

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

GRACIELE DA SILVA CAMPELO BORGES

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS DIFERENTES FRAÇÕES
DOS FRUTOS DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Mart.) CULTIVADOS NO
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Florianópolis, SC

2013.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Borges, Graciele

Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no Estado de Santa Catarina / Graciele Borges ; orientadora, Roseane Fett - Florianópolis, SC, 2013.
165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. juçara. 3. palmito. 4. *Euterpe edulis* M. I. Fett, Roseane. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

GRACIELE DA SILVA CAMPELO BORGES

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS DIFERENTES FRAÇÕES
DOS FRUTOS DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Mart.) CULTIVADOS NO
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Roseane Fett.

Florianópolis, SC

2013.

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados avós, Waldir e
Zaura Campelo
“in memorian”*

*A minha querida e
amada mãe, Gilza
Campelo, por todo amor,
carinho, compreensão,
incentivo e fé que me fez
ir à busca dos meus
ideais e chegar tão
longe.
Meu grande exemplo de
vida!*

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras para agradecer e expressar a minha gratidão às pessoas que acreditaram e contribuíram para a realização dessa conquista

em minha vida, meu agradecimento em especial:

Ao grande Deus pelo dom da vida, força e proteção que venho recebendo ao longo da vida, permitindo o meu aperfeiçoamento constante, tanto profissional como espiritual.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos pela estrutura física e profissional.

A professora Dra. Roseane Fett, minha orientadora, ao longo desses cinco anos de pós-graduação, auxiliando, apoiando e buscando sempre o melhor para seus alunos. Agradeço professora pela oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa, pelo incentivo à docência e a grande confiança sempre depositada no meu trabalho.

Ao Luciano Gonzaga pelos ensinamentos, idéias, a contribuição e a participação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa. Obrigado por acreditar nesta pesquisa e pela amizade criada.

A professora Dra. Ana Carolina Costa Oliveira, que durante a realização deste trabalho sempre esteve disposta a ajudar de forma incansável contribuindo muito na área da analítica, com idéias e sugestões. Também quero agradecer a professora, pela ajuda na docência e o incentivo constante, obrigado por tudo e acima de tudo isso, a melhor recompensa é sua amizade.

As minhas queridas Siluana Seraglio, Isadora Pontalti e Isis Olivo, estagiárias no nosso laboratório, que me ajudaram muito na realização prática deste trabalho. Agradeço a colaboração, amizade e a descontração na rotina do dia-a-dia.

E como não agradecer a família *Química de Alimentos*. Obrigado queridos colegas a todos vocês, por toda ajuda recebida, pela “*mãozinha*” na despolpa interminável dos frutos de juçara tornando as tardes de trabalho mais alegres e descontraídas. Queridos colegas peço desculpa por não citar os nomes, somos uma família tão grande que faltariam linhas para descrever o nome de todos vocês, agradeço a todos que participaram do grupo de pesquisa ao longo desses cinco anos e com certeza vocês ficarão lembrança eternamente.

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
pela bolsa cedida.

Ao professor Dr. Paul Richard Momsen Miller, pelos seus ensinamentos sobre os frutos de juçara e pela parceria realizada para o desenvolvimento deste trabalho disponibilizando seus alunos e infraestrutura para a realização das coletas dos frutos.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa

Catarina (EPAGRI), pela doação de frutos e polpa de juçara para realização desse trabalho.

A Empresa Alicon, ao Andrey e Juliana pela atenção prestada, juntamente com a doação de polpas e frutos oriundos da região Norte do Estado de Santa Catarina.

Ao professor Gustavo Micke, por conceder seu laboratório para realizar a identificação e quantificação de compostos fenólicos e ácidos graxos nos frutos.

Ao professor Jorge Mancini pela colaboração e parceria na avaliação da atividade antioxidante celular e na identificação do perfil de ácidos graxos.

Em especial quero agradecer as pessoas que não se encontram neste mundo acadêmico, mas que sempre estiveram presentes contribuindo para o meu crescimento pessoal:

Ao meu pai Ubirajara Borges, por ter me proporcionado a dádiva da vida, pelo amor e pelos sábios ensinamentos de um pai.

Ao meu namorado e companheiro Paulo Eduardo Garcés por todo amor, carinho, apoio, paciência e compreensão ao longo dessa caminhada.

Aos meus queridos tios Jairo e Paulo Roberto Campelo presentes em minha vida, acreditando, contribuindo e dando amor e carinho em todos momentos mesmo com a grande distância.

“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino.”

Antoine de Saint-Exupery

BORGES, G. S. C. Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no Estado de Santa Catarina. 2013.

Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.165p.

RESUMO

A juçara ou “jussara” é um fruto arredondado de coloração violáceo-púrpuro, oriundos das palmeiras (*Euterpe edulis* M.) a espécie é encontrada na Mata Atlântica, desde o sul da Bahia até o Norte do Rio Grande do Sul. No Estado de Santa Catarina, a palmeira *Euterpe edulis* M. é popularmente conhecida como palmitreiro juçara jiçara, ou ripa. este caracteriza-se por produzir um palmito de excelente qualidade e com alto valor econômico. Entretanto, nos últimos anos a exploração inadequada da espécie vem causado sua extinção. A exploração dos frutos de juçara e a comercialização como bebida, polpa ou ainda frutos tornou-se uma forma de conciliar proteção ambiental da espécie com valorização econômica. O presente trabalho teve como propósito avaliar os compostos bioativos presentes em frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) utilizando métodos rápidos de preparo de amostra e separação de compostos como a cromatografia líquida de ultra eficiência e avaliar a atividade antioxidante dos frutos *in vivo* e *in vitro* correlacionando com seus compostos bioativos, além de avaliar a influência do estágio de maturação dos frutos cultivados em regiões distintas, sobre o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante. Através da metodologia desenvolvida para a extração de ácidos fenólicos por hidrólise ácida assistida por microondas e o emprego da metodologia desenvolvida de separação de compostos fenólicos por UPLC-DAD foi possível determinar a predominância de ácidos fenólicos (benzóico, cafeico, clorogênico, ferúlico, protocatecuico, siríngico, vanílico e p - cumárico) e flavonoides (quercetina e rutina), além do elevado conteúdo de antocianinas. Estes compostos contribuíram para elevada atividade antioxidante determinada por métodos químicos (DPPH, FRAP, β -caroteno), e atividade antioxidante celular em estudo com células Vero. Observou-se correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas com a atividade antioxidante total dos frutos. A fração lipídica dos frutos é composta de ácidos graxos insaturados, sendo que o ácido oléico está presente majoritariamente. Os resultados deste trabalho demonstram as diferenças na composição química dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) cultivado em diferentes regiões, influenciado

pelas condições edafoclimáticas e pelo estágio de maturação. Ressalta-se assim a importante composição dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) e seu potencial antioxidante com benefícios a saúde, assim sendo uma importante fonte de renda para a economia do Estado de Santa Catarina através da produção da bebida comercialmente chamada de bebida de juçara.

Palavras-chave: Açaí. Compostos fenólicos. *Euterpe edulis*. Juçara. Palmito

ABSTRACT

The juçara or "jussara" is a fruit rounded purplish-violet color, from the

palm (*Euterpe edulis* M.) the species is found in the Atlantic, from southern Bahia to northern Rio Grande do Sul in the state of Santa Catarina, palm *Euterpe edulis* M. is popularly known as palmitreiro “juçara”, “jiçara” or ripa. This is characterized by a palm produce excellent quality and high economic value. However, in recent years the inadequate exploitation of the species has caused their extinction. The exploitation of the fruits of juçara and marketing as a beverage, pulp or fruit has become a way of reconciling environmental protection with economic valuation of the species. This study aimed to evaluate the bioactive compounds present in fruits juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Using rapid methods of sample preparation and separation of compounds such as liquid chromatography ultra efficiency and evaluate the antioxidant activity of the fruit in vivo and in vitro correlating with its bioactive compounds, and to evaluate the influence of the maturation of the fruit grown in different regions on the content of bioactive compounds and antioxidant activity. Through the methodology developed for the extraction of phenolic acids by microwave-assisted acid hydrolysis and employment of the methodology developed for the separation of phenolic compounds by UPLC-DAD was possible to determine the predominant phenolic acids (benzoic, caffeic, chlorogenic, ferulic, protocatechuic, syringic, p -coumaric and vanillic) and flavonoids (quercetin and rutin), plus the high content of anthocyanins. These compounds contribute to antioxidant activity determined by chemical methods (DPPH, FRAP, β -carotene), and cellular antioxidant activity in a study with Vero cells. We observed a positive correlation between the content of phenolic compounds and anthocyanins monomer with the total antioxidant activity of the fruit. The lipid fraction of the fruit is composed of unsaturated fatty acids, with oleic acid is present mostly. The results of this study demonstrate the differences in the chemical composition of the fruits of juçara (*Euterpe edulis* M.) grown in different regions, influenced by environmental conditions and the maturation stage. It is emphasized so important composition of juçara fruit (*Euterpe edulis* M.) and its antioxidant potential health benefits, thus being an important source of for the economy of the State of Santa Catarina through the ion of commercially drink called drink juçara.

Keywords: Açaí. Phenolic compounds. *Euterpe edulis*. Juçara. Palm

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição das espécies *Euterpe edulis*, *Euterpe precatória*, *Euterpe oleracea* no Brasil 32
- Figura 2** - Acúmulo de antocianinas em frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) ao longo de uma estação, em três diferentes regiões de cultivo na Amazônia 45
- Figura 3** - Índice de inibição da oxidação do β -caroteno 71
- Figura 4** - Separação de 10 ácidos fenólicos padrão com detecção em $\lambda = 280$ nm (A), 254nm (B), 320nm (C) 89
- Figura 5**- Separação dos ácidos fenólicos em extrato de polpa de juçara (*Euterpe edulis*M.) detectado a $\lambda = 280$ nm 93
- Figura 6** - Cromatograma de identificação de compostos fenólicos presentes em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) obtidos por hidrólise ácida, detectado a $\lambda = 280$ nm 110
- Figura 7** - Cromatograma de identificação de compostos fenólicos presentes em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) obtidos por extração assistida em micro-ondas, detectado a $\lambda = 280$ nm 112
- Figura 8** - Separação de compostos fenólicos extraídos da polpa de juçara através da hidrólise ácida em assistida por micro-ondas nas seguintes condições: tempo de extração 210 segundos, potência do micro-ondas 100 W e relação massa:solvente (1:10, m/v) detectado a $\lambda = 280$ nm 113
- Figura 9** - Fluxograma do processamento da polpa de juçara para a extração dos compostos fenólicos e fração lipídica 125
- Figura 10** - Conteúdo de fenólicos totais ao longo da maturação em frutos de juçara coletados na região da Lagoa da Conceição 135
- Figura 11** - Conteúdo de fenólicos totais em frutos de juçara em diferentes períodos de maturação coletados na região da Costeira do baé 136
- a 12** - Capacidade inibição do radical DPPH por extratos de frutos de juçara coletados na região da Lagoa da Conceição em diferentes períodos de colheita 138
- 13** - Avaliação do poder redutor de ferro dos frutos de juçara em diferentes períodos de colheita provenientes da região da Lagoa da Conceição 139
- Figura 14** - Atividade antioxidante dos frutos de juçara avaliados pelo método DPPH (EC 50) em diferentes períodos de colheita

oriundas da Costeira do Pirajubáé	140
Figura 15 - Avaliação do poder redutor de ferro dos frutos de juçara em diferentes períodos de colheita Provenientes da Costeira do Pirajubáé	141
Figura 16 - Perfil de ácidos graxos presentes em frutos de juçara ao longo da maturação coletados na região da Lagoa da Conceição	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de polpa de açai (<i>Euterpe oleracea</i>) e juçara (<i>Euterpe edulis</i>)	37
Tabela 2 - Composição química dos frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) cultivados no Estado de Santa Catarina	38
Tabela 3 - Composição mineral da polpa de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) e juçara (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	39
Tabela 4 - Condições edafoclimáticas das regiões de cultivo de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	58
Tabela 5 - Parâmetros do espectrômetro de massas	61
Tabela 6 - Conteúdo de fenólicos totais e flavanois totais na polpa desengordurada (PD) e fração lipídica (FL) de frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	66
Tabela 7 - Compostos fenólicos majoritários identificados em juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	68
Tabela 8 - Avaliação da atividade antioxidante em polpa de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) desengordurada	69
Tabela 9 - Avaliação do efeito protetor do extrato de juçara após 24 h do estresse oxidativo induzido em células Vero	72
Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração lipídica dos frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	74
Tabela 11 - Linearidade do método de separação de ácidos fenólicos	90
Tabela 12 - Parâmetros analíticos do método	92
Tabela 13 - Perfil de ácidos fenólicos em polpa de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	94
Tabela 14 - Avaliação da recuperação dos analitos em estudo, em três níveis de recuperação, empregando métodos de extração de fenólicos livres em polpa de juçara	109
Tabela 15 - Comparação entre a recuperação dos compostos extraídos por hidrólise ácida e por hidrólise assistida por microondas, em polpa de juçara	114
Tabela 16 - Avaliação do rendimento da polpa, conteúdo de água e proteína dos frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) coletados na Lagoa da Conceição	129
Tabela 17 - Avaliação do rendimento da polpa, conteúdo de umidade e proteína dos frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) coletados na Costeira do Pirajubáé	130

Tabela 18 - Avaliação de cor e conteúdo de antocianinas monoméricas totais em frutos de juçara durante a maturação coletados na Lagoa da Conceição	132
Tabela 19 - Avaliação de cor e do conteúdo de antocianinas monoméricas totais em frutos de juçara durante a maturação coletados na Costeira do Pirajubá	133

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1.1 Identificação botânica e ocorrência do gênero <i>Euterpe Martius</i>	31
1.2 Exploração das espécies juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) e açai (<i>Euterpe oleracea</i> M.) e sua importância econômica	33
1.3 Processamento de frutos de açai (<i>Euterpe oleracea</i> M.) e juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.): aspectos tecnológicos	34
1.4 Composição química e compostos bioativos de açai (<i>Euterpe oleracea</i> M.) e juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	36
1.5 Influência dos fatores agrônomicos sobre a composição dos frutos de juçara (<i>Euterpe edulis</i>)	44
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS JUÇARA (<i>Euterpe edulis</i> M.) NA CULTURA DE CÉLULAS VERO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS USANDO HPLC-ESI-MS/MS	49
Resumo	51
1 Introdução	53
2 Material e Métodos	57
2.1 Amostragem	57
2.2 Materiais	58
2.3 Preparo das amostras	59
2.4 Extração dos compostos fenólicos da polpa desengordurada e da fração lipídica	59
2.5 Identificação de compostos fenólicos utilizando HPLC-ESI-MS/MS	60
2.6 Determinação dos compostos fenólicos totais (FT), flavanois totais (FVT) e antocianinas monoméricas totais (AMT)	62
2.7 Avaliação da atividade antioxidante	63
Avaliação da atividade antioxidante celular	64
Análise de ácidos graxos	65
2.10 Análise Estatística	66
3 Resultados e Discussão	66
3.1 Fenólicos totais (FT), flavanois (FVT) e antocianinas monoméricas totais (AMT)	66
3.2 Perfil de compostos fenólicos	67

3.3 Atividade antioxidante	68
3.4 Atividade antioxidante celular	71
3.5 Perfil de ácidos graxos	73
4 Conclusões	75

CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPA DE JUÇARA (*Euterpe edulis*M.)UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC-DAD) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 77

Resumo	79
1 Introdução	80
2 Material e Métodos	83
2.1 Materiais	83
2.2 Reagentes	84
2.3 Hidrólise	84
2.4 Condições cromatográficas	84
2.5 Parâmetros de desempenho analítico	85
2.6 Avaliação da atividade antioxidante	86
2.6.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH	86
2.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP	86
2.7 Análise Estatística	86
3. Resultados e Discussão	87
3.1 Otimização das condições cromatográficas	87
3.2 Parâmetros de desempenho analítico	90
3.3 Aplicação do método em polpa de juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.)	92
3.4 Avaliação da atividade antioxidante	94
4 Conclusões	95

CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODOC RÁPIDO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM JUÇARA (*Euterpe edulis* M.)UTILIZANDO A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM COMPARAÇÃO À HIDRÓLISE ÁCIDA 97

Resumo	99
1 Introdução	101

2 Material e Métodos	103
2.1 Material	103
2.2 Reagentes	103
2.3 Extração dos ácidos fenólicos livres	104
2.4 Extração dos ácidos fenólicos conjugados	106
2.4.1 Hidrólise alcalina	106
2.4.2 Hidrólise ácida	106
2.4.3 Hidrólise ácida assistida por micro-ondas	106
2.5 Condições cromatográficas	107
2.6 Análise Estatística	107
3 Resultados e Discussão	108
3.1 Identificação de ácidos fenólicos livres	108
3.2 Identificação de ácidos fenólicos conjugados	110
4 Conclusões	115

CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRUTA JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) CULTIVADA NA MATA ATLÂNTICA DURANTE O CICLO DE MATURAÇÃO

117

Resumo	119
1 Introdução	121
2 Material e Métodos	122
2.1 Amostragem	122
2.2 Reagentes	123
2.3 Preparo do material	123
2.4 Preparo dos extratos	124
2.5 Determinação do conteúdo de fenólicos totais (FT)	126
2.6 Quantificação das antocianinas monoméricas totais (AMT)	126
2.7 Análise instrumental de cor	126
2.8 Avaliação da atividade antioxidante	127
- - - perfil de ácidos graxos	128
- - - análise Estatística	128
- - - Resultados e Discussão	128
3.1 Análises químicas	128
3.2 Avaliação da cor e conteúdo de antocianinas monoméricas totais	131
3.3 Conteúdo de fenólicos totais (FT)	135
3.4 Avaliação da atividade antioxidante	137
3.5 Perfil de ácidos graxos	142

4 Conclusões	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
REFERÊNCIAS	147
APÊNDICE	163
APÊNDICE A - Curva padrão de ácido gálico, utilizado no método de Folin-Ciocalteu para determinação de fenólicos totais.	163
APÊNDICE B - Curva do extrato de juçara <i>versus</i> a inibição do radical DPPH	164
APÊNDICE C – Curva padrão de Trolox, utilizado no método do poder de redução do ferro (FRAP)	165

INTRODUÇÃO

A juçara ou “jussara” é um fruto arredondado, de cor violáceo-púrpuro, quase negro quando maduro, com polpa fina que recobre uma semente dura, similar aos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004; DE BRITO et al., 2007; BORGES et al., 2011a). Oriundo das palmeiras (*Euterpe edulis* M.), a espécie é encontrada na Mata Atlântica, desde o sul da Bahia até o Norte do Rio Grande do Sul (IADEROZA et al., 1992; EMBRAPA, 1998; EPAGRI, 1998; HENDERSON, 2000).

No Estado de Santa Catarina, a palmeira (*Euterpe edulis* M.) é popularmente conhecida como palmiteiro “jussara”, juçara, jiçara, ou ripa, este caracteriza-se por produzir um palmito de excelente qualidade, com alto valor econômico (IADEROZA et al., 1992; MAC FADEN, 2005; MARTINS-CORDER, et al. 2006).

A espécie *E. edulis* M. foi amplamente explorada durante muitos anos para a extração do palmito representando uma fonte de renda no Estado de Santa Catarina, porém para a extração do palmito é necessário o corte da palmeira. Devido ao corte indiscriminado das palmeiras e a exploração clandestina dentro da Mata Atlântica, a espécie *Euterpe edulis* M. tornou-se uma preocupação devido seu risco de extinção (MAC FADEN, 2005; SILVA, 2005; MARTINS-CORDER, et al. 2006; SCHULTZ, 2008; SCHIRMANN, 2009).

Nos últimos anos, os frutos de juçara vêm sendo estudados em relação a sua similaridade aos frutos de açaí. Os frutos de juçara estão sendo utilizados para produção de uma bebida popularmente chamada de polpa de juçara, ou até mesmo de açaí, como uma alternativa aos agricultores nos Estados do Sul (MAC FADDEN, 2005; SCHULTZ, 2008; SCHIRMANN, 2009; BORGES et al., 2011b). Esta bebida utiliza a transferência da tecnologia de produção empregada na fabricação do açaí (*Euterpe oleracea* M.) característico de Belém do Pará (ROGEZ 2000, SCHULTZ, 2008).

A exploração dos frutos de juçara e a comercialização como bebida, ou polpa de juçara, ou ainda polpa de açaí é uma forma de conciliar a proteção ambiental e o rendimento econômico de modo racional e equilibrado, uma atividade de utilização de produto florestal não madeireiro, o qual contribui para a conservação do bioma ameaçado. Assim, a palmeira neste sistema não é cortada para a colheita, como ocorre com a produção de palmito (MAC FADEN, 2005; SILVA, 2005; SCHULTZ, 2008).

Sobre os frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) poucos são os trabalhos descritos na literatura que avaliam sua composição química, valor nutricional e influência das regiões de cultivo sobre sua composição, como também exploram suas propriedades funcionais, comparados a vasta literatura apresentada para o açaí (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004; MAC FADEN, 2005; DE BRITO et al., 2007; SCHULTZ, 2008; BORGES et al., 2011b).

Considerando as possibilidades de ampliação do setor produtivo da fruticultura, vimos na palmeira juçara (*Euterpe edulis* M.) a possibilidade de expansão da cultura no Brasil especificamente no “bioma Mata Atlântica” como uma nova fonte de renda a agricultura familiar, unindo a exploração dos frutos como fonte potencial de compostos bioativos para uma diversidade de aplicação na indústria alimentícia e cosmética. Dessa forma o extrativismo da palmeira para a extração do palmito, em alguns situações de forma clandestina, dá lugar a exploração dos frutos como fonte de renda sustentável.

A proposta de pesquisa deste foi apresentada, considerando-se as necessidades de estudos aprofundados desta diversidade de compostos fitoquímicos presentes na espécie *Euterpe edulis* M., em referência a outras espécies como *Euterpe oleracea* M. e *Euterpe precatoria* M., aliando a escassez de estudos, tanto de aproveitamento dos frutos como do potencial produtivo desta cultura, considerando o desenvolvimento de tecnologias que visem o aproveitamento global da matéria prima, durante o ciclo de maturação, e a relevância econômica e ecológica da manutenção e ampliação da área cultivada de juçara (*Euterpe edulis* Martius) para a potencial comercialização, motivaram a realização deste estudo.

O presente trabalho está apresentado na forma de capítulos com os seguintes enfoques:

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Este capítulo apresenta uma breve revisão sobre a espécie *Euterpe edulis* M. foco deste estudo, como também das outras espécies *Euterpe oleracea* M. e *Euterpe precatória* M.. Ademais uma revisão sobre a composição e estudos recentes sobre o produto oriundo das espécies acima citadas, o açaí.

Capítulo 2: Avaliação da atividade antioxidante dos frutos juçara (*Euterpe edulis* M.) na cultura de células Vero e identificação dos compostos fenólicos usando HPLC-ESI-MS/MS.

Este capítulo avalia atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.), oriundos de três

regiões distintas de cultivo e identificação dos compostos fenólicos presentes utilizando HPLC-ESI-MS/MS e dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Capítulo 3: Determinação de compostos fenólicos em bebida de juçara (*Euterpe edulis* M.) utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD) e avaliação da atividade antioxidante.

Este capítulo apresenta o desenvolvimento de um método rápido e com alta eficiência utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD) para a determinação dos compostos fenólicos presentes em polpa comercial de juçara, como também avaliou-se a atividade antioxidante da polpa.

Capítulo 4: Desenvolvimento de um método rápido de extração de ácidos fenólicos presentes em juçara (*Euterpe edulis* M.) utilizando a extração assistida por micro-ondas em comparação à hidrólise ácida.

Este capítulo apresenta o desenvolvimento de um método rápido de extração dos ácidos fenólicos livres e conjugados para os frutos de juçara e aplicação da metodologia de UPLC-DAD desenvolvida no capítulo anterior para separação e identificação dos compostos.

Capítulo 5: Avaliação da composição química e atividade antioxidante da fruta juçara (*Euterpe edulis* M.) cultivada na Mata Atlântica durante o ciclo de maturação.

O último capítulo deste trabalho contempla a avaliação do ciclo de maturação dos frutos de juçara (*Euterpe edulis*), cultivados em duas regiões distintas, e a influência da maturação sobre a composição química e atividade antioxidante dos frutos.

Por fim este trabalho apresenta algumas considerações finais a respeito deste projeto de pesquisa desenvolvido, como também as perspectivas de trabalhos futuros para este tema.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Identificação botânica e ocorrência do gênero *Euterpe*

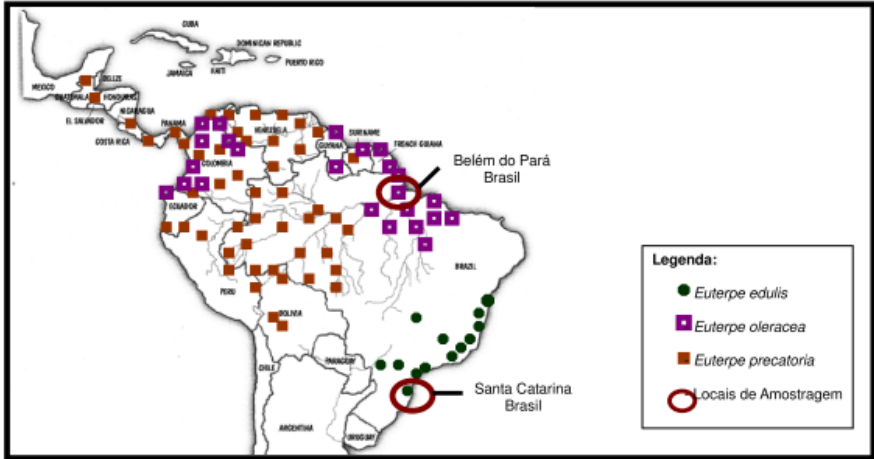
O gênero *Euterpe* está amplamente distribuído na América Central e do Sul, ocupando florestas de terras baixas e montanhas úmidas. No Brasil, cinco espécies foram constatadas: *Euterpe edulis* Martius (palmiteiro), *Euterpe catinga* Wallace (açazinho), *Euterpe oleracea* Martius (açazeiro), *Euterpe longibracteata* Barbis Rodrigues (açai da terra firme), *Euterpe precatória* Martius (açazeiro) (HENDERSON, 2000; LORENZI, 2006).

A espécie *Euterpe oleracea* M. encontrada na Floresta Amazônica, conforme ilustrado na Figura 1 (REITZ et al., 1978; HENDERSON, 2000; LORENZI, 2006; SCHIRMANN, 2009), é uma palmeira tropical nativa na região do estuário amazônico, nos Estados do Pará, Maranhão, Amapá, Mato Grosso e Tocantins e em ecossistemas de várzea, sob influência das marés e inundações, ou seja, em solos bastante úmidos (ROGEZ, 2000; LORENZI, 2006).

A espécie *E. precatória*, segundo Henderson (2000) é uma palmeira de estipe solitária único, não formando densas touceiras, ereto, 3 a 20 m de altura, com ocorrência natural nos Estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, em florestas de terras baixas ao longo de rios, nas áreas de inundações periódicas, abaixo de 350m de altitude, onde é a principal espécie produtora de açai (ROGEZ, 2000). É uma espécie produtora de frutos esféricos, com polpa negra (1 a 1,8 cm de diâmetro) com período de colheita de dezembro a agosto, os quais são utilizados no beneficiamento do açai (HENDERSON, 2000; ROGEZ, 2000; LORENZI et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2009).

O palmiteiro juçara (*Euterpe edulis* Mart.) encontra-se na Mata Atlântica, floresta ombrófila densa (HENDERSON, 2000), distribuído geograficamente desde o Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul, entre o nível do mar e 1000m de altitude, predominando na região litorânea (HENDERSON, 2000; CALLEGARI, 2003; MAC FADEN, 2005; SILVA, 2005).

Figura 1 -Distribuição das espécies *Euterpe edulis*, *Euterpe precatoria*, *Euterpe oleracea* no Brasil



Fonte: SCHIRMANN (2009).

Este palmeiteiro (*Euterpe edulis* Mart.) é monocaule de 5-12m de altura, caule de 10-15 centímetros (cm) de diâmetro, com um cone de raízes visíveis na base, folhas em número de 8-15 contemporâneas; pinas 65-72 pares, distribuídas uniformemente e dispostas em um mesmo plano, produz cachos de frutos drupáceos, esféricos quando maduros de cor preta a negra vinosa com mesocarpo fino e fibro-carnoso, denominados popularmente de juçara (MAC FADEN, 2005, LORENZI et al., 2006) estes com propriedades sensoriais e nutritivas similares aos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria*) (SILVA, 2005).

No Estado de Santa Catarina a espécie *Euterpe edulis* M. ocorre desde o nível do mar até 600 metros de altitude, com a topografia complexa resultando de diferentes altitudes, inclinações, composição de solo e condições climáticas (EMBRAPA, 1998, EPAGRI, 1998).

As palmeiras (*Euterpe edulis* Mart.) formam cachos com milhares de frutos que medem de 2 a 4 cm de diâmetro pesando em média 1 g e os cachos podem atingir 5 kg, sendo a média de 3 kg (HENDERSON, 2000; MAC FADEN, 2005).

1.2 Exploração das espécies juçara (*Euterpe edulis* M.) e açai (*Euterpe oleracea* M.) e sua importância econômica

O palmito juçara caracteriza-se por produzir um palmito de excelente qualidade, com valor econômico elevado e amplamente consumido na alimentação humana (MAC FADEN, 2005; MARTINS-CORDER et al. 2006), porém é uma planta que não rebrota e seu corte causa a morte (MARTINS-CORDER et al. 2006). Este palmito é de extrema importância ecológica na cadeia alimentar do ecossistema florestal, pois apresenta altos níveis de interação com os animais e desempenha papel significativo na nutrição da fauna da Mata Atlântica através de seus frutos (REIS et al., 1996; MARTINS-CORDER et al., 2006). Em virtude do intenso extrativismo do palmito a regeneração natural está comprometida, pois o corte dos indivíduos das populações nativas de palmito, incluindo as plantas que produzem sementes, ainda é a prática mais comum no Brasil (MAC FADEN, 2005; MARTINS-CORDER, et al. 2006; SCHULTZ, 2008).

O uso dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) para beneficiamento de polpa e produção de açai ainda está sendo fomentado, mas já tem grande aceitação no sul e sudeste do Brasil, como Santa Catarina, Paraná e São Paulo (SILVA; BARRETTO; SERÔDIO, 2004; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ 2008). A obtenção do açai a partir de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) é uma atividade nova na região sul da Bahia, e está sendo bastante aceito pela população baiana que a considera mais doce quando comparado ao fruto do açai (*Euterpe oleracea*) segundo estudo de Silva, Barreto e Serôdio (2004). Entretanto, ainda não existem dados sobre a produção e beneficiamento de frutos de juçara (*Euterpe edulis*).

A produção nacional de frutos de espécies nativas da palmeira de açai (*Euterpe oleracea*), em 2011 totalizou 215 381 toneladas, sendo 73,1 % maior que o ano anterior com aumento em quase todos os estados produtores, à exceção da Bahia e do Tocantins (IBGE, 2011).

O crescimento mais expressivo ocorreu no Amazonas (89.480 toneladas em 2011 contra 3.256 toneladas em 2010), onde se localiza também o maior produtor municipal, Codajás. Entretanto o principal produtor é o Estado do Pará que, na safra de 2011, foi o responsável por 109.345 toneladas que abriga 12 dos 20 maiores municípios produtores (oito amazonenses), que juntos são responsáveis por 71,4 % da produção nacional (IBGE, 2011).

O consumo do açaí é de origem indígena difundido na região Norte do Brasil no estuário Amazônico, a partir dos frutos das espécies *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatória* (ROGEZ, 2000; PACHECO-PALENCIA et al., 2009). Atualmente é o segundo produto mais consumido nos Estados do Pará e Amapá, ultrapassando as fronteiras da Amazônia, sendo exportado e comercializado para locais como Estados Unidos, Japão e continente Europeu (ROGEZ, 2000; ROGEZ; SILVA; POMPEU, 2009).

1.3 Processamento de frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) e juçara (*Euterpe edulis* M.): aspectos tecnológicos

A produção tradicional do açaí de origem indígena consiste no despulpamento manual dos frutos de palmeiras do gênero *Euterpe*. Neste processamento, os frutos são embebidos em água morna (40°C) e em seguida amassados sobre uma primeira peneira de fibras naturais. Neste procedimento ocorre o despulpamento manual onde são separados a polpa, o caroço e as cascas. A água é progressivamente adicionada a fim de separar definitivamente os caroços e as cascas. A mistura da polpa e água é novamente amassada durante 10 a 15 minutos para formar uma emulsão a qual é peneirada e, obtendo-se assim o açaí (ROGEZ, 2000; MAC FADEN, 2005).

Os frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.), igualmente aos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) não são comercializados para consumo *in natura* em função de terem apenas uma pequena proporção de polpa a qual está em torno de 15% do peso dos frutos (ROGEZ, 2000; ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; SILVA; BARRETTO; SERÔDIO, 2004; SCHULTZ, 2008). O processamento ao quais os frutos são submetidos é originário da cultura indígena, atualmente com algumas modificações e implantações de tecnologias visando uma melhor conservação da polpa baseado no processamento do açaí (*Euterpe oleracea*) (SILVA; BARRETTO; SERÔDIO, 2004; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ, 2008).

A polpa de juçara produzida dos frutos de *Euterpe edulis* M. no Estado de Santa Catarina é proveniente de uma agroindústria localizada na cidade de Garuva, Norte do Estado, sendo submetido dentro da agroindústria a um processamento mecânico de despulpamento seguido de pasteurização (SCHULTZ, 2008).

A primeira etapa do processamento refere-se à seleção dos frutos para o processamento. Estes devem estar bem maduros com coloração

negra, de forma que sejam separados frutos vermelhos e verdes (CALLEGARI, 2003; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ, 2008).

Após a seleção dos frutos estes são lavados em água potável e corrente e em seguida são embebidos em água por um determinado tempo para o amolecimento do mesocarpo (ROGEZ, 2000; CALLEGARI, 2003; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ, 2008). A temperatura e o tempo de imersão variam de acordo com a empresa que processa o fruto (ROGEZ, 2000).

A etapa seguinte é o despulpamento mecânico utilizando uma despulpadeira elétrica vertical composta de uma peneira de furos menores do que 0,6 mm no fundo. Primeiramente, os frutos são batidos e depois é adicionada água progressivamente. Uma emulsão é formada e o açaí desce por gravidade através da peneira e pode então ser coletado, ficando retidos na peneira a casca e a semente (ROGEZ, 2000; CALLEGARI, 2003; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ, 2008).

A quantidade de água adicionada determina o tipo de açaí que é produzido. O açaí é altamente perecível, sendo que seu tempo máximo de conservação, mesmo sob refrigeração é de 12 horas apenas, sendo esta alta perecibilidade resultante da elevada carga microbiana, que juntamente com a ação de enzimas, são responsáveis pela alteração de cor e sabor (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004).

O processamento seguido de pasteurização da polpa de açaí é utilizado com intuito de aumentar a vida de prateleira e garantir a segurança alimentar do produto (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; SCHULTZ, 2008). A conservação da polpa de açaí é realizada através do método de congelamento em câmara fria, um processo oneroso, em termos de investimento, manutenção de equipamentos, estocagem e transporte.

De acordo com o Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade para polpa de açaí e açaí, esses são produtos oriundos de frutos de palmeira (*Euterpe oleraceae*) com a quantidade mínima de lipídios, proteínas e carboidratos presentes na polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) de 20, 5 e 51 %, respectivamente, variando de acordo com a quantidade de sólidos totais presentes (BRASIL, 2000).

A polpa de açaí é a polpa extraída do açaí, sem adição de água, por meios mecânicos sem filtração, podendo ser submetido ao processo físico de conservação (BRASIL, 2000).

De acordo com a Legislação brasileira o termo açaí é o produto extraído da parte comestível dos frutos de açazeiro (*Euterpe oleracea* M.) após amolecimento através de processos tecnológicos adequados. O açaí é

classificado em grosso, médio e fino de acordo com o teor de sólidos totais em 14 %, de 11 a 14 %, e de 11 % a 8 %, respectivamente (BRASIL, 2000).

Na literatura não existem diferenças para o termo açaí ou polpa de açaí, ambos são produtos oriundos do beneficiamento dos frutos das palmeiras (*Euterpe oleracea* ou *Euterpe precatoria*) com importante valor econômico para o Brasil, devido a grande exportação da polpa de açaí para consumo alimentar e o uso como ingrediente alimentício (DEL-POZO INFRAN; TALCOTT; BRENES; 2004; GALLORI et al., 2004; LICHTENTHALER, et al., 2005; SCHAUSS et al. 2006a; SCHAUSS et al. 2006b; PACHECO-PALENCIA et al., 2008a, PACHECO-PALENCIA et al., 2008b; TALCOTT, PACHECO-PALENCIA & TALCOTT, 2008; PACHECO-PALENCIA et al., 2009).

1.4 Composição química e compostos bioativos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) e juçara (*Euterpe edulis* M.)

Segundo Rogez (2000) a polpa de açaí tem um alto valor nutricional e energético contendo aproximadamente 40 a 50% de lipídios e 10% de proteínas. No estudo realizado por Alexandre, Cunha e Hubinger (2004) são confirmados os dados citados por Rogez (2000) demonstrando que os lipídios são componentes majoritários na polpa de açaí, sendo assim o açaí uma emulsão de óleo em água.

Outros componentes que se destacam são as fibras com uma quantidade de 30%, e os carboidratos 3,55% da polpa de açaí (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004).

Em um estudo de caracterização química, Schauss et al. (2006a), identificaram e quantificaram os açúcares presentes em polpa de açaí. Os principais açúcares encontrados foram glicose, frutose e maltose. A quantidade de carboidratos totais estimada pelos autores foi de 52,2 100 g⁻¹ de matéria seca e 44,2 100 g⁻¹ de fibra alimentar na matéria seca.

Em estudo realizado Silva, Barretto e Serôdio (2004) em que comparam a polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) com a polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) produzida no sul da Bahia, foram observadas diferenças significativas entre ambas espécies, conforme demonstrado na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1-Composição química de polpa de açáí (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis* M.)

Amostra	Determinações			
	Proteína*	Açúcares*	Lipídios*	Kcal/100g
Polpa açáí	7,76	1,02	13,78	152,93
Polpa juçara	6,72	1,20	13,9	155,74

*Valores expressos em g 100g⁻¹ de matéria seca.

Fonte: adaptado de SILVA, BARRETTO e SERÔDIO (2004).

Os teores de açúcares totais e lipídios foram superiores na polpa da juçara, resultando em maior valor energético para esta polpa.

O estudo realizado por Borges et al., (2011a) apresentou a caracterização físico-química de frutos de juçara cultivados em regiões de SC, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) cultivados no Estado de Santa Catarina

	Matéria seca (g)	pH	Acidez (AT)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)
Barra Velha	40,09 ± 0,23 ^b	5,45 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,07 ^c	5,13 ± 0,15 ^c	18,45 ± 1,15 ^c	1,99 ± 0,08 ^a
Garuva	34,95 ± 1,11 ^d	4,72 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,19 ^b	8,21 ± 0,09 ^a	29,37 ± 2,08 ^b	1,86 ± 0,04 ^a
Luí Alves	37,02 ± 0,14 ^c	5,36 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,70 ^c	7,15 ± 0,15 ^{ab}	43,19 ± 2,39 ^a	2,07 ± 0,34 ^a
Parque	42,47 ± 0,41 ^a	4,65 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,03 ^c	5,84 ± 0,04 ^b	18,96 ± 2,30 ^c	1,55 ± 0,23 ^a
Urussanga	37,93 ± 0,33 ^c	4,47 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,04 ^a	7,33 ± 0,02 ^{ab}	44,08 ± 1,87 ^a	3,32 ± 0,01 ^a

Resultados expressos em média ± DP de três repetições.

^{a-d} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

AT: acidez titulável, expresso em mg equivalente ácido cítrico 100g⁻¹ de polpa fresca. %: g 100g⁻¹ de matéria seca.

Fonte: BORGES et al. (2011a)

Tabela 3 - Composição mineral da polpa de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) e juçara (*Euterpe edulis* Mart.)

Amostra	Determinações								*Valores expressos em g
	P*	K*	Ca*	Mg*	Fe**	Zi**	Cu**	Mn**	
Polpa açaí	1,4	7,4	4,8	1,4	328,5	10,1	20,4	34,3	res essos em g
Polpa juçara	0,8	12,1	4,3	1,5	559,6	12,2	14,0	43,4	

kg⁻¹ em matéria seca.

**Valores expressos em mg 100 g⁻¹ em matéria seca.

Fonte: adaptado SILVA, BARRETTO e SERÔDIO (2004).

Os resultados ilustrados na Tabela 3 indicam que a polpa de juçara possui elementos minerais em quantidades próximas ou, para alguns elementos, superiores as do açaí, a exemplo do potássio (K), ferro (Fe) e zinco (Zn). O teor de K na juçara foi 62,4 % superior ao encontrado no açaí. O Fe e o Zn foram 70,3 % e 20,8 % maior, respectivamente, que no açaí. Os teores de fósforo (P) e cobre (Cu) foram significativamente maiores no açaí, e o cálcio (Ca) e magnésio (Mg) não apresentaram diferenças significativas no nível de 95% de confiança (SILVA, BARETTO e SERÔDIO, 2004).

Schauss e colaboradores (2006a) relataram os aminoácidos que constituem a polpa de açaí (*Euterpe oleracea*), num total de 7,59 % de matéria seca, dos quais são: 0,83 % ácido aspártico, 0,31 % treonina, 0,32 % serina, 0,80 % ácido glutâmico, 0,39 % glicina, 0,46 % alanina, 0,51 % valina, 0,12 % metionina, 0,38 % isoleucina, 0,65 % leucina, 0,29 % tirosina, 0,43 % fenilalanina, 0,66 % lisina, 0,17 % histidina, 0,42 % arginina, 0,53 % prolina, 0,18 % cistina, 0,13 % triptofano e hidroxiprolina em quantidades menores que 0,01 %.

Atualmente, o açaí está sendo valorizado como um alimento funcional devido às suas propriedades antioxidantes. Esta característica se deve ao fato do açaí ser um fruto fonte de compostos fenólicos e antocianinas (SCHAUSS et al., 2006a; PACHECO PALENCIA et al., 2008a; PACHECO PALENCIA et al., 2008b; ROSSO et al., 2008; PACHECO PALENCIA et al., 2009).

Dentre os primeiros estudos citados na literatura para identificação de antocianinas em frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) estão os descritos por Bobbio et al. (2000), que identificaram cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-arabinosilarabinosídeo, num total de 263 mg de antocianinas em 100 g polpa de açaí (matéria úmida).

Del Pozo-Insfran, Brenes e Talcott (2004) quantificaram as antocianinas presentes em polpa de açaí provenientes do Belém do Pará através de cromatografia líquida de alta desempenho acoplado ao espectrofotômetro de ultra violeta (HPLC-UV), concluindo assim a presença de 104 mg de cianidina 3-glicosídeo e 7,44 mg de pelargonidina 3-glicosídeo 100 g⁻¹ de polpa (matéria úmida). Gallori et al. (2004) confirmaram os estudos anteriores identificando as principais antocianinas: cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, como também foram identificados traços de pelargonidina e peonidina, sendo o total de antocianinas de 75 mg 100 g⁻¹ de polpa (matéria úmida).

Os primeiros estudos relacionados a pigmentos em açaí descrevem teores de antocianinas de acordo com a época da safra, o açaí do período de baixa produção (janeiro a junho) apresentou 357 mg de antocianinas 100 g⁻¹ de polpa, enquanto que o açaí de alta produção 926 mg 100 g⁻¹ (julho a dezembro) (LICHTENTHÄLER et al., 2005).

Estudos mais recentes utilizando amostras de açaí liofilizado em sistema cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a fotodiodo e detector de espectrofotometria de massas (HPLC-PDA-MS/MS) identificaram cinco antocianinas presentes: cianidina 3-rutinosídeo (193 mg 100 g⁻¹ matéria seca) e cianidina 3-glicosídeo (117 mg 100 g⁻¹ matéria seca) seguida de cianidina 3-sambubiosídeo e peonidina 3-rutinosídeo (40 mg 100 g⁻¹ matéria seca), peonidina 3-glucosídeo (20 mg 100 g⁻¹ matéria seca), sendo o conteúdo total de antocianinas de 319 mg 100 g⁻¹ de polpa liofilizada (SCHAUSS et al., 2006b).

Rosso et al. (2008) quantificou um total de antocianinas 293mg 100 g⁻¹ de polpa de açaí congelado proveniente do Estado do Pará, dentre as antocianinas identificadas: cianidina 3- rutinosídeo (86,8 mg 100g⁻¹) e cianidina 3-glicosídeo (13,2 mg 100g⁻¹).

Essa amplitude de variação na quantificação das antocianinas é descrita por Rogez (2000) em seu detalhado estudo sobre a concentração de antocianinas em que verificou o acúmulo desse pigmento nos frutos conforme aumenta o estágio de maturação, assim definindo-se cinco estágios de maturação, sendo: verde, vitrin, preto, tuíra e bem maduros. Lichtenthäler et al. (2005) demonstraram esta grande variação entre as amostras ao analisar polpas de diferentes épocas de colheita, percentual de sólidos solúveis, e fornecedores, observando variações entre 13 e 456 mg 100g⁻¹ de polpa de açaí.

Muitos trabalhos determinaram as antocianinas em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), entretanto, poucos estudos identificaram e quantificaram

as antocianinas de *Euterpe edulis* Mart.. Iaderoza et al. (1992) realizaram a extração de antocianinas a partir dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe edulis* Mart. utilizando cromatografia em papel e identificaram cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo como as principais antocianinas em ambas as espécies. A quantidade de antocianinas dos frutos de *E. oleraceae* e *E. edulis* foram 336 mg 100g⁻¹ e 1340 mg 100g⁻¹, respectivamente. Portanto, segundo esse estudo, frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) apresentam quatro vezes mais antocianinas do que o açazeiro (*Euterpe oleracea*). O trabalho de Harborne et al. (1994) também identificou as antocianinas de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) como a cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Schultz (2008) comparando o teor médio de antocianinas entre as polpas de *Euterpe edulis* Mart.e *Euterpe oleracea* Mart encontrou 58,5 mg de cianidina 3-glicosídeo 100g⁻¹ de polpa fresca e 18,4 mg de cianidina 3-glicosídeo 100g⁻¹ de polpa fresca, respectivamente. Os resultados encontrados pelo autor demonstram a importância do estudo da polpa de juçara como fonte de antocianinas e pigmentos.

Entretanto, a polpa de açaí (*Euterpe oleracea* M.) apresenta também ácidos fenólicos, flavanois e protoantocianidinas tais como: ácido ferúlico 21,2 mg; epicatequina 12,9 mg; ácido p-hidroxibenzóico 8,05 mg; ácido gálico 6,45 mg; ácido protocatecuíco 6,4 mg; catequina; 6,08 mg; ácido elágico 5,54 mg; ácido vanílico 3,32 mg; ácido p-cumárico 1,71 mg e derivados de ácido gálico 11,7 mg, sendo todos estes valores considerados em 100g de polpa congelada (DEL-POZO INFRAN; TALCOTT; BRENES; 2004).

Gallori et al. (2004) e Schauss et al. (2006b) identificaram outros compostos fenólicos em polpa de açaí como homoorientina, orientina, taxifolina desoxihexose, isovitexina, e escorparina.

Lichtenthäler et al. (2005) caracterizaram outros compostos fenólicos como o ácido protocatecuíco, catequina, dímeros, trímeros e tetrâmeros de procianidina, como também quercetina-rutinosídeo. Já Schauss et al. (2006a) com uma metodologia mais detalhada confirmaram os dados reportados e quantificaram as procianidinas presentes, sendo 928 mg 100g⁻¹ representadas por polímeros de uma quantidade total de 1289 mg 100g⁻¹ de matéria seca.

Em seus estudos com polpa de açaí liofilizada Schauss et al. (2006b) prepararam extratos utilizando solventes com diferentes polaridades e avaliaram a atividade antioxidante a partir do método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) apresentando os seguintes resultados:

997 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ (capacidade antioxidante equivalente a Trolox) sistema hidrofílico ORAC_{FL} , 30 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ sistema lipofílico ORAC_{FL} , 1027 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de capacidade antioxidante total, e 13,9 mg equivalente a ácido gálico g^{-1} . Este mesmo estudo mostra a ação antiinflamatória com a inibição da atividade de ciclooxygenases 1 e 2, e inibição da geração de espécies de oxigênio.

A avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico comparando diversas polpas de frutas, mostra a maior porcentagem de inibição para o açaí (*Euterpe oleracea*), quando comparado à acerola, morango e amora (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os compostos antioxidantes do açaí têm se apresentado como quelantes de radicais peroxil e peroxinitrito. Outros estudos também demonstraram a capacidade antioxidante do açaí e da juçara utilizando diferentes metodologias como cobre induzido, peroxidação de lipossomas e inibição da co-oxidação do ácido linoleico e sistema β -caroteno (SCHAUSS et al., 2006b; BORGES et al., 2013). Além disso, alguns estudos têm descrito a atividade antiproliferativa do açaí sobre as células tumorais humanas de leucemia (SCHAUSS et al., 2006b; TALCOTT et al., 2008). Como mecanismo de ação do açaí sobre vários sistemas modelo *in vitro* de células cancerígenas, têm sido proposto a indução da apoptose, e a inibição da proliferação celular (PACHECO-PALENCIA, 2008b). Para os frutos de juçara, um estudo inédito demonstra o efeito protetor do extrato de juçara sobre a indução oxidativa de células Vero com base na composição dos fenólicos por HPLC-MS/MS (BORGES et al., 2013).

Os resultados dos estudos *in vitro* sustentam as evidências encontradas nos estudos *in vivo* que indicam que a ingestão de polifenóis está inversamente relacionada com a incidência de diversas doenças crônicas não transmissíveis, tais como diversos tipos de câncer e doenças cardiovasculares. Este efeito protetor do açaí contra diversas doenças têm sido associado ao aumento do potencial antioxidante no plasma e na proteção vascular do organismo humano (DEL-POZO INSFRAN; TALCOTT; BRENES; 2004, GALLORI et al., 2004, LICHTENTHALER, et al., 2005, SCHAUSS et al. 2006a; SCHAUSS et al. 2006b; PACHECO-PALENCIA et al., 2008a, PACHECO-PALENCIA et al., 2008b; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; TALCOTT et al., 2008).

O açaí é um fruto rico em lipídios variando entre 40 a 50 % de sua composição. Este lipídio rico em ácidos graxos mono e poli-insaturados, respectivamente 60 e 14 %, semelhante ao óleo de oliva e abacate (ROGEZ,

2000; SCHAUSS et al., 2006b; PACHECO-PALENCIA et al. 2008b; NASCIMENTO et al. 2008).

O óleo de açaí, um subproduto obtido da clarificação da polpa de açaí, destinado à produção de sucos clarificados, apresenta características físicas de um fluido viscoso de coloração verde escura e distinto aroma remanescente da polpa de açaí. Os índices de identidade e qualidade do óleo demonstram sua semelhança a outros óleos de frutas como oliva, amêndoa, índice de refração 1,4685, índice de iodo $75 \text{ g } 100^{-1}$ óleo, índice de peróxido $5,71 \text{ meq kg}^{-1}$ de óleo (PACHECO-PALENCIA et al. 2008b).

Analisando os ácidos graxos presentes no açaí revela-se a predominância de ácidos graxos insaturados (73,9 %) sendo que dentre os ácidos graxos insaturados há predominância de ácido oleico (56,2 %), seguido do ácido linoleico (12,5 %) e linolênico (0,8 %), enquanto que os ácidos graxos saturados principais estão o ácido palmítico (24,1 %) e o ácido esteárico (1,6 %). (SCHAUSS et al., 2006b; NASCIMENTO, et al. 2008, PACHECO-PALENCIA, 2008b). O açaí também apresenta β -sitosterol ($0,44 \text{ mg g}^{-1}$ matéria seca); estigmasterol ($0,04 \text{ mg g}^{-1}$ matéria seca) e campesterol ($0,03 \text{ mg g}^{-1}$ matéria seca) (SCHAUSS et al., 2006b).

O resveratrol ($3,5, 4'$ - trihidroxi - trans - estilbeno) é um polifenol encontrado em uvas exibindo propriedades quimiopreventivas ao câncer. Esse composto também foi encontrado em pequenas quantidades $1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ de trans-resveratrol na polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (SCHAUSS et al., 2006b).

A polpa de açaí contém uma alta atividade antioxidante sendo representada por diversas antocianinas, entretanto durante o processo de retirada do óleo estes componentes não são retidos, somente ácidos fenólicos e flavanois são solubilizados na fração lipídica (PACHECO-PALENCIA et al. 2008b).

Pacheco-Palencia et al. (2008b) em seu estudo caracterizaram as duas frações do açaí resultando em algumas diferenças. A polpa de açaí clarificada contém ácidos fenólicos e flavanois como: ácido protocatecuíco ($15,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$); ácido p-hidroxibenzóico ($17,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), catequina ($49,1 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido vanílico ($57,7 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido siríngico ($43,4 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), epicatequina ($44,6 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido ferúlico ($12,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$); dímeros de procianidina ($230 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e trímeros de procianidina ($237 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) em matéria seca, capacidade antioxidante de $17,2 \mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$, o que confirmam estudos anteriores de polpa integral, porém estes compostos apresentam-se em menores quantidade na polpa clarificada (DEL-POZO INFRAN; TALCOTT; BRENES, et al. 2004;

LICHTENTHÄLER et al., 2005;PACHECO- PALENCIA et al., 2008a; PACHECO- PALENCIA et al., 2008b).

O óleo de açaí retirado durante a clarificação apresenta uma fração dos diversos ácidos fenólicos e taninos presentes na polpa como: o ácido protocatecuíco ($54 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$); ácido p-hidroxibenzóico ($57 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), catequina ($6,7 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido vanílico ($161 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido siríngico ($96,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido ferúlico ($10,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$); dímeros de procianidina ($103 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e trímeros de procianidina ($204 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e atividade antioxidante total de $15,3\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$ (PACHECO-PALENCIA et al., 2008b).

Os valores de ácido ferúlico são muito próximos na polpa e no óleo, entretanto os flavonóis como catequina e epicatequina encontram-se somente na polpa.Pacheco-Palenciaet al. (2008b) encontraram alta correlação de Pearson ($r = 0,94$) entre o conteúdo total de ácidos fenólicos e a capacidade antioxidante total do óleo de açaí, e também observaram uma alta estabilidade desse óleo quando estocado a diferentes temperaturas por um período de 10 semanas.

1.5 Influência dos fatores agrônômicos sobre a composição dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.)

A composição química dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é influenciada por diversos fatores como o estágio de maturação, condições climáticas, região de cultivo, as condições do cultivo (ROGEZ, 2000; LICHTENTHALER et al., 2005; SANABRIA; SANGRONIS, 2007; ROGEZ et al., 2011).

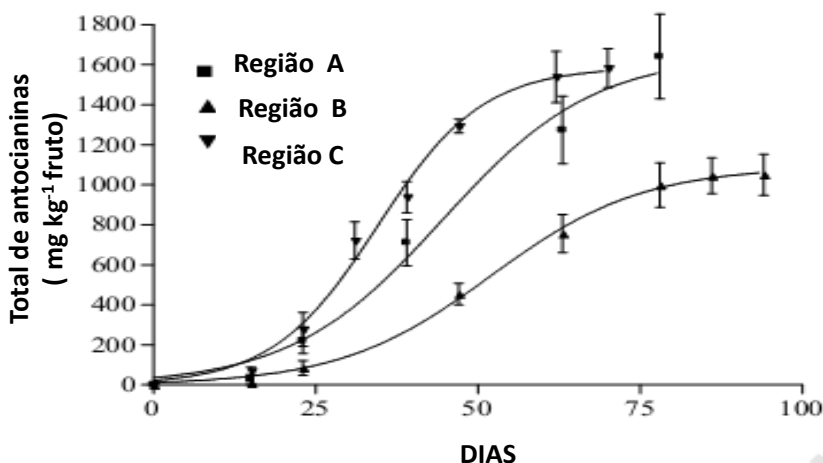
O ponto de colheita dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) é determinado de acordo com a coloração dos frutos, apesar dos frutos terem uma qualidade ótima quando colhidos em plena maturidade. Os produtores colhem os frutos precocemente para facilitar as manipulações e prolongar a conservação dos frutos pós-colheita.

Os frutos muito maduros são, geralmente, mais adocicados, mas apresentam sabor insípido depois de colhidos. Os frutos colhidos antes do ponto de maturação ou após, são mais suscetíveis a desordens fisiológicas e apresentam um tempo de armazenamento menor quando comparados aqueles colhidos em pleno ponto de maturação dentro da safra (ROGEZ, 2000).

Em recente estudo, Rogez et al. (2011) verificaram a cinética de maturação dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) cultivados em

diferentes regiões da Amazônia, conforme a Figura 2, onde o acúmulo de antocianinas durante a maturação pode ser descrito por curvas sigmoidais.

Figura 2 - Acúmulo de antocianinas em frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) ao longo de uma estação, em três diferentes regiões de cultivo na Amazônia.



(A e B: Abaetetuba; C: Ilha do Cumbu). Os símbolos da região representam a média de quatro amostras. As linhas de erro representam o desvio padrão relativo. Linhas completas representam a curva sigmoidal de melhor ajuste.

Fonte: Adaptado de ROGEZ et al. (2011).

O tempo necessário para atingir a concentração máxima é muito longo, entre 69 e 94 dias após o aparecimento dos primeiros frutos pretos variando de acordo com a localização.

O estudo de Rogez et al. (2011) confirma a hipótese já descrita para outros frutos nos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*), em que a cinética de acúmulo de antocianinas é altamente dependente do local de cultivo, dos efeitos de fatores ambientais tais como o tipo de solo, o nível de inundação, a intensidade da luz solar e a época de safra.

De acordo com Rogez (2000), com os dados coletados em campo por agricultores da região de Belém do Pará podem-se distinguir cinco

estágios de maturação para os cachos na palmeira:

Verdes: define o estado de maturidade de um conjunto de frutos do qual no mínimo, metade dos frutos ainda é de cor verde;

Vitrin: corresponde aos cachos que passaram da cor verde à cor preta e que contêm uma proporção maior de frutos pretos e uma proporção menor de frutos verdes, neste estágio já existe a comercialização dos frutos, mas o rendimento em polpa é baixo;

Preto: se refere um conjunto de frutos de cor preta cuja superfície é brilhante; os rendimentos e a qualidade do suco são bons, mas não é considerada a fase ideal de colheita.

Tuíra: qualifica os frutos uniformemente pretos e cobertos por uma fina película de ceras, dando aos frutos uma aparência esbranquiçada, os rendimentos são bons e a qualidade do fruto é ideal para a produção de suco;

Bem maduros: define um conjunto de frutos cobertos da mesma película de cera, mas já um pouco seca e murcha; tipicamente este estado se observa quando o cacho foi colhido muito tarde.

A cinética de maturação dos frutos é muito relevante, pois permite definir o estágio de maturação durante o qual a síntese de antocianinas máxima é alcançada, sendo ambos os parâmetros importantes para caracterizar a pós-colheita e o estágio ótimo de sua industrialização (ROGEZ et al., 2011).

Uma vez que as antocianinas apresentam diversos benefícios à saúde humana e interesse para a indústria, o conhecimento sobre a cinética de maturação de frutos definindo o melhor estágio de colheita dos frutos de acordo com o interesse do beneficiamento pós-colheita.

A colheita dos cachos de frutos das palmeiras (*Euterpe edulis* Mart.) é realizada igualmente aos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) quando os mesmos apresentarem cor violácea ou preta, identificando sua maturidade (MANTOVANI; MORELLATO, 2000; ROGEZ, 2000; MAC FADEN, 2005; SCHULTZ, 2008).

O início da fase reprodutiva é determinado por uma série de fatores, os quais estão relacionados principalmente ao meio ambiente em que as plantas se encontram (MANTOVANI; MORELLATO, 2000; SILVA, 2005).

As palmeiras que recebem grande incidência de luz, plantadas por mudas, atingem a fase reprodutiva entre o sétimo e o décimo ano. Porém, dentro das florestas nativas não existem dados sobre a idade reprodutiva das palmeiras (MANTOVANI; MORELLATO, 2000; MAC FADEN, 2005).

O período de amadurecimento dos frutos é influenciado pela altitude.

De acordo com Silva (2005) as palmeiras localizadas a 650 m de altitude no município de Blumenau/SC apresentaram floração entre os meses de abril e junho e maturação dos frutos de dezembro a fevereiro. Já na região litorânea catarinense, o período de amadurecimento ocorre de abril a novembro, enquanto as palmeiras isoladas na mata o amadurecimento ocorre entre abril e junho (SILVA, 2005).

Na floresta Ombrófila Densa localizada no município de São Pedro de Alcântara-SC, as palmeiras apresentam período de oferta de frutos (seis meses), com o pico de oferta nos meses de agosto a outubro. O palmitero apresenta floração de novembro a fevereiro, com frutos imaturos durante o ano inteiro e frutos maduros de maio a novembro (MANTOVANI; MORELLATO, 2000; MAC FADEN, 2005).

**CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS
FRUTOS JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) NA CULTURA DE CÉLULAS
VERO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
USANDO HPLC-ESI-MS/MS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS
JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) NA CULTURA DE CÉLULAS VERO E
IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS USANDO
HPLC-ESI-MS/MS**

RESUMO

Este artigo relata o estudo da avaliação da atividade antioxidante de frutas de juçara (*Euterpe edulis* M) e o efeito protetor dos extratos de juçara na cultura de células Vero induzidas ao estresse oxidativo com terc-butil hidroperóxido (TBH). Em paralelo avaliou-se a composição fenólica dos extratos metanólicos empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (HPLC-ESI-MS/MS) e o perfil de ácidos graxos da fração lípica utilizando cromatografia gasosa. Devido ao seu alto teor em óleo, a atividade antioxidante foi avaliada separadamente na polpa desengordurada e na fração lipídica, a fim de evitar interferência nos métodos químicos propostos para este estudo. O extrato metanólico de juçara, originado a partir da polpa desengordurada exibiu maior capacidade de captura de radicais livres DPPH (1,1-difenil- 2- picril hidrazil), poder de redução do Fe (FRAP) e inibição da oxidação do β - caroteno em sistema emulsionado. Os extratos lipofílicos apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos comparado aos extratos metanólicos oriundos da polpa desengordurada, porém estes extratos apresentaram uma atividade antioxidante inferior a 5 % para os ensaios de DPPH e FRAP. Os extratos metanólicos de juçara (1,5; 4,5; 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram efeito protetor significativo as células Vero quando induzidas ao estresse oxidativo em comparação com o controle de ácido gálico. A predominância de ácidos fenólicos (benzóico, caféico, clorogênico, ferúlico, protocatecuico, siríngico, vanílico e p -cumárico) e flavonoides (quercetina e rutina) foram observados nos extratos metanólicos por infusão em sistema de HPLC-ESI-MS/MS. O perfil de ácidos graxos presentes na polpa de juçara apresentou a predominância de ácidos graxos monoinsaturados representados pelo ácido oleico (45 – 50 %); seguido dos ácidos graxos poli-insaturados, o α -linoléico; e os ácidos saturados representaram em torno de 25 % da fração lipídica, sendo o ácido palmítico o principal ácido graxo. Os resultados demonstraram que a atividade antioxidante dos frutos juçara está correlacionada com seu alto conteúdo de compostos fenólicos e de flavonoides.

Palavras-chave: Açaí. Ácidos fenólicos. Atividade antioxidante celular. Cromatografia. Palmito.

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio e o nitrogênio são espécies que desempenham papéis fundamentais em processos fisiológicos, incluindo a vida e a morte celular, a proteção contra patógenos via de sinalização celular e o regulamento do tônus vascular (JENSEN; WU; PATTERSON; BARNES; CARTER, 2008).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) incluindo as diversas formas de oxigênio ativo como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO) são muitas vezes gerados no organismo como subprodutos de reações biológicas ou de fatores exógenos (DAR et al., 2011).

É comumente reconhecido que ERO estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo o sinal de transdução celular, detoxificação, sinalização química, proliferação celular, apoptose, bem como isquemia, reperfusão, inflamação, diabetes, catarata e muitas doenças neurodegenerativas (DAR et al., 2011; LIU; FINLEY, 2005).

A etiologia de várias doenças crônicas está associada a um desequilíbrio no sistema redox celular levando a um aumento do nível de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERN) (DEIANA et al., 2010).

A homeostase do organismo depende do equilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes, sendo assim, a produção de ERO em grandes quantidades pode induzir a danos no DNA, carbonilação de proteínas, peroxidação de lipídios, conseqüentemente a formação de um quadro de estresse oxidativo que atinge as células, os tecidos e os órgãos e, como consequência, doenças crônicas degenerativas, como inflamações, alguns tipos de câncer, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose (LIU; FINLEY, 2005; TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007; WOLFE et al., 2008; DAR et al., 2011).

No organismo a produção de ERO é equilibrada pela ação de enzimas de ação antioxidantes (superóxido-dismutase, catalase e glutatona peroxidase) e também por antioxidantes exógenos oriundos da dieta, como as vitaminas A, C e E e os compostos fenólicos (TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007). Assim, o aumento da ingestão de compostos fenólicos tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas na dieta é uma estratégia promissora para prevenir a iniciação do câncer em células, uma etapa importante no início da carcinogênese. (LIU; FINLEY, 2005, WOLFE et al., 2008; DAR et al., 2011; OKE; ASLIM, 2011).

Estudos epidemiológicos mostraram, consistentemente, que existe

significativa associação entre o consumo regular de frutas e verduras e a redução da incidência de doenças crônicas (CARVALHO et al., 2010).

As propriedades relacionadas com a saúde e a composição química dos frutos têm sido amplamente exploradas. Interesse em novas opções de frutas exóticas no mercado tem aumentado por causa de seus potenciais benefícios para a saúde (SCHRECKINGER; LOTTON; LILA; MEIJA, 2010).

Muitos estudos examinaram os potenciais benefícios do açaí (*Euterpe oleracea* M.) para a saúde (SCHAUSS et al., 2006a; HONZEL et al., 2008; JENSEN et al., 2008; RUFINO et al., 2010). O açaí, considerado um “super fruto”, juntamente com sua polpa, tem recebido muita atenção nos últimos anos, devido a sua capacidade antioxidante extremamente alta e o seu papel como “alimento funcional” (KANG et al., 2010; KANG et al., 2012). O perfil dos compostos fenólicos presentes no açaí e sua atividade antioxidante foi estudada em sistemas “*in vitro*” e “*in vivo*” (em humanos, animais e cultura de células) (JENSEN et al., 2008; HOGAN et al., 2010; KANG et al., 2010; PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; XIE et al., 2012).

O fruto açaí é produzido pelas espécies *Euterpe precatoria* M. e *Euterpe oleracea* M. . “Juçara” ou “jussara” é o fruto da espécie *Euterpe edulis* M. cultivada na Mata Atlântica, e esta planta é procurada como a principal fonte de palmito. No entanto, a exploração dos frutos surgiu recentemente como uma promissora fonte de antioxidantes naturais, e tem aparência similar aos frutos de açaí (*Euterpe precatoria* M.) (*Euterpe oleracea* M.).

O interesse crescente em fontes de antioxidantes naturais na indústria alimentícia e farmacêutica requer a prova de seu efeito *in vitro* e *in vivo*, bem como a sua biodisponibilidade e propriedades toxicológicas.

Desde a década de 90 a pesquisa em antioxidantes vem se expandindo com o desenvolvimento de diversas técnicas para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*. (WOLFE et al., 2008).

É extremamente necessário que a determinação da capacidade antioxidante seja avaliada utilizando-se mais de um método a fim de se obter melhor avaliação da atividade antioxidante dos compostos em um extrato. Conforme descrito em alguns trabalhos, diferentes extratos hidroalcoólicos, alcoólicos e orgânicos apresentam respostas diferentes em métodos distintos como captura de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), poder redutor do ferro (FRAP), lipoperoxidação do β -caroteno, sugerindo assim a interação dos compostos (GIADA; MANCINI-

FILHO, 2008; VIDAL et al., 2009).

O método de atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] consiste na avaliação dos compostos antioxidantes sobre uma solução contendo o radical cromóforo. Após a adição do antioxidante, este reduz o radical no sistema provocando uma descoloração da cor inicial, o qual diminui a sua absorvância. Assim, a capacidade dos compostos de sequestrar o radical estável DPPH é aplicada de acordo com o método desenvolvido por Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995. A medida da absorvância do radical é realizada no comprimento de onda de 517 nm, antes de adicionar a amostra (A_0) e com a adição da amostra com leitura após 30 minutos da reação (A_t).

O método do poder redutor do ferro (FRAP) é baseado na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) do extrato reduzirem em meio ácido (pH 3,6) o Fe^{3+} a formar o Fe^{2+} . O Fe^{2+} reage com o 2,4,6-tri (2-piridil) – 1,3,5 – triazina TPTZ formando o complexo de intensidade azul, comparando com a força antioxidante em meio plasmático (BENZIE; STRAIN, 1996). A vitamina C e o ácido úrico, por exemplo, reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Já um antioxidante que reduz efetivamente um pró-oxidante, não reduz, necessariamente, Fe^{3+} a Fe^{2+} , sendo esta uma das limitações do método.

O método de lipoperoxidação do β -caroteno é baseado na técnica de co-oxidação do substrato ácido linoleico. Ao ser exposto a condições que favorecem a sua oxidação (como presença do oxigênio e alta temperatura) produz estruturas radiculares, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, que ao perder o seu cromóforo provoca a descoloração da solução (MARCO, 1968; MILLER, 1971).

Os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* não refletem necessariamente as condições fisiológicas celulares e não consideram a biodisponibilidade e suas propriedades toxicológicas bem como um conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares que contribuem para a sua atividade biológica (LIU e FINLEY, 2005; ROSA et al., 2008). Modelos animais e estudos com humanos possuem custos elevados e não são adequados para a triagem inicial de antioxidantes. Portanto, há necessidade de modelos de cultura de células de apoio à avaliação da atividade antioxidante antes de estudos em animais e ensaios clínicos em humanos (LIU e FINLEY, 2005).

O estudo da atividade antioxidante de um composto em uma cultura celular fornece informações relevantes que poderão elucidar o mecanismo de estresse oxidativo subjacente ao efeito antioxidante e ao efeito relacionado com a estrutura do composto. (ROSA et al., 2008; OKE;

ASLIM, 2011).

A técnica de atividade antioxidante celular foi desenvolvida utilizando eritrócitos para abordar a questão dos antioxidantes provenientes de extratos naturais terem permeabilidade no citosol e contribuir para a redução dos danos oxidativos dentro da célula. Assim, os dados do ensaio refletem se os antioxidantes são capazes de penetrar nas células vivas protegendo-as de danos oxidativos (HONZEL et al., 2008; KANG et al., 2010).

O método para determinação da atividade antioxidante celular descrito por Wolfe & Liu (2007), consiste em fazer um pré-tratamento das células do hepatocarcinoma humano (HepG2) com os extratos hidrofílicos e diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os antioxidantes do extrato e a DCFH-DA se difundem através da membrana celular, e após a ação das esterases celulares ocorre à liberação do diacetato formando uma molécula mais polar (DCFH) que fica retida dentro da célula. Em seguida as células são tratadas com 2,2' – azobis-amidinopropano-diidroclorídrico (ABAP) que se difunde através da membrana e se decompõe espontaneamente dando origem aos radicais peróxil. Estes radicais peróxil atacam a membrana celular para produzir mais radicais peróxil e oxidar o DCFH (não fluorescente) intracelular a DCF (diclorofluoresceína) que é fluorescente. Os antioxidantes impedem a oxidação da DCFH e dos lipídios da membrana celular, reduzem a formação de DCF. A diminuição na fluorescência celular comparado as células do controle indica a capacidade antioxidante dos compostos.

Os extratos polifenólicos de açaí têm demonstrado atividade antioxidante para suprimir a proliferação de células HL-60 de leucemia (DEL POZO-INSFRAN; TALCOTT, 2006). Outro estudo relata que a fração polifenólica não antocianina da polpa inibiu a proliferação de células HT-29 de câncer de colo humano (PACHECO-PALENCIA et al., 2008b). O açaí é aparentemente rico em antocianinas e já expôs forte atividade antiproliferativa em células tumorais cerebrais de ratos (HOGAN et al., 2010).

A efetividade da atividade antioxidante do extrato é dependente da polaridade do sistema em estudo, natureza do radical livre, do substrato a ser protegido (KING; YOUNG, 1999). A diversidade de compostos fenólicos presentes nos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) formam uma complexa matriz para avaliação da atividade antioxidante. (DEL-POZO INSFRAN; TALCOTT; BRENES, 2004; PACHECO- PALENCIA et al., 2008a; PACHECO- PALENCIA et al., 2008b; PACHECO- PALENCIA et

al., 2010).

Pacheco-Palencia et al. (2008b), caracterizaram a polpa desengordurada e fração lipídica do açaí apresentando algumas diferenças na composição fitoquímica. A polpa clarificada sem gordura continha ácidos fenólicos e flavonóis como: ácido protocatecuico ($15,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido p-hidroxibenzoico ($17,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), catequina ($49,1 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido vanílico ($57,7 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido siríngico ($43,4 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), epicatequina ($44,6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), ácido ferúlico ($12,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), dímeros de procianidina ($230 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), trímeros de procianidina ($237 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e capacidade antioxidante de $17,2 \text{ } \mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$, o que confirma estudos anteriores com polpa integral, porém, estes compostos apresentaram-se em menor quantidade na polpa clarificada (DEL-POZO INFRAN; TALCOTT; BRENES, 2004; PACHECO- PALENCIA et al., 2008a; PACHECO- PALENCIA et al., 2008b).

O objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavanois totais e antocianinas monoméricas totais, e também avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da fração lipofílica e da polpa desengordurada dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) e sua atividade antioxidante celular. Simultaneamente, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas do tipo “ion trap” com fonte “electrospray” (HPLC-ESI-MS/MS) foi usada para identificar os compostos fenólicos não antociânicos presentes nos extratos metanólicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As amostras de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) foram coletadas em três regiões distintas de cultivo no Estado de Santa Catarina (SC), Brasil, durante a safra de 2009/2010, descritas na Tabela 4. As regiões foram definidas de acordo com os dados descritos por Borges et al., 2010.

Tabela 4 – Condições edafoclimáticas das regiões de cultivo de juçara (*Euterpe edulis*)

	Latitude Longitude	Altitude (m)	Temperatura mínima – máxima (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Mês de colheita
Barra Velha	26°37'56" 48°41'05"	27	11,00 – 31,14	87	maio
Luis Alves	26° 43' 14" 48° 55' 58"	558	5,35 – 28,61	83	julho
Urussanga	28° 31' 50" 49° 13' 22"	368	9,33 – 30,98	81	janeiro

Fonte: EPAGRI (2009).

Os cachos de frutos foram colhidos em estágio ideal de maturação para o processamento. Após a debulha dos cachos, os frutos sadios, inteiros, maduros foram selecionados, armazenados em embalagens plásticas e congelados. Após, foram transportados ao Laboratório de Química de Alimentos em caixas térmicas a $5.0 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Materiais

Hexano, etanol, metanol, 4 dimetil-aminocinamaldeído (DMACA), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromane-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), tert-butil hidroperóxido (TBH), dimetil-sulfóxido (DMSO), 2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina(TPTZ), ácido clorídrico (HCl),

cloreto de ferro (FeCl_3) foram adquiridos da Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, E.U.A.).

As células Vero foram obtidas no Laboratório de Virologia do Instituto Butantã, São Paulo, SP, Brasil e mantidos em Leibovitz 15 (L 15). O meio de cultivo com 10 % de soro fetal de bovino foi obtido da Cutilab (Campinas, Brasil). O reagente Folin-Ciocalteu foi obtido da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça).

Ácido gálico, ácido cítrico, peroxidissulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), cloreto de potássio (KCl), carbonato de sódio (Na_2CO_3), acetato tri-hidratado de sódio, hidróxido de potássio (KOH), cloreto de amônio (NH_4Cl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Os padrões de ácidos fenólicos (ácidos cafeico, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuíco, siríngico e vanílico) e os flavonoides (epicatequina, catequina, miricetina, kaempferol e quercetina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (St. Louis, E.U.A.) e Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Os padrões de ácidos graxos metilados foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemie (St. Louis, E.U.A.). Os reagentes utilizados para as fases móveis foram de elevado grau de pureza (HPLC) e passaram por filtração em membranas de PTFE de $0,45\mu\text{m}$ da Millipore (Billencia, E.U.A.). Para as demais análises todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3 Preparo das amostras

Frutos maduros, em torno 100g, foram submetidos ao processo de despolpe manual. Após, a polpa foi submetida ao processo de branqueamento por imersão a $85 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min, e na sequência, submetidos a processo de secagem em estufa de ar circulante a uma temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ por período de 12h. Por último, a polpa foi triturada em moinho de bancada (IKA A49, SP, Brasil). O conteúdo de matéria seca dos frutos foi determinado por secagem em estufa a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ até peso constante (AOAC, 2005).

2.4 Extração dos compostos fenólicos da polpa desengordurada e da fração lipídica

Para a extração da fração lipofílica submeteu-se a polpa desidratada (2 g) a uma extração com 25 mL de hexano em ultrassom (Unique, São

Paulo, Brasil) por 15 minutos a 25°C. Após centrifugou-se o extrato a 2000 g por 15 minutos (Fanen 280R, São Paulo, Brasil) separando a fração orgânica em um balão de rotaevaporador com capacidade para 200 mL. O resíduo foi submetido novamente à extração por duas vezes. Por fim centrifugou-se o extrato e juntaram-se as frações orgânicas. Esse foi submetido à rotaevaporação a temperatura < 35°C para remoção do hexano.

Para o preparo do extrato lipofílico, a fração lipídica foi submetida a uma extração líquido-líquido com metanol usando banho de ultrassom por 15 min a 25°C e após centrifugado a 2000. g por 15 min. Este extrato foi utilizado para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, flavanóis totais e atividade antioxidante.

Para o extrato hidrofílico da polpa desengordurada realizou-se uma extração em banho de ultrassom com 50 mL de metanol a 25°C por 30 minutos. Após este extrato foi centrifugado por 15 min a 2000.g. O sobrenadante foi recolhido em um balão de rotaevaporador e removeu-se o solvente em rotaevaporador a < 35°C até secagem.

O extrato seco foi reconstituído em um balão volumétrico de 5 mL, este extrato foi utilizado para a quantificação de fenólicos totais, flavanóis totais e antocianinas monoméricas e identificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas(HPLC-MS/MS).

Para avaliação do efeito citotóxico do terc-butil-hidroperóxido (TBH) foi utilizado o extrato hidrofílico reconstituído em água deionizada, em um balão volumétrico de 5 mL.

2.5 Identificação de compostos fenólicos utilizando HPLC-ESI-MS/MS

O método usando LC-MS/MS para a separação dos compostos fenólicos foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 1200 Series da marca Agilent Technologies (Alemanha). A coluna de separação utilizada foi C18 (15 mm, 2,0 mm d.i., 4,6 µm de tamanho da partícula) da marca Varian. A separação dos compostos fenólicos foi feita no modo gradiente usando os solventes A (água com 0,1 % de ácido fórmico) e B (acetonitrila: água,95:5, v/v). A eluição na coluna iniciou-se com 20 % da fase B em 0 min aumentando linearmente para 95 % da fase B em 15 minutos. Retornou-se as condições iniciais de eluição 20 % B nos 30 min, e equilibrando a coluna por mais 10 min. A temperatura da coluna foi mantida 40°C e a taxa de fluxo de 200 µL min⁻¹, o volume de injeção da amostra de 10 µL.

O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e *ion trap* linear, modelo Q Trap 3200 da Applied Biosystems/ MDS Sciex (Concord, Canadá). O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para controlar o LC-MS/MS e tratar os dados obtidos a partir das análises. Os experimentos foram realizados usando a fonte TurboIonSpray™ (*electrospray* – ESI). Outros parâmetros para o cone e energia de célula de colisão estão listados na Tabela 5. Os compostos fenólicos foram monitorados usando o monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de solução metanólica contendo os analitos de interesse.

Tabela 5 - Parâmetros do espectrômetro de massas.

Parâmetro	DP*	EP*	CEP*	CE*	CXP*
p-Cumárico	21	4	10	13/33	6/4
Vanílico	26	5,5	10	4	4
Siringico	26	4	12	11/19	17/35
Rutina	31	5	26	27/49	6/4
Quercetina	56	4,5	14	41/69	4
Protocatecuico	26	9	10	17/31	4
Ferílico	21	4	12	13/17	4
Cafetco	21	5	12	11/37	4
Clorogênico	26	2,5	18	17/75	6/4
Benzóico	41	11,5	10	15/31	4

*DP- *Declustering Potential*; EP- *Entrance Potential*; CEP- *Collision Cell Entrance Potential*; CE- *Collision Energy*; CXP- *Collision Cell Exit Potential*.

2.6 Determinação dos compostos fenólicos totais (FT), flavanois totais (FVT) e antocianinas monoméricas totais (AMT)

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método espectrofotométrico com reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) com absorvância medida em 765 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalentes a ácido gálico (EAG) 100g^{-1} de polpa desengordurada ou 100g^{-1} de óleo.

O conteúdo de flavanois estimado pelo método espectrofotométrico dimetilaminocinamaldeído (DMACA) segundo Arnous, Markis e Kefalas (2002). A leitura de absorvância realizada em 640nm em espectrofotômetro UV-Vis modelo HP 8452A Hewlett-Packard (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) resultados expressos em miligramas de equivalentes a catequina (ECA) 100g^{-1} de polpa desengordurada.ou 100g^{-1} de óleo.

Para a quantificação das antocianinas totais utilizou-se o método descrito por Giusti e Wrolstad (2001), em que os extratos foram adicionados separadamente em solução tampão cloreto de potássio (KCl, $0,025\text{ mol L}^{-1}$, pH 1,0) e solução tampão de acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $0,4\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5), e efetivadas as medidas a absorção em 510 nm e a 700 nm usando um espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport, Cheshire, UK). A absorção (A) das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Equação (1)

O conteúdo de antocianinas monoméricas calculado segundo a fórmula:

$$\text{Conteúdo de antocianinas (mg } 100\text{g}^{-1}\text{fruta)} = (A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 100) / (\epsilon \times l)$$

Equação (2)

Onde a massa molecular (MM) da cianidina3-glicosídeo ($449,2\text{ g mol}^{-1}$) e o coeficiente de absorção molecular ($\epsilon = 26900\text{ mol L}^{-1}$) são constantes. FD é o fator de diluição.

O conteúdo de antocianinas monoméricas totais expresso em mgcianidina3-glicosídeo 100g^{-1} de polpa.

2.7 Avaliação da atividade antioxidante

a) Avaliação da atividade antioxidante pelo método seqüestro de radicais DPPH

A atividade antioxidante dos frutos foi quantificada através da capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos em sequestrar/desativar o radical estável DPPH[•] de acordo com o método descrito por Brand Willians, Cuvelier e Berset (1995).

Uma solução de metanol contendo 0,06 mmol L⁻¹ de DPPH foi preparada e, em seguida, armazenada a 20°C até a sua utilização. A solução de trabalho foi obtida por diluição com metanol da solução estoque de DPPH (0,06 mmol L⁻¹) até a obtenção de uma solução com absorvância de aproximadamente 0,980 ± 0,02 a 515 nm.

O percentual de inibição do radical foi medido através da leitura de absorvância em espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport, Cheshire, UK) a 515 nm, a leitura da absorvância do radical antes de adicionado os extratos (A₀) e após a adição (A_f) do extrato com tempo de reação fixado em 30 minutos. A inibição do radical DPPH em termos de percentual (% I) é calculada de acordo com a fórmula:

$$\% I = [1 - (\text{absorvância da amostra}_{t=30 \text{ min}} / \text{absorvância controle}_{t=0 \text{ min}})] \times 100 \text{ Equação (3)}$$

Uma curva padrão de Trolox (75-1050 μmol L⁻¹; y = 14,089x + 10,858, r² = 0,9953; onde y = concentração da solução; x = leitura da absorvância) utilizada para quantificar a atividade antioxidante dos extratos e os resultados expressos em μmol L⁻¹ capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) 100g⁻¹ de polpa desengordurada ou 100g⁻¹ de óleo.

b) Poder redutor/antioxidante do ferro (FRAP)

Este procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996). Este método baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) presentes na amostra, em meio ácido, pH 3,6, reduzirem o complexo de Fe⁺³/tripiridiltriazina (TPTZ) para formar Fe⁺², de cor azul intensa. A absorvância do complexo foi medida em

comprimento de onda de 620 nm em um espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport, Cheshire, UK).

Uma curva padrão de Trolox ($75-1050 \mu\text{mol L}^{-1}$; $y = 13,07 x + 7,6$, $r^2 = 0,9978$; onde y = concentração da solução; x = leitura da absorvância) utilizada para quantificar a atividade antioxidante dos extratos e os resultados expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) 100g^{-1} de polpa desengordurada ou óleo.

c) Avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno

A atividade antioxidante baseada na cooxidação do β -caroteno/ ácido linoléico será avaliada de acordo com o método descrito por Marco (1968), modificado por Miller (1971). Prepara-se uma solução de β -caroteno em clorofórmio (20 mg mL^{-1}) e uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ desta solução será transferida para um frasco de erlenmeyer com $40 \mu\text{L}$ de ácido linoléico, 1mL de clorofórmio e 500 mg de Tween 40. Posteriormente o clorofórmio é completamente evaporado à frio com gás inerte. E o sistema é adicionado de 150 mL de água desionizada saturada com oxigênio e a mistura homogeneizada. As medidas serão realizadas em diferentes sistemas contendo soluções dos extratos e grupos controle. Além disso, o efeito sinergista será avaliado utilizando misturas das amostras com BHT nas mesmas concentrações do extrato puro. Uma leitura inicial da absorvância (470 nm) é feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema, e a absorvância monitorada a cada 15 min , durante um período de 2 h . Os sistemas foram mantidos a 50°C durante o período. A atividade antioxidante (AA) é obtida em termos de percentual de inibição, relativos ao grupo controle, utilizando a Equação 4:

$$AA = \frac{A_s - A_c}{A_o - A_c} \times 100 \quad \text{Equação 4} \quad (4)$$

Onde A_s e A_c são, respectivamente, as absorvâncias da amostra e do controle ao final da análise; A_o é a absorvância da amostra (470 nm) no início da análise.

2.8 Atividade antioxidante celular

As células HepG2 (linhagem Vero) foram mantidas em meio de crescimento E Williams (MEW) suplementado com 5% de soro fetal de bovino (SFB), 10 mmol L^{-1} de hepes, 2 mM L-glutamina, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de

insulina, $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidrocortisona, 50 units mL^{-1} de penicilina, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ estreptomicina e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . As células foram usadas entre 12 e 32 passagens. Como controle positivo utilizou-se uma solução de ácido gálico nas concentrações dos extratos de juçara (*Euterpe edulis* M.).

O efeito citotóxico terc-butil-hidroperóxido (TBH) foi avaliado pelo método do

brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (SCHILLER; KAINZ; MYNETT; GESCHER, 1992). As células HepG2 (linhagem Vero) foram semeadas a densidade de 6×10^4 /poço em uma microplaca de 96 poços, utilizando $100 \mu\text{L}$ de meio de crescimento por poço, a placa foi mantida em estufa (37°C). Após 24 horas o meio de crescimento foi removido e os poços lavados com uma solução salina. Os extratos foram diluídos no meio L-15 nas concentrações de 0,5 a $5 \mu\text{g}$ de fenólicos totais (volume final $200 \mu\text{L}$), colocado nos poços e mantidas a 37°C por 24 h. Dois grupos dos poços não receberam amostra, e eles foram separados como controles positivos e negativos.

Após a incubação, os poços foram lavados e adicionou-se $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBH nos poços. O controle positivo não recebeu este tratamento. As placas foram mantidas a 37°C durante 1 h. Após as placas foram novamente lavadas e todas receberam a solução de MTT (5 mg mL^{-1}), e foram, em seguida mantidas a 37°C durante 4 h. Finalmente os poços foram novamente lavados e preenchidos com DMSO. Os resultados foram lidos em 570 nm num espectrofotômetro BIOTEK (modelo Synergy HT). A avaliação das células mortas foi realizada por meio da observação microscópica.

2.9 Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos da fração lipídica da juçara (*Euterpe edulis* M.) foram submetidos ao método de extração e derivatização (AOCS, 2004). Para determinação de ácidos graxos utilizou-se um cromatógrafo a gás, equipado com detector de ionização de chama acoplado a um integrador e registrador (Shimadzu CG17/Class GC10, Tóquio, Japão). Uma coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) com diâmetro interno de $0,25 \text{ mm}$ com espessura de 100 mm . O fluxo de gás de arraste hélio foi de 1 mL min^{-1} . A temperatura do injetor foi de 140°C por 5 minutos, e então aquecimento de 4°C/min até 240°C permanecendo nesta temperatura por 20 minutos e a temperatura do detector de 260°C . A

identificação dos principais ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção das bandas cromatográficas das amostras com os padrões de ácidos graxos esterificados, e a quantificação, por normalização das áreas dos picos, sendo os resultados expressos em percentagem.

2.10 Análise Estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey, análise de correção em um intervalo de confiança de 95%. As análises foram realizadas com auxílio do programa Statistic 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fenólicos totais (FT), flavanois (FVT) e antocianinas monoméricas totais (AMT)

Como apresentado na Tabela 6, o conteúdo de fenólicos totais na fração lipídica do fruto da região A ($4336,00 \pm 24,46$ mg EAG $100g^{-1}$) diferindo estatisticamente das outras regiões ($p < 0,05$). A fração lipídica da região A também apresentou o maior conteúdo ($83,64 \pm 5,4$ mg EAG $100g^{-1}$) diferindo-se estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Conteúdo de fenólicos totais e flavanois totais na polpa desengordurada (PD) e fração lipídica (FL) de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.)

Amostra	Fenólicos totais*		Flavanois totais**	
	PD	FL	PD	FL
A	$1466,00 \pm 3,39$	$4336,00 \pm$	$38,75 \pm$	$83,64 \pm$
Barra	^a	$25,46$ ^a	$7,8$ ^b	$5,4$ ^a
Velha				
B	$1476,74 \pm 18,6$	$3020,98 \pm$	$72,56 \pm$	$51,63 \pm$
Luís Alves	^a	$35,99$ ^b	$3,2$ ^a	$3,6$ ^b
C	$1418,73 \pm$	$3030,39 \pm$	$75,06 \pm$	$28,22 \pm$
Urussanga	$11,14$ ^a	$18,75$ ^b	$4,9$ ^a	$5,55$ ^c

*Valores expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG). $100g^{-1}$. ** Valores expressos em mg equivalentes de catequina (ECA). $100g^{-1}$. ^{a-c}: Valores seguidos por diferentes letras minúsculas, na vertical, representam diferenças significantes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras.

O conteúdo de fenólicos totais para polpa desengordurada não apresentam diferença estatística entre si ($p > 0,05$) com os maiores conteúdos encontrados na região B. Entretanto para o conteúdo de flavanóis totais os maiores conteúdo foram encontrados nas amostras B e C com 72,56 e 75,04 mg ECA 100g^{-1} , respectivamente; diferindo significativamente em relação a amostra A ($p < 0,05$).

As frações de polpa desengordurada (PD) apresentam os maiores conteúdos de fenólicos para as regiões B e C com 1476,74 e 1418,73 EAG 100g^{-1} , respectivamente diferindo significativamente ($p < 0,05$) da região A. A mesma relação pode ser observada para o conteúdo de flavanóis nas frações de polpa desengordurada.

Para o conteúdo de antocianinas os frutos da região C apresentaram os maiores conteúdos ($409,85 \pm 2,33$ mg cianidina 3-glicosídeo 100g^{-1} matéria fresca), enquanto que o menor conteúdo foi observado na região A ($72,50 \pm 2,1$ mg cianidina 3-glicosídeo 100g^{-1} matéria fresca). As frutas da região B apresentaram $207,94 \pm 1,68$ mg cianidina 3-glicosídeo 100g^{-1} matéria fresca. Todos os frutos apresentam diferença estatística com relação ao conteúdo de antocianinas.

A variação dos níveis de antocianinas nos frutos de juçara pode ser devido as diferenças entre as regiões de cultivo (BORGES et al., 2011a). Os frutos da região foram cultivados em região de altitude média (368 m) e o período de frutificação das palmeiras ocorre nos meses de verão. A luminosidade influencia grandemente, uma vez que os fótons são absorvidos e transmitidos no sistema de fitocromos, que produzem uma elevação da atividade enzimática implicada na via de biossíntese das antocianinas. Assim podemos relacionar a altitude das regiões em estudo com a maior incidência solar favorecendo o acúmulo das antocianinas (TAIZ & ZEIGER, 2006; BORGES et al., 2011a).

3.2 Perfil de compostos fenólicos

Em estudos anteriores sobre as espécies de açai (*Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*), os ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas foram determinados por HPLC (DEL POZO-INSFRAN, PERCIVAL & TALCOTT, 2006; SCHAUSS et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2008; KANG et al., 2010; PACHECO-PALENCIA et al., 2010; GORDON et al., 2012; KANG et al., 2012; MULABAGAL & CALDERÓN, 2012). No entanto, até o momento, não há relatos disponíveis na literatura para o perfil dos compostos fenólicos dos frutos *Euterpe edulis* M.

A análise dos extratos de juçara por HPLC-ESI-MS/MS levou a identificação de ácidos fenólicos e flavonoides com base na fórmula molecular, no padrão de fragmentação e pela comparação dos tempos de retenção com os padrões disponíveis comercialmente. A separação dos compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS do extrato metanólico de juçara (Tabela 7) indicou a presença de ácidos fenólicos e flavonoides.

Tabela 7 – Compostos fenólicos majoritários identificados em juçara (*Euterpe edulis* M.)

Tempo retenção (min)	Massa molecular calculado (M)	Massa molecular experimental (m/z) (M-H) ⁻	MS/MS (m/z)	Composto identificado
12,08	124,04	123,04	78,9; 77,1	Ácido benzóico
10,03	182,07	181,07	163,1; 89,1	Ácido cafeíco
9,22	356,11	355,11	163,2; 89,1	Ácido clorogênico
11,59	196,11	195,11	177,1; 145	Ácido ferúlico
6,16	156,05	155,05	93,1; 65,1	Ácido protocatecúico
10,91	304,03	303,3	153,1; 69	Quercetina
10,57	612,12	611,12	303,1; 85	Rutina
10,22	200,12	199,12	155; 149,1	Ácido siríngico
10,08	170,06	169,06	92,9; 64,8	Ácido vanílico
11,32	166,11	165,11	147,1; 91,1	Ácido ρ -Coumaric

3.3 Atividade antioxidante

Os frutos de juçara apresentam elevado conteúdo de lipídios em sua matéria (18,45 – 44,08 % de óleo em matéria seca) (BORGES et al., 2011a). A fim de evitar a interferência da fração lipídica nos métodos de

avaliação da atividade antioxidante geralmente ocorre a separação da fração lipídica da polpa do fruto (ARRANZ; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006; RUFINO et al., 2011). Neste estudo, avaliou-se a atividade antioxidante da polpa desengordurada e da fração lipídica dos frutos de através dos métodos de DPPH, FRAP e β -caroteno.

A contribuição da fração lipídica com a capacidade antioxidante (ensaios de DPPH e FRAP) é inferior a 5 %. Isto pode ser justificado devido a sua composição química apresenta esteróis, carotenóides, clorofilas, tocóis e glicerídeos. Estes compostos não agem sobre o mecanismo de atividade antioxidante dos ensaios DPPH e FRAP.

Testes preliminares apresentaram a influência da fração lipídica como interferente na determinação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos oriundos da extração do fruto inteiro, sem remoção da fração lipídica. Este fator que pode ter interferido nos dados relatados na literatura. Assim recomenda-se a avaliação da atividade antioxidante separada da polpa desengordurada e da fração lipídica.

No ensaio de DPPH e FRAP, Tabela 8, as amostras B e C apresentaram maior atividade antioxidante com 1325,51 e 1332,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ TEAC 100 g^{-1} de polpa desengordurada (DPPH); e 1110,86 e 1158,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ TEAC 100 g^{-1} de polpa desengordurada (FRAP), respectivamente. Estes valores não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 8- Avaliação da atividade antioxidante em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) desengordurada

Amostra	DPPH*	FRAP*
A	836.1 \pm 5.7 ^b	571.14 \pm 8.9 ^b
B	1325.50 \pm 6.8 ^a	1110.86 \pm 13.11 ^a
C	1332.05 \pm 5.5 ^a	1158.87 \pm 10.2 ^a

* Valores expresso $\mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox. 100 g^{-1} polpa desengordurada.

^{a-c}: Letras diferentes na mesma coluna, os valores apresentam diferença significativa (Tukey $p < 0.05$).

A atividade antioxidante de muitos frutos surge da ação sinérgica combinada de uma mistura de compostos, incluindo compostos fenólicos, carotenóides e vitamina C e E. No entanto, em frutas como o açaí, que contém quantidades relativamente pequenas dessas vitaminas, ácidos fenólicos, flavonóis, flavanóis, e antocianinas são os principais

contribuintes para a capacidade antioxidante (RUFINO et al., 2010).

A percentagem de inibição dos radicais DPPH foi mais elevada para os extratos da amostra C com $59,9 \pm 3,4\%$, seguindo-se dos extratos da amostra B ($57,91 \pm 5,6 \%$), não apresentam diferença significativa estatisticamente entre os resultados obtidos ($p > 0,05$). Os extratos da amostra A demonstraram a inibição de $50,44 \pm 3,7 \%$ e este valor difere significativamente das outras.

Neste trabalho, as correlações (R^2) são forte ($p < 0,05$) entre o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante medida por ensaios de DPPH e FRAP no extrato da polpa desengordurada ($R^2 = 0,91$ e $R^2 = 0,87$, respectivamente). Além disso, o extrato da polpa desengordurada com maior conteúdo de antocianinas monoméricas totais também apresentou elevada atividade antioxidante.

A Figura 3 apresenta um gráfico do índice de inibição da oxidação do β -caroteno a 50°C em emulsão com ação do extrato da polpa de juçara desengordurada e da fração lipídica de juçara.

Observa-se que os extratos da fração lipídica possuem menor atividade antioxidante neste ensaio em comparação com os extratos da polpa desengordurada.

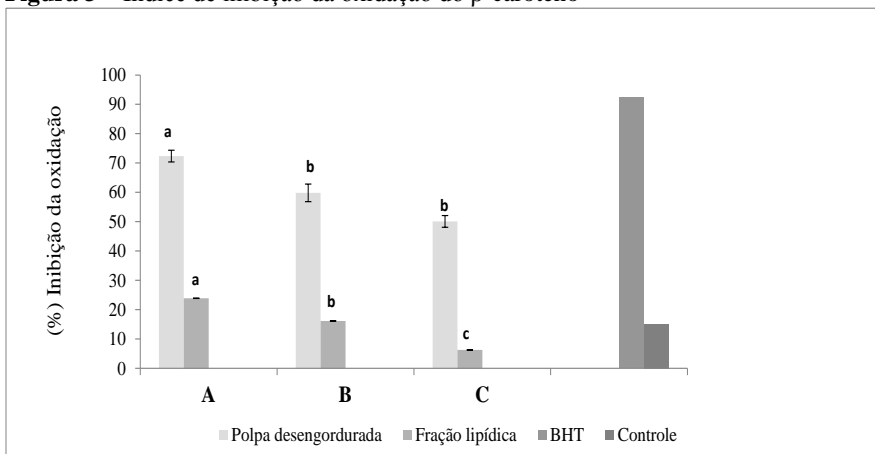
Os extratos da fração lipídica apresentam comportamento semelhante a do controle após 60 minutos de reação. Os extratos da polpa desengordurada também apresentam comportamento semelhante entre as amostras (A, B, C) e para o extrato com BHT.

O extrato da polpa desengordurada com a inibição de oxidação mais elevada (A, $72,37 \pm 2,3 \%$) o resultado diferiu significativamente dos extratos de B ($59,83 \pm 3,0 \%$) e C ($50,1 \pm 2,1 \%$), com atividade antioxidante intermediária.

A fração lipídica apresentou menores índices de inibição da oxidação de $23,89 \pm 2,6 \%$; $16,14 \pm 4,7 \%$ e $6,27 \pm 2,1 \%$ para os extratos A, B e C, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o potencial dos extratos de juçara para inibir o processo oxidativo em sistemas emulsionados deve ser explorado.

O extrato da polpa desengordurada (A), com menor conteúdo de antocianinas apresentou o maior índice de inibição da oxidação no sistema emulsionado, com menor atividade antioxidante para os ensaios de DPPH e FRAP. A correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos totais e a inibição da oxidação do β -caroteno, no extrato da polpa desengordurada e na fração lipídica foi $R^2 = 0,45$ e $R^2 = 0,31$, respectivamente.

Figura 3 – Índice de inibição da oxidação do β -caroteno

a-c: Letras diferentes apresentam diferença estatística entre si (Tukey's HSD $p < 0.05$).

3.4 Atividade antioxidante celular

A avaliação da atividade antioxidante pela capacidade de redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} pelo método FRAP e o método de captura do radical livre DPPH são métodos químicos amplamente utilizados. No entanto, o ensaio químico não reflete as condições fisiológicas celulares de um organismo. A utilização de novas plantas e frutas em busca de compostos fenólicos como antioxidantes para as indústrias alimentícias e farmacêuticas requer estudos sobre a atividade antioxidante *in vivo* (ROSA et al., 2008).

A capacidade antioxidante dos três extratos de juçara também foram avaliados pelo ensaio de MTT (SCHILLER et al., 1992; WOLFE et al., 2008; WOLFE & LIU, 2007). Os dados do método *in vivo* MTT reflete a capacidade dos antioxidantes presentes no extrato poderem entrar nas células vivas e proteger contra danos oxidativos. Os resultados para o ensaio de MTT são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação do efeito protetor do extrato de juçara após 24 h do estresse oxidativo induzido em células Vero

Extrato	Concentração do extrato $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Células viáveis
Amostra A	1,5	$34,84 \pm 2,54^c$
	4,5	$20,46 \pm 1,66^d$
	9	$13,81 \pm 0,30^d$
	15	$17,31 \pm 0,35^d$
Amostra B	1,5	$34,73 \pm 2,61^c$
	4,5	$21,32 \pm 1,60^d$
	9	$15,94 \pm 0,72^d$
	15	$16,30 \pm 0,27^d$
Amostra C	1,5	$44,18 \pm 0,82^b$
	4,5	$38,68 \pm 2,97^{bc}$
	9	$42,78 \pm 1,74^b$
	15	$31,97 \pm 1,25^c$
Controle Positivo	7,5	$81,14 \pm 5,44^a$
Controle Negativo	-	$26,66 \pm 5,48^{cd}$
Ácido gálico	1,5	$56,92 \pm 1,71^b$
	4,5	$51,18 \pm 4,43^b$

Valores de média \pm d.p., n = 7. Controle negativo

Valores referentes à média \pm desvio-médio, n = 7. Controles negativos células não foram submetidas a oxidação com TBH. Controle positivo as células foram submetidas a oxidação com TBH.

a-d: letra diferentes na mesma coluna os valores apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

A fim de induzir o estresse oxidativo diferenciadas células Vero foram tratadas com tert-butil hidroperóxido (TBH) ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ durante 2 horas) utilizando a concentração mais elevada capaz de induzir ao dano oxidativo significativo, mas não a morte celular (dados não apresentados).

Os extratos A, B e C ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) da polpa de juçara desengordurada suprimiu significativamente o estresse oxidativo induzido

por TBH (controle negativo) com a percentagem de células viáveis de 34,84 %, 34,73 % e 44,18 %, respectivamente.

Os resultados para o extrato C, em todas as concentrações, não diferiram significativamente do extrato com ácido gálico (1,5 e 4,5 mmol L⁻¹), e estes extratos foram mais eficientes do que os outros em todas as concentrações avaliadas, embora a significância estatística foi observada apenas para a concentração de 15 μmol L⁻¹ em relação ao controle positivo.

Os resultados revelaram resposta dependente da concentração do extrato, uma vez que a maior percentagem da viabilidade celular foi observada com 1,5 μmol L⁻¹. Este resultado indica que os extratos de juçara apresentam efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido em células Vero.

Um estudo demonstra a inibição da proliferação de células HT-29 do carcinoma do cólon de maneira dose-dependente utilizando extrato de açaí (PACHECO-PALENCIA et al., 2008). Outro estudo demonstra o efeito das antocianinas de um extrato de açaí suprimindo a proliferação de células HL-60 ao serem induzidas a apoptose celular (DEL POZO-INSAFRAN, TALCOTT & BRENES, 2006).

3.5 Perfil de ácidos graxos

A Tabela 10 apresenta o perfil de ácidos graxos dos frutos juçara (*Euterpe edulis* M.) das três amostras em estudo.

Considerando o perfil de ácidos graxos saturados não existem diferenças significativas entre as amostras, e apresentam como principal ácido graxo saturado o ácido palmítico. Os ácidos graxos monoinsaturados são predominantes representados pelo ácido oléico, apresentando diferenças estatísticas entre amostras, a região C com o menor conteúdo. Os ácidos graxos poliinsaturados, representados pelo ácido α -linoléico, apresentam diferença estatística entre as amostras.

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração lipídica de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.)

Ácidos Graxos	Amostras		
	A	B	C
Mirístico (14:0)	0,06 ± 0,00	Ni	0,07 ± 0,00
Palmítico (16:0)	24,86 ± 0,03	22,41 ± 0,02	24,44 ± 0,01
Palmitoléico (16:1)	1,59 ± 0,00	0,72 ± 0,00	1,23 ± 0,00
Margárico (17:0)	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Heptadecenóico (17:1)	Ni	Ni	0,05 ± 0,01
Esteárico (18:0)	2,35 ± 0,00	5,01 ± 0,00	3,84 ± 0,00
Oleico (18:1)	44,63 ± 0,01	50,25 ± 0,02	44,17 ± 0,05
Vacênico (18:1)	ni	Ni	ni
Linoléico (18:2)	25,36 ± 0,02	19,53 ± 0,01	24,93 ± 0,02
Araquídico (20:0)	0,18 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,19 ± 0,00
Eicosenóico (20:1)	0,07 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,07 ± 0,00
α-Linolênico (18:3)	0,67 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,70 ± 0,00
Docosanóico (22:0)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01
Erúcido (22:1)	ni	0,24 ± 0,00	ni
Lignocérico (24:0)	ni	ni	ni
Nervônico (24:1)	ni	0,10 ± 0,00	ni
Não identificados	0,07 ± 0,00	0,57 ± 0,00	ni
Saturados	27,60 ± 0,03 ^a	27,83 ± 0,02 ^a	28,71 ± 0,01 ^a
Monoinsaturados	46,30 ± 0,01 ^b	51,56 ± 0,02 ^a	45,53 ± 0,03 ^b
Polinsaturados	26,03 ± 0,03 ^a	20,04 ± 0,00 ^b	25,63 ± 0,03 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três repetições. ^{a-b}

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha apresentam diferenças estatística significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

ni – não identificados

Conclui-se que juçara (*Euterpe edulis* M.) é um fruto rico em ácidos graxos insaturados, apresentando em torno de 70% destes em sua composição.

A amostra da região B diferencia-se das demais por apresenta uma relação de menor conteúdo de α-linolênico e maior conteúdo de ácido palmítico.

O conteúdo de lipídios e a composição de ácidos graxos nos frutos

de juçara (*Euterpe edulis* M.) se assemelha aos frutos do açaí (*Euterpe oleracea*), esse alto teor de lipídios representa 90% da calorias contida nos frutos (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004).

Em relação ao ácido oléico, os resultados de juçara (*Euterpe edulis* M.) (44,63 a 55,61%) são muito próximos aos encontrados por Nascimento et al. (2008), Schauss et al. (2006b) e Rogez (2000) para o açaí (*E. oleracea*) (52, 56,2 e 54,9 %, respectivamente).

4 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo sobre a capacidade antioxidante de frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) apresentando ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”. O extrato de juçara apresenta alto conteúdo de antocianinas associado com elevada atividade antiproliferativa contra a indução do estresse oxidativo em células Vero. O conteúdo de fenólicos totais apresenta maiores concentrações na fração lipídica, porém este não contribui para atividade antioxidante. A análise dos extratos metanólicos de juçara (*Euterpe edulis* M.) por HPLC-ESI-MS/MS identificou a presença de compostos tais como ácidos fenólicos (benzóico, clorogênico, cafeíco, ferúlico, protocatecuíco, siríngico, vanílico e *p*-cumárcio) e flavonoides (quercetina e rutina) que contribuem de forma significativa para a atividade antioxidante.

**CAPÍTULO 3- DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EM BEBIDA DE JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC-
DAD) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM BEBIDA DE JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC-DAD) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO

Juçara (*Euterpe edulis* M.), pertencente à família Arecaceae é uma palma que produz um tipo nobre de palmito. A palmeira juçara produz um fruto redondo, conhecido como juçara. O fruto da juçara é macerado com água e separado das suas sementes para se obter uma bebida popularmente chamada polpa de juçara, similar ao açaí. A exploração de diversas espécies nativas e exóticas tem aumentado nos últimos anos devido à presença de compostos fenólicos, estes fornecendo benefícios à saúde como redução de patologias causadas pelos efeitos nocivos dos radicais livres, além do valor nutricional. Não existem trabalhos na literatura que determinem os compostos fenólicos presentes na bebida de juçara. O objetivo deste capítulo foi desenvolver um método rápido e eficiente para determinação de compostos fenólicos empregando UPLC-DAD e a aplicação deste método em bebida de juçara. Em paralelo buscou-se a determinação da atividade antioxidante utilizando os métodos de captura de radicais DPPH e capacidade redutora de ferro (FRAP). Dez ácidos fenólicos foram analisados dentro de 8 min, utilizando o UPLC-DAD equipado com coluna analítica C18 (50 mm x 4,6 mm d.i., 1,7 µm de tamanho de partícula), usando 0,1% de ácido fórmico e metanol de fase móvel, no gradiente de eluição. O método foi totalmente desenvolvido em termos de linearidade ($r > 0,997$ para todos os 10 compostos), LOD (0,3-3,4 mg L⁻¹), LOQ (1,1-11,3 mg L⁻¹), recuperação (78,5 – 103,5 %). Os ácidos fenólicos encontrados foram protocatecuico > ferúlico > rutina > gálico > vanílico > siríngico > p-cumárico. Tais compostos contribuem para a alta atividade antioxidante determinada 1256,56 ± 32,3 µmol TEAC 100g⁻¹ de (DPPH) e 1196,65 ± 23,4 µmolTEAC 100g⁻¹ de polpa (FRAP). O desempenho analítico do método, em particular o tempo de análise muito curto indica a sua potencial aplicabilidade para análises de rotina e automatizada destes compostos em amostras de frutos.

Palavras-chave: Açaí. Alimentos funcionais. Compostos bioativos. *Euterpe edulis*. Juçara.

1 INTRODUÇÃO

O alto consumo de frutas ricas em antioxidantes tem sido associado a uma incidência reduzida de doenças degenerativas causadas por estresse oxidativo (DE BRITO et al., 2007; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011). As propriedades biológicas destes frutos têm sido amplamente atribuídas a vários compostos ativos presentes, tais como: vitaminas, minerais, compostos fenólicos, entre outros. Esses compostos fornecem benefícios à saúde além do valor nutricional e função metabólica (KALILI & VILIERIS, 2011; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011). Considerável atenção tem sido dada ao estudo dos compostos fenólicos presentes em matrizes alimentares, devido sua ingestão na dieta contribuir para redução da incidência de patologias como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações. Esses distúrbios são causados, entre outros fatores, pelos efeitos nocivos dos radicais livres (SPÀCIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008; NOVÁKOVÀ et al., 2010; GRUZ; AYAZ; TORUN e STRNAD, 2011; KALILI; VILIERIS, 2011). Os compostos fenólicos são capazes de inibir o processo de oxidação e formação de radicais livres, e estão amplamente distribuídos em frutas, especialmente as pequenas frutas vermelhas chamadas *berries* (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

O Brasil é um país com grande diversidade de espécies nativas e exóticas sub exploradas com potencial interesse para a indústria agrícola (GENOVESE et al., 2008).

Juçara (*Euterpe edulis* M.) é um fruto redondo contendo uma polpa roxa e fibrosa quando maduro, com uma semente castanho claro, não climatérico, é produzido pelas palmeiras (*Euterpe edulis* M.) cultivadas na Mata Atlântica. Apesar de sua ampla distribuição no Brasil, a juçara é muito menos consumida e conhecida do que os frutos açaí (*Euterpe oleracea*), e seus produtos como açaí, polpa e suco de açaí (HENDERSON, 2000; DE BRITO et al., 2007; BORGES et al., 2011a).

Recentemente o fruto de juçara (*Euterpe edulis* M.) vem sendo explorado no Estado de Santa Catarina para a fabricação de uma bebida roxa espessa obtida da maceração do fruto com água e a remoção da semente, essa bebida é popularmente chamada açaí (SCHIRMAN, 2009).

A literatura demonstra apenas três trabalhos com frutos de juçara (*Euterpe edulis*M.) identificando compostos fenólicos como: ácido protocatecuico, *p*-cumárico, siringico, vanílico, ferúlico, cafeico e gálico, alguns flavonoides como quercetina e a rutina, presentes na polpa identificados através de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada (HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) a

detectores de arranjo de diodos (DAD, do inglês “diode array”) ou espectrômetros de massas (BORGES et al., 2011a; BORGES et al., 2013); e ainda as antocianinas com espectroscopia de infra vermelho próximo (NIR, do inglês “near infra red”) (CAVALCANTI; LIMA; LOPES; PESSOA; TEIXEIRA, 2013).

Não existem relatos na literatura sobre o perfil e a quantificação de compostos fenólicos em bebida de juçara (*Euterpe edulis* M.), apenas um trabalho do nosso grupo de pesquisa descreve o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante em bebida de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no Estado de Santa Catarina (BORGES et al., 2011b).

Para os frutos de açaí a exploração sobre a composição fenólica desta espécie vem ocorrendo desde o ano 2004 com o primeiro estudo na Flórida (E.U.A.), o qual identificou a presença dos ácidos elágico, ferúlico, gálico, vanílico, *p*-hydroxibenzoico, *p*-cumárico, respectivamente ácidos fenólicos, e também a presença de catequina e epicatequina utilizando HPLC-DAD.

A partir deste, vários trabalhos avaliando a composição fenólica dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) foram desenvolvidos empregando HPLC-DAD (PACHECO-PALENCIA et al., 2008a; PACHECO-PALENCIA et al., 2008b) HPLC acoplado a um espectrômetro de massas do tipo “ion trap” com fonte “electrospray” (HPLC-ESI-MS) (SCHAUSS et al., 2006a; SCHAUSS et al., 2006b; HOGAN et al., 2010; KANG et al., 2010; PACHECO-PALENCIA et al., 2010; PACHECO-PALENCIA & TALCOTT, 2010) ou a ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês nuclear magnetic resonance) (KANG et al., 2010) obtendo-se assim um perfil de compostos fenólicos presentes nos frutos, tais como os ácidos elágico, ferúlico, gálico, vanílico, *p*-hydroxibenzóico, *p*-cumárico, protocatecuíco; epicatequina, catequina, homorientina, orientina, taxifolina, isovitexina, procianidinas, antocianinas, majoritariamente cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, como também derivados do ácido gálico.

Entretanto, nenhum destes trabalhos supracitados apresentam o enfoque analítico de desenvolvimento de método de separação, preparo de extratos, ou até mesmo a otimização da separação dos compostos com a avaliação dos parâmetros de desempenho do método.

É importante salientar que nenhum dos trabalhos supracitados aborda um enfoque analítico, tampouco contempla a otimização do desenvolvimento de um método de separação para os compostos estudados ou o estudo das variáveis envolvidas no preparo das amostras a fim de

umentar a eficiência das metodologias propostas. Ainda, são escassos os trabalhos que apresentam validação completa ou parcial dos métodos apresentados.

Existe um aumento na demanda para métodos analíticos com alta detectabilidade e seletividade para determinação destes compostos (SPÁCIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011). É possível observar que a cromatografia líquida de alta eficiência ocupa uma posição de liderança na separação e determinação de compostos fenólicos com diferentes sistemas de detecção, sendo comumente empregados UV-Vis, arranjo de diodos, UV-fluorescência, ressonância magnética nuclear, espectrômetro de massas (STALIKAS, 2007; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

A evolução da cromatografia líquida tem sido direcionada à necessidade de análises rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Em busca disso, a redução do tamanho das partículas, menores que 2 μm da fase estacionária das colunas é uma das alternativas recentemente exploradas, entretanto a elevada pressão resultante da redução de partículas não foi compatível aos sistemas cromatográficos convencionais (MALDANER; JARDIM, 2008; SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011).

Somente na década de 90 surgiram partículas esféricas porosas de 2,5 μm , com as quais são obtidas colunas com alta eficiência (25000 pratos/15 cm), os recheios são reprodutíveis e as análises mais rápidas, devido à concomitante diminuição do tamanho das colunas. Pouco mais tarde surgiram as partículas esféricas porosas de 1,7 μm , que comparadas às partículas de 5 ou 3 μm , permitiram melhores resoluções e altas eficiências, 30000 pratos/15 cm (DAO et al., 2007).

Atualmente, a miniaturização dos sistemas cromatográficos tem sido uma convergência predominante na comunidade científica, porque reduz o consumo de solventes e reagentes e melhora o desempenho (SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011).

Dentre as modificações requeridas em um sistema de cromatografia de ultra eficiência (UPLC) destacam-se a capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para suportar altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos, dentre outros (KALILI; VILLIETS, 2011; SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011).

Atualmente, as vantagens da UPLC, em termos de eficiência de

separação, maior resolução, sensibilidade e redução do tempo de análise surgem a partir da utilização de partículas menores (tamanho da partícula aproximadamente 1,7 μm), entretanto a redução do diâmetro das partículas não diminui a vazão da fase móvel, de acordo com a teoria de Van Deenter (DAO et al., 2007; SUÁREZ et al., 2008; ORTEGA et al., 2010).

A UPLC abre possibilidades para aprimorar os métodos analíticos destinados a matrizes complexas, que requerem maior resolução e menor tempo de análise, análises de alto desempenho, em geral com tempo menor de 10 min (SPÁCIL et al., 2008; DARTORA et al., 2011; ORTEGA et al., 2010).

Recentemente trabalhos publicados na literatura empregam a UPLC acoplada a espectrometria de massas (MULAGAL; CALDERÓN, 2012) e UPLC ESI MS/MS (GORDON et al., 2012) na identificação de compostos fenólicos presentes no açaí (*Euterpe edulis* M.) com tempos de análise de aproximadamente 25 minutos.

Considerando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método rápido e com alta eficiência para análise de compostos fenólicos utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência com arranjo de diodos (UPLC-DAD). O método foi aplicado em amostras de polpa comercial de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) para determinação dos compostos fenólicos e comparação com sua atividade antioxidante. Foram avaliados alguns parâmetros de desempenho analítico, tais como linearidade, repetibilidade, limites de detecção, limite de quantificação e precisão intra e inter-ensaio, e recuperação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

A bebida congelada de juçara (*Euterpe edulis* M.) pasteurizada foi gentilmente fornecida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). As amostras da bebida de juçara (três polpas do mesmo lote) foram produzidas a partir de frutos colhidos na safra de 2010. As bebidas foram transportadas para o laboratório, mantidas em caixas térmicas contendo gelo a $5 \pm 2^\circ\text{C}$. No laboratório as amostras foram armazenadas em freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

2.2 Reagentes

Os padrões de compostos fenólicos utilizados nesse estudo foram os ácidos: benzoico, clorogênico, ferúlico, gálico, siríngico, p -cumárico, protocatecuico e vanílico, e ainda quercetina e rutina que foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Água purificada pelo sistema de desionização (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). A fase móvel metanol grau HPLC bem como ácido fórmico 98% e o ácido clorídrico p.a. e os demais reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico e obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.).

2.3 Hidrólise

Os ácidos fenólicos foram extraídos a partir de hidrólise alcalina, de acordo com método modificado de Gruz et al. (2011) e Krygier, Sosulski e Hogge (1982). A bebida de juçara (aproximadamente 5 g) foi pesada em um tubo de plástico com capacidade de 50 mL e adicionado de 20 mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} . A hidrólise foi realizada por um período de 12 horas a temperatura de 45°C . Após a hidrólise a solução foi acidificada a pH 2 com HCl 5 mol L^{-1} . Os ácidos fenólicos foram extraídos por partição com éter etílico (1:1, v/v). O extrato foi centrifugado a 4000 g por 10 min para a remoção de partículas em suspensão, e o sobrenadante cuidadosamente removido. O resíduo foi extraído por mais duas vezes, seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados e submetidos a secagem em rotaevaporador. Por fim o extrato foi ressuspensos em $500 \mu\text{L}$ de metanol e armazenado a -5°C até serem analisadas.

2.4 Condições cromatográficas

Os experimentos serão realizados em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência 1260 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.). Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna Zorbax Poroshell 120 C18 ($50 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm d.i.}$, tamanho da partícula de $1,7 \mu\text{m}$). O gradiente de eluição definido inicialmente foi adaptado do método proposto por Novaková et al. (2010), composto por (A) água acidificada com ácido fórmico 0,1 %, (B) metanol, na seguinte eluição: 0 min, 88,5% A, 11,5% B; aumentando para 25% B em 0,5 min, de 0,5 – 2,5 min, 75 - 50% A, 25% - 50% B, mantendo-se este gradiente até os 4 min, 4-

5 min 50% – 1% A, 50% - 99% B, 5-6 min 1 – 50% A, 99 – 50 % B, 6 – 8 min 50 – 88,5 % A , 50 – 11,5 % B. A vazão mantida a 1,5 mL/min até os 3 min, após reduz-se em 1,2 mL/min até os 5 min, em seguida retornara-se a 1,5 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção 1,5 µL. Todos os analitos foram detectados em 254 nm, 280 nm e 320 nm. Para a identificação dos compostos foram comparados os espectros dos padrões presentes na biblioteca de espectros do “software” de aquisição e tratamento dos dados do equipamento.

2.5 Parâmetros de desempenho analítico

Para verificar o desempenho analítico do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (instrumental, intra-ensaio e inter-ensaio) e a recuperação.

A linearidade foi avaliada utilizando sete soluções metanólicas de diferentes concentrações contendo uma mistura de padrões dos doze compostos fenólicos estudados. Curvas de calibração para cada um dos compostos fenólicos foram construídas com os valores da área do pico do analito *versus* a concentração.

Os LD e LQ foram obtidos a partir da relação sinal ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

A precisão instrumental foi avaliada a partir do coeficiente de variação (CV %) das áreas das bandas cromatográficas de cada analito, obtidos em vinte injeções consecutivas do ponto central da curva.

A precisão intra-ensaio foi determinada com a injeção em triplicata de duas soluções padrão na mesma concentração com preparações independentes. Para analisar a precisão inter-ensaio foram injetadas seis vezes por dia a mesma solução padrão por três dias consecutivos. Os resultados da precisão intra e inter-ensaio foram expressos pelo coeficiente de variação (CV %) das áreas dos picos.

Para avaliar a recuperação dos analitos adicionou-se à polpa de juçara um volume adequado de solução padrão de compostos fenólicos, em três concentrações distintas para cada analito. A recuperação dos analitos foi calculada com base na diferença entre o conteúdo total do analito na amostra adicionada e o conteúdo presente na amostra sem a adição, dividido pela quantidade adicionada.

2.6 Avaliação da atividade antioxidante

2.6.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos antioxidantes presentes no extrato da bebida de juçara em desativar o antioxidante o radical estável DPPH de acordo com o método descrito por Brand Willians; Cuvelier; Berset (1995).

O percentual de inibição do radical foi medido através da leitura de absorvância em espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport, Cheshire, UK) em 515 nm, do radical no sistema reacional antes de adicionar o extrato (A_0) e após a adição (A_f) do extrato com tempo de reação fixado em 30 minutos. Uma curva padrão de Trolox ($75-1050 \mu\text{mol L}^{-1}$; $y = 14,089 x + 10,858$, $r^2 = 0,9953$; onde y = concentração da solução; x = leitura da absorvância) utilizada para quantificar a atividade antioxidante dos extratos e os resultados expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) 100 g^{-1} bebida.

2.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP

A avaliação do potencial redutor de ferro (FRAP) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalentes ao Trolox ($\mu\text{mol L}^{-1}$ TEAC 100 g^{-1}). Soluções padrão de Trolox foram preparadas em concentrações que variaram de $25-500 \mu\text{mol L}^{-1}$, com uma curva linear padrão $y = x - 0,001 / 0,001$; $r^2 = 0,9937$; y é a concentração da solução; x é leitura da absorvância.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o “software” STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, E.U.A.). Os resultados experimentais foram expressos em médias \pm D.P. de valores em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das condições cromatográficas

A definição das condições cromatográficas iniciais para a separação dos compostos fenólicos na matriz polpa de juçara foi realizado um levantamento bibliográfico considerando estudos para determinação destes com o emprego de UPLC – DAD.

Como padrões utilizados para separação nas condições cromatográficas a serem avaliadas, foram escolhidos 10 compostos fenólicos, considerando os estudos já realizados por nosso grupo de pesquisa o qual identificou previamente alguns compostos fenólicos presentes nos frutos (BORGES et al., 2011a; BORGES et al., 2013).

Foram aplicados diferentes gradientes utilizando como fase móvel combinações entre metanol, acetonitrila, água, água acidificada com 0,1% de ácido acético (v/v) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (ABAD-GARCÍA et al., 2007; SPÁCIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008; NOVÁKOVÁ et al., 2010; HUNG; HATCHER; BARKER, 2011; RAFFERTY; SIEPMANN; SHURE, 2011).

Pela observação da separação dos compostos nos testes realizados, e considerando a solubilidade desses descritos na literatura, os gradientes que apresentaram melhor linha de base das bandas cromatográficas e eficiência foram utilizando como fase móvel água acidificada em combinação com metanol ou acetonitrila. Entretanto, optou-se trabalhar apenas com metanol devido ao custo relativamente menor e melhor interação com a fase estacionária da coluna, uma vez que a utilização de acetonitrila nessa fase estacionária reduz sua vida útil.

Dos gradientes avaliados, o que se mostrou promissor foi o gradiente citado por Novaková et al. (2010). O gradiente de eluição foi composto por (A) água acidificada com ácido fórmico 0,1 %, (B) metanol na seguinte eluição: 0-4 min, 88,5 % A, 11,5 % B e 4-20 min, 88,5 % - 50 % A; 11,5 % - 50 % B, gradiente linear.

Observou-se que a modificação do método isocrático para gradiente linear com aumento do metanol diminuiu o tempo de retenção das bandas cromatográficas, diminuindo também o tempo final de análise. Entretanto, com o gradiente de eluição atingindo 100 % de metanol ocorreu a co-eluição de alguns ácidos fenólicos. Dessa forma, inicialmente optou-se por manter o máximo do gradiente em 50 % A água acidificada e 50 % B metanol com o objetivo de alcançar a separação entre as bandas do ácido

clorogênico, vanílico e siríngico, devido as propriedades de retenção muito semelhantes desses analitos.

Foram avaliadas vazões constantes de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, sendo possível observar que a vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ aumentou o tempo de retenção dos analitos e diminuiu a resolução entre as bandas cromatográficas, enquanto que a vazão constante de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ causou a co-eluição dos ácidos vanílico e clorogênico, bem como os ácidos *p*-cumárico e ferúlico com a rutina.

Dessa forma observou-se que o aumento do gradiente de eluição com metanol a 70 % e a vazão a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ favoreceu a separação das bandas cromatográficas, não ocorrendo co-eluição entre os compostos. Entretanto, observou-se que após 10 injeções consecutivas da amostra houve a distorção das bandas cromatográficas e também o aumento da relação sinal/ruído, fato que pode ser atribuído ao perfil de retenção dos compostos na coluna, pelo fato do solvente não apresentar força suficiente para arrastá-los através da fase estacionária.

A fim de aumentar a repetibilidade do método, elevou-se o gradiente para 99 % de metanol voltando a condição de 50 % em um minuto de corrida, essa brusca elevação de solvente foi realizada mantendo-se a pressão constante, com o objetivo de forçar o solvente a arrastar todos compostos com polaridades próximas.

Com o aumento da temperatura da coluna de 25°C para 40°C , como proposto por Novakováet al. (2010) observou-se a diminuição o tempo de retenção das bandas cromatográficas de alguns analitos, não comprometendo a separação, ou seja, a temperatura influenciou no tempo de retenção dos ácidos gálico, *p*-cumárico, elágico e protococateúico. Dessa forma, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C durante a separação.

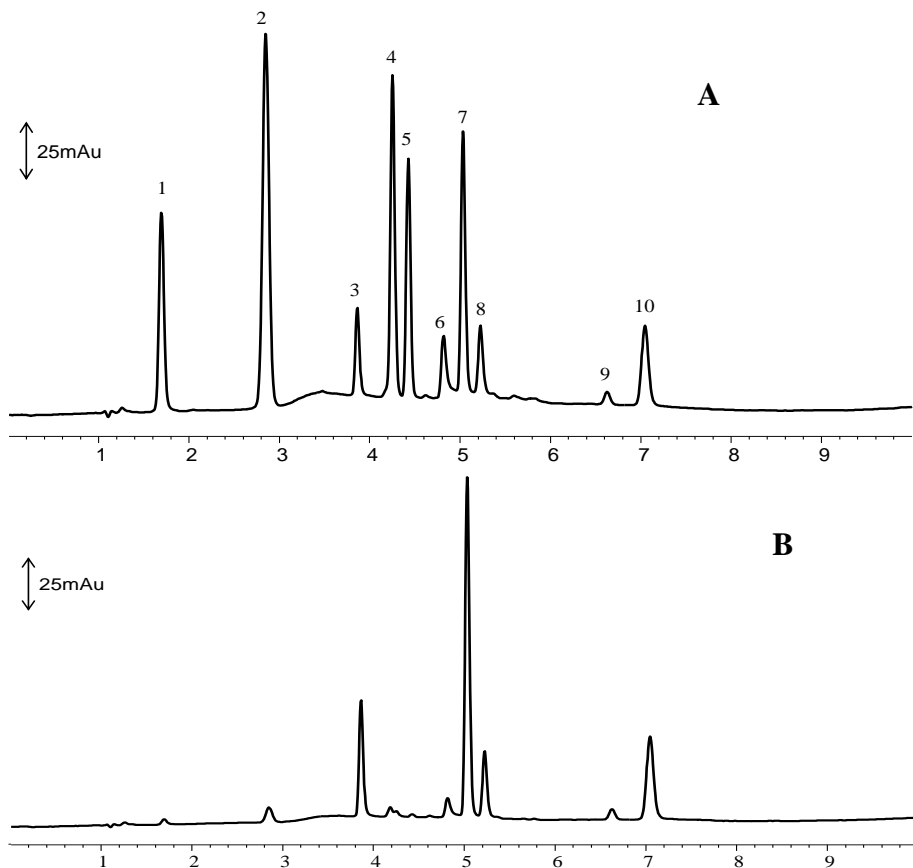
Apesar da fase móvel ser predominantemente aquosa no início do gradiente, o metanol foi utilizado como solvente para o preparo das soluções estoque dos padrões de ácidos fenólicos. Isto se deve a fraca solubilidade de algumas substâncias fenólicas em água. A diferente força do solvente metanol quando comparado a água causou ampliação e redução no início da eluição das bandas.

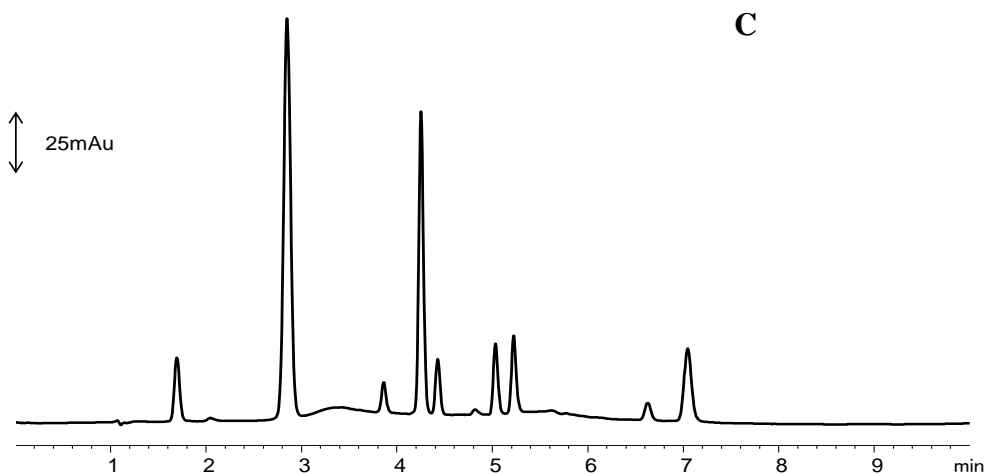
A Figura 4 apresenta a separação dos dez padrões dos compostos fenólicos estudados utilizando as condições cromatográficas definidas após as modificações do método.

A separação em linha de base das bandas cromatográficas foi satisfatória e a eficiência da coluna foi significativamente melhorada com o tamanho das partículas da fase estacionária de $1,7 \mu\text{m}$ e o tamanho da

coluna reduzido, como a utilizada neste método, uma vez que o método de separação proposto por Novaková et al. (2010) utilizou colunas de $1,7\mu\text{m}$. Nessa situação, o tempo de retenção dos analitos foi reduzido significativamente quando comparado com outro trabalho já realizado nessa matriz (BORGES et al., 2011a).

Figura 4- Separação de 10 ácidos fenólicos padrão com detecção em $\lambda = 280\text{ nm}$ (A), 254 nm (B), 320 nm (C). (1) gálico, (2) protocatecuico, (3) clorogênico, (4) vanílico, (5) siríngico, (6) p -cumárico, (7) ferúlico, (8) rutina, (9) benzóico, (10) quercetina. Condições cromatográficas Seção 2.4.





3.2 Parâmetros de desempenho analítico

Foram construídas curvas de calibração contendo os padrões dos dez ácidos fenólicos com oito níveis, cujas concentrações estão indicadas na Tabela 11.

Tabela 11- Linearidade do método de separação de ácidos fenólicos

Compostos	Concentração	a	b	r	F
Benzóico	14,4 – 64,8	0,5631	0,4010	0,9979	2231,97
Clorogênico	7,2 – 64,8	5,1040	10,7491	0,9985	3356,13
Ferúlico	12 – 108	12,535	33,0072	0,9981	4361,37
Gálico	7,2 – 64,8	9,2656	15,6641	0,9973	8015,59
<i>p</i> -cumárico	1,2 – 12	8,5835	2,0920	0,9970	4634,01
Protocatecuíco	7,2 – 36	1,7710	2,0919	0,9977	2624,87
Quercetina	14,4 -64,8	7,0853	21,6723	0,9996	3789,09
Rutina	7,2 – 72	5,8853	10,6912	0,9982	5364,01
Siríngico	2 – 20	5,6045	2,6381	0,9999	12047,15
Vanílico	4 – 20	2,7740	1,2152	0,9993	4666,19

a: coeficiente angular, b: coeficiente linear da equação $A = aC + b$, onde A = área da banda cromatográfica e C= concentração em mg L^{-1} .

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para calcular as estimativas dos parâmetros da regressão, tais como a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) para cada um dos analitos em estudo. Coeficientes de correlação maiores do que 0,997 foram obtidos, indicando boas correlações entre as concentrações dos compostos investigados e as áreas das bandas, no intervalo estudado das curvas de calibração.

Para a determinação da significância da regressão e a falta de ajuste da equação da reta, foi utilizado o *teste F*. Para o teste da significância da regressão, o valor de F_{reg} foi obtido pela divisão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQ_{reg}/MQ_r), sendo esses determinados em função do número de graus de liberdade e com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), tanto para a regressão, quanto para a falta de ajuste. Um valor estatisticamente significativo da razão entre as médias MQ_{reg}/MQ_r (isto é, menor do que o valor tabelado para F) indicou a existência de uma relação linear entre as duas variáveis para os dez compostos avaliados.

O desempenho do método analítico e alguns parâmetros do método proposto estão expostos na Tabela 12. A recuperação do método foi estabelecida pela adição dos padrões dos analitos em três níveis de concentração, e as recuperações alcançadas foram entre 85 e 100%.

O limite de detecção significa a menor concentração do composto em análise que pode ser detectado, podendo não ser quantificado pelo método experimental, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração do composto que pode ser quantificado utilizando o método experimental (RIBANI et al., 2004). Os valores do LD variaram entre $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ para os ácidos síringico e ρ -cumárico, a $3,4 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido ferúlico. Já o LQ apresentou-se entre $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ e $11,3 \text{ mg L}^{-1}$ para os mesmos compostos. Os valores da precisão instrumental foram $\leq 0,19 \%$, para as precisões intra-ensaio e inter ensaio, os valores foram respectivamente $\leq 1,51 \%$ e $\geq 8,32$.

A exatidão do método foi determinada com ensaios de recuperação, em três níveis para cada composto, e os resultados da percentagem de recuperação estiveram entre 78,5 e 103,5 %, também com satisfatórios valores de CV%.

Tabela 12-Parâmetros analíticos do método

Composto	Precisão**					Recuperação***
	LD*	LQ*	Inst	Intr	Inter	
Benzóico	2,7	9,1	0,11	0,05	2,3	94,5 – 89,1 ± 2,3 – 2,7
Clorogênico	2,1	7,0	0,18	0,08	0,93	91,7 – 85,9 ± 2,9 – 3,2
Ferúlico	3,4	11,3	0,14	1,09	8,32	86,7 – 78,5 ± 4,4 – 3,9
Gálico	1,5	5,0	0,12	0,70	2,38	88,3 – 79,0 ± 3,8- 4,7
Protocatecuíco	1,3	4,5	0,13	1,10	3,79	90,6 – 84,8 ± 2,9 – 4,8
Quercetina	2,9	9,6	0,19	1,09	2,68	99 – 92,7 ± 2,5 – 3,9
Rutina	0,9	3,0	0,11	1,51	0,35	97,6 – 101 ± 3,2 – 4,8
Siríngico	0,3	1,1	0,06	1,34	4,5	103,5 – 91,4 ± 3,9 – 5,1
Vanílico	0,6	1,9	0,09	1,09	3,88	102,3 – 94,9 ± 3,3- 4,9
ρ-Cumárico	0,3	1,1	0,11	0,68	2,03	93,8 – 99,3 ± 2,1 – 3,6

*Valores expressos em mg L⁻¹. LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação.

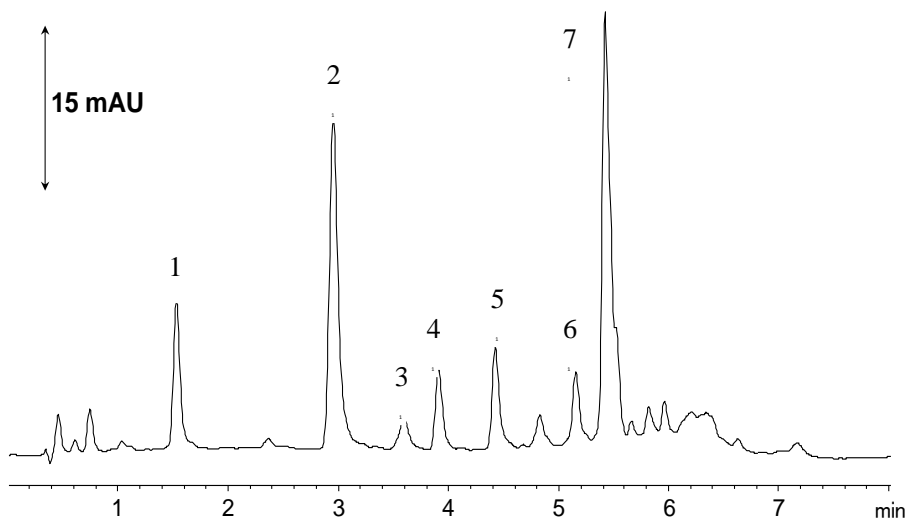
**% Coeficiente de variação. Inst- precisão instrumental, Intr- precisão intra-dia, Inter – precisão inter-dia

***Valores expressos em % de recuperação

3.3 Aplicação do método em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.)

A Figura 5 ilustra o cromatograma dos ácidos fenólicos encontrados na polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.). As amostras foram hidrolisadas e logo após injetadas em triplicata. As concentrações dos ácidos fenólicos observados nas amostras são apresentados na Tabela 13.

Figura 5- Separação dos ácidos fenólicos em extrato de polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) detectado a $\lambda=280$ nm. Ácidos (1) gálico (2) protocatecuico, (3) vanílico, (4) siríngico, (5) p -cumárico, (6) ferúlico e (7) rutina. Condições cromatográficas descritas na Seção 2.4



No cromatograma apresentado na Figura 5 identificou-se seis ácidos fenólicos e a rutina. Outras bandas cromatográficas foram visualizadas sendo provável a presença de compostos fenólicos como flavonóis, flavanonas, proantocianidinas, considerando o comprimento de onda de 280 nm, onde estes compostos absorvem e a semelhança de composição com os frutos de açai (*Euterpe oleracea*), no qual a literatura descreve a presença destes compostos (DEL POZO-INSFRAN et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006; TALCOTT et al., 2008).

A juçara (*Euterpe edulis* M.) é um fruto complexo com uma alta concentração de fibras, a essas vários compostos fenólicos estão ligados. As antocianinas responsáveis pela pigmentação do fruto são compostos os quais interferem nas bandas do cromatograma, uma vez que seu cátion flavilium absorve na região do UV.

Seis ácidos fenólicos e um flavonoides foram identificados utilizando o método por UPLC em bebida de juçara.

Tabela 13- Perfil de ácidos fenólicos em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.)

Composto	Concentração mg kg ⁻¹
Ferúlico	2,99 ± 0,1
Gálico	1,99 ± 0,07
Protocatecuíco	3,48 ± 0,31
Rutina	2,89 ± 0,45
Siríngico	0,43 ± 0,04
Vanílico	1,23 ± 0,07
p-cumárico	0,21 ± 0,02

Valores expressos como média e desvio padrão de três injeções.

Alguns compostos identificados são coerentes com nosso estudo, Borges et al., 2011, com extração a partir de hidrólise ácida. A diferença na quantificação dos compostos pode ser detectada devido às condições de extração e sistemas cromatográficos empregados serem diferentes (HUNG; HATCHER; BARKER 2011).

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

Os valores de atividade antioxidante pelo método de DPPH foram de 1256,56 ± 32,3 µmol TEAC 100g⁻¹ bebida de juçara o qual foi capaz de inibir 50% do radical DPPH no tempo de 30 minutos. Com a metodologia de redução do ferro (FRAP) o valor encontrado foi de 1196,65 ± 23,4 µmol TEAC 100g⁻¹ bebida de juçara.

Rufino et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante de frutos de açaí quantificando 1510 µmol TEAC 100 g⁻¹ de fruto. Esses valores encontram-se acima da atividade antioxidante da polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.). Para frutos de juçara, Rufino et al. (2010) quantificou 7830 µmol TEAC 100 g⁻¹, tais valores são superiores aos descritos neste estudo, porém deve ser considerado o conteúdo de água de 92 % na polpa de juçara em estudo, diferenciando do conteúdo de água nos frutos de açaí. Outro fator que deve ser considerado é o processamento dos frutos para a fabricação da bebida com consequente perdas no conteúdo de compostos fenólicos.

4. CONCLUSÕES

Neste capítulo um método rápido e eficiente para a determinação de dez compostos em polpa de juçara foi desenvolvido. O desempenho analítico do método, apresentou tempo de análise curto em comparação aos métodos descritos na literatura utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, é importante ressaltar o mínimo consumo de solventes e tempo quando o UPLC é usado ao invés do sistema de HPLC. Até o presente momento não foi encontrado na literatura um método de UPLC-DAD mais rápido que este para a determinação de tais compostos em polpa de juçara ou até mesmo em açaí. Este método demonstra seu potencial de aplicabilidade para análise de rotina e automatizado destes compostos em amostras de frutas.

A bebida de juçara (*Euterpe edulis* M.) demonstrou ser promissora para o consumo considerando os valores encontrados para a atividade antioxidante e o conteúdo de ácidos fenólicos quando comparados com açaí (*Euterpe oleracea* M.).

**CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO
DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM
JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) UTILIZANDO A EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM COMPARAÇÃO À
HIDRÓLISE ÁCIDA**

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM JUÇARA (*Euterpe edulis* M.) UTILIZANDO A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM COMPARAÇÃO À HIDRÓLISE ÁCIDA

RESUMO

Os ácidos fenólicos ocorrem de diferentes formas em frutas, como ácidos fenólicos livres, e como ésteres de glicosídeos ou complexos conjugados. Estas diferentes formas de ácidos fenólicos requerem diferentes condições de extração e apresentam diferentes suscetibilidades a degradação. Os ácidos fenólicos livres são facilmente extraídos com solventes orgânicos, já os ácidos fenólicos conjugados são basicamente liberados através da hidrólise ácida, alcalina ou ambas. A identificação precisa dos compostos fenólicos em juçara (*Euterpe edulis* M.) é fundamental no desenvolvimento de um novo valor acrescentado ao produto a base de polpa de juçara visando novas oportunidades de mercado nos alimentos funcionais. A extração assistida por micro-ondas é uma técnica relativamente recente, a qual vem sendo aplicada em diversas matrizes alimentícias demonstrando resultados satisfatórios no desenvolvimento de um método de extração de ácidos fenólicos livres e conjugados. Este capítulo apresenta o desenvolvimento de método de extração de ácidos fenólicos em polpa de juçara utilizando a UPLC-DAD para determinação dos compostos fenólicos presentes. Com o uso da hidrólise ácida assistida por micro-ondas pode se identificar compostos fenólicos como benzóico, cafeíco, gálico, ferúlico, vanílico, siríngico, protocatecuíco, p -cumárico, p -hidroxybenzoico, protocatecuíco, respectivamente, e os flavonoides catequina, rutina e quercetina na bebida de juçara. Os níveis de recuperação do método de extração por hidrólise ácida em micro-ondas variou de 85 a 110 %, em comparação com hidrólise ácida convencional de 78 a 103 %. Além disso, alguns compostos identificados nos extratos da hidrólise ácida não foram identificados na hidrólise convencional. Desta forma, pode – se concluir que a hidrólise ácida assistida por micro-ondas é um método promissor, eficiente, rápido, de baixo custo e com altos níveis de recuperação, o que torna sua utilização promissora no controle de qualidade de indústrias devido sua alta frequência analítica.

Palavras-chave: Açaí. Ácidos fenólicos. Juçara. Hidrólise. Micro-ondas.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são um grande grupo de produtos secundários do metabolismo dos vegetais, os quais possuem em sua estrutura básica um anel aromático e um ou mais substituintes hidroxila (MATTILA; HELLSTROM; TÖRRÖNEN, 2006).

Em plantas, os compostos fenólicos são produzidos principalmente pela via de fenil-propanóides. Os metabólitos iniciais da via são o ácidos hidroxicinâmicos que formam em conjunto com os ácidos hidroxibenzóicos, um grupo específico de metabólitos de plantas denominados ácidos fenólicos (GRUZ et al. 2011). A diferença existente ocorre de acordo com o número e posição das metoxilas e hidroxilas no anel aromático. Ácido gálico, protocatecuíco, p -hidroxibenzóico e vanílico são derivados do ácido benzóico, já o ácido cafeico, p -cumárico e ferúlico são derivados do ácido cinâmico (NEO et al., 2010).

Juçara (*Euterpe edulis* M.) é uma palma popular amplamente distribuída na Floresta Atlântica (LORENZI, 2006). Essa palmeira produz um tipo nobre de palmito e frutas com qualidade. As frutas são normalmente maceradas com água e separadas de suas sementes para obtenção de uma bebida espessa púrpura denominada como bebida de juçara. Esta bebida é muito semelhante com o obtido de outros frutos do gênero *Euterpe*, em todo o mundo conhecido como açáí (BORGES et al., 2011a).

No entanto a bebida produzida pela espécie *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatória*, açáí, tem sido extensamente estudada, principalmente no que concerne a composição de substâncias fenólicas e outras moléculas bioativas (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; GORDON et al., 2012; MULABAGAL; CALDERÓN, 2012).

A identificação precisa dos compostos fenólicos em juçara (*Euterpe edulis* M.) é fundamental no desenvolvimento de um novo valor acrescentado ao produto a base de juçara visando novas oportunidades de mercado nos alimentos funcionais, uma vez que há um grande interesse no conhecimento da composição fitoquímica dos frutos. Entretanto, o primeiro desafio em analisar frutos de juçara é a complexidade química de sua estrutura.

A etapa de extração dos compostos fenólicos é chave para a investigação e determinação destes através da cromatografia líquida de ultra eficiência (BIESAGA et al., 2011; CHAN et al., 2011).

Os ácidos fenólicos ocorrem de diferentes formas em frutas, como agliconas ou ácidos fenólicos livres, e como ésteres de glicosídeos ou

complexos ligados (NACZK; SHAHIDI, 1989). Estas diferentes formas de ácidos fenólicos resultam em diferentes condições de extração e diferentes suscetibilidades a degradação (ROSS; BETA; ARNTFIELD, 2009). Os ácidos fenólicos livres são facilmente extraídos com solventes orgânicos, já os ácidos fenólicos conjugados são basicamente liberados através da hidrólise ácida, alcalina ou ambas (MATILLA; HELLSTROM; TÖRRÖNEM, 2006).

A diversidade de técnicas de extração com diferentes solventes e métodos vem sendo apresentada para a extração de ácidos fenólicos e flavonoides em polpa de açaí nos últimos anos (DEL POZO INFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; SCHAUSS et al., 2006a; SCHAUSS et al., 2006b; PACHECO-PALENCIA et al., 2008; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; KANG et al., 2010; GORDON et al., 2012).

Técnicas de extração convencional incluem a maceração, extração de Soxhlet, e percolação de água. Essas técnicas têm sido utilizadas ao longo das últimas décadas, porém apresentam algumas desvantagens, sendo uma das principais os volumes elevados de solventes, os quais incorporam riscos de degradação térmica dos compostos ativos termolábeis (WANG & WELLER, 2006; BIESAGA, 2011; CHAN et al., 2011).

Nos últimos anos, alguns métodos novos de extração vêm sendo explorados, incluindo a extração com ultra-som, em micro-ondas, extração com fluido supercrítico, extração líquido-líquido e extração acelerada com solvente (WANG; WELLER, 2006; BIESGA, 2011; CHANG et al, 2011). Estas técnicas de extração apresentam vantagens pelo reduzido tempo de extração, baixo consumo de solventes orgânicos, melhores rendimentos de extração, e redução significativa de interferentes presentes nas matrizes (WANG; WELLER, 2006, CHAN et al, 2011).

A extração assistida por micro-ondas é uma técnica relativamente recente, a qual vem sendo aplicada em diversas matrizes alimentícias como sementes de uva, feijão, castanhas, óleos vegetais, óleos essenciais, resíduo agroindustrial, demonstrando resultados satisfatórios (WANG; WELLER, 2006; ROSS; BETA; ARTNIFIEL, 2009; LOU et al., 2010; BIESGA, 2011; CHENG et al, 2011; LIAZID et al., 2011).

Além de ser uma alternativa aos procedimentos convencionais de extração apresenta diversas vantagens, tais como, mínima manipulação de amostras e reagentes, elevadas exatidão, precisão, sensibilidade e, principalmente, a diminuição do número de etapas envolvidas em um procedimento analítico (ROSS; BETA; ARTNIFIEL, 2009; LOU et al., 2010; BIESAGA, 2011).

A extração assistida por micro-ondas foi promissora na pesquisa de plantas medicinais e indicou que o método estudado tem o potencial de ser desenvolvido e possivelmente ampliado, apesar de algumas desvantagens, com a necessidade de limpeza do extrato após hidrólise e a restrição de aplicação apenas de solvente polar no sistema (WANG et al., 2006).

No desenvolvimento de métodos relacionados à extração assistida por micro-ondas, a eficiência é fortemente dependente da escolha das condições de extração e parâmetros que afetam os mecanismos de extração e rendimento. Dentre os parâmetros que podem influenciar no desempenho da extração encontram-se a natureza do solvente, proporção massa/solvente, tempo de extração, potência do micro-ondas, temperatura, composição da matriz, entre outros. É importante entender os efeitos e interações destes parâmetros no processo de extração utilizando radiação micro-ondas (CHAN et al., 2010; LIAZID et al., 2011).

Este capítulo apresenta o desenvolvimento de um método de extração de ácidos fenólicos livres e conjugados, empregando-se amostras de bebida de juçara (*Euterpe edulis* M.), com o objetivo de propor um método rápido de extração e purificação e consequente determinação utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação de ácidos fenólicos em juçara (*Euterpe edulis* M.), e a possível perspectiva de aplicação também em açaí (*Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os frutos de juçara utilizados para o desenvolvimento deste estudo foram coletados na região da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC; durante a safra de 2012 (abril a junho). Os frutos foram coletados e transportados para o laboratório de Química de Alimentos em caixa térmica a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para a utilização da polpa do fruto procedeu-se com o tratamento de preparo da amostra conforme descrito no capítulo anterior, seguindo a metodologia de BORGES et al., 2013.

2.2 Reagentes

Os padrões de ácidos fenólicos utilizados nesse estudo foram: ácido benzóico, cafeico, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, siríngico, p-cumárico, protocatecuico, vanílico, rutina e quercetina, adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Água purificada pelo sistema de

desionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). A fase móvel constituída por metanol grau HPLC, bem como ácido fórmico 98%, o ácido clorídrico p.a. e os demais reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico e obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.).

2.3 Extração dos ácidos fenólicos livres

Solvente acetona: tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v): 2 g de polpa seca de juçara foi desengordurada utilizando-se 40 mL de hexano com extração (15 minutos) em ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil), seguido de centrifugação (15 min) a 2000 x gem centrífuga (Fanem, São Paulo, SP). Após a centrifugação a fase orgânica foi transferida para um balão de rotaevaporador e realizou-se uma nova extração da polpa remanescente neste sistema, procedendo-se da mesma metodologia.

A fração residual proveniente do sistema de rotaevaporação, aproximadamente 1 g, foi submetida a extração com 25 mL de uma mistura acetona:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) em ultrassom por 15 min, seguido de uma etapa de centrifugação (15 min) a 2000 g. O sobrenadante foi transferido para um balão do rotaevaporador. Realizou-se uma nova extração da fase aquosa remanescente no frasco com 25 mL de acetona:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v). Os sobrenadantes foram combinados e submetidos à concentração em sistema de rotaevaporador até um volume final de 5 mL. O pH do extrato concentrado proveniente do rotaevaporador foi ajustado em aproximadamente 2 com HCl 6 mol L⁻¹ e adicionou-se 5 mL de éter etílico a fim de realizar uma partição líquido-líquido, sendo a fração etérea recolhida em um balão de rotaevaporador com capacidade para 50 mL. O mesmo procedimento foi realizado três vezes.

As três frações etéreas provenientes das extrações líquido-líquido foram combinadas e submetidas a rotaevaporador para obtenção do resíduo seco. Posteriormente, o resíduo seco foi dissolvido em 500 µL de uma mistura contendo metanol: tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50 v/v) em banho de ultrassom, para posterior injeção no sistema cromatográfico (PACHECO – PALENCIA et al., 2009; GORDON et al., 2012).

Solvente metanol:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v): o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado, modificando-se

apenas o solvente extrator a partir da substituição da acetona por metanol, de acordo com procedimento descrito por Borges et al. (2011b).

Solvente metanol:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) seguida de uma etapa de clean-up: o procedimento realizado consistiu na remoção da fração lipídica presente na polpa desidrata de juçara (*Euterpe edulis* M.), conforme descrito na primeira extração desta Seção 2.3.

A fração aquosa residual foi submetida a extração com 25 mL de metanol:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) em banho de ultrassom, seguido de centrifugação (15 min) a 2000x ge o sobrenadante foi transferido para um balão de rotaevaporador de 50 mL. Posteriormente foi realizada uma nova extração da fase aquosa remanescente com 25 mL de metanol:tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v). Os sobrenadantes foram combinados e submetidos à rotaevaporação até um volume final de 2 mL.

Utilizando-se um sistema de extração em fase sólida (*manifold*), cartuchos contendo fase poliestireno-divinilbenzeno (Strata X) foram condicionados com 5 mL água desionizada e 5 mL de metanol: tampão ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) com vazão de aproximadamente 1 mL min⁻¹ e o extrato obtido com o solvente extrator metanol:ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) foram eluídos sob a mesma vazão através do cartucho de extração em fase sólida. O eluato foi mantido sob fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura e, em seguida, o mesmo foi dissolvido em 500 µL de metanol:ácido fórmico 0,1 % (50:50, v/v) em banho de ultrassom e posteriormente injetado no sistema cromatográfico.

Solvente metanol: uma amostra contendo 2 g de polpa seca de juçara foi desengordurada com 40 mL de hexano, realizando-se a extração durante 15 minutos em ultrassom centrifugada (15 min) a 2000 x ge a fase orgânica transferida para um frasco âmbar de 100 mL e uma nova extração foi realizada utilizando-se a fase aquosa remanescente da extração com hexano.

A fase aquosa residual foi submetida a duas extrações sucessivas com 25 mL de metanol em ultrassom, seguindo-se da etapa de centrifugação (15 min) a 2000x g e o sobrenadante foi transferido para um balão de rotaevaporador de 50 mL. Os sobrenadantes da fase aquosa foram combinados e submetidos a rotaevaporação para concentração até um volume final de 5 mL (MULABAGAL; CALDERÓN, 2012).

2.4 Extração de ácidos fenólicos conjugados

2.4.1 Hidrólise alcalina

Os ácidos fenólicos foram extraídos a partir de hidrólise alcalina de acordo com método de Ross, Beta, Arntfield (2009) e Krygier, Sosulski e Hogge (1982) modificado. A polpa de juçara desidratada (1 g) foi pesada em um tubo de centrífuga e adicionada de 10 mL de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹. A hidrólise alcalina (pH = 10) foi realizada por um período de 30 minutos a uma temperatura de 40-45°C. Após a hidrólise a solução foi acidificada com HCl 6 mol L⁻¹ até pH próximo a 2. Os ácidos fenólicos foram extraídos por partição com éter etílico (5 mL). O extrato foi centrifugado a 4000 g por 10 min para remover materiais em suspensão, e o sobrenadante cuidadosamente removido. O resíduo foi extraído mais duas vezes, seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados, e submetidos à secagem em rotaevaporador, por fim, o extrato foi ressuspensão em 500 µL de metanol e armazenado a -5°C até ser analisado.

2.4.2 Hidrólise ácida

Os ácidos fenólicos foram extraídos através da hidrólise ácida de acordo com método modificado de Ross, Beta, Arntfield (2009) e Krygier, Sosulski e Hogge (1982). A polpa de juçara desidratada (1 g) foi pesada em um tubo de polietileno (25 mL) e adicionado de 10 mL de metanol com HCl 6 mol L⁻¹, a hidrólise ácida (pH = 1,0) foi realizada por um período de 30 minutos a 85°C em estufa. Após a hidrólise a solução foi ajustada a pH 2 com NaOH 6 mol L⁻¹. Os ácidos fenólicos foram extraídos por partição em éter etílico (5 mL). O extrato foi centrifugado a 4000 x g por 10 min para remover qualquer material floculado e o sobrenadante cuidadosamente removido. O resíduo foi extraídas mais duas vezes consecutivas, seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados, e submetidos à secagem em rotaevaporador, por fim o extrato foi ressuspensão em 500 µL de metanol e armazenado a -5°C até ser analisado.

2.4.3 Hidrólise ácida assistida por micro-ondas

A polpa de juçara desidratada (1 g) foi pesada em um tubo de polietileno (25 mL) e adicionado de 10 mL de HCl 1,5 mol L⁻¹. A hidrólise

foi realizada por um período de 2 minutos em potência de 100 W utilizando forno micro-ondas doméstico (Philco). Os ácidos fenólicos foram extraídos por partição em éter etílico (5 mL) após o procedimento de hidrólise. O extrato foi centrifugado a 4000 x g por 10 min para remover qualquer material floculado e o sobrenadante cuidadosamente removido. O resíduo foi extraído mais duas vezes consecutivo, seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados, e submetidos à secagem em rotaevaporador, por fim o extrato foi ressuspensão em 500 µL de metanol e armazenado a -5°C até ser analisado.

2.5 Condições cromatográficas

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *ultra high performance chromatography*) 1260 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.). Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna Zorbax Poroshell 120 C18 (50 mm x 4,6 mm d.i., tamanho da partícula 1,7 µm). O gradiente de eluição definido inicialmente foi adaptado do método proposto por Novaková et al. (2010) composto por (A) água acidificada com ácido fórmico 0,1 %, (B) metanol, na seguinte eluição: 0 min, 88,5 % A, 11,5 % B; aumentando para 25 % B em 0,5 min, de 0,5 – 2,5 min, 75 – 50 % A, 25 % - 50 % B, mantendo-se este gradiente até os 4 min, 4-5 min 50% – 1% A, 50 % - 99 % B, 5-6 min 1 – 50 % A, 99 – 50 % B, 6 – 8 min 50 – 88,5 % A , 50 – 11,5 % B. A vazão mantida a 1,5 mL/min até os 3 min, após reduz-se em 1,2 mL/min até os 5 min, em seguida retornara-se a 1,5 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção 1,5 µL. Todos os analitos foram detectados em 254 nm, 280 nm e 320 nm. A identificação das bandas cromatográficas foi realizada por semelhança espectral e pureza de pico.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, E.U.A.). Os resultados experimentais foram considerados como média ± desvio padrão de três repetições independentes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey considerados como estatisticamente significativos para diferença entre valores ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de extração avaliados neste estudo foram definidos seguindo as metodologias de extração descritas na literatura para os ácidos fenólicos livres e conjugados em matrizes vegetais (KRYGIER; SOSULSKI; HOGGE, 1982; ROSS; BETA; ARNTFIELD, 2009; RUSSEL et al., 2009; PACHECO – PALENCIA et al., 2009; GRUZ et al., 2011; LOU et al., 2011; MATILLA; HELLSTROM; TÖRRÖNEM, 2006; GORDON et al., 2012; MULABAGAL; CALDERÓN, 2012) com algumas adaptações de acordo com trabalhos de Borges et al. (2011b) e Borges et al. (2013).

3.1 Identificação de ácidos fenólicos livres

Para avaliar a fração de ácidos fenólicos livres presentes nos frutos de juçara utilizou-se de metodologias já descritas para os frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) com algumas adaptações os quais já identificaram os ácidos gálico, cumárico, vanílico, siríngico, clorogênico, ρ -hidroxibenzóico, ρ -cumárico, cafeico e ferúlico (PACHECO – PALENCIA et al., 2009; GORDON et al., 2012; MULABAGAL; CALDERÓN, 2012).

A partir dos resultados obtidos não foi possível a identificação de nenhum dos compostos estudados (ácidos benzóico, cafeico, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, siríngico, ρ -cumárico, protocatecuico, vanílico, rutina e quercetina) em concentrações superiores aos limites de quantificação (1,1 e 11,3 mg Kg⁻¹) do método empregado neste estudo, utilizando UPLC.

Experimentos contemplando a adição de padrões de ácidos fenólicos na matriz estudada seguida da extração descrita na Seção 2.3.1 indicaram valores de recuperação que variam entre 75 a 110 % nos três níveis avaliados (Tabela 14).

Tabela 14 -Avaliação da recuperação dos analitos em estudo, em três níveis de recuperação, empregando métodos de extração de fenólicos livres em polpa de juçara

Método				
10 mg. Kg⁻¹	A	B	C	D
Benzóico	93 ± 3,3	99 ± 3,8	87 ± 3,6	92 ± 1,0
Cafeico	98 ± 4,0	100 ± 2,9	90 ± 2,0	92 ± 1,1
Clorogênico	92 ± 5,7	93 ± 2,0	78 ± 3,4	95 ± 1,7
Elágico	85 ± 1,5	90 ± 2,3	75 ± 4,1	81 ± 2,3
Ferúlico	100 ± 2,9	104 ± 3,3	88 ± 4,0	100 ± 2,8
Gálico	98 ± 3,2	97 ± 2,8	89 ± 5,1	98 ± 1,2
Siríngico	95 ± 1,9	97 ± 1,6	76 ± 3,8	95 ± 2,0
ρ-Cumárico	100 ± 1,4	96 ± 1,7	75 ± 5,5	95 ± 2,1
Protocatecuíco	97 ± 1,5	97 ± 1,8	86 ± 2,3	93 ± 1,9
Vanílico	103 ± 2,9	94 ± 2,3	95 ± 6,0	94 ± 2,1
25 mg kg⁻¹	A	B	C	D
Benzóico	96 ± 6,7	100 ± 3,4	89 ± 2,1	95 ± 1,4
Cafeico	99 ± 3,3	99 ± 2,1	97 ± 3,1	96 ± 1,9
Clorogênico	89 ± 7,6	95 ± 1,2	79 ± 2,1	95 ± 1,9
Elágico	87 ± 1,6	91 ± 2,3	77 ± 9,9	88 ± 2,6
Ferúlico	103 ± 4,5	103 ± 2,4	88 ± 3,1	100 ± 1,3
Gálico	95 ± 1,3	97 ± 2,9	95 ± 9,9	97 ± 1,2
Siríngico	97 ± 2,3	98 ± 2,1	87 ± 2,7	95 ± 1,9
ρ-Cumárico	103 ± 1,9	95 ± 2,0	79 ± 3,4	94 ± 1,2
Protocatecuíco	98 ± 1,7	99 ± 1,7	90 ± 1,7	93 ± 1,1
Vanílico	105 ± 1,5	94 ± 1,5	94 ± 3,3	94 ± 1,2
50 mg. Kg⁻¹	A	B	C	D
Benzóico	95 ± 6,9	101 ± 2,6	98 ± 1,1	96 ± 1,0
Cafeico	103 ± 9,7	99 ± 2,3	98 ± 5,5	97 ± 1,9
Clorogênico	90 ± 4,4	96 ± 1,6	79 ± 2,2	95 ± 1,7
Elágico	89 ± 1,9	90 ± 1,3	85 ± 3,3	84 ± 4,6
Ferúlico	101 ± 1,8	101 ± 2,1	92 ± 3,4	99 ± 2,0
Gálico	96 ± 1,5	96 ± 1,9	94 ± 8,6	98 ± 1,6
Siríngico	95 ± 2,0	95 ± 1,7	80 ± 5,5	96 ± 1,4
ρ-Cumárico	99 ± 1,2	96 ± 1,8	77 ± 3,3	95 ± 1,5
Protocatecuíco	99 ± 1,8	98 ± 1,5	89 ± 2,2	97 ± 1,5
Vanílico	104 ± 2,2	97 ± 1,0	97 ± 5,8	95 ± 1,8

Experimentos realizados em triplicata. Valores expressos como média ± desvio padrão. % Recuperação avaliada de acordo com $[(\text{área da amostra} + \text{área do padrão}) - (\text{área da amostra})] / \text{área do padrão} * 100$. Extração sólido-líquido, método

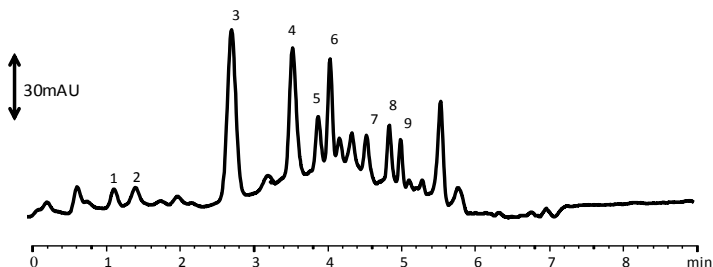
A: acetona:tampão ácido fórmico 0,1% (50:50, v/v); método B: metanol:tampão ácido fórmico 0,1% (50:50, v/v); método C: metanol seguido de etapa de “clean up”; método D: metanol.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que não existe a presença dos ácidos benzóico, cafeíco, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, siríngico, ρ -cumárico, protocatecuíco e vanílico.

3.2 Identificação de ácidos fenólicos conjugados

O perfil do UPLC-DAD revelou bandas cromatográficas correspondentes a quatro ácidos fenólicos, sendo os ácidos ρ -hidroxibenzóico, vanílico, ρ -cumárico e ferúlico encontrados, após procedimento de extração utilizando hidrólise alcalina. Na extração com hidrólise ácida foi possível a identificação de outros 5 compostos, além dos quatros compostos citados acima, sendo os ácidos gálico, protocatecuíco, siríngico, ácidos fenólicos, e ainda os flavonoides rutina e quercetina (Figura 6).

Figura 6 - Cromatograma de identificação de compostos fenólicos presentes em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) obtidos por hidrólise ácida, detectado a $\lambda = 280$ nm. Ácidos (1) gálico, (2) protocatecuíco, (3) ρ -hidroxibenzóico, (4) vanílico, (5) siríngico, (6) ρ -cumárico; (7) vanilina, (8) ácido ferúlico e (9) cafeíco. Condições cromatográficas descritas na Seção 2.5.



A maior quantidade de ácidos fenólicos detectados encontra-se na fração conjugada, sugerindo assim que os ácidos fenólicos presentes nos frutos de juçara encontram-se na forma esterificada ou glicosilada. Ácidos fenólicos são comumente encontrados na forma conjugada e são facilmente convertidos a ácidos fenólicos livres durante o processo de amadurecimento (NEO et al., 2010). Os níveis de ácidos fenólicos na forma livre nos tecidos de plantas são baixos quando comparados com a fração esterificada ou glicosilada (KRYGIER; SOSULSK; HOGGE, 1982; NEO et al., 2010).

De acordo com o trabalho de Del-Pozo Insfran, Talcott e Brenes (2004) grande parte dos compostos fenólicos presentes nos frutos de açai (*Euterpe oleracea* M.) apresentam-se na forma conjugada a taninos presentes nos frutos, tornando-se necessária uma extração severa com o uso de ácidos ou álcalis para romper as ligações presentes.

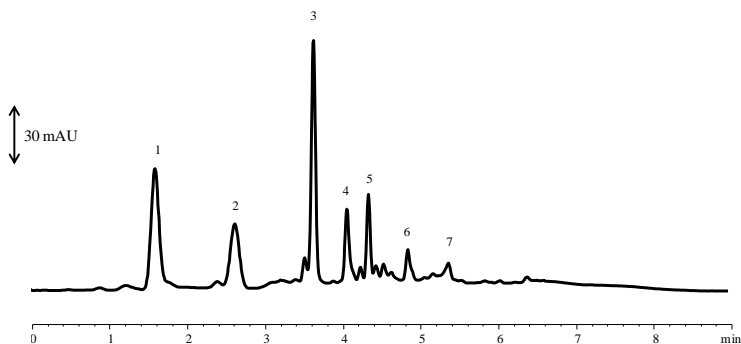
Alguns trabalhos na literatura descrevem uma hidrólise alcalina seguida de hidrólise ácida para a realização da extração dos compostos fenólicos conjugados que não tenham sido previamente hidrolisados (ROSS; BETA; ARTNIFIEL, 2009). Mattila, Hellstrom e Törrönen, 2006; demonstraram que a hidrólise ácida extraiu quantidades significativas de ácido gálico de framboesas e morangos, juntamente com significativas quantidades de ácido protocatecuíco.

Na hidrólise ácida assistida por micro-ondas, Figura 7 foi possível a identificação dos ácidos gálico, protocatecuíco, p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, p-cumárico eferúlico na polpa de juçara, totalizando 7 analitos.

Estes analitos identificados estão de acordo com os já descritos por Borges et al. (2011a) e Borges et al. (2013); os quais utilizaram HPLC-DAD e HPLC-MS/MS como técnicas de separação, respectivamente, para identificação e confirmação da identidade dos analitos detectados.

O perfil de compostos fenólicos entre os frutos de açai (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*) são semelhantes. Alguns estudos demonstram a presença de ácidos fenólicos no açai como os ácidos protocatecuíco, gálico, elágico, p-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, ferúlico, e seus derivados de ácidos gálico e de ácido elágico (DEL-POZO INSFRAN; TALCOTT; BRENES, 2004; SCHAUSS et al., 2006a; SCHAUSS et al. 2006b; PACHECO-PALENCIA et al., 2008; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; GORDON et al., 2012; MULABAGAL; CALDERÓN, 2012).

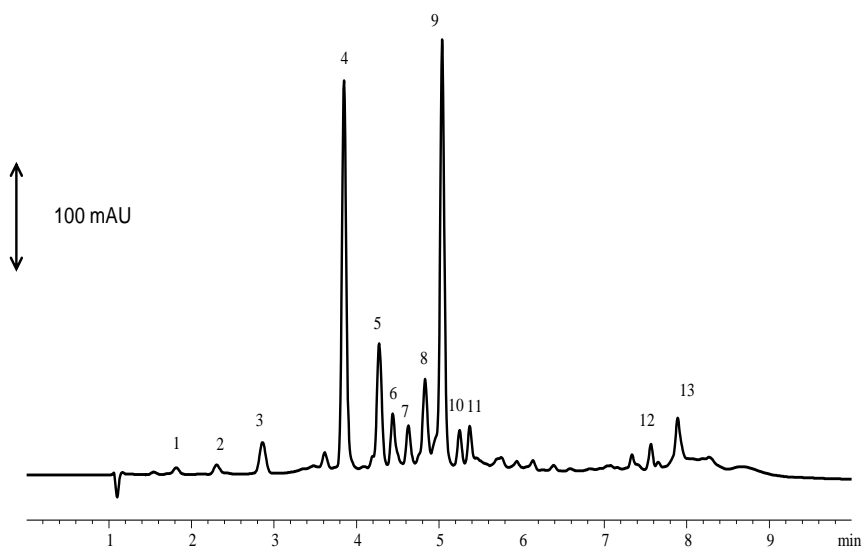
Figura 7- Cromatograma de identificação de compostos fenólicos presentes em polpa de juçara (*Euterpe edulis* M.) obtidos por extração assistida em micro-ondas, detectado a $\lambda = 280$ nm. Ácidos (1) gálico, (2) protocatecuico, (3) ρ -hidroxibenzoico, (4) vanílico, (5) siríngico, (6) ρ -cumárico, (7) ferúlico. Condições cromatográficas descritas na Seção 2.5.



Com o objetivo de avaliar a presença de outros ácidos fenólicos que possivelmente estivessem presentes na matriz, mas não extraídos pelas condições dos métodos utilizados foram realizados estudos utilizando a extração assistida por micro-ondas avaliando três fatores, são eles: tempo de extração; potência do micro-ondas; e relação massa/ solvente da extração. Tais parâmetros e os níveis utilizados foram definidos de acordo com dados experimentais prévios e com o que já foi descrito em trabalhos científicos (ROSS, BETA, ARTNIFIEL, 2009; LOU et al., 2010; BIESAGA, 2011).

De acordo com as respostas obtidas durante os experimentos, onde buscou-se um maior número de picos identificados, é possível observar a maior relação quando a extração foi realizada nas condições experimentais com o tempo de extração de 210 segundos, potência do forno micro-ondas de 100 W, e volume de solvente de 5 mL. Os extratos preparados foram analisados por UPLC-DAD, e o cromatograma de separação dos compostos é apresentado na Figura 8, abaixo.

Figura 8 -Separação de compostos fenólicos extraídos da polpa de juçara através da hidrólise ácida em assistida por micro-ondas nas seguintes condições: tempo de extração 210 segundos, potência do micro-ondas 100 W e relação massa:solvente (1:5, m/v) detectado a $\lambda = 280$ nm. Condições cromatográficas descritas na Seção 2.5. Ácidos (1) gálico, (2) catequina, (3) protocatecuíco, (4) ρ -hidroxibenzoico, (5) cafeico, (6) siríngico, (7) vanílico, (8) ρ -cumárico, (9) ferúlico, (10) benzóico, e os flavonoides (11) rutina e (12) quercetina.



De acordo com o perfil do cromatograma na Figura 8, observamos que a partir da hidrólise ácida assistida por micro-ondas foi possível identificar 13 compostos fenólicos, dos quais, os ácidos benzóico, cafeico, ferúlico, protocatecuíco, quercetina, rutina, siríngico e vanílico já foram identificados em polpa de juçara cultivadas no Estado de Santa Catarina em trabalho anterior utilizando HPLC-MS/MS (BORGES et al., 2013).

Comparando à hidrólise ácida, descrita na Seção 2.4.2, a hidrólise ácida assistida por micro-ondas revelou a extração de um maior número de compostos, um extrato final com menor número de interferentes que pode ser visto no cromatograma da separação dos compostos, além da rapidez do método, baixo custo, menor consumo de solvente, e reduzida massa da amostra.

Na Tabela 15 é possível observar os valores de recuperação dos analitos encontrados, tanto para a hidrólise ácida quanto para a hidrólise ácida assistida por micro-ondas, onde pode se observar mais uma vantagem do uso do micro-ondas para a extração.

Tabela 15 - Comparação entre a recuperação dos compostos extraídos por hidrólise ácida e por hidrólise assistida por micro-ondas, em polpa de juçara

Analito	Recuperação (%)	
	Hidrólise ácida	Hidrólise ácida em micro-ondas
Benzóico	nd	94 ± 8,1
Cafeico	80 ± 8,8	89 ± 3,0
Ferúlico	78 ± 4,5	87 ± 2,9
Gálico	88 ± 10,9	103 ± 5,4
Protocatecuico	nd	99 ± 2,9
Quercetina	nd	85 ± 6,2
Rutina	nd	90 ± 9,8
Siríngico	103 ± 8,4	110 ± 8,9
Vanílico	90 ± 5,5	93 ± 4,1
p-Cumárico	88 ± 10,9	102 ± 6,6

Experimentos realizados em triplicata. Valores expressos como média ± desvio padrão

% Recuperação avaliada de acordo com $[(\text{área da amostra} + \text{área do padrão}) - (\text{área da amostra})] / \text{área do padrão} * 100$.

nd não detectado.

Os resultados da recuperação demonstram que na hidrólise ácida assistida por micro-ondas o tempo de extração é drasticamente reduzido e a recuperação dos compostos efetivamente melhor em relação à hidrólise ácida. Isto pode ser explicado devido a fundamentação da extração em micro-ondas ser a melhoria na cinética da extração devido ao aquecimento.

A grande vantagem da extração assistida por microondas é em relação ao aquecimento dos fluidos da solução de extração. No sistema de aquecimento por microondas a irradiação faz com que a solução de extração (solvente e amostra) atinja a temperatura desejada rapidamente evitando o gradiente térmico causado pelo aquecimento convencional. Além disso, o uso de sistemas fechados reduz o risco de perdas e o fato da irradiação do micro-ondas reduzirem problemas de superaquecimento, minimiza também a degradação dos compostos (BIESAGA, 2011).

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste capítulo sugerem que as maiores concentrações de ácidos fenólicos presentes na polpa de juçara encontram-se na forma conjugada. Para a identificação de ácidos fenólicos livres é necessário o uso de técnicas de separação com limites de quantificação menores do que o proposto neste trabalho.

Para a identificação dos ácidos fenólicos conjugados a hidrólise ácida assistida por micro-ondas é um método novo, eficiente, rápido, de baixo custo e com altos níveis de recuperação, o que torna sua utilização promissora no controle de qualidade de indústrias devido sua alta frequência analítica.

Por fim podemos caracterizar que a polpa de juçara contém compostos fenólicos como benzóico, cafeíco, gálico, ferúlico, vanílico, siríngico, protocatecuíco, *p*-cumárico, *p*-hidroxybenzoico, protocatecuíco, respectivamente, e os flavonoides catequina, rutina e quercetina.

**CAPÍTULO 5- AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRUTA JUÇARA (*Euterpe edulis*
M.) CULTIVADA NA MATA ATLÂNTICA DURANTE O CICLO DE
MATURAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DA FRUTA JUÇARA (*Euterpe edulis* M.)
CULTIVADA NA MATA ATLÂNTICA DURANTE O CICLO DE
MATURAÇÃO**

RESUMO

Juçara (*Euterpe edulis* M.) é um fruto roxo amplamente distribuído no Brasil, similar aos frutos de açaí, porém menos conhecido do que este. Os frutos de juçara são utilizados para o processamento e fabricação da bebida de juçara, o qual é preparado por maceração dos frutos em água, seguido de trituração para extração da polpa amolecida através da adição de água. Para a fabricação desta bebida é necessário que os frutos estejam num ponto ideal de colheita para que se obtenha o maior rendimento e qualidade sensoriais ideais. Não existem parâmetros padronizados que indiquem o estágio de maturidade ideal para a colheita dos frutos de juçara sendo os critérios para a colheita baseados nas experiências dos produtores da região. Assim não existem relatos na literatura que descrevam o efeito da maturação sobre o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante. O objetivo deste capítulo é avaliar a influência da maturação sobre o teor do fruto, o conteúdo de antocianinas monoméricas totais, fenólicos totais, o perfil de ácidos graxos e a atividade antioxidante buscando avaliar o ciclo de maturação do fruto definindo pontos de colheita. A avaliação dos parâmetros de cor mostrou que ao longo da maturação ocorre uma redução da luminosidade dos frutos, e também redução da coloração vermelha, com aumento da coloração roxa, em paralelo ocorre um aumento no conteúdo de antocianinas atingindo um pico máximo, com posterior decréscimo. O conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante também aumentam ao longo da maturação dos frutos até atingir um ponto máximo, subsequentemente ocorre decréscimo. Estes comportamentos podem ser explicados pela alta correlação entre os fenólicos totais ($r > 0,97$) e as antocianinas monoméricas totais ($r > 0,95$) e atividade antioxidante. O perfil de ácidos graxos também apresentou modificações aumentando os níveis de ácidos graxos poli-insaturados e reduzindo o conteúdo de saturados ao longo da maturação. Dessa forma, se evidenciou a influência do período de maturação dos frutos sobre a composição química e a atividade antioxidante podendo-se definir os melhores períodos de colheita para os frutos das regiões em estudo.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Atividade antioxidante. Fenólicos. Juçara.

Maturidade.

1 INTRODUÇÃO

Juçara (*Euterpe edulis* M.) é uma palmeira presente na Mata Atlântica e se distribui do Norte do Brasil até o Sul, a maioria é encontrada em região litorânea. Juçara, o fruto da palmeira *E. edulis* M., é redondo e tem uma polpa roxa que cobre a semente dura. Apesar de sua ampla distribuição no Brasil, juçara é muito menos conhecido do que o fruto da palmeira do mesmo gênero *Euterpe*, o açai (*Euterpe oleracea*) (DE BRITO et al., 2007). Os frutos de juçara (*Euterpe edulis*) são utilizados para o processamento e fabricação da bebida de juçara a qual é preparado por maceração dos frutos em água, seguido de trituração para extrair a polpa amolecida através da adição de água, com posterior filtração do suco (SCHULTZ, 2008).

Trabalhos sobre frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) são escassos. A caracterização química de juçara se concentra na composição química e na capacidade antioxidante das frutas cultivadas em cinco regiões distintas na Mata Atlântica no Sul do Brasil (BORGES et al., 2011a). O outro estudo disponível descreve a caracterização das antocianinas em polpa de juçara com a presença de cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, majoritariamente (DE BRITO et al., 2007).

O fruto de juçara tem como característica marcante o elevado teor de lipídios que varia de 10 a 25 % do seu peso. A fração lipídica é rica em ácido oléico (44 – 55 %), ácido palmítico (20 – 25 %), ácido linoléico (18 – 25 %), e o ácido esteárico em quantidades traços (BORGES et al., 2011a). Além disso, os frutos de juçara contêm vários compostos bioativos como ácido benzóico, cafeico, clorogênico, ferúlico, protocatecuico, p -cumárico, siríngico, vanílico e flavonoides como quercetina e rutina (BORGES et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa também analisou as diferenças em locais de cultivo dos frutos de juçara em relação ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante apresentando diferenças significativas (BORGES et al., 2011a).

O conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em frutos não só são afetados por cultivar, diferenças genéticas, condições ambientais pré-colheita, manipulação pós-colheita, mas também pelo grau de maturidade na colheita (ZADERNOWSKI, NACZK & NESTEROWICZ, 2005; KEVERS et al., 2007).

Não há parâmetros padronizados indicando o estágio de maturidade ideal para a colheita dos frutos de juçara. Critérios para a colheita são baseados nas experiências dos produtores da região. É uma prática comum

dos produtores coletarem cachos em estágio maduro e supermaduros a serem comercializados nos próximos dias seguintes. Não se sabe se frutos comestíveis maduros e bem maduros, bem como frutos verdes são adequados para o consumo e o conteúdo de compostos bioativos presentes.

Várias estratégias têm sido estudadas para definir o tempo de colheita ideal dos frutos a partir do início do ciclo de maturação, semelhantes aos estudos descritos ao açaí (*Euterpe oleracea* M.). O conteúdo de antocianinas é altamente correlacionada com indicadores de maturação (ROGEZ, 2000; ROGEZ et al., 2011; GORDON et al., 2012).

A maturidade fisiológica no momento da colheita é fundamental para a vida de prateleira dos frutos durante a comercialização. Para os mercados locais de juçara (*Euterpe edulis* M.) os critérios utilizados para colheita são definidos quando o pericarpo, em parte, apresenta-se vermelho ou com 75 – 80 % roxo.

Em consequência, o ciclo de amadurecimento e a definição das fases imaturo, maduro e super maduros, separadamente, em compostos bioativos não foram avaliados, como também não se sabe a contribuição de compostos bioativos e a capacidade antioxidante do fruto. Tal informação poderá agregar valor aos frutos de juçara e poderia aumentar o seu consumo e a comercialização.

O objetivo principal deste trabalho foi monitorar o amadurecimento dos frutos juçara (*Euterpe edulis* M.) em duas regiões distintas avaliando a influência do estágio de maturação sobre a cor do fruto, o conteúdo de antocianinas monoméricas totais, fenólicos totais, o perfil de ácidos graxos e a atividade antioxidante buscando avaliar o ciclo de maturação do fruto definindo pontos de colheita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As amostras dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) foram coletadas na safra de 2012, na Lagoa da Conceição, e na região da Costeira do Pirajubaé, na cidade de Florianópolis no Estado de Santa Catarina (SC), Brasil.

Amostras de frutos foram coletadas na região da Lagoa da Conceição a partir do final de abril até o final de maio com intervalos semanais (3-4 dias) (n= 100 bagas/ colheita).

Os frutos coletados na Costeira do Pirajubaé iniciaram o ciclo de

maturação no final do mês de agosto até o início de dezembro com intervalos semanais (7 a 10) (n= 100 bagas/ colheita). Entretanto, nesta região foram coletados frutos de três palmeiras distintas.

A colheita dos frutos foi realizada de modo aleatório, foram selecionadas ráquias do cacho com os frutos no estágio inicial de maturação (100 % dos frutos vermelhos). As ráquias foram manuseadas com luvas e embaladas em sacos esterilizados. Imediatamente após a colheita os frutos foram transportados ao Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina em caixas térmicas a $5,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Na bancada do laboratório foram selecionados frutos sadios, inteiros e sem deformação. Após os frutos foram submetidos ao despolpe e análises.

2.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para as análises são de grau analítico. Folin Ciocalteu, carbonato de sódio, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,4,6-tripiridyl-s-triazina (TPTZ), cloreto de ferro (FeCl_3), e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo carboxílico (Trolox[®]) foram adquiridos da Sigma ChemicalCo. (St. Louis, MO). Ácido gálico, (+) catequina foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Metanol (MeOH), n-hexano, ácido clorídrico (HCl), persulfato de potássio, os ésteres metílicos de ácidos graxos com uma mistura de 37 padrões e todos os outros reagentes foram adquiridos da Aldrich (St. Louis, MO).

2.3 Preparo do material

Dentre os frutos selecionados para o despolpe retirou-se em torno de 10 % da amostra para realizar a análise de cor. Após, estes frutos foram despolpados e a polpa submetida a análise de umidade por secagem em estufa a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ até peso constante (AOAC, 940.26) e determinação do conteúdo de proteínas (F= 6,25) pelo método AOAC (920,152).

Os outros frutos selecionados em torno de 90 g foram submetidos ao processo de despolpe manual, conforme descrito na Figura 10, com o uso de facas, após a polpa foi submetida ao processo de secagem em estufa de ar circulante a temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12h. Após o resfriamento em dessecador a polpa foi triturada em moinho de bancada (IKA A49, SP, Brasil).

Posteriormente, amostras de 2g foram desengorduradas com 25 mL de n-hexano através de uma extração a frio em ultrassom (Unique 1400 A,

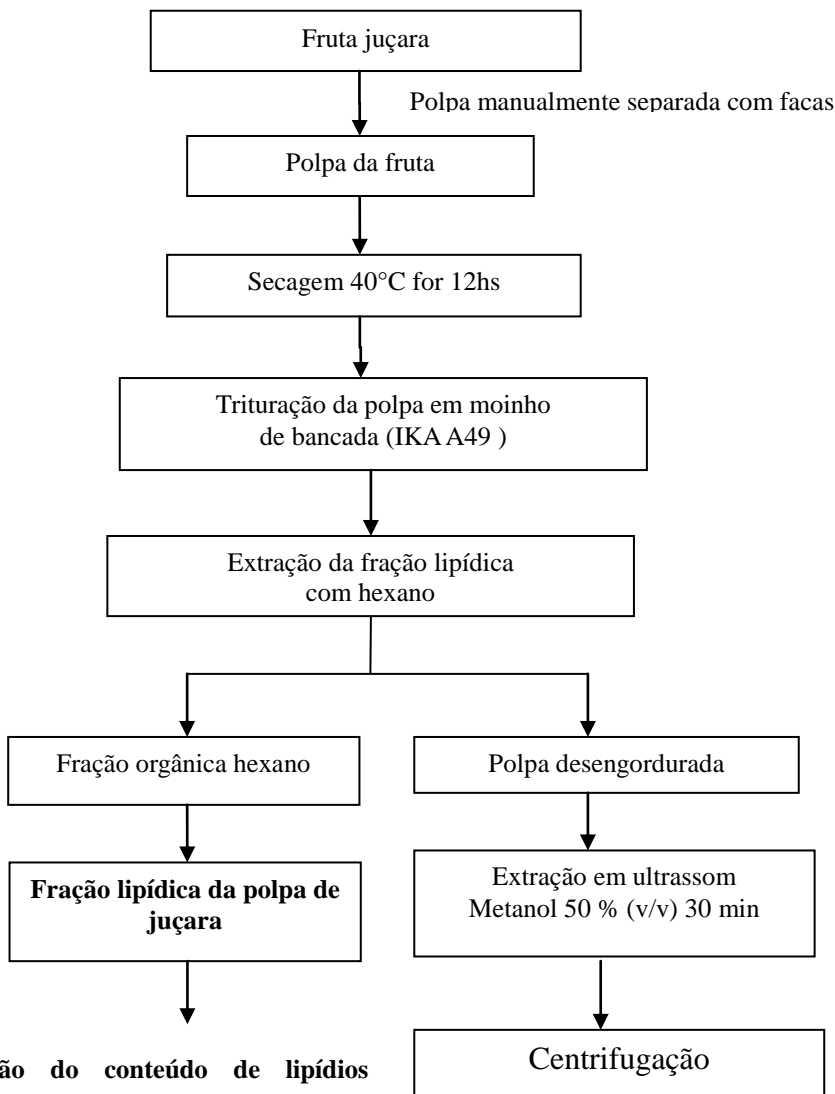
São Paulo, Brasil) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 minutos, e seguidamente centrifugados (Fanem 280R, São Paulo, Brasil) a 2000g por 15 minutos. O sobrenadante foi então removido e reservado em um balão de rotaevaporador de 200 mL, e o resíduo extraído novamente com n-hexano por mais duas vezes. Por fim, os sobrenadantes das extrações foram submetidos à evaporação do solvente em rotaevaporador a $< 35 \pm 2^\circ\text{C}$ e a fração lipídica armazenada em tubos de ensaio com rosca sob atmosfera de N_2 em freezer a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ para posteriores análises do perfil de ácidos graxos (BORGES et al., 2013).

O resíduo remanescente da extração (polpa desengordurada) foi submetida a evaporação do solvente residual em rotaevaporador a $< 35 \pm 2^\circ\text{C}$, para posteriormente ser utilizada no preparo dos extratos.

2.4 Preparo dos extratos

Para obtenção dos extratos foram pesadas 1 g da polpa desengordurada em tubo de polietileno de 50 mL adicionados 10 mL de metanol: água (50: 50) (v/v) homogeneizado e submetido ao processo de extração em ultrassom por 30 minutos USC-1400 (Unique, São Paulo, Brasil), após, o extrato foi centrifugados a 2000 x g por 15 minutos (Fanem 280R, São Paulo, Brasil). Em seguida coletou-se o sobrenadante em um balão volumétrico de 25 mL, e o resíduo centrifugado foi submetido a um novo processo de extração com adição de 10 mL de acetona: água (70:30) (v/v) em ultrassom por 30 minutos, novamente o extrato submetido ao processo de centrifugação a 2000 g. O novo sobrenadante extraído foi adicionado ao sobrenadante da primeira extração e aferido volume para 25 mL do balão volumétrico com água deionizada.

Figura 9 – Fluxograma do processamento da polpa de juçara para a extração dos compostos fenólicos e fração lipídica



**Determinação do conteúdo de lipídios totais;
Avaliação do perfil de ácidos graxos por CG.**

**Determinação do conteúdo de fenólicos totais;
Avaliação da atividade antioxidante (DPPH e FRAP)**

2.5 Determinação do conteúdo de fenólicos totais (FT)

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método espectrofotométrico com reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) com leituras realizadas a 765 nm em espectrofotômetro UV-Vis modelo HP 8452A Hewlett-Packard (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) e os resultados expressos em miligramas de equivalentes a ácido gálico (EAG) 100g^{-1} de polpa seca desengordurada calculados a partir da curva de calibração do ácido gálico ($50\text{-}500\ \mu\text{mol}$; $y = 724,0x + 14,79$, $r^2 = 0,997$; y = concentração da solução; x = leitura da absorvância), apresentada no Apêndice A.

2.6 Quantificação das antocianinas monoméricas totais (AMT)

Para a quantificação de antocianinas monoméricas totais realizou-se a extração por maceração a frio de 1g de polpa de juçara com 50 mL de metanol 1,5 M HCl em frasco âmbar a temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Em sequência os extratos foram centrifugados a 2000 g por 15 minutos aferidos volume a 50 mL e quantificados o teor de antocianinas (BORGES et al., 2010b).

Para a quantificação desses compostos utilizou o método descrito por Giusti e Wrolstad (2001) os extratos foram adicionados às duas soluções tampão e efetivadas as medidas a 510 nm e a 700 nm usando um espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (CheadleHeath, Stockport, Cheshire, UK). O conteúdo de antocianinas monoméricas totais expressas em mg cianidina3-glicosídeo $100\ \text{g}^{-1}$ de polpa.

2.7 Análise instrumental da cor

As alterações de cor dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) foram verificadas através da análise instrumental de cor utilizando um colorímetro portátil (Konica Minolta CR-400, Itália) com o iluminante C equipado com uma esfera de integração com abertura de 10 mm. Os valores de cor para cada fruta foram calculados como o meio de 20 medidas em pontos equidistantes de cada fruta. Os parâmetros de cor medidos foram: L^* , a^* e b^* , onde L^* indica a luminosidade (0= preto e 100=branco) e a^* e b^* representam as coordenadas de cromaticidade ($+a^*$ = vermelho, $-a^*$ = verde; $+b^*$ = amarelo, $-b^*$ = azul). Os parâmetros de cor foram convertidos em ângulo de cor, $H^\circ = \tan^{-1}b/a$, indicando o ângulo Hue (H°) da amostra (0° ou 360° = vermelho; 90° = amarelo; 180° =verde; 270° = azul) (MCGUIRE,

1992).

2.8 Avaliação da atividade antioxidante

a) Atividade antioxidante pela captura de radicais DPPH

A atividade antioxidante dos frutos de juçara foi quantificada através da capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos sequestrar/ retardar o radical estável DPPH \cdot de acordo com o método descrito por Brand Williams; Cuvelier; Berset (1995) com algumas modificações de Rufino et al. (2007). A solução de trabalho de DPPH com absorvância cerca de $0,980 \pm 0,02$ em 515 nm foi preparada a partir de uma solução estoque DPPH 0,06 mM DPPH. Uma alíquota 2,9 mL da solução de trabalho do DPPH foi adicionada a uma cubeta e realizada a leitura da absorvância a 515 nm (t_{0min}); após, adicionou-se 100 μ L do extrato de juçara em concentrações variadas. A solução foi agitada e incubada no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a leitura em 515 nm da absorvância final (t_{30min}). Calcula-se a porcentagem de inibição do radical DPPH \cdot . A partir das absorvâncias e da inibição do radical obtidos a partir das diferentes concentrações dos extratos, plotou-se um gráfico da absorvância x inibição e determinação uma equação da reta (exemplo Apêndice B). Para calcular a atividade antioxidante substituiu-se a inibição de 50 % do radical DPPH \cdot e encontrou-se o resultado que corresponde a concentração do extrato necessária para reduzir 50 % da concentração do radical inicial (EC 50).

b) Avaliação do potencial redutor do ferro (FRAP)

A avaliação da atividade pelo método do FRAP foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (μ mol L $^{-1}$ TEAC 100 g $^{-1}$ polpa seca desengordurada). Soluções padrão de Trolox foram preparadas em concentrações que variam de 10-500 μ mol L $^{-1}$; $y = 0,0017x + 0,1783$, $r^2 = 0,9947$; y = leitura da absorvância; x = concentração da solução, conforme Apêndice C.

2.9 Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos da fração lipídica da juçara foram submetidos ao método de extração e derivatização, de acordo com Metcalfe, Shmitz e Pelka (1966) e Hartman e Lago (1973), com algumas adaptações. A determinação de ácidos graxos utilizou-se um cromatógrafo a gás, equipado com detector de ionização de chama acoplado a um integrador e registrador (7890A, Agilent Technologies). Uma coluna capilar de cianopropilaril HP-88 (88 % cianopropilaril 60 m x 0,250 mm d.i. x 0,20 mm) foi utilizada. O fluxo de gás de arraste hélio foi de 1mL/min. A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno foi 140°C por 5 min com uma rampa de aquecimento de 4°C/ min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min. A identificação dos principais ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os padrões de ácidos graxos metilados, e a quantificação, por normatização das áreas dos picos, sendo resultados expressos em percentagem.

2.10 Análise Estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicata e os dados expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de significância seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias. A análise de regressão linear e correlação de Pearson foi realizada entre as variáveis em estudo com auxílio do programa Statistic 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises químicas

Durante as coletas realizadas dos frutos de juçara avaliou-se a percentagem de frutos maduros na amostra e o rendimento de polpa pelo processo despolpe manual, conforme apresentado nas Tabelas 16 e 17, abaixo.

Tabela 16 – Avaliação do rendimento da polpa, conteúdo de umidade e proteína dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) coletados na Lagoa da Conceição

Período de colheita	Data da colheita	Frutos maduros*	Rendimento	Umidade**	Proteínas**
1	20/04/12	87,70	28,70	41,12 ± 0,73	3,04 ± 0,15
2	24/04/12	94,41	25,67	41,64 ± 1,4	3,02 ± 0,10
3	27/04/12	95,83	29,13	39,58 ± 0,74	2,83 ± 0,17
4	02/05/12	96,1	29,32	40,72 ± 0,40	3,26 ± 0,01
5	04/05/12	98,9	30,09	40,80 ± 0,85	2,97 ± 0,05
6	08/05/12	100	36,69	41,89 ± 0,50	3,03 ± 0,09
7	11/05/12	100	36,46	43,45 ± 0,40	3,17 ± 0,04
8	15/05/12	100	31,08	44,61 ± 0,43	3,08 ± 0,07

*Valores expressos em percentagem de fruto vermelhos. **Valores expressos em g 100 g⁻¹ de matéria fresca.

Para os frutos coletados na região da Lagoa da Conceição os valores de rendimento da polpa variaram de 25,67 a 36,69 %, sendo que os frutos da colheita 6 e 7 apresentaram os maiores rendimentos, ocorrendo uma queda na próxima colheita. A maturação dos frutos ocorre de maneira similar ao rendimento apresentando 100 % de frutos maduros a partir da sexta colheita.

Os valores de umidade dos frutos aumentam levemente comparando a primeira e a última colheita, entretanto observa-se uma grande oscilação de valores ao longo da maturação (39,58 – 44,61 %). Para os frutos coletados na Costeira do Pirajubaé observa-se uma grande oscilação nos valores de rendimento de polpa (21,28 – 39,32 %) considerando que avaliou-se três palmeiras distintas. Entretanto, os frutos dessa região apresentaram um maior rendimento da polpa em relação aos frutos coletados na região da Lagoa da Conceição, porém essa diferença não apresenta uma diferença estatística significativa.

Tabela 17 – Avaliação do rendimento da polpa, conteúdo de umidade e proteína dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) coletados na Costeira do Pirajubaé

Período de colheita	Data da colheita	Frutos maduros*	Rendimento	Umidade**	Proteínas**
Palmeira 1					
1	28/08/12	96	23,18	64,7 ± 0,1	2,31 ± 0,10
2	14/09/12	98	27,51	61,2 ± 0,2	2,59 ± 0,03
3	20/09/12	100	30,08	62,5 ± 1,24	2,44 ± 0,07
4	27/09/12	100	32,37	63 ± 0,7	2,47 ± 0,05
5	09/10/12	100	33,72	63,6 ± 0,2	2,52 ± 0,02
6	23/10/12	100	34,63	58,9 ± 7,7	2,43 ± 0,09
7	05/11/12	100	39,32	55,7 ± 0,6	2,96 ± 0,08
Palmeira 2					
1	14/09/12	95	30,72	57,7 ± 0,3	2,85 ± 0,04
2	20/09/12	98	31,28	58,14 ± 0,4	2,82 ± 0,16
3	27/09/12	95	25,09	58,7 ± 2,5	2,94 ± 0,2
4	09/10/12	100	33,79	58,3 ± 3,4	3,00 ± 0,14
5	23/10/12	100	29,19	60,1 ± 2,3	2,69 ± 0,03
6	05/11/12	100	34,53	57,6 ± 0,5	2,93 ± 0,08
Palmeira 3					
1	28/08/12	95	26,82	64,3 ± 0,7	2,29 ± 0,10
2	14/09/12	97	29,67	63,5 ± 0,8	2,64 ± 0,06
3	20/09/12	98	31,4	61,5 ± 0,4	2,70 ± 0,10
4	27/09/12	100	33,28	61,8 ± 0,9	2,75 ± 0,24
5	09/10/12	100	30,43	58 ± 3,8	2,74 ± 0,24
6	23/10/12	100	36,23	62,8 ± 0,65	2,79 ± 0,05
7	05/11/12	100	38,61	55,8 ± 0,5	3,17 ± 0,04

*Valores expressos em percentagem g 100 g⁻¹ de fruto. **Valores expressos em g 100 g⁻¹ de matéria úmida.

O conteúdo de umidade dos frutos da região da Costeira do Pirajubaé variou entre 55,7 a 64,7 % reduzindo os teores conforme o avanço do ciclo de maturação dos frutos. Estes valores encontram-se acima na Tabela 19, para os frutos coletados na região da Lagoa da Conceição, essa diferença pode ser justificada pelas diferentes regiões de cultivo da palmeira, e também distintas épocas de amadurecimento.

Estes resultados são semelhantes aos descritos em outro trabalho com frutos de juçara cultivados em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina (BORGES et al., 2011a) e aos descritos na literatura para frutos de

açaí (*Euterpe oleracea* M.) com 60 – 55 % de umidade (ROGEZ, 2000; SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004; SANABRIA e SANGRONIS, 2007).

O teor de proteína dos frutos de cada região de coleta apresenta pequenas variações ao longo da maturação, estes conteúdos são semelhantes ao já descritos na literatura para juçara (BORGES et al., 2011b).

As variações na composição química entre as amostras de diferentes estágios de maturação são esperada, uma vez que a maturação pode ser geralmente definida como uma sequência de alterações de cor, sabor e textura dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Ao longo da maturação o conteúdo de água do fruto aumenta até atingir um ponto máximo de maturação, após o fruto começa a perder água apresentando a sua polpa com característica rugosa, característico do período de senescência (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

3.2 Avaliação da cor e conteúdo de antocianinas monoméricas totais

Na análise instrumental de cor dos frutos não foi possível obter um ajuste adequado de nenhum dos parâmetros adotados (L^* , a^* , b^*) nos modelos cinéticos avaliados. A avaliação dos modelos foi realizada através da análise de variância, e do coeficiente de determinação R^2 , não sendo obtidos valores de $R^2 \geq 0,80$. Por isso utilizou-se da análise de Tukey para avaliação dos resultados.

Os valores dos parâmetros L^* (luminosidade), a^* (vermelho) e b^* (amarelo) para os frutos coletados na região da Lagoa da Conceição estão apresentados na Tabela 18.

Observa-se uma significativa redução nos valores de L^* , a^* e b^* na segunda colheita ($p < 0,05$). Também é significativa a redução do valor de a^* do terceiro para o quarto período de colheita. Entretanto os parâmetros L^* e b^* avaliados não apresentam diferença significativa para os demais períodos de colheita.

Tabela 18 - Avaliação de cor e conteúdo de antocianinas monoméricas totais em frutos de juçara durante a maturação coletados na Lagoa da Conceição

Período de colheita	L*	a*	b*	Antocianinas monoméricas totais*
1	25,6545 2,21 ^a	± 5,9545 3,65 ^a	± 2,5440 3,19 ^a	± 83,47 ± 8,73 ^a
2	24,4985 0,85 ^b	± 2,1410 0,63 ^b	± 0,9550 0,51 ^b	± 107,93 7,62 ^b
3	24,4245 1,05 ^b	± 2,1150 0,71 ^b	± 0,7090 0,41 ^b	± 132,38 7,48 ^c
4	24,3715± 0,77 ^b	± 1,3785 0,67 ^c	± 1,0180 0,48 ^b	± 156,80 7,25 ^d
5	24,4705 0,74 ^b	± 1,3150 0,45 ^c	± 0,6535 0,36 ^b	± 181,30 7,04 ^c
6	24,0230 0,72 ^b	± 0,9515 0,35 ^c	± 0,5630± 0,31 ^b	± 205,75 7,62 ^f
7	22,1390 1,10 ^c	± 0,9560 0,18 ^c	± 0,5250 0,31 ^b	± 224,10 4,70 ^g
8	25,6545 0,97 ^b	± 0,9510 0,48 ^c	± 1,0430 0,53 ^b	± 236,41± 4,05 ^g

*Valores de antocianinas expressos em mg cianidina 3-glicosídeo 100g⁻¹ de fruta

A luminosidade e a* são parâmetros interessante para avaliação da maturação dos frutos de juçara porque ao longo da maturação os frutos de coloração vermelha tornam-se negros azulados, assim espera-se uma redução nos valores a* (vermelho), o que pode ser observado na colheita 7 e 8 as quais apresentam o menor valor de a* e o maior conteúdo de antocianinas; ambos não diferindo estatisticamente entre si.

Também deveria ocorrer uma redução na luminosidade uma vez que os frutos de juçara no estágio final de maturação apresentam sua superfície esbranquiçada, a qual é uma cutícula cerosa de proteção aos frutos, semelhantes ao que ocorre com açaí, o que reduziria a luminosidade do fruto (ROGEZ, 2000).

Com relação ao conteúdo de antocianinas monoméricas totais observa-se um acúmulo dos pigmentos ao longo da maturação com teores variando de 83,47 a 236,41 mgcianidina 3-glicosídeo 100g⁻¹ de polpa, o qual conteúdo difere-se estatisticamente entre todos os períodos de colheita.

Na Tabela 19, abaixo se apresenta os valores para os parâmetros de cor e o conteúdo de antocianinas para os frutos coletados na região da Costeira do Pirajubaé.

Tabela 19 - Avaliação de cor e do conteúdo de antocianinas monoméricas totais em frutos de juçara durante a maturação coletados na Costeira do Pirajubaé

Período de colheita	L*	a*	b*	Antocianinas monoméricas totais*
Palmeira 1				
1	20,95 ± 2,59 ^b	2,64 ± 0,43 ^a	1,31 ± 0,93 ^a	4,45 ± 0,78 ^a
2	21,51 ± 1,85 ^b	0,59 ± 0,53 ^c	1,19 ± 1,08 ^a	121,98 ± 10,05 ^b
3	24,29 ± 1,43 ^a	0,73 ± 0,70 ^c	1,42 ± 0,56 ^a	601,03 ± 1,54 ^b
4	25,30 ± 0,89 ^a	0,52 ± 0,27 ^c	1,57 ± 1,01 ^a	537,75 ± 2,87 ^b
5	20,41 ± 1,85 ^b	1,22 ± 0,33 ^b	1,22 ± 0,42 ^a	426,99 ± 5,32 ^c
6	20,03 ± 1,00 ^b	0,46 ± 0,18 ^c	1,30 ± 0,47 ^a	889,93 ± 7,09 ^d
7	24,68 ± 0,71 ^a	0,46 ± 0,09 ^c	1,27 ± 0,30 ^a	601,03 ± 1,54 ^e
Palmeira 2				
1	20,89 ± 1,35 ^b	0,37 ± 0,15 ^c	0,87 ± 0,33 ^c	48,11 ± 0,63 ^a
2	23,77 ± 1,54 ^a	0,48 ± 0,44 ^c	1,14 ± 0,47 ^a	271,37 ± 0,69 ^b
3	25,75 ± 0,72 ^a	0,63 ± 0,26 ^b	1,27 ± 0,85 ^a	316,62 ± 0,96 ^c
4	20,71 ± 2,04 ^b	1,15 ± 0,20 ^a	1,01 ± 0,22 ^b	419,43 ± 6,99 ^d
5	20,43 ± 1,00 ^b	0,50 ± 0,31 ^b	0,82 ± 0,64 ^c	614,13 ± 4,24 ^e
6	24,85 ± 0,83 ^a	0,62 ± 0,22 ^b	1,21 ± 0,51 ^a	420,62 ± 1,15 ^d

Palmeira3				
1	24,93 ± 1,46 ^a	2,85 ± 0,63 ^a	1,07 ± 0,73 ^a	20,83 ±1,46 ^a
2	21,05 ± 1,59 ^b	0,99 ± 0,40 ^b	0,74 ± 0,62 ^b	70,36 ± 0,22 ^b
3	23,49 ± 1,39 ^a	1,07 ± 0,77 ^b	0,91 ± 0,46 ^a	260,39 ± 13,5 ^c
4	25,05 ± 0,92 ^a	0,89 ± 0,32 ^c	1,36 ± 0,60 ^a	272,98 ± 2,51 ^d
5	20,50 ± 1,40 ^b	1,45 ± 0,48 ^b	0,98 ± 0,31 ^a	676,30 ± 1,7 ^e
6	20,19 ± 1,07 ^b	0,66 ± 0,30 ^c	0,89 ± 0,23 ^b	398,74 ± 1,32 ^f
7	25,08 ± 0,75 ^a	0,74 ± 0,27 ^c	0,95 ± 0,35 ^a	255,65 ± 1,71 ^d

*Valores de antocianinas expressos em mgcianidina 3-glicosídeo 100g⁻¹ de fruta

A luminosidade (L^{*}) apresenta uma grande oscilação em seus valores ocorrendo aumento e redução ao longo da maturação. Já para o parâmetro a^{*} e b^{*} ocorre uma redução dos valores indicando uma redução da coloração vermelha intensa e a predominância da coloração roxa a azulada.

O conteúdo de antocianinas apresentou uma grande oscilação entre os valores de 4,45 a 889,93 mg cianidina 3-glicosídeo. Observa-se que para as três palmeiras em estudo existe um pico de maturação atingido com o maior conteúdo de antocianinas que ocorre no sexto período de colheita para a palmeira 1 e 2, e no quinto período para palmeira 3. O acúmulo de antocianinas durante o ciclo de maturação já foram demonstrados em estudos realizados com frutos de açaí, os quais também apresentaram no conteúdo de antocianinas ao no último estágio da maturação denominado *túira* (ROGEZ et al., 2011; GORDON et al., 2012).

Comparando este comportamento com os frutos de açaí Rogez (2000) e Rogez (2011) definiram cinco estágios de maturação variando entre verde até os frutos bem maduros, onde na fase inicial ocorre um acúmulo de 90% das antocianinas, seguido de um aumento desacelerado até concentração máxima dos pigmentos, sendo observado na última fase, que consiste no final da maturação, um decréscimo na concentração das antocianinas.

Esta cinética descrita acima pode ser observada também para os frutos de juçara coletadas na região da Costeira do Pirajubáé, a partir dos

frutos no estágio ideal de maturação semelhantes aos frutos de açaí no estágio de o mesmo comportamento não foi alcançado com os frutos coletados na região da Lagoa da Conceição devido ao menor espaço de tempo entre as coletadas alcançado o término das amostras antes de completar o ciclo de maturação.

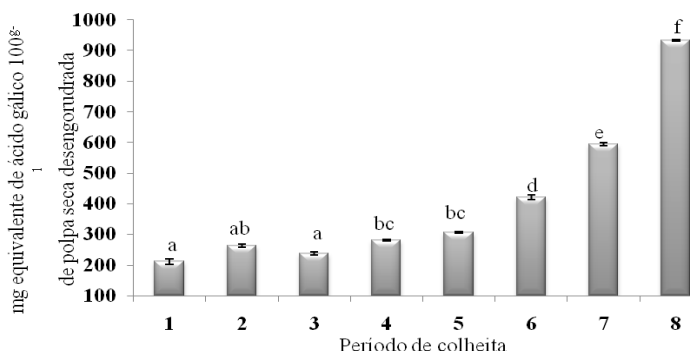
O ciclo de maturação de Rogez (2011) é de 100 dias, no nosso caso o estudo foi realizado durante 30 diase 75 dias.

Estes valores de antocianinas encontram-se próximos aos descritos para outros frutos de juçara cultivados em diferentes regiões (BORGES et al., 2011b).

3.3 Conteúdo de fenólicos totais (FT)

A Figura 10 apresenta o conteúdo de fenólicos totais dos frutos de juçara durante o ciclo de maturação.

Figura 10 - Conteúdo de fenólicos totais ao longo da maturação em frutos de juçara coletados na região da Lagoa da Conceição



a-f: Letras diferentes nas colunas os valores apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

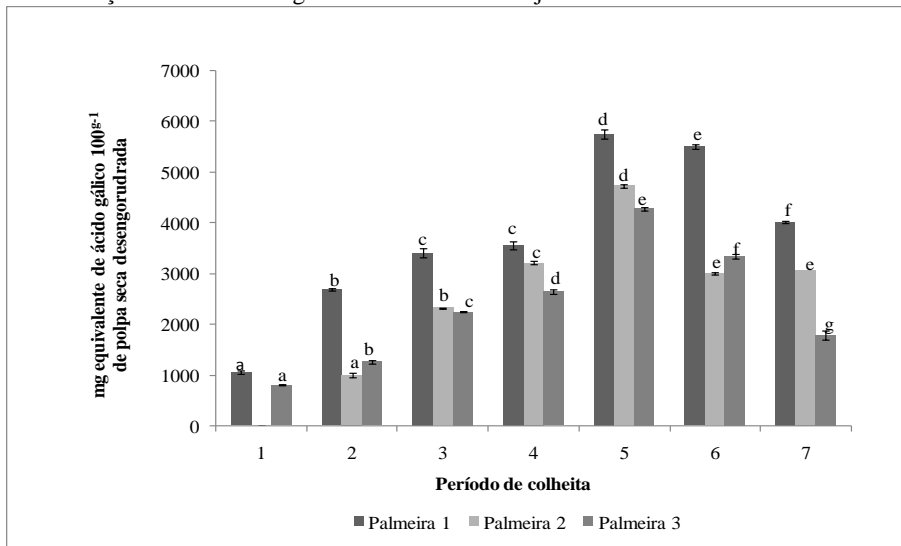
De acordo com a Figura 10 podemos definir 3 estágios de maturação, para os frutos coletados na região da Lagoa da Conceição, de acordo com a variação no conteúdo de fenólicos. O estágio 1 que compreende do primeiro ao terceiro período de colheita com o conteúdo de fenólicos totais variando de 200 a 250 mg EAG 100 g⁻¹ polpa seca desengordurada. Um segundo

estágio que compreende o quarto e o quinto período de colheita com valores próximo a 250 a 300 mg EAG 100 g⁻¹ polpa seca desengordurada, os quais não diferem estatisticamente do segundo período de colheita. E por fim um terceiro estágio de maturação onde têm-se um aumento consecutivo do conteúdo de fenólicos com 421,35; 595,28; 934,27 mg polpa seca desengordurada, respectivamente para o sexto, sétimo e oitavo período de colheita.

Estes valores encontram-se muito abaixo dos valores descritos para o açaí em três estágios distintos de maturação, onde os maiores conteúdos foram encontrados nos frutos verdes com 12,317; seguidos dos frutos intermediários 3039 e completamente maduros 3437 mg EAG 100 g⁻¹ matéria seca. (GORDON et al., 2012).

A Figura 11 apresenta o conteúdo de compostos fenólicos em frutos de juçara ao longo da maturação coletados na região da Costeira do Pirajubáé.

Figura 11- Conteúdo de fenólicos totais em frutos de juçara em diferentes períodos de maturação coletados na região da Costeira do Pirajubáé



a-f: Letras diferentes nas colunas das mesmas amostras os valores apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Podemos observar na Figura 11, o comportamento dos fenólicos

totais semelhante ao que ocorre com conteúdo das antocianinas. Os frutos coletados das três palmeiras distintas apresentaram um aumento no conteúdo de fenólicos até o quinto período de colheita ocorrendo um decréscimo no conteúdo no sexto e sétimo período de colheita.

O conteúdo de fenólicos totais variou de 1055,50 a 5764,03 mg EAG 100g⁻¹, 1003,80 a 4733,13 mg EAG 100g⁻¹, e 802,05 a 4284,20 mg EAG 100g⁻¹, respectivamente para as palmeiras 1, 2 e 3. Comparando-se os diferentes períodos de colheitas, em cada palmeira individual, observa-se um aumento linear no conteúdo de fenólicos totais em cada período, os quais apresentam diferença estatística entre si ($\rho < 0,05$).

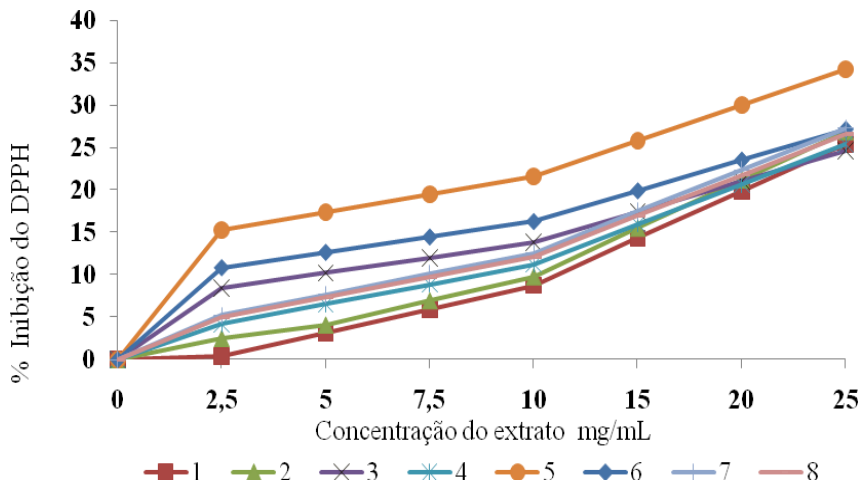
O conteúdo de compostos fenólicos totais é maior para os frutos coletados na região da Costeira do Pirajubaé comparados aos frutos oriundos da Lagoa da Conceição. Além de regiões distintas o período de maturação dos frutos também influenciará fortemente no metabolismo da célula vegetal influenciando na síntese destes compostos (TAIZ; ZEIGER, 2006). Um estudo com frutos de açaí (*Euterpe oleracea* M.) cultivados na região da Amazônia também apresentou diferenças marcantes no conteúdo de compostos fenólicos para os frutos coletados em julho e em fevereiro (SANABRIA; SANGRONIS, 2007).

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de frutas vem sendo determinada pela presença de diferentes antioxidantes com diferentes mecanismos de ação, podendo haver interações sinérgicas, fazendo-se necessário combinar mais de um método para determinar a atividade antioxidante *in vitro* (HUANG; OU; PRIOR, 2005, PÉREZ JIMÉNEZ et al., 2006). Quanto ao mecanismo desses métodos utilizados, o DPPH mede a capacidade de desativar radicais livres, enquanto o FRAP mede a capacidade de redução de metais. Do ponto de vista mecanístico em ambos os métodos existe uma simples transferência de elétrons (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH mostrou a grande variação nos resultados descritos na Figura 12, demonstrando que o período de colheita influencia o conteúdo de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais, o que conseqüentemente, irá influenciar a atividade antioxidante.

Figura 12 – Capacidade inibição do radical DPPH por extratos de frutos de juçara coletados na região da Lagoa da Conceição em diferentes períodos de colheita

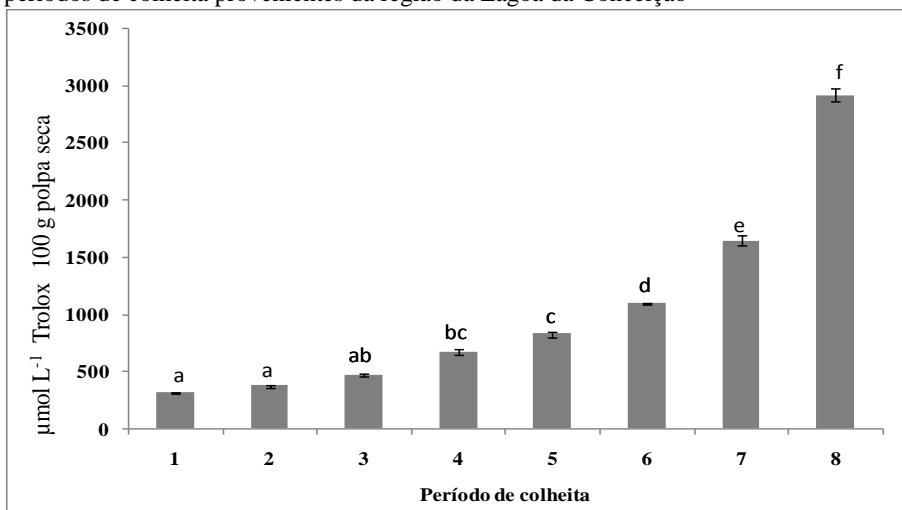


De acordo com a Figura 12, podemos verificar uma maior atividade antioxidante para os frutos provenientes do quinto período de colheita. Também podemos concluir que o aumento da maturação reduz a atividade antioxidante dos frutos. Os frutos do sétimo e oitavo período de colheita apresentam um comportamento semelhante frente ao radical DPPH. Após o quinto período de colheita observa-se que sexto e o terceiro período de colheita apresentam maior atividade antioxidante.

Avaliando – se atividade antioxidante pelo poder redutor do Fe verifica-se um comportamento distinto do descrito para o método de DPPH.

De acordo com Figura 13 verifica-se uma maior atividade apresentada para os frutos oriundos da oitava colheita diferindo estaticamente das demais coletas. Semelhante ao gráfico para o conteúdo de compostos fenólicos, o qual também apresenta um comportamento linear com o maior conteúdo de fenólicos totais na oitava colheita.

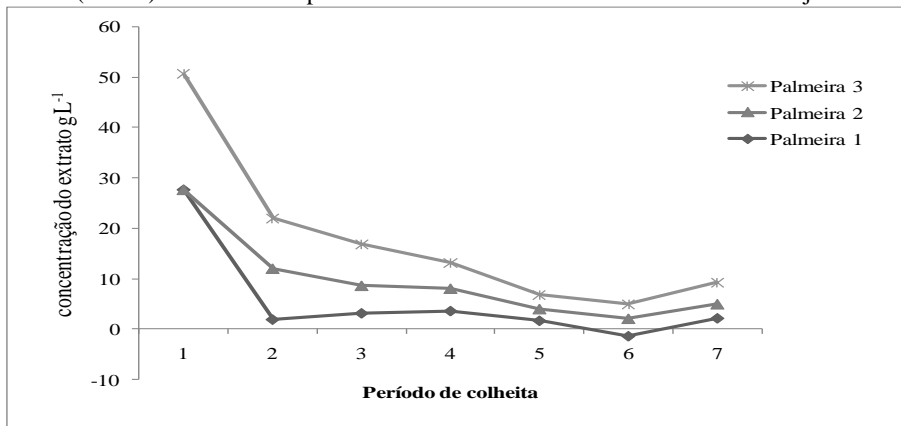
Figura 13 – Avaliação do poder redutor de ferro dos frutos de juçara em diferentes períodos de colheita provenientes da região da Lagoa da Conceição



Avaliou – se também a atividade antioxidante para os frutos de juçara coletados na região da Costeira do Pirajubaé. A Figura 14 apresenta a concentração de extrato necessária para inibir 50 % do radical DPPH no tempo de 30 minutos, para os diferentes períodos de colheita das palmeiras estudo.

Conforme a Figura 14, o quinto e o sexto período de colheita apresentam os maiores índices de atividade antioxidantes comparados aos demais períodos de colheita, para o ensaio de DPPH, com um decréscimo de valores para o sétimo período.

Figura 14 – Atividade antioxidante dos frutos de juçara avaliados pelo método DPPH (EC 50) em diferentes períodos de colheita oriundas da Costeira do Pirajubáé



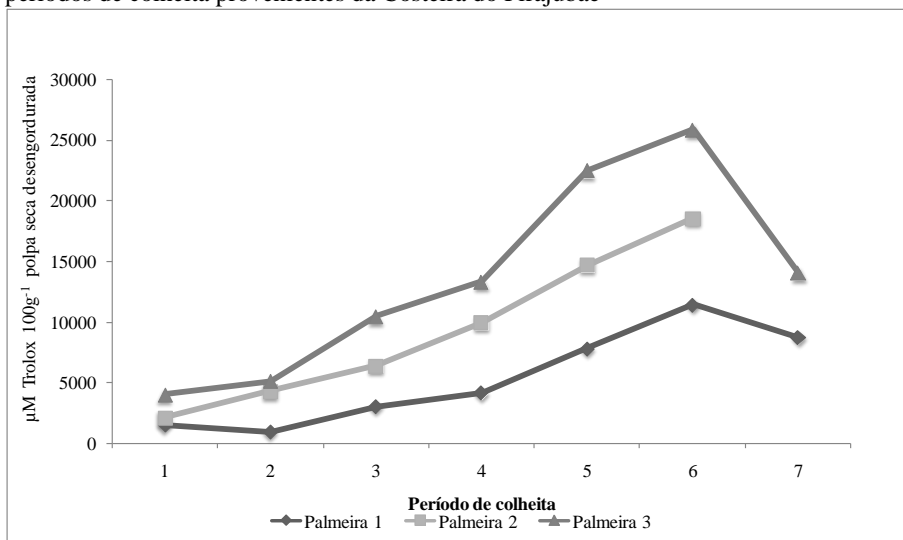
Concentração do extrato em g L⁻¹ necessária para inibir 50 % do radical no tempo de 30 minutos.

Comportamento semelhante é observado para a avaliação antioxidante pelo poder redutor de ferro (FRAP) dos extratos de juçara, na Figura 15 abaixo.

Os extratos de juçara apresentam um aumento da atividade antioxidante pelo método FRAP ao longo da maturação atingindo o ponto máximo no sexto período de colheita, com decréscimo nos valores na próxima colheita.

O comportamento apresentado pelos extratos para os ensaios de atividade antioxidante tanto para o FRAP, quanto para o DPPH, podem ser explicados comparando estes aos conteúdos de antocianinas e fenólicos totais presentes nos frutos ao longo da maturação. O maior conteúdo de fenólicos totais e antocianinas também ocorrem no quinto e sexto período de colheita.

Figura 15 – Avaliação do poder redutor de ferro dos frutos de juçara em diferentes períodos de colheita provenientes da Costeira do Pirajubaé



Através da análise de correlação de Pearson encontra-se uma forte correlação da atividade antioxidante com conteúdo de fenólicos totais ($r > 0,97$) e antocianinas monoméricas totais ($r > 0,95$) nos frutos. A correlação entre os métodos de DPPH e FRAP ($r = 0,90$) é forte e isso se explica pelos mecanismos de ação dos métodos iguais, a transferência de elétrons (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A atividade antioxidante de muitos frutos surge da ação sinérgica combinada de uma mistura de compostos, incluindo compostos fenólicos, carotenóides e vitamina C e E (RUFINO et al., 2010). No entanto, em frutas como a juçara, que contêm quantidades relativamente pequenas dessas vitaminas, os ácidos fenólicos, flavonóis, flavanois, e antocianinas são os principais contribuintes para a atividade antioxidante (BORGES et al., 2013).

Dessa forma podemos verificar a importância do período de colheita para a composição de fenólicos, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante dos frutos.

3.5 Perfil de ácidos graxos

Os frutos de juçara apresentam um elevado conteúdo de lipídios variando entre 20 a 40 % em matéria seca semelhante aos frutos do gênero como o açaí (*Euterpe oleracea* M.).

De acordo com Borges et al., 2011a o perfil de ácidos graxos apresenta a predominância de ácido oléico (45 – 55 %).

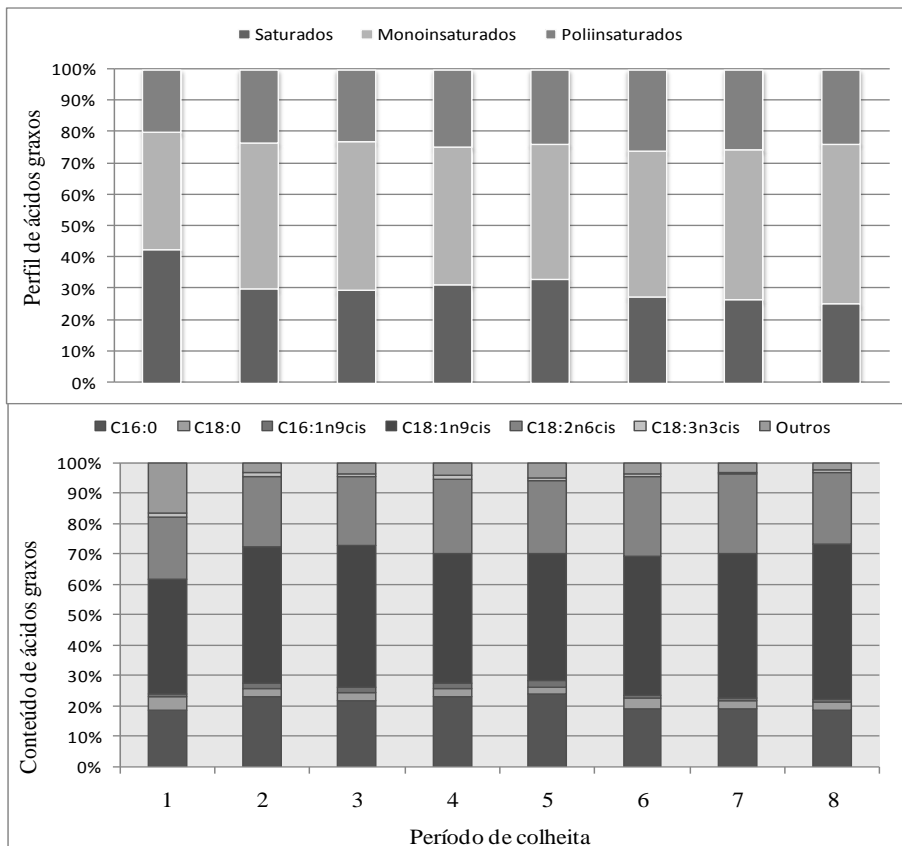
A Figura 16 abaixo apresenta o perfil de ácidos graxos dos frutos de juçara ao longo da maturação.

Podemos observar que ao longo da maturação os frutos apresentam um aumento no conteúdo do ácido palmítico (17,06 – 22,84 %) até o quinto período de colheita, com redução dos conteúdos nos próximos períodos de colheita para 17,86 %. Sendo este ácido o majoritário representante dos ácidos graxos saturados.

Os ácidos graxos insaturados são o maior representante da fração lipídica, em torno de 70 % da composição lipídica. O ácido oléico é o majoritário, dentre os insaturados, apresentando 34,03 % no primeiro período de colheita e aumentando linearmente até o último período de colheita atingindo 49,54 %. Já o ácido linoléico, principal poliinsaturado presente apresentou conteúdo de 18,96 %, na primeira colheita a 25 % na última colheita.

Em frutos oriundos da palma o período de amadurecimento tem grande influência no conteúdo total de lipídios e no perfil de ácidos graxos, o conteúdo de ácidos graxos saturados aumenta enquanto o teor de poliinsaturados diminui, conforme o período de amadurecimento (PRADA et al. 2011). Esta relação também ocorre e é válida para os frutos de juçara o qual apresentou um decréscimo no conteúdo de saturados de 42,46 % para 25,01 %; já os ácidos monoinsaturados aumentaram o conteúdo de 37,39 % para 51,22 %, e os ácidos poliinsaturados também com um leve aumento de 20,21 % para 23,77 %.

Figura 16 – Perfil de ácidos graxos presentes em frutos de juçara ao longo da maturação coletados na região da Lagoa da Conceição



4 CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos, as antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante dos frutos apresentaram variações nos seus conteúdos de fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais, e atividade antioxidante em relação ao período de colheita, como também em relação à região de cultivo e o período de maturação. Os frutos coletados a partir do mês de setembro apresentaram maior conteúdo de fenólicos, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante do que frutos coletados em

maio. O perfil de ácidos graxos é influenciado também pelo período de maturação dos frutos ocorrendo uma redução do conteúdo de ácidos graxos saturados e aumento dos ácidos monoinsaturados ao longo da maturação.

Com este estudo foi possível avaliar o ciclo de maturação dos frutos definindo o período ideal para colheita, conforme a caracterização química desejada do produtor. Os resultados deste trabalho demonstraram que ocorrem diferenças significativas na composição química dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) cultivado em diferentes regiões, e em diferentes estágios de maturação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD) e o emprego de micro-ondas para extração dos compostos fenólicos foi possível desenvolver um método rápido de extração e purificação destes compostos para posterior identificação e quantificação por UPLC – DAD, com tempo de análise de 10 minutos e alta eficiência na separação.

A partir destas técnicas desenvolvidas e o emprego do HPLC-ESI-MS/MS foi possível identificar compostos como: ácidos fenólicos (benzóico, clorogênico, cafeico, ferúlico, protocatecuico, siringico, vanílico e *p*-cumárcio) e flavonoides (quercetina e rutina), os quais contribuem de forma significativa para a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

Este trabalho apresentou um estudo inédito demonstrando a elevada capacidade antioxidante dos frutos de juçara frente à oxidação de células. Além disso, comprovou-se a forte correlação existente entre a atividade antioxidante com os compostos fenólicos identificados por HPLC-ESI-MS/MS, e com as antocianinas.

Por fim, foi possível definir o comportamento da juçara (*Euterpe edulis* M.) ao longo da maturação demonstrando uma dependência da composição química e a atividade antioxidante com o período de maturação dos frutos, como também com as regiões de cultivo.

Os resultados deste trabalho revelam a importância do cultivo e comercialização dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* M.) como fonte de compostos bioativos e agregação de valor nutricional a dieta. A juçara (*Euterpe edulis* M.) vêm sendo explorada não só no Estado de Santa Catarina, como também o Paraná devendo ser incentivado seu cultivo ao longo de todo território brasileiro contribuindo para o aumento da diversidade de frutas, como também para a preservação da espécie *Euterpe edulis* M. na Mata Atlântica.

Estudos mais específicos para avaliação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos frutos devem ser realizados, como também o estudo da atividade antioxidante e da bioacessibilidade de compostos isolados dos frutos.

Como perspectivas de trabalhos verificaram-se a necessidade de estudos mais aprofundados tanto de aproveitamento dos frutos como do potencial produtivo desta cultura, considerando o desenvolvimento de tecnologias que visem o aproveitamento global da matéria prima, durante os ciclos produtivos nas diferentes micro - regiões do Estado de Santa

Catarina, e a relevância econômica e ecológica da manutenção e ampliação da área cultivada de juçara (*Euterpe edulis* M.) para a potencial comercialização. Também a valorização dos frutos da palmeira juçara não deve retirar a responsabilidade da manutenção do cultivo da espécie em retorno às florestas, para a sua exploração sustentável.

REFERÊNCIAS

ABAD-GARCIA, B., L.A. BERRUETