 min, 5% isocrática, 5-35min, 5-100% (v / v) Metanol. Utilizou-se uma janela de 100-700m/z. O fluxo da fase móvel foi de 0.3 mL/min e o volume de amostra injetado foi 20µL. As condições de ionização foram: *spray voltage* 4500 kV, *sheath gas pressure* 35 psi, *auxiliar gas pressure* 5 psi, usando gás nitrogenio (pureza>99%), *capillary temperature* 250°C; *capillary offset* 35 V, *tube lens* 75 V, para o modo positivo e, para o modo negativo a única alteração foi no *spray voltage*, 3800 kV.

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados 5mg de cada uma das frações C, D, F, I, K, e de PA para análise por EMAR -TOF-ESI (+/-) e 25mg para a análise por RMN de ^1H .

7 Análise das frações por RMN ^{13}C e ^1H e por EMAR-ESI(+/-)

Alíquotas de aproximadamente 25 miligramas das amostras selecionadas para análise por RMN foram solubilizadas em solventes deuterados [CDCl_3 (δ_{H} 7,26 e δ_{C} 77,0), $\text{DMSO}-d_6$ (δ_{H} 2,4; δ_{C} 39,51) D_2O (δ_{H} 3,79)]. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro da Varian®, Inova 500 (11.7 T) a 500 MHz (^1H) e 126 MHz (^{13}C) no Laboratório de RMN da Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). Todas as análises foram feitas a 28°C (301.1K).

Alíquotas de 5mg das frações D, F e K e de PA foram solubilizadas em um mililitro de metanol e, em seguida, uma alíquota foi inserida no espectrômetro de massas de alta resolução com analisador tipo TOF e ionização por *eletrospray* nos modos positivo e negativo. O cálculo do erro entre os íons foi feito a partir da equação abaixo:

$$\text{erro} = (\text{massa molecular do íon observado na amostra} - \text{massa molecular do íon do padrão} \times 10^6) / \text{massa molecular do íon padrão}$$

8 Análise quantitativa de ácido ascórbico (AA) no fruto liofilizado e no fruto *in natura* por CLAE-EM

A análise de AA dos extratos dos frutos foi realizada baseando-se no método de análise de Valente *et al.* (2011) e Franke *et al.* (2004) com modificações.

8.1 Construção da curva de calibração do padrão de ácido L-(+)-ascórbico

A calibração foi feita a partir da injeção de solução padrão de ácido L-(+)-ascórbico em triplicata, em oito concentrações diferentes. O padrão de ácido L-(+)-ascórbico foi solubilizado em solução de 1% (v/v) ácido *m*-fosfórico (MPA).

8.2 Parâmetros cromatográficos

A fase móvel constituiu-se de um sistema de acetonitrila ACN a 5%/formiato de amônio a 1mM, MPA a 0,015% (pH 3,5), no modo isocrático. A calibração foi feita a partir da injeção de solução padrão de ácido L-(+)-ascórbico em triplicata.

O padrão de ácido L (+)-ascórbico foi solubilizado em solução de 1% (v/v) ácido *m*-fosfórico (MPA). Resultados foram expressos em miligramas de AA por 100 g de fruto fresco.

A seletividade do método foi avaliada utilizando-se o LC-EM através da comparação das respostas do tempo de retenção (t_R) do íon 175 presente nas amostras e na solução padrão. A resolução dos picos obtidos para cada amostra foi calculada de acordo com a equação abaixo:

Cálculo da Resolução (R_s) do pico de AA nas amostras:

$$R_s = [0,505(t_2 - t_1) / (w_2 - w_1)], \text{ onde } w = t_2 - t_1 (w = \text{largura do pico})$$

Viscosidade da ACN a 25°C em 95% de H₂O = 0,505

Os LD e LQ foram determinados pela menor concentração (5 µg/mL de AA) cromatográfica, cuja altura do pico do cromatograma da solução de AA se destacou à uma altura três vezes superior a média das oscilações de ruído da linha de base cromatográfica. O LD representa a menor concentração capaz de produzir um pico perfeitamente detectável (3 vezes superior a média das oscilações produzidas na linha de base (Snyder e Kirkland, 1979). Os resultados foram obtidos a partir das seguintes Equações: **LD = (3xDP)/b = (µg/mL)** e **LQ = (10xDP)/b = (µg/mL)**.

Onde, DP =Desvio Padrão das médias das áreas obtidas; b = coeficiente linear da reta obtida a partir da curva de calibração do padrão de AA.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Composição centesimal dos frutos de *Psidium acutangulum* DC

A Tabela 3 mostra as médias dos teores da composição centesimal dos frutos de araçá-pera liofilizados. Os teores de proteínas, carboidratos e calorias do fruto de *P. acutangulum* apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) entre as diferentes partes do fruto. Este fruto tem um teor de lipídios muito baixo de 0,077 g/100 g no epicarpo. Contudo, seu endocarpo (0,198 g/100 g) apresentou teor superior ao valor encontrado para goiaba vermelha (*P. guajava*, var. *mifera*, Lin) 0,10 g/100 g. Esta classe inclui glicerídeos, glicolipídeos, esteroides (colesterol e vitamina D), tocoferóis (vitamina K e E) e terpenos (vitamina A) (Vieira, 1998). As fibras são encontradas, em geral, sobretudo na casca dos frutos. Os teores de fibras solúveis para as diferentes partes do fruto mostram que não há problema em obter este macronutriente no fruto inteiro, uma vez que o teor de fibras totais não variou significativamente entre as diferentes partes do fruto. O teor de fibras totais no fruto inteiro (4,17g/100 g) foi um valor compatível com o encontrado em outros *Psidium* como a goiaba vermelha (*P. guajava*, var. *mifera*, Lin) (5,30g/100g fibras), e o araçá (*P. cattleyanum* Sabine) (5,2g g/100g). As goiabas são ricas em compostos fenólicos extraíveis das fibras solúveis, como compostos flavonoídicos, e fibras insolúveis, associadas às propriedades de polifenóis não extraíveis como taninos (Jimenez-Escrig *et al.*, 2001).

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o endocarpo do fruto contribui em maior porcentagem para o teor proteico da espécie. O teor de proteínas no fruto inteiro (2,36g/100g) mostrou-se maior que o determinado na goiaba branca (*P. guajava*, var. *pyrifera*, Lin 1,09g/100 g), e goiaba vermelha (*P. guajava*, var. *mifera*, Lin, 0,90 g/100 g), goiaba comum (*Psidium guajava* L. 1,10g/100 g e no araçá (*P. cattleyanum*, Sabine) 1,00 g/100 g. O endocarpo de fruto de araçá-pera apresenta o maior teor proteico, o que sugere uma maior abundância de glicoproteínas, responsável pela paredes celulares (Heldt, 2004).

O teor de carboidratos totais do araçá-pera ($14,28 \pm 0,48$ g/100g) demonstra que este fruto, mesmo não sendo um alimento amiláceo, como grãos e tubérculos, é uma boa fonte para reserva energética, tendo a vantagem de ser pouco calórico (67,27 kcal) em comparação a alimentos ricos em carboidratos como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) que apresenta 36,2g de carboidratos/100g, porém, mais calórico 151kcal/100g (Taco, 2011). Os açúcares mais frequentemente encontrados são a frutose, glucose, galactose e manose (Vieira, 1998).

Tabela 3. Análise Centesimal e Nutricional de diferentes partes dos frutos de araçá-pera liofilizados.

	epicarpo	Endocarpo	fruto inteiro	resíduo de sementes
*(g/100g) ¹				
Cinzas ¹	0,789±0,041	0,798±0,015	0,766±0,262	0,126±0,035
*Proteínas Totais	1,866±0,076 ^a	3,287±0,302 ^b	2,360±0,276 ^{ac}	0,857±0,144 ^d
Lipídios Totais ^e	0,036±0,006	0,198±0,012	0,077±0,000	0,045±0,002
Fibras Solúveis ^f	0,97±0,66	0,27±0,66	0,99±0,67	0,000±0,000
Fibras Insolúveis ^f	3,65±0,17	2,88±0,01	3,18±0,02	6,05±0,26
*Carboidratos Totais ^{2,3}	14,79±0,05 ^a	13,20±0,29 ^b	14,28±0,48 ^{ac}	16,46±0,17 ^d
Carboidratos Metabolizáveis	10,17±0,05	10,05±0,29	10,11±0,47	10,41±0,17
**Calorias ⁴	66,97±0,16 ^a	67,75±0,03 ^{ab}	67,27±1,05 ^a	69,67±0,13 ^c

1 Média de 2 determinações ± o desvio padrão; 2 Umidade=82,51±0,15; 3 Obtidos por diferença (100-(umidade+proteína+lipídeos+cinzas) e adição de fibras totais no somatório no caso dos carboidratos metabolizáveis; 4 Valor calórico em Cal/100g (não inclui a fibra). *Distribuição normal com nível de significância em P≤0,05; ** Distribuição normal com nível de significância em P≤0,10; a-d: valores antecidos pela mesma letra são estatisticamente iguais; e: distribuição não normal e distinguíveis entre si; f: distribuição não normal e indistinguíveis entre si.

O teor de cinzas não foi estatisticamente diferente entre as partes do fruto. Inteiro apresentou teor maior (0,76g/100 g) que o da goiaba branca (*P. guajava*, var. *pyrifera*, Lin 0,5g/100g), e goiaba comum (*Psidium guajava* L. 0,5g/100g). O teor de cinzas se refere ao resíduo inorgânico que contém cálcio, magnésio, ferro, fósforo, sódio e componentes minerais como Ca, Zn, Mn (Franco, 2004). Comparando-se os valores de minerais encontrados nesta matriz com os dados da tabela brasileira de composição de alimentos, observou-se que as quantidades desses minerais são superiores a de outros frutos de outras espécies de *Psidium*.

A goiaba branca apresenta teores de Mg (7mg/100g), Fe (0,2mg/100g), Cu (0,04mg/100g), Mn (0,07mg/100g). O teor de potássio (K) para os frutos analisados foi superior ao encontrado em frutos conhecidos por sua riqueza neste nutriente como a castanha-do-Brasil (*Berthletia excelsa* H.B.K., 519,9 mg/100g). Frutos amazônicos apresentam alto teor deste elemento devido à riqueza de potássio do solo (Orrutéa *et al.*, 2012). As médias dos valores apresentados na Tabela 4 estão dentro do limite estabelecido pela (Anvisa, 2005).

Tabela 4. Concentração de elementos (macro e micro) minerais nas diferentes partes dos frutos de araçá-pera liofilizados, faixa linear e comprimento de onda (λ) nos quais foram identificados.

	epicarpo	endocarpo	fruto inteiro	resíduo de sementes	faixa linear (mg/L)	λ (nm)
	(mg/100g)					
Ca	tr	tr	Tr	tr	0,2-0,8	422,7
Mg ^d	61,99±3,52	74,43±3,21	73,98±1,93	12,17±1,52	0,15-0,5	285,2
K ^d	1.517±7,43	1.444,41±24,55	1.665,40±20,49	258,16±6,36	0,4-0,8	766,5
Na	tr	tr	Tr	tr	0,3-0,6	589,0
Mn ^d	1.199±0,084	0,999±0,014	1.264±0,077	0,345±0,148	0,2-1,0	279,5
Cu ^d	0,360±0,028	0,605±0,035	0,410±0,014	0,370±0,014	0,2-1,5	324,8
Zn	tr	tr	Tr	tr	0,2-0,3	213,9
*Fe	0,915±0,02 ^a	1,644±0,148 ^b	0,749±0,0141 ^{ab}	0,130±0,014 ^c	0,2-2,5	248,3

tr = valores abaixo do limite de quantificação (traço). * Distribuição normal com nível de significância em $P \leq 0,10$; a-c: valores antecedidos pela mesma letra são estatisticamente iguais; d: distribuição não-normal e indistinguíveis entre si.

9.2 Potencial antioxidante do extrato dos extratos etanólicos das diferentes partes de *P. acutangulum* liofilizado e dos extratos hidroalcoólicos dos frutos de *Psidium* sp. *in natura*

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos para o material liofilizado e para o *in natura* foram expressos em grama por 100g de fruto (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), e mostram que os resíduos de sementes apresentam potencial antioxidante maior que dos extratos obtidos das outras partes do fruto.

Dos frutos *in natura*, para efeito de comparação, o teste foi realizado também para frutos das espécies goiaba-da-costa-rica e goiaba vermelha. A composição química dos compostos antioxidantes do *P. guajava* já é bem descrita na literatura, ao contrário dos demais araçás. O ensaio biológico *in vitro* utilizando o radical livre DPPH• mede a capacidade das substâncias em doar hidrogênio radicalar a este radical, desta maneira, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior sua atividade. Os radicais formados precisam ser estáveis, ou seja, estas substâncias precisam ser capazes de estabilizar, por ressonância ou deslocalização o elétron do radical formado. Nos testes realizados para os extratos obtidos, observou-se que as amostras apresentaram atividade baixa (epicarpo) a moderada (endocarpo, resíduos de sementes e fruto *in natura*).

O ensaio frente ao radical ABTS⁺• foi realizado apenas para os extratos que demonstraram melhor resposta frente ao radical livre DPPH•. Este é um ensaio que se baseia na capacidade de antioxidantes eliminar os radicais ABTS⁺•. A atividade foi comparada ao resultado da atividade do ácido L(+)-ascórbico (Tabela 3). O resíduo das sementes dos frutos de araçá-pera apresentou maior atividade frente ao radical DPPH•. Resíduos de frutos são fontes promissoras de antioxidantes naturais (Sousa e Vieira, 2011). O extrato do fruto *in natura* apresentou resultado próximo ao do padrão de ácido ascórbico (6,21± 0,035µg/mL) e revelou-se bem mais ativo que os da goiaba vermelha e da goiaba-da-costa-rica sob as mesmas condições.

Os teores de fenólicos totais nas amostras avaliados variou de 603,6 (epicarpo) a 785,7 (resíduos de semente) mgEAG/ 100g (Tabela 5). O valor de fenólicos totais para o fruto mostrou-se superior (481,8 mgEAG/ 100g) a do araçá amarelo (*Psidium cattleianum* var. *Lucidum*, 292,03 mgEAG/100g de fruto) de acordo com a de Biegelmeyer e colaboradores (2011) determinaram um teor de fenólicos totais de 1279mg/100g de polpa de fruta fresca para o araçá-pera. Os frutos de *P. acutangulum* D.C. apresentam valores de fenólicos totais superiores aos determinados por McCook-Russell e colaboradores (2012) para *P. cattleianum* (443,9 ±15,9 mg/100g de fruto fresco) e *P. guajava* (195,2±11,1 mg EAG/100g de fruto). Alguns frutos exóticos apresentam valor menor de fenólicos totais como os determinados em saptilha (*Manilkara zapota*(L.) P. Rayen, 13,5±1.1 mg de EAG/100 g), e para o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr., 38,1±0.7 mg de EAG/100 g), valores acima de 80mg/100g foram considerados teores elevados de compostos fenólicos totais em frutos como o murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth.), a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), e o tamarindo (*Tamarindus indica* L., 81,7±4.0 a 159,9±5,6 mg de EAG/100 g) (Almeida *et al.*, 2011).

O conteúdo de flavonoides totais deste fruto variou de 46,1 (PAa) a 82,7 (PAc) mg de equivalente de quercetina / 100g de fruto. Na goiaba vermelha o teor de flavonoides totais foi determinado em 39.36 ± 3.56 mg de equivalente de quercetina / 100g de fruto por Okuda e colaboradores (Okuda, Hatano e Yazaki, 1984).

Tabela 5. Fenóis totais (FenT), flavonoides totais (FlavT), e atividade antioxidante em extratos de frutos liofilizados de *Psidium acutangulum*.

Amostra	FenT (mgGAE/100 g)	FlavT (mgQ/100 g)	DPPH		
			IC ₅₀ (µg/mL)	g/gDPPH	g/gQ
PA	481,8±22,6 ^a	25,7±4,2 ^a	201,30±22,00 ^a	332,17±36,30 ^a	42,31±4,62 ^a
PAa	603,6±11,8 ^{ab}	46,1±3,4 ^b	152,30±2,54 ^b	191,98±3,20 ^b	24,46±0,41 ^b
PAb	315,1±68,5 ^c	17,1±2,6 ^{ac}	171,28±11,13 ^b	406,52±26,42 ^c	51,79±3,37 ^c
PAc	785,7±86,6 ^d	82,7±3,7 ^d	67,14±2,80 ^c	41,29±1,72 ^d	5,26±0,22 ^d

média±DesvioPadrão das triplicatas. ^{a-d}Letras diferentes sobrescritas entre os valores indicam diferenças significantes (Tukey's, p<0.05). EAG: equivalentes em ácido gálico. Q: Quercetina.

Por meio da análise de correlação verificou a associação significativa entre todas as partes do fruto e o potencial antioxidante das mesmas. As correlações foram positivas e confirmaram a relação inversamente proporcional entre teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante no teste *in vitro* frente ao radical livre DPPH; bem como confirmaram a correlação dos teores dos compostos bioativos flavonoídicos e vitamina C com a resposta frente ao DPPH (Tabela 8). Diante disso, pode-se constatar que os frutos de araçá-pera apresentam qualidades favoráveis a uma alimentação saudável podendo ser totalmente aproveitado.

Tabela 6. Correlação de Pearson (r) entre fenólicos/flavonoides totais, vitamina C e capacidade antioxidante (fruto fresco) de *P.acutangulum* DC.

R*	Fenólicos totais	Flavonoides totais	Vitamina C
Flavonoides totais	0,857		
Vitamina C	-0,896	-0,952	
DPPH	-0,975	-0,941	0,952

*fator de correlação, p < 0,01.

Avaliou-se a atividade antioxidante frente aos radicais DPPH• e ABTS+•, os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante por Equivalente de Vitamina C – VCEAC, cujos resultados estão apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

O extrato de frutos *in natura* de *P. acutangulum* (PA2) mostrou-se mais ativo (24,96±0,75 mgVCEAC/100g) que os extratos de *P. friedrichsthalianum* (PF2) (14,83±0,48 mgVCEAC/100g) e *P. guajava* (PG2) (8,65±0,53mgVCEAC/100g) frente ao radical DPPH. As capacidades antioxidantes frente ao cátion radical ABTS para os extratos *in natura* de *P. acutangulum* (PA2) e *P. friedrichsthalianum* (PF2) mostram-se estatisticamente semelhantes entre si (93,10±4,41 e 85,57±1,36 mgVCEAC/100g, respectivamente) e distintas em comparação ao extrato de *P. guajava* (67,39±7,91 mgVCEAC/100g).

A comparação entre os teores de AA (por CLAE-EM) e os valores de capacidade antioxidante por equivalente de Vitamina C (por DPPH e ABTS) para os extratos *in natura* dessas três espécies de goiaba revelou correlações de Pearson positivas e moderadas ($r = 0,673$ e $r = 0,768$), bem como uma correlação intensa entre os dois ensaios antioxidantes ($r = 0,854$) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A análise dessas correlações também revelou que ambos os ensaios antioxidantes (DPPH e ABTS) apresentam tendências similares. Esses resultados sugerem que o principal agente responsável pela capacidade antioxidante presente em frutos frescos dessas três espécies de *Psidium* seja o ácido ascórbico. *Thaipong et al.*(2005) também observou uma forte correlação entre a capacidade antioxidante (FRAP) e os teores de vitamina C presentes em extrato aquoso de guava (*P. guajava*).

Tabela 7 Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a capacidade antioxidante e teor de ácido ascórbico em frutos de *Psidium spp.* (*in natura*).

	AA	ABTS
ABTS	0,673 ^a	
DPPH	0,768 ^a	0,854 ^b

^a Significativo em $p < 0,05$,

^b Significativo em $p < 0,01$.

Tabela 8. Valores de IC₅₀ (por DPPH) e VCEAC (por DPPH e ABTS), de frutos *in natura* *Psidium spp.*

Amostra	Coleta	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	VCEAC ^d (mg/100 g)	
			DPPH ^e	ABTS ^e
<i>P. acutangulum</i>	08/2013	27,85±4,35 ^a	24,96±0,75	93,10±4,41
	09/2013			
<i>P. friedrichsthalianum</i>	08/2013	35,09±1,93 ^b	14,83±0,48	85,57±1,36
	09/2013			
<i>P. guajava</i>	08/2013	52,73±16,37 ^c	17,30±1,07	33,69±3,96
	09/2013			

Média±DP das triplicatas. ^{a-c}Letras diferentes sobrescritas entre valores denotam diferença significativa (teste Tukey, $p < 0,05$). ^dVCEAC: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg de vitamina C/100 g fruto fresco). ^eDistribuição não-normal.

9.3 Determinação dos constituintes químicos presentes no extrato etanólico de frutos de *Psidium acutangulum* DC

O espectro de RMN de ^{13}C de PA (Figura 11) apresenta cerca de 71 sinais, sendo seis relativos a carbonos carboxílicos (169-175 ppm), sete anoméricos (91-104ppm) e 36 sinais relativos a carbonos carbinólicos (60-83ppm), e sinais de menor intensidade entre 13-52 ppm. O espectro de RMN de ^1H de PA apresenta sinais com deslocamentos químicos entre δ 3,0-4,0 e três dubletos em 4,0-5,1ppm, característicos de hidrogênios carbinólicos, e sinais de hidrogênios alílicos entre δ 0,5 – 1,5 (Figura 11). Além de sinais entre δ 0,8-2,9, um tripleto entre 1,03 a 1,06 ($J_1 = J_2 = 7\text{Hz}$) característicos de hidrogênios alifáticos alílicos, o que sugere a presença de compostos carboxílicos na amostra.

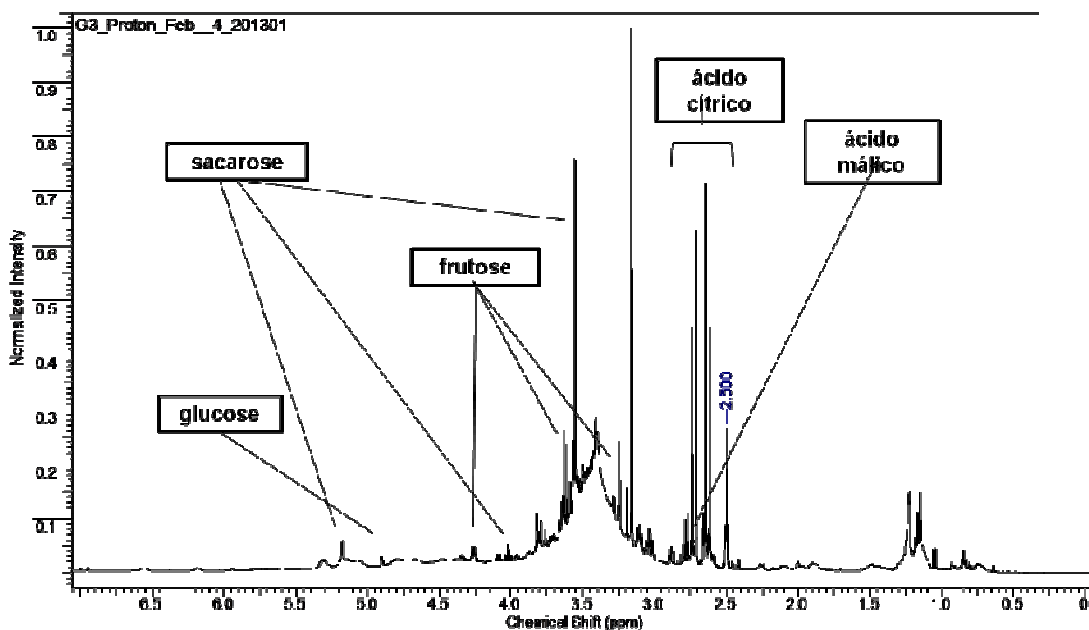


Figura 10 Espectro de RMN de ^1H de PA (DMSO- d_6).

A análise detalhada do espectro de RMN de ^{13}C de PA evidenciou sinais em δ 104,0 e 92,2 pertencem a carbonos anoméricos de unidades furanosídica e piranosídica da sacarose, respectivamente, além de outros dez sinais carbinólicos da sacarose (Figura 11).

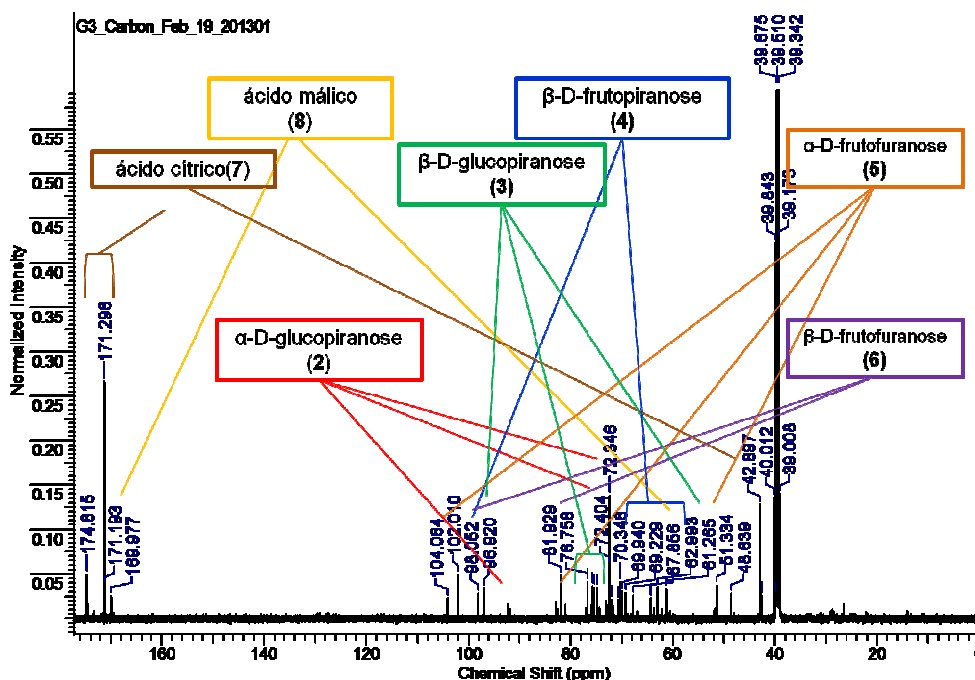


Figura 11 Espectro de RMN de ^{13}C de PA ($\text{DMSO-}d_6$).

Estes sinais foram comparados com os sinais obtidos a partir da análise de RMN de ^{13}C de CG3(1) um sólido cristalino amarelo esbranquiçado que foi isolado a partir do extrato etanólico de PA. Na análise de RMN de ^1H de CG3(1) observaram-se três tripletos em δ 3,43, 3,72 e um em 4,01ppm referentes a hidrogênios metínicos característicos de hidrogênios carbinólicos e um dubleto em 5,17 referentes a um hidrogênio anomérico (Tabela 9).

Pelos Espectros de correlação entre hidrogênios ($g\text{COSY } ^1\text{H-}^1\text{H}$ e $\text{TOCSY } ^1\text{H-}^1\text{H}$) (Figura 12) verificou-se também o acoplamento spin-spin dos prótons. As correlações estão apresentadas na Tabela 9. Pelas correlações obtidas pelos mapas, é possível verificar que a estrutura da substância isolada trata-se de um dímero formado por um anel piranosídico e, outro, furanosídico ligados pela ligação *1alfa-2'beta* típica dos glicosídeos, formando, assim um hidrogênio anomérico ligado ao carbono C1, que acopla somente com seu próton vizinho ligado ao C2, a unidade piranosídica liga-se à furanosídica por uma ligação glicosídica C1-C2' com perda de uma molécula de água.

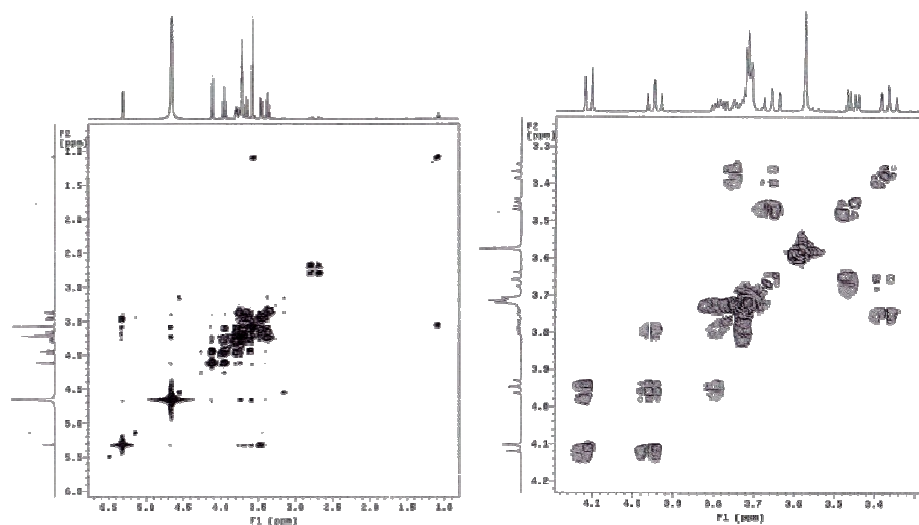


Figura 12. Espectro gCOSY ^1H - ^1H de CG3 com ampliação (D_2O , 11,7 T).

Os hidrogênios ligados ao C1' do anel furanosídico não acoplam com nenhum outro próton, formando, assim, o singlete característico na região de 3,69 ppm. A magnitude do valor da constante de acoplamento observado para o hidrogênio anomérico (H1) de CG3 (1) (δ_{H} 3,6, $J=3,5\text{Hz}$) definiu a configuração relativa como sendo *alfa* para a ligação glicosídica (Figura 15).

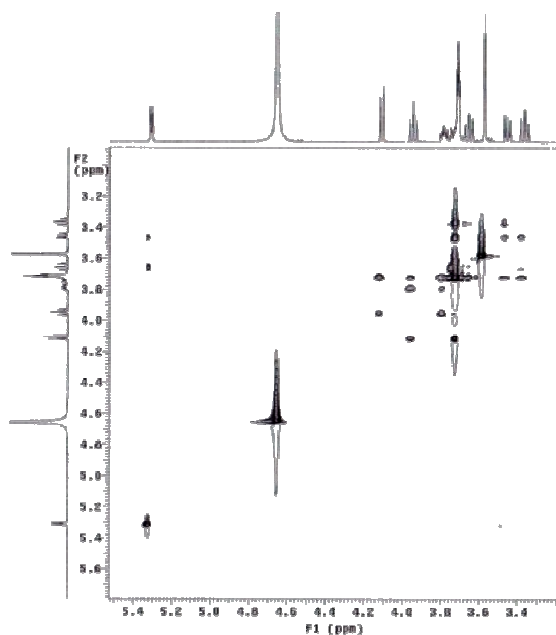


Figura 13. Espectro TOCSY ^1H - ^1H de CG3 (D_2O).

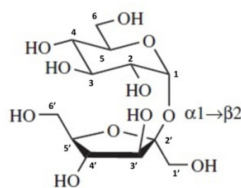


Figura 14. Estrutura da sacarose.

A análise comparativa dos dados espectroscópicos de CG3 com os descritos para o dissacarídeo sacarose permitiu confirmar que se trata da mesma substância (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Os deslocamentos de RMN de ^{13}C de PA apresentaram sinais na região de açúcares (60-83ppm) revelando um total de 36 carbonos pertencentes a unidades glicosídicas (Figura A1a). Subtraindo-se os sinais de CG3 do espectro têm-se os sinais referentes a mais três unidades glicosídicas, que, em mistura, podem apresentar os mesmos deslocamentos químicos devido à coalescência dos sinais. Os quatro deslocamentos de menor intensidade entre 60-80 ppm e dois em δ 102,0 e 104,1 referentes a carbonos anoméricos, indicam a presença de pelo menos mais três açúcares diferentes da sacarose. Por comparação com dados da literatura foram identificados como glucose, frutose (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), unidades glicosídicas que compõem a estrutura química da sacarose.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H de CG3 (**1**) e sacarose (δ , J em Hz)

Posição	1^a			1^a	
	^{13}C	Sacarose ^b (d) ^{13}C	Erro $\Delta\delta$	^1H ^c	TOCSY/gCOSY
C1	92,3	92,9	-0,6	5,37 <i>d</i> (1H, $J=3,5$)	H1-2,3,1/H-2
C2	73,1	73,5	-0,4	3,85 <i>m</i> (1H)	H2-1,3,4/H-1,3
C3	73,0	73,2	-0,2	3,72 <i>t</i> (1H)	H3-4,5,6/H-2,4
C4	69,9	70,2	-0,3	3,43 <i>t</i> (1H, $J^1=J^2=9,0$)	H4-3,4,5,6/H-3,5
C5	74,9	75,0	-0,1	3,78 <i>m</i> (1H)	H5-6,4,3/H-6,4
C6	61,1	61,2	-0,1	3,20 <i>dd</i> (2H, $J^1=8; J^2=3,5$)	H6-4,5,3/H-5
C1'	62,2	62,5	-0,3	3,69 <i>s</i> (2H)	H1'-3'/-
C2'	104,2	104,5	-0,3	-	-
C3'	77,1	77,6	-0,5	4,17 <i>d</i> (1H, $J=9$)	H3'-1',4',5'/H-4'
C4'	81,9	82,2	-0,3	4,01 <i>t</i> (1H, $J^1=J^2=5,5$)	H4'-5',6',3'/H-5',3'
C5'	74,9	75,0	-0,1	3,81 <i>m</i> (1H)	H5'-6',4',3'/H-6',4'
C6'	63,0	63,1	-0,1	3,52 <i>dd</i> (2H, $J^1=4; J^2=3,5$)	H6'-5,4''/H-5'

^aDados obtidos em D₂O, 11,7 T;

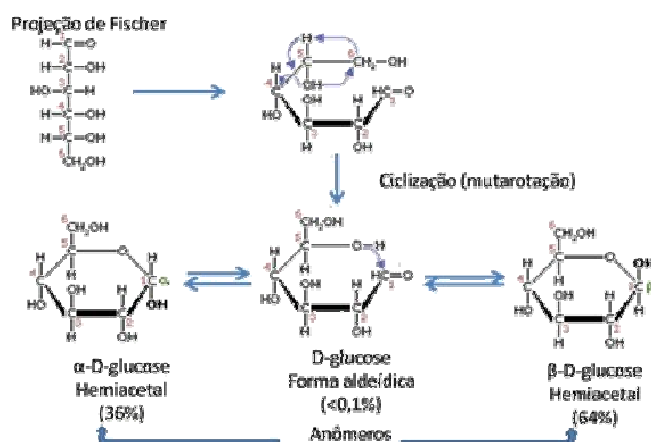
^bDados obtidos em D₂O, 11,7 T;

^cMultiplicidade estabelecida com base em experimento gCOSY ^1H - ^1H .

^d(Houg, Phadnis e Tarelli, 1976)

A forma com que um anômero da glicose cicliza determina sua configuração em α ou em β . O Esquema 4 mostra como um hemiacetal pode ser torcido de uma maneira ou de outra. Quando a ligação glicosídica ocorre, o álcool do carbono C5 pode ir para a posição para cima do plano (*beta*) ou para baixo do plano (*alfa*). O mesmo ocorre em relação às ligações glicosídicas entre monômeros de glicose ou entre frutose e glicose, ou ainda, entre outros monossacarídeos como a xilose, a raminose (Heldt, 2004). A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta os deslocamentos de RMN de ^{13}C da glicose comparados com os dados de RMN descritos na literatura (Asaoka, 1983).

Esquema 4. Mutarrotação da molécula de glicose (Heldt, 2004).



Estes açúcares foram identificados em frutos de *P.guajava* por Katayama (1965) por cromatografia em camada delgada e por Soares e colaboradores (2007) sacarose (11,37mg/100g de fruto), glicose (14,13mg/100g de fruto) e frutose (18,39mg/100g de fruto) por CLAE com Detector de Índice de Refração. Jimenez-Scrieg e colaboradores (2001) determinaram os teores de raminose ($0,53 \pm 0,02\text{mg}/100\text{g}$), fucose ($0,20 \pm 0,01 \text{mg}/100\text{g}$), arabinose ($1,21 \pm 0,34 \text{mg}/100\text{g}$), xilose ($11,51 \pm 1,06 \text{mg}/100\text{g}$), manose ($0,53 \pm 0,11 \text{mg}/100\text{g}$), galactose ($0,80 \pm 0,13$), glicose ($12,21 \pm 1,25 \text{mg}/100\text{g}$) empregando cromatografia gasosa. Estes açúcares compõem as hemiceluloses, importante constituinte da parede celular das espécies vegetais. Estas consistem em uma variedade de polissacarídeos que contém as hexoses D-glicose, D-manose, D-galactose e D-frutose, e pentoses D-xilose e L-arabinose adicionadas a sua estrutura (Heldt, 2004). A glicose está presente na parede celular das espécies vegetais, cuja constituição é de 90% de carboidratos e 10% de proteínas. A glicose é

o monômero que compõe a celulose, um polímero de glucose, carboidrato essencial para todos os organismos e junto com a frutose, outro carboidrato ocorrente em frutos, compõe a molécula da sacarose. Tem participação nas rotas do acetato, chiquimato, mevalonato e metileritritol fosfato na formação dos metabólitos secundários. Muitos metabólitos secundários importantes de uso medicinal apresentam uma unidade glicosídica em sua estrutura (Dewick e Wiley, 2009).

O espectro de massas de PA obtido por CLAE-EM evidencia picos característicos de dissacarídeo ($C_{12}H_{22}O_{11}$) no modo negativo m/z 341($M-H$)⁻ e, no modo positivo 365u ($[M+Na]$)⁺ e m/z 381 ($[M+K]$)⁺ (Figura 15). E sinais que sugerem a presença de monossacarídeos ($C_6H_{12}O_6$), m/z 179 ($M-H$)⁻, m/z 203 ($[M+Na]$)⁺ e m/z 219 ($[M+K]$)⁺ (Figura 14).

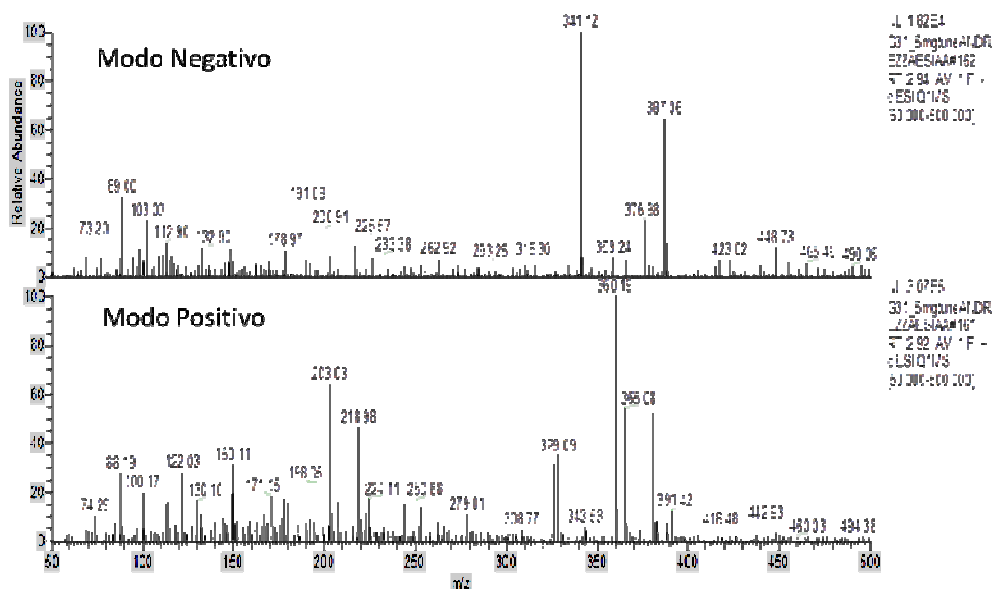


Figura 15. Espectro de massas de PA obtido por CLAE-EM-ESI (-/+).Gradiente 5-100% (ACN/Tampão).

Como o espectrograma de massas do extrato etanólico PA não apresentou uma boa separação cromatográfica (Figura 15), foi necessário realizar o fracionamento por cromatografia de exclusão em coluna aberta.

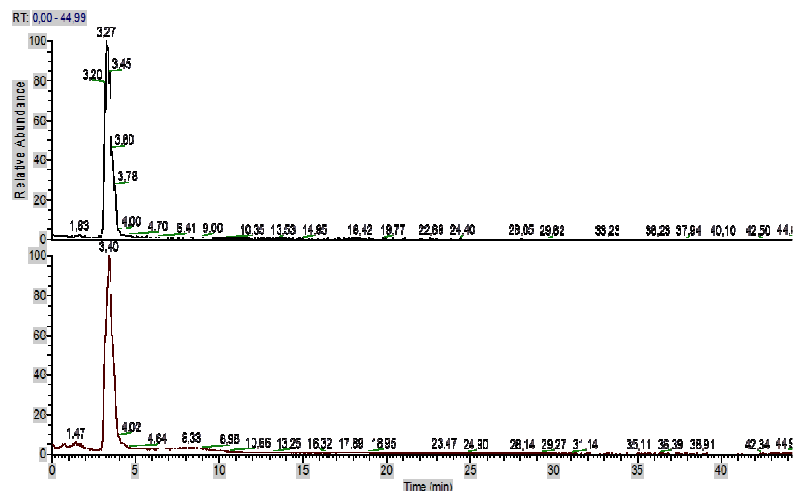


Figura 16. Espectrograma de massas do extrato etanólico do fruto liofilizado PA . Análise feita em modo gradiente de 5 a 100% em ACN. Coluna C18, 2,6 X 100mm, fluxo de 0,3mL/minuto.

O fracionamento resultou em treze frações, cujos perfis cromatográficos e espectroscópicos (RMN de ^1H) mostram-se semelhantes. As análises por CLAE-EM e EMAR em PA possibilitaram identificar sinais correspondentes à massa molecular de outros compostos presentes, como os sinais de pico em m/z 191 $[\text{M-H}]^-$, (Figura 19) relativo à massa molecular $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ do ácido cítrico (**8**) observado no espectro por CLAE-EM, no modo negativo (Figura 18).

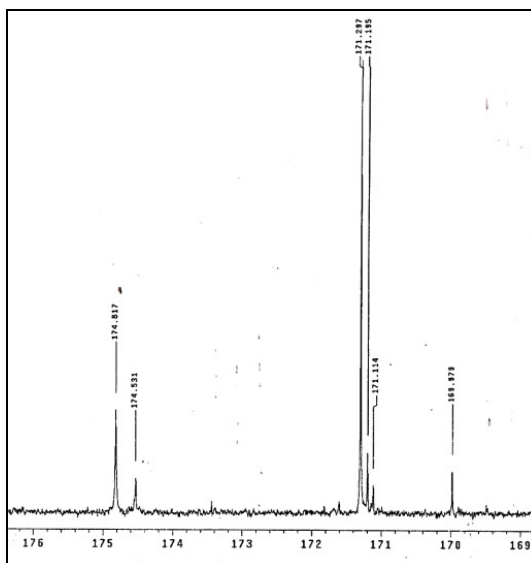


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de PA: sinais de carbonos carboxílicos das estruturas (**8**) e (**9**) (500MHz, DMSO-d_6 , δ 39,51).

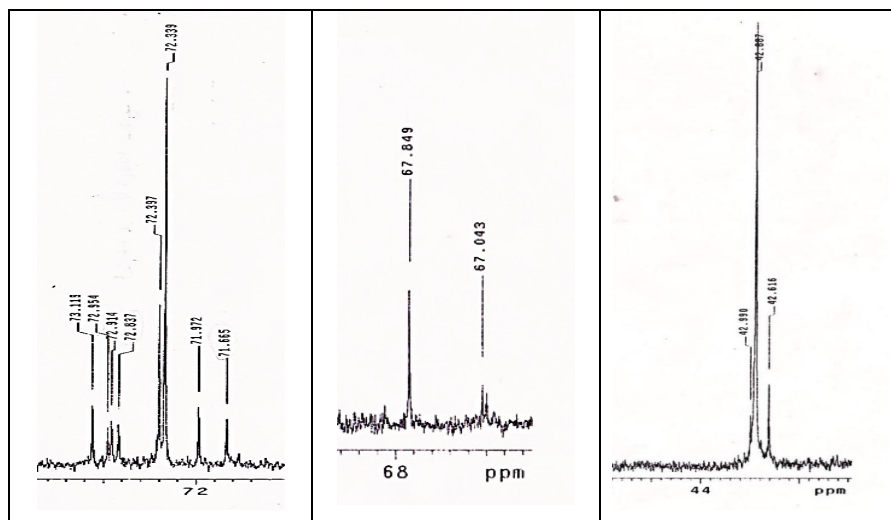


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C de PA: sinais de carbonos carbinólicos e metínico das estruturas (8) e (9) (500MHz, DMSO d_6 , δ 39,51).

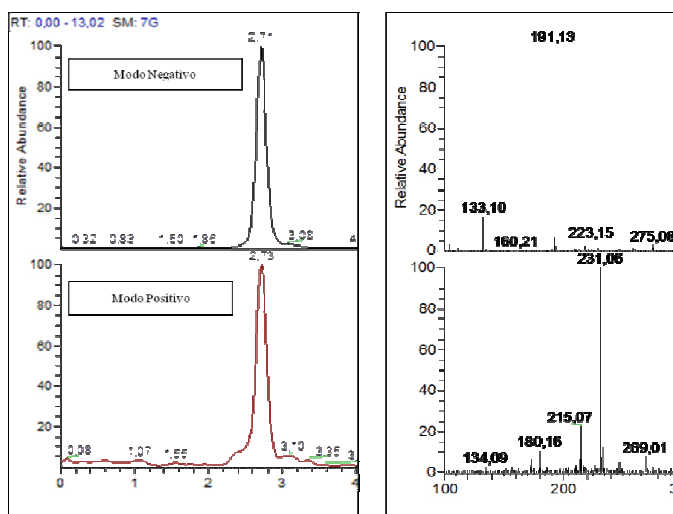


Figura 19. Espectrômetro de massas obtidos a partir de PA, m/z 191[M-H] $^-$ observado no modo negativo e positivo m/z 215 [M+Na] $^+$. Fase móvel:20% metanol, 10 minutos, modo isocrático. Coluna C18, 2,6x100mm, fluxo:0,3mL/minuto.

O extrato PA apresenta baixa complexidade química, observando-se co-eluição dos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios dos constituintes presentes. Também ocorreu coincidência nos tempos de retenção dos picos cromatográficos, sabe-se que estes ácidos orgânicos apresentam tempo de retenção muito próximos quando analisados por CLAE-EM em coluna ODS (Shui e Leong, 2002). A dificuldade em observar uma perfeita separação entre estes constituintes levou à necessidade do fracionamento de PA (item 2.5). Foram obtidas 14 frações que foram reagrupadas em quatro grupos que apresentaram perfil espectrométrico muito semelhante. Da fração A' foi isolado e identificado o constituinte (1), e

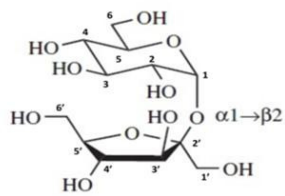
identificados (2 - 4). Na fração B' foi identificado o constituinte (5 - 6) e na fração C', o constituinte (7).

Metabólitos primários (açúcares, ácidos orgânicos) foram determinados por CLAE-EM e RMN nos frutos de araçá-pera. Na constituição química de frutos de *Psidium* spp. é possível encontrar aldeídos, cetonas, fenóis simples (Paniandy, Chane-Ming e Pieribattesti, 2000). Frutos de *P. guajava* apresentam teores de glicose 4.14% e sacarose 1.62% (Dweck, 2001). Um estudo fitoquímico do extrato acetônico das sementes de *Psidium guajava* levou ao isolamento de compostos glicosilados feniletanóides que apresentaram atividade biológica (Salib e Michael, 2004). O ácido cítrico (7) foi um importante produto natural encontrado nos frutos de *P. cattleianum* (McCook-Russell *et al.*, 2012), assim como o ácido málico (5) em frutos de *P. guajava* (Nadkarni *et al.*, 1999) e o malônico (6) (Kim *et al.*, 2011).

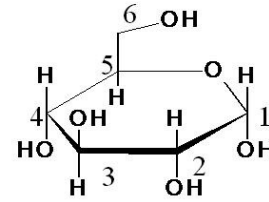
Tabela 10. Constituintes químicos identificados por RMN de ^{13}C e RMN de ^1H observados no extrato etanólico (PA) dos frutos de *P. acutangum* DC liofilizados.

Substancia	CLAE-EM (m/z) (Intensidade)	RMN	
		$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
Sacarose (1)	381,19 (25) [M+K] ⁺	5,37 (H-1, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,5), 3,85 (H-2, <i>m</i>); 3,72 (H-3, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,0); 3,43 (H-4, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,0); 3,78 (H-5, <i>m</i>), 3,20 (H-6, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,5e 8,0), 3,64 (H-2', <i>s</i>), 4,17 (H-3', <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0), 4,01 (H-4', <i>t</i> , <i>J</i> = 8,5), 3,81 (H-5', <i>m</i>)	92,3 (C-1), 73,1 (C-2), 73,0 (C-3), 69,9 (C-4), 74,9 (C-5), 61,1 (C-6), 62,2 (C-1'), 104,2 (C-2'), 77,1 (C-3'), 81,9 (C-4'), 74,9 (C-5'), 63,0 (C-6')
α -D-glucopirranose (2)			92,3 (C-1), 72,3 (C-2), 73,1 (C-3), 70,6 (C-4), 72,0 (C-5), 61,3 (C-6)
β -D-glucopirranose (3)		3,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0), 3,29 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0), 3,38-3,54 (<i>m</i>), 3,57 (<i>st</i>), 3,59 (<i>st</i>), 3,62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0), 3,64-71 (<i>m</i>), 3,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,5), 3,78 (<i>m</i>), 3,82 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0), 3,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0), 3,97 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 5,5), 4,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0 and 7,0), 4,08 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 7,0), 4,24 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,0), 4,26 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 8,0), 4,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5), 5,31 (<i>m</i>)	96,9 (C-1), 74,9 (C-2), 76,8 (C-3), 70,3 (C-4), 76,8 (C-5), 61,3 (C-6)
β -D-frutopirranose (4)	203,11 (23)[M+Na] ⁺ , 219,08 (100) [M+K] ⁺		64,4 (C-1), 98,0 (C-2), 67,8 (C-3), 69,9 (C-4), 69,2 (C-5), 63,0 (C-6)
α -D-frutofuranose (5)			63,8 (C-1), 104,2 (C-2), 83,0 (C-3), 75,9 (C-4), 81,0 (C-5), 61,1 (C-6)
β -D-frutofuranose (6)			63,0 (C-1), 102,0 (C-2), 75,8 (C-3), 75,4 (C-4), 81,9 (C-5), 63,0 (C-6)
Ácido cítrico (7)	191,12 (100) [M-H] ⁻ , 215,09 (11) [M+Na] ⁺ , 231,08 (35) [M+K] ⁺	2,63 (H-2a, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,5), 2,73 (H-2b, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,5)	171,3 (C-1), 42,9 (C-2), 72,3 (C-3), 174,5 (C-4)
Ácido málico (8)	133,12 (30) [M-H] ⁻ , 174,23 (69) [M+K] ⁺ , 173,04 (46)[M+K] ⁺	2,81 (H-3a, <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,5), 2,88(H-3b, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5and 7,5), 4,34 (H-2, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,5 and 5,0)	174,5 (C-4), 171,2 (C-1), 67,0 (C-2)

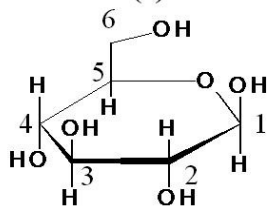
Quadro 2 Estruturas químicas das substancias identificadas no extrato etanólico (PA) dos frutos liofilizados de *P.acutangulum* DC.



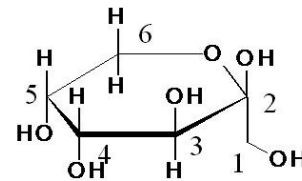
sacarose
(1)



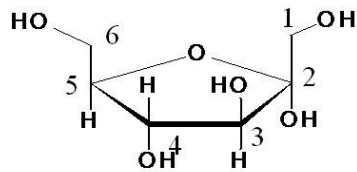
α -D-glucopiranoose
(2)



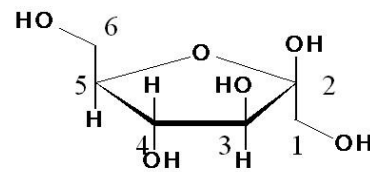
β -D-glucopiranoose
(3)



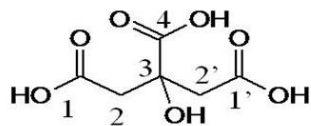
β -D-frutopiranoose
(4)



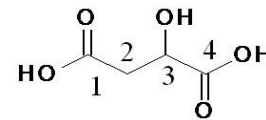
α -D-frutofuranose
(5)



β -D-frutofuranose
(6)



ácido cítrico
(7)



ácido málico
(8)

9.1 Determinação de ácido L(+)-ascórbico no fruto liofilizado e em frutos de *Psidium spp in natura*

Um método de extração e quantificação do ácido L(+)-ascórbico (AA) em frutos frescos de *P. acutangulum* foi desenvolvido empregando-se CLAE-EM. A Figura 17 apresenta o espectrograma obtido por CLAE-EM, a partir da solução padrão de AA. Observa-se o pico de m/z 175 referente ao AA (Figura 20.A). A curva analítica apresentada na Figura 22 foi obtida a partir das médias das áreas dos picos cromatográficos do padrão de AA em sete diferentes concentrações. O extrato de araçá-pera, ao ser analisado sob as mesmas condições cromatográficas que as do padrão de AA revelou um pico cromatográfico m/z 175, com o mesmo tempo de retenção do padrão de AA (3,73min \pm 0,00). Obteve-se uma resolução cromatográfica do pico de interesse (Equação 4.8.1) na faixa de aceitação para picos que sofrem sobreposição de outro adjacente, $0,4 < R_s < 1,3$ (Snyder e Kirkland, 1979). O coeficiente de correlação linear (r^2) para a curva de calibração obtida foi 0,9905. O método mostra boa linearidade na faixa de concentração testada (1-120 $\mu\text{g/mL}$). A partir da equação da reta, foi possível inferir a quantidade de AA, em $\mu\text{g/mL}$, na matriz dos frutos de araçá-pera *in natura*.

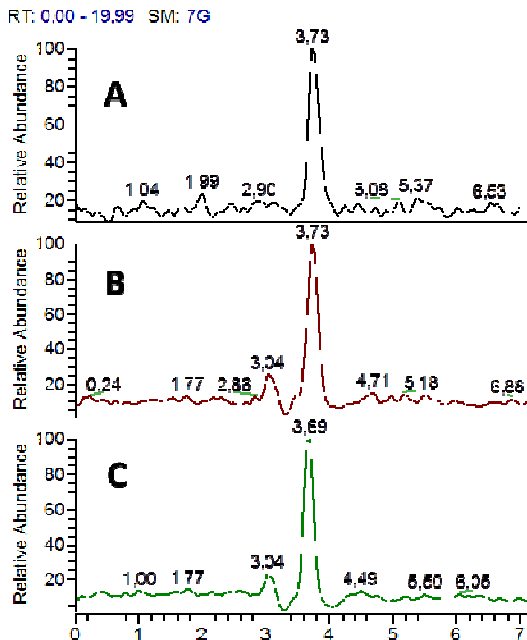


Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE-EM: A) Solução padrão de AA (40 $\mu\text{g/mL}$), B) araçá-pera *in natura*, C) extrato de araçá-pera com adição de padrão de AA (40 $\mu\text{g/mL}$).

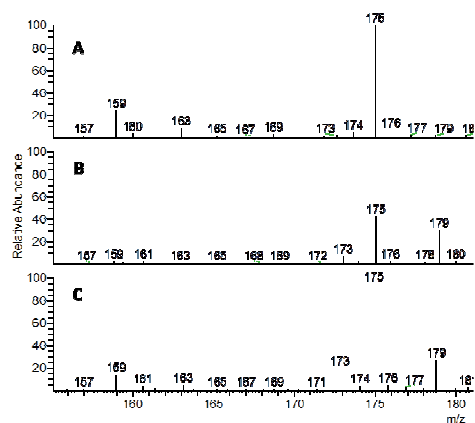


Figura 21. Espectrograma de massas : A) Solução padrão de AA (40 µg/mL), B) extrato de araçá-pera *in natura*, C) extrato de araçá-pera com adição de padrão de AA (40 µg/mL).

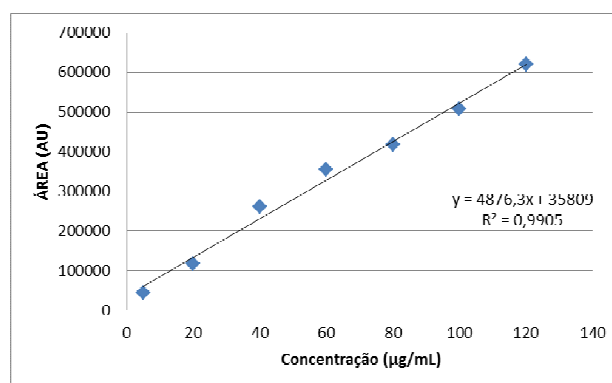


Figura 22. Curva de calibração de AA empregando-se EM como detector.

O limite LQ encontrado foi de 0,1304 µg/mL e de detecção (LD) para este método foi de 0,0391µg/mL. Este foi determinado com base na resposta mínima aceitável, a partir da menor concentração do padrão de AA (5,0µg/mL) que apresentou menor relação sinal/ruído (S/N) (Snyder e Kirkland, 1979; Ich, 1996). Valente e colaboradores (2011) determinaram um melhor LD de 0,035µg/mL e LQ 0,090 µg/mL para um método de análise de AA via CLAE-UV em frutos de *Psidium guajava*.

A escolha dos solventes, tanto na abertura da amostra quanto aqueles empregados na análise, pode ser determinante para a eficiência da extração de um determinado metabólito. A solução extratora ácida contendo dois estabilizantes, MPA e EDTA, foi a mais eficiente para a quantificação de vitamina C em matrizes de *Psidium*. O modo isocrático combinando 95% de tampão e 5% ACN, num fluxo de 0,3mL/min, e o efeito da temperatura mantida a 24°C para as amostras dentro do cromatógrafo e 10°C para os solventes e soluções

(mantidos sob refrigeração), proporcionou melhor resultado para o detector espectrofotométrico utilizado.

As figuras 19 e 20 mostram os picos referentes ao ácido L-(+)-ascórbico contido no fruto de araçá-pera liofilizado e *in natura*, bem como os resultados da determinação nas matrizes *in natura* de outros dois frutos de *Psidium*, a goiaba-da-costa-rica e de uma matriz já conhecida, a da goiaba-vermelha. A figura 20 (B e C) demonstra que houve redução do AA a ácido desidroascórbico, representado pelo pico *dem/z* 173 presente na matriz do fruto liofilizado. No fruto liofilizado, foram observados sinais apenas do produto de degradação do AA (Fig.21A).

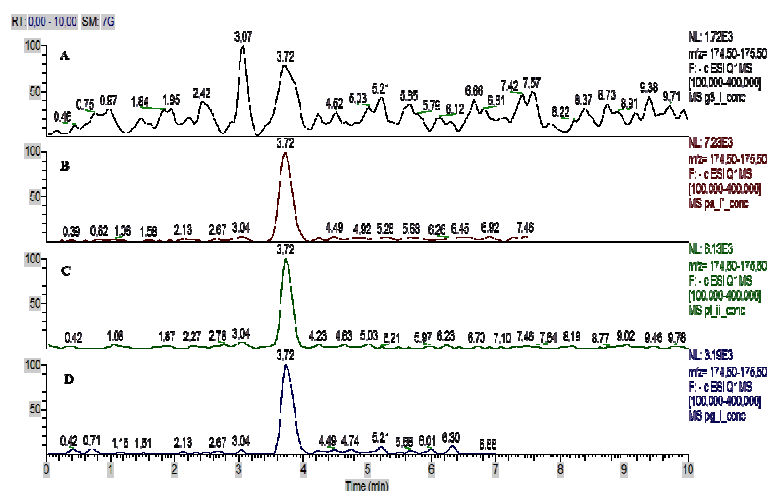


Figura 23. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM observados no range 175: A) *P.acutangulum* liofilizado (G3), B) araçá-pera (*P.acutangulum*), C) goiaba-da-costa-rica (*P. friedrichsthalianum*), D) goiaba vermelha (*P.guajava*).

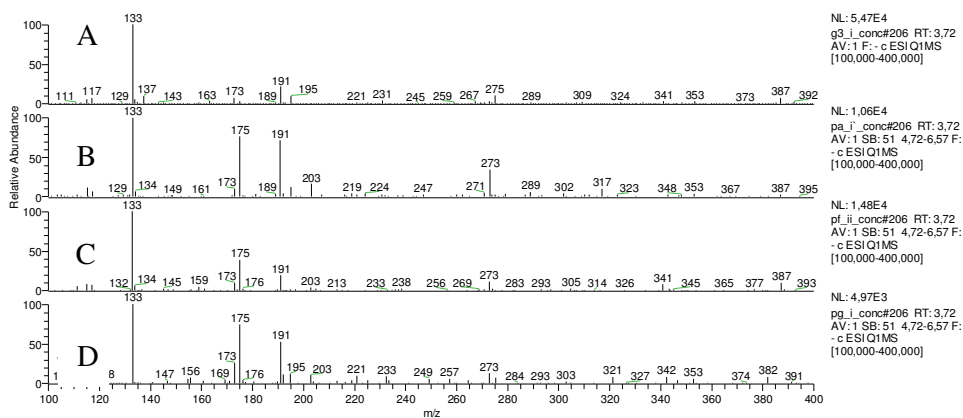


Figura 24. Espectrogramas de massas observados a partir dos cromatogramas da Figura19 A) *P.acutangulum* liofilizado (G3b), B) araçá-pera (*P.acutangulum*), C) goiaba-da-costa-rica (*P. friedrichsthalianum*), D) goiaba vermelha (*P.guajava*)

O método de análise desenvolvido mostrou-se eficiente para determinação do ácido ascórbico em matrizes de frutos de *Psidium*. A partir da interpolação do valor médio de área para o sinal de AA obtidos nos frutos de *Psidium*, empregando-se o cálculo da Equação da Reta obtida na curva analítica de padrão de AA, que permitiu determinar o teor de AA de 23,09±0,38 mg/100gramas de fruto de araçá-pera, foi 5,47± 0,11 mg/100gramas de fruto da goiaba-da-costa-rica e 1,68±0,93 mg/100gramas de fruto de goiaba vermelha.

A Tabela 11 apresenta o valor de ácido ascórbico juntamente com seu desvio padrão determinado nos frutos *in natura* de *P. acutangulum* DC (PA) e em G3b. Os espectros de massas apresentam sinais que sugerem a presença do produto de oxidação do AA, o ácido desidroascórbico, *m/z* 173, cujo teor não foi possível determinar por este método. Os frutos de *P. acutangulum* são tão ricos em vitamina C quanto frutos considerados fonte dessa vitamina, exemplo jamelão (*Syzygium cumini* Lamarck) 27,1mg/100g de fruto, espécies de maçãs (1,5 a 13,4mg/100g), espécies de mangas (17,4 a 24,9mg/100g) (Taco, 2011).

Table 1. Teor de ácido ascórbico nos frutos *in natura* de *Psidium* spp.

Amostra	Coleta	AA (mg/100g)
<i>P. acutangulum</i>	08/2013	20.14±7.28
	09/2013	74.32±1.23
<i>P. friedrichsthalianum</i>	08/2013	15.20±3.42
	09/2013	6.12±0.62
<i>P. guajava</i>	08/2013	8.47±1.35
	09/2013	3.92±1.75

* FF= fruto fresco; ** $R_s = [0,505(t_2 - t_1) / w_2 - w_1]$ = **0.4 < R_s < 1.3, onde $w = t_2 - t_1$ e viscosidade da ACN a 25°C em 95% de H₂O: 0,505; LD (µg/mL) = 0,039; LQ (µg/mL) = 0,1304

Tabela 11. Valores do teor de AA±Desvio Padrão, Resolução para o pico de AA analisado em *P. acutangulum* (P.A.), *P. friedrichsthalianum* (P.F.) e *P. guajava* (P.G.) e Limites de Detecção e Quantificação de AA.

Fruto	*AA (mg/100gFF)	**0.4 < R_s < 1.3	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
PA2	23,09±0,38	0,75		
PF2	5,47± 0,11	0,79		
PG2	2,31±0,18	0,73		

* FF= fruto fresco; ** $R_s = [0,505(t_2 - t_1) / w_2 - w_1]$, onde $w = t_2 - t_1$ e viscosidade da ACN a 25°C em 95% de H₂O: 0,505

O teor de vitamina C em frutos de *Psidium acutangulum* determinado neste trabalho é maior que o teor determinado no *Psidium guineenses* (araçá) ($4,7 \pm 0,5$ mg/100g de fruto fresco) (Genovese *et al.*, 2011). Valente e colaboradores (2011), Oliveira e colaboradores (2011) e Soares e colaboradores (2007) determinaram por CLAE-DAD teores superiores de AA em *P. guajavade* $65,8 \pm 2,7$, $85,9 \pm 10$, e $168,36$ mg/100g, respectivamente.

Os teores de AA podem variar significativamente nas matrizes de *Psidium* porque o teor de metabolitos contidos nessa matriz vegetal pode variar de acordo com a fenologia e condições de crescimento da espécie. Seu desenvolvimento depende, pois, de diferentes fatores como clima, estação, tratamento do solo (Falcão *et al.*, 1992).

Os constituintes químicos nesses frutos são capazes de prevenir ou diminuir danos oxidativos por radicais livres a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Naidu e Swamy, 1995; Dewick e Wiley, 2009), conseqüentemente o interesse na análise e determinação desses metabolitos tem crescido. A utilização de métodos como a CLAE acoplada a EM pode facilitar este tipo de análise de compostos mais polares, pois o método de separação por CLAE é muito sensível e rápido quando acoplado a uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Crews, **Rodríguez** e **Jaspars**, 1998).

8 CONCLUSÃO

A análise por RMN do extrato etanólico de PA possibilitou a determinação dos constituintes contidos nesta matriz e levou à conclusão da necessidade de se realizar o fracionamento do extrato etanólico bruto (PA). O estudo químico do extrato etanólico dos frutos de *P.acutangulum* resultou na identificação de CG3 (**1**), substância isolada cujos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C estão em concordância com os espectros da sacarose. O espectro de RMN de ^{13}C de PA também possibilitou a identificação de mais dois açúcares e dois ácidos carboxílicos. A comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C desses valores com os descritos para padrões levou a conclusão de que se tratavam da α -D-glucopiranosose (**2**), β -D-glucopiranosose (**3**), β -D-frutopiranosose (**4**), α -D-frutofuranose (**5**), β -D-frutofuranose (**6**), ácido cítrico (**7**), ácido málico (**8**).

Análise de variância dos resultados obtidos no ensaio frente ao DPPH• e ABTS⁺ evidenciaram a diferença entre a parte comestível e os resíduos de sementes dos frutos de araçá-pera. Os potenciais antioxidantes do extrato etanólico (PAc) apresentou maior atividade frente ao radical livre DPPH• em detrimento dos outros extratos PA, PAa, PAb. Os resultados do potencial antioxidante destes quatro extratos foram inversamente proporcionais aos teores de fenólicos e flavonoides totais respaldadas pelas correlações de Person (-0,975 e -0,941, $p < 0,05$), DPPH• e ABTS⁺ respectivamente. Levando-se em consideração os resultados obtidos, a capacidade antioxidante das amostras dos resíduos das sementes apresenta melhor atividade devido ao seu maior teor de fenólicos totais em relação à polpa do araçá-pera. O extrato hidroalcoólico (P.A.) apresentou potenciais antioxidantes frente aos radicais livres ABTS⁺ e DPPH• de $7,32 \pm 0,36$ e $34,50 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quanto ao fruto *in natura* em relação ao liofilizado, a atividade antioxidante foi superior. A análise de variância também possibilitou verificar a diferença entre os resultados da análise centesimal das diferentes partes do fruto revelando maior potencial proteico no endocarpo do fruto ($p < 0,05$).

O método para determinação de ácido L-(+)-ascórbico em frutos de araçá-pera por CLAE-EM mostrou-se eficiente para a conclusão do objetivo proposto, pois permitiu, desde a extração, uma análise rápida e inequívoca. Isto se confirma pelo tempo de retenção do analito e pela curva de calibração da reta obtida na análise da solução padrão de ácido ascórbico, valores de LQ e LD, que atendem aos critérios de precisão e sensibilidade

necessários ao método. Uma vez que se faz necessário um método rápido, robusto e preciso para determinação de substâncias sensíveis a temperaturas elevadas e à luz e que necessitam de um meio extrativo de baixo pH como é o caso da vitamina C. O fruto também apresenta, pelo método aqui desenvolvido, um teor de vitamina C superior ao teor de dois outros *Psidium* considerados exóticos, a goiaba-da-costa-rica (*P. friedrichsthalianum*) e, satisfatoriamente, superior a goiaba vermelha (*P. guajava L.*). Não foi possível determinar o teor de ácido ascórbico na amostra liofilizada pelo método desenvolvido. O processo de liofilização proporciona redução do volume da amostra e concentração dos seus constituintes, porém o tempo de estocagem deve ser levado em consideração quando se quer quantificar ou analisar constituintes que se oxidam facilmente como a vitamina C.

Diante dos resultados obtidos dos teores da análise da composição centesimal, teor de ácido ascórbico e os constituintes determinados por RMN e CLAE-EM e, pela ação antioxidante exibida, os frutos de araçá-pera podem ser apontados como boa fonte de antioxidantes naturais podendo ser mais efetiva e econômica que o uso de suplementos dietéticos na proteção do organismo contra os danos oxidativos e, portanto, o seu consumo deve ser estimulado. Os dados do presente estudo mostram o potencial nutricional e antioxidante desta espécie frutífera e podem ampliar o conhecimento sobre o potencial do araçá-pera para a nutrição humana e colaborar para preencher a tabela nutricional de alimentos (TACO).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, Aug 2011. ISSN 0963-9969. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293759400056 >.
- ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; FERREIRA, S. A. N. Caracterização física e química dos frutos de araçá-pera (*Psidium acutangulum DC*). v. 23, p. 213-217, 1993.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais 2005.**
- AOAC. **Official methods of analysis.** Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists 2005.
- ASAOKA, H. H-1-NMR AND C-13-NMR SPECTROSCOPY OF ALPHA-D-GLUCOSE AND ALPHA-D-MANNOSE WITH BORON(III) OXIDE AS SHIFT-REAGENT. **Carbohydrate Research**, v. 118, n. JUL, p. 302-307, 1983. ISSN 0008-6215. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983RD25600032 >.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 385-396, Jun-Aug 2004. ISSN 0889-1575. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222071900016 >.
- BEGUM, S. et al. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Natural Product Research**, v. 18, n. 2, p. 135-140, Apr 2004. ISSN 1478-6419. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186616700007 >.
- BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S. Two new triterpenoids from the fresh leaves of *Psidium guajava*. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1149-1152, Dec 2002. ISSN 0032-0943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180439100025 >.
- BEGUM, S. et al. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 4, p. 399-403, Oct 2002. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179114500009 >.
- BEGUM, S.; SIDDIQUI BINA, S.; HASSAN SYED, I. Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. **Nat Prod Lett**, v. 16, n. 3, p. 173-7, 2002. ISSN 1057-5634.
- BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S.; HASSAN, S. I. Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 3, p. 173-177, Jun 2002. ISSN 1057-5634. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175715800006 >.
- BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta.** Revista de Nutrição. Campinas. 12: 123-130 p. 1999.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. C991-C996, Sep 2011. ISSN 0022-1147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295076000023 >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959 1959. ISSN 0576-5544. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1959WM52500001 >.

BORGES, G. D. S. C. et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011. ISSN 0963-9969.

BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. USE OF A FREE-RADICAL METHOD TO EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995 1995. ISSN 0023-6438. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QH21700005 >.

CHEN, H.-Y.; YEN, G.-C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 686-694, 2007 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241044100033 >.

CORRÊA, L. C. **Similaridade genética em acessos de goiabeiras e araçazeiros: análises químicas e bioquímicas dos frutos**. 2010. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, Botucatu -S.P.

CREWS, P.; RODRÍGUES, J.; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**. 1998.

DA SILVA, J. D. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 3, p. 240-243, May-Jun 2003. ISSN 0882-5734. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182713600016 >.

DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES, A. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, Apr 28 2010. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276782100019 >.

DEMBITSKY, V. M. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011. ISSN 0963-9969.

DEWICK, P. M.; WILEY, J. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 3. 2009.

DWECK, A. C. A review of *Psidium guajava* **Malayan Journal of Medical Science** v. 8, p. 27-30, 2001.

FALCÃO, M. A. et al. **Crescimento e fenologia de araçá-pera (*Psidium acutangulum*)**. AMAZONAS: ACTA Amazônica. 22(3): 285-293 p. 1992.

FERREIRA, P. R. B. et al. Morphoanatomy, histochemistry and phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) leaves. **J. Pharm. Res.**, v. 4, n. 4, p. 942-944, 2011. ISSN 0974-6943. Disponível em: < <http://jpronline.info/article/view/6817/3468> >.

FRANCO, G. **Tabela de Composicao Química dos Alimentos**. 9. Sao Paulo: Atheneu, 2004.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), arapa-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263-1265, Apr 2000. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086572200048 >.

FRANKE, A. A. et al. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 1, p. 1-35, Feb 2004. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220267100001 >.

FRANZON, R. C. et al. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **EMBRAPA DOCS**, EMBRAPA Cerrados, p. 2176-5081, 2009 ISSN ON LINE: 266.

FU, L. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chem.**, v. 129, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 345-350, 2011. ISSN 0308-8146.

GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207-214, Jun 2008. ISSN 1082-0132. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259227500002 >.

GHOSH, P. et al. Triterpenoids from *Psidium guajava* with Biocidal Activity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 4, p. 504-507, Jul-Aug 2010. ISSN 0250-474X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285553200018 >.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry**. USA: Elsevier Academic Press: elsevier: 435 p. 2004.

HOUG, L.; PHADNIS, S. P.; TARELLI, E. The application of ¹³C-n.m.r. spectroscopy to products derived from sucrose. **Carbohydrate Research**, v. 47, p. 151-154, 1976.

ICH, I. C. O. H. **Q2b: Validation of analytical procedures: Methodology**: US FDA Federal Register. 62 1996.

INTERNATIONAL, A. **Association of Official Analytical CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists Chemists**. Washington, D.C. 1980.

JIA, Z.; TANG, M. C.; WU, J. M. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, Mar 1999. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078181100017 >.

JIMENEZ-ESCRIG, A. et al. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 11, p. 5489-93, 2001. ISSN 0021-8561.

JORDAN, M. J. et al. Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1421-1426, Feb 26 2003. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181087100051 >.

KATAYAMA, O. **Chemical composition of fruit of psidium guajava. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 12 n. 5, p. 176-8, 1965.

KIM, S.-H. et al. Metabolic Profiling and Predicting the Free Radical Scavenging Activity of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves According to Harvest Time by H-1-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 6, p. 1090-1097, Jun 2011. ISSN 0916-8451. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292487100010 >.

KIYOSHIMA, J. et al. **Medicine for prophylaxis and treatment of virus infection/Guava leaf extract for preventing and treating virus infection**. Application: JP
JP: (Yakult Honsha Co., Ltd., Japan). 5 pp p. 2000.

LIANG, Q. R.; QIAN, H.; YAO, W. R. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 1, p. 93-101, 2005 2005. ISSN 1469-0667. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229097800011 >.

MCCOOK-RUSSELL, K. P. et al. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, Sep 15 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000304433100060 >.

MILES, D. H.; DEL MEDEIROS, J. M. R.; CHITTAWONG, V. 3'-Formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone-metildihydrochalcona, a prospective new agrochemical from *Psidium acutangulum*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1548-1551, 1990.

- MILES, D. H. et al. **3'-Formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone from *Psidium acutangulum***. 1991a.
- _____. 3'-Formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone from *Psidium acutangulum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1131-1132, 1991b.
- MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity** 2004.
- NADKARNI, V. M. et al. Metabolic cost to rescuers of 15 : 2 vs 50 : 5 compression-ventilation ratio during simulated adult CPR. **Circulation**, v. 100, n. 18, p. 314-314, Nov 2 1999. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083417101642 >.
- NAIDU, C. V.; SWAMY, P. M. Effect of gibberellic acid on growth, biomass production and associated physiological parameters in some selected tree species. **Indian J. Plant Physiol.**, v. 38, n. 1, p. 15-17, 1995. ISSN 0019-5502.
- OKUDA, T.; HATANO, T.; YAZAKI, K. GUAVIN-B, AN ELLAGITANNIN OF NOVEL TYPE. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 3787-3788, 1984 1984. ISSN 0009-2363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984TN53700071 >.
- ORRUTÉA, A. G. et al. Mineralogia e reserva de K de Cambissolos submetidos a diferentes manejos após derrubada e queima da floresta na Amazônia Meridional **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 461 - 470, 2012.
- PANIANDY, J. C.; CHANE-MING, J.; PIERIBATTESTI, J. C. Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 2, p. 153-158, Mar-Apr 2000. ISSN 1041-2905. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088288000007 >.
- PERALTA-BOHORQUEZ, A. F. et al. Analysis of Volatile Compounds of Sour Guava (*Psidium guineense* Swartz) Fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 493-498, Nov-Dec 2010. ISSN 1041-2905. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284247000008 >.
- PINO, J. A.; MARBOT, R.; VASQUEZ, C. Characterization of volatiles in Costa Rican guava *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6023-6026, Oct 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178501300039 >.
- PINO JORGE, A.; MARBOT, R.; BELLO, A. Volatile compounds of *Psidium salutare* (H.B.K.) Berg. fruit. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 18, p. 5146-8, 2002. ISSN 0021-8561.
- PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 487-495, Aug 2006. ISSN 1364-5072. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239006200026 >.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, May 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080705000021 >.

REBOUÇAS, E. R.; GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. **Caracterização física de frutos e sementes de goiaba-da-costa-rica, Produzidos em Manaus, Amazonas. Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - Sao Paulo. 30: 546-548 p. 2008.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug 15 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255541700026 >.

RIBEIRO, J. E. H., M. J. G. VICENTINI, A. SOTHERS, C. A. COSTA, M. A. S. BRITO, J. M. SOUZA, M. A. D. MARTINS, L. H. P. LOHMANN, L. G. ASSUNÇÃO, P. A. C. L. PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F. M., M. R. PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke. Manaus - AM: **INPA-DFID**, 1999.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1660S-1664S, Jun 2000. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087462400003 >.

RUFINO, M. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **elsevier, food chemistry**, n. 121, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, Aug 15 2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277107100012 >.

SALIB, J. Y.; MICHAEL, H. N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from Psidium guajava seeds. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2091-2093, Jul 2004. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223527500011 >.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas úteis na Vida Amazonica**. Belem, Para: CIFOR, Imazon, 2005. ISBN 85-88808-02-1.

SHUI, G. H.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 89-96, Nov 15 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179186100009 >.

SILVA, O. et al. Application of high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry to the characterisation of ellagitannins from Terminalia macroptera roots. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 11, p. 1396-1401, Nov 2000. ISSN 0724-8741. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166489100009 >.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2. New York: Wiley Interscience, 1979.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 15-21, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240838400003 >.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

STEVENS, K. L.; BREKKE, J. E.; STERN, D. J. VOLATILE CONSTITUENTS IN GUAVA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 598-&, 1970. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970G822000012 >.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos** Campinas: NEPA - UNICAMP 2011.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. S157-S162, Dec 2009. ISSN 0749-1581. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272505700022 >.

THAIPONG, K. et al. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health** v. 36, p. 254-257, 2005.

VALENTE, A. et al. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2237-2242, Aug 2011. ISSN 0963-9969. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293759400068 >.

VIEIRA, E. C., GAZZINELLI, G., MARES-GUIA, M. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. Atheneu, 1998. 23 e 72.

WILLE, G. M. F. et al. **Desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de doce em massa com araçá-pêra (*Psidium acutangulum* D. C.) para o pequeno produtor**. Ciência e Agrotecnologia. 28: 1360-1366 p. 2004.

WILSON, P. G. et al. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **Am J Bot**, v. 88, n. 11, p. 2013-25, 2001. ISSN 0002-9122.

ZANATTA, C. F. et al. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, Nov 30 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233516600035 >.

ZHU, M. et al. Plant polyphenols: Biologically active compounds or non-selective binders to protein? **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 441-447, Feb 1997. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WE12900014 >.

Anexo A

Tabelas apresentando as triplicatas, médias e DP das análises centesimais realizadas.

	Lipídio Total (mg/100g)					
	Massa Seca (MS)			Massa Umida		
	% MS	MÉDIA	Desv.Pad	%MU	MEDIA	DesvPad
epicarpo	1,7552	1,7406	0,2624	0,0361	0,0364	0,006455
	1,9955			0,043		
	1,4712			0,0301		
endocarpo	8,9678	9,3709	0,3919	0,2132	0,198967	0,012827
	9,7505			0,1954		
	9,3943			0,1883		
fruto inteiro	3,8783	3,8649	0,0277	0,0779	0,077567	0,000666
	3,8833			0,078		
	3,8331			0,0768		
resíduos de sementes	2,2898	2,2429	0,1099	0,0459	0,045067	0,002079
	2,3214			0,0466		
	2,1173			0,0427		

	Proteína Total(mg/100g)					
	Massa Seca			Massa Umida		
	PROT%MS	MÉDIA	Desv.Pad	%MU	MÉDIA	DesvPad
Epicarpo	4,5562	4,5562	0,1850	1,822498	1,866882	0,076875
	4,5336			1,822498		
	4,8648			1,955649		
Endocarpo	7,7823	7,7823	0,7292	3,120716	3,287154	0,302808
	9,0240			3,636674		
	7,7408			3,104072		
fruto inteiro	6,6202	5,7471	0,6993	2,654689	2,360648	0,276675
	5,2374			2,105443		
	5,7471			2,321813		
resíduos de sementes	2,5399	1,9348	0,3550	1,023595	0,857157	0,14414
	1,9348			0,773938		
	1,9157			0,773938		

	Cinzas Total(mg/100g)					
	Massa Seca			Massa Umida		
	%MS	MÉDIA	Desv.Pad	%MU	MÉDIA	DesvPad
Epicarpo	4,1809	3,8830	0,2066	0,836185	0,789867	0,041314
	3,8830			0,776599		
	3,7841			0,756816		
endocarpo	4,0738	3,9732	0,0767	0,814764	0,79802	0,015333
	3,9233			0,784666		
	3,9732			0,794631		
fruto inteiro	4,1445	3,2686	1,2386	0,828893	0,766941	0,262935
	2,3928			0,478561		
	4,9668			0,993368		
resíduos de sementes	0,7671	0,6994	0,1787	0,153417	0,126388	0,035745
	0,6994			0,139888		
	0,4293			0,085858		

	Carboidratos Totais (mg/100g de Fruto)		
	Massa Umida		
	%MU	MEDIA	DESVPAD
epicarpo	14,79326	14,79489	0,050254
	14,84594		
	14,74548		
endocarpo	13,33936	13,2039	0,289685
	12,8713		
	13,40104		
fruto inteiro	13,92656	14,28288	0,477957
	14,82604		
	14,09606		
resíduos de sementes	16,26513	16,45943	0,170744
	16,52761		
	16,58554		

	Carboidratos Metabolizados (mg/100g de Fruto)		
	Massa Umida		
	%MU	MEDIA	DESVPAD
epicarpo	14,79326	14,79489	0,050254
	14,84594		
	14,74548		
endocarpo	13,33936	13,2039	0,289685
	12,8713		
	13,40104		
fruto inteiro	13,92656	14,28288	0,477957
	14,82604		
	14,09606		
resíduos de sementes	16,26513	16,45943	0,170744
	16,52761		
	16,58554		

	Calorias (kcal/100g)		
	%MU	MEDIA	DESVPAD
	epicarpo	66,78792	66,97469
67,06076			
67,07539			
endocarpo	67,7591	67,75491	0,037855
	67,7905		
	67,71514		
fruto inteiro	67,02609	67,27223	1,054385
	68,42791		
	66,36269		
resíduos de sementes	69,56799	69,67194	0,1333
	69,62561		
	69,82223		

Minerais						
MASSA SECA				MASSA		UMIDA
Amostra	Mg(mg)	Média	DesvPad	Amostra	Média	DesvPad
Epicarpo	64,48	61,99	3,52	12,90	12,40	0,70
	59,50			11,90		
Endocarpo	79,70	77,43	3,22	15,94	15,49	0,64
	75,15			15,03		
fruto inteiro	72,46	73,83	1,94	14,49	14,77	0,39
	75,20			15,04		
resíduos sementes	11,09	12,17	1,52	2,22	2,43	0,30
	13,24			2,65		
Mn(mg)						
epicarpo	1,14	1,20	0,08	0,23	0,24	0,02
	1,26			0,25		
endocarpo	0,99	1,00	0,01	0,20	0,20	0,00
	1,01			0,20		
fruto inteiro	1,21	1,26	0,08	0,24	0,25	0,02
	1,32			0,26		
resíduos sementes	0,24	0,34	0,15	0,05	0,07	0,03
	0,45			0,09		
Fe(mg)						
epicarpo	0,93	0,91	0,02	0,19	0,18	0,00
	0,90			0,18		
endocarpo	1,54	1,64	0,15	0,31	0,33	0,03
	1,75			0,35		
fruto inteiro	0,74	0,75	0,01	0,15	0,15	0,00
	0,76			0,15		
resíduos sementes	0,14	0,13	0,01	0,03	0,03	0,00
	0,12			0,02		
K(mg)						
epicarpo	1522,59	1517,34	7,43	304,52	303,47	1,49
	1512,08			302,42		
endocarpo	1461,77	1444,41	24,56	292,35	288,88	4,91
	1427,04			285,41		
fruto inteiro	1650,90	1665,40	20,50	330,18	333,08	4,10
	1679,89			335,98		
resíduos sementes	262,39	257,89	6,36	52,48	51,58	1,27
	253,39			50,68		
Cu(mg)						
epicarpo	0,38	0,36	0,03	0,08	0,07	0,01
	0,34			0,07		

endocarpo	0,63	0,60	0,04	0,13	0,12	0,01
	0,58			0,12		
fruto inteiro	0,40	0,41	0,01	0,08	0,08	0,00
	0,42			0,08		
resíduos sementes	0,36	0,37	0,01	0,07	0,07	0,00
	0,38			0,08		

Anexo C

Determinação de Fenólicos Totais

	Absorbância			Fenóis totais (mgEAG/g do extrato) Equação: $(Abs_{Amostra} \times 100) / Abs_{Ácido}$ Gálico			Média	DesvPad
epicarpo	0,0778	0,0706	0,0702	6,319038	5,734243	5,701754	5,918345	0,34739
endocarpo	0,0321	0,0318	0,0272	2,607212	2,582846	2,209227	2,466428	0,223076
fruto	0,0621	0,0616	0,0626	5,04386	5,003249	5,08447	5,04386	0,040611
resíduos	0,0833	0,0895	0,0854	6,765757	7,269331	6,936322	6,99047	0,256116
epicarpo'	0,0734	0,0746	0,0793	5,961663	6,059129	6,440871	6,153888	0,253267
endocarpo'	0,0487	0,0439	0,0491	3,955491	3,565627	3,987979	3,836366	0,235029
fruto'	0,0605	0,0562	0,0529	4,913905	4,564652	4,296621	4,591726	0,309531
resíduos'	0,105	0,1122	0,105	8,528265	9,11306	8,528265	8,723197	0,337632
padrão de ácido gálico	1,2752	1,2549	1,1635				1,2312	0,059502

Fenóis totais a partir das médias das duplicatas das amostras

mgEAG/100g de Fruto Fresco				
	epicarpo	endocarpo	fruto inteiro	resíduo sementes
Valores de Massa dos extratos para cálculo de conversão (g)	11,90	6,32	9,09	24,39g
	797,17	618,8004	832,3201	416,0982
	722,5146	613,0172	825,6186	447,0683
	718,4211	524,3418	839,0215	426,5881
Média	746,0352	585,3865	832,3201	429,9182
DesvPad	44,33129	52,94528	6,70145	15,75132

Flavonoides Totais

	Absorbância			Flavonoides Totais Equação: $(Abs_{Amostra} \times 100) / Abs_{Quercetina}$			Média	DesvPad
Epicarpo	0,1235	0,1092	0,109	4,198585	3,712433	3,705634	3,872218	0,282663
Endocarpo	0,0674	0,0919	0,0835	2,291374	3,124291	2,83872	2,751462	0,423259
Fruto	0,0796	0,1104	0,0933	2,706133	3,753229	3,171887	3,210416	0,524611
Resíduos	0,091	0,0855	0,0934	3,093694	2,906713	3,175286	3,058565	0,13769
epicarpo'	0,0964	0,1124	0,1127	3,277276	3,821223	3,831422	3,643307	0,317033
endocarpo'	0,1007	0,0999	0,097	3,423462	3,396265	3,297674	3,372467	0,066184
fruto'	0,1255	0,1084	0,0949	4,266579	3,685236	3,226281	3,726032	0,521347
resíduos'	0,1149	0,1099	0,0996	3,906214	3,736231	3,386066	3,67617	0,265225
Padrão de Quercetina	2,6063	3,0415	3,1766				2,941467	0,298019

	Flavonoides Totais (mg/100g de fruto)			Média	DesvPad	Valores de Massa dos extratos para cálculo de conversão
Epicarpo	49,98316	44,19563	44,11469	46,09783	1,122328	11,90
Endocarpo	14,22943	19,40185	17,62845	17,08658	1,210996	6,32
Fruto	21,64906	30,02583	25,37509	25,68333	2,600697	9,09
Resíduos	83,61328	78,55973	85,81846	82,66382	3,639702	24,39
epicarpo'	39,01519	45,49074	45,61216	43,3727	1,259368	11,90
endocarpo'	21,2597	21,0908	20,47856	20,94302	0,319481	6,21
fruto'	34,13263	29,48189	25,81025	29,80826	2,220041	8,00
resíduos'	105,5732	100,9791	91,51519	99,35585	5,060907	27,02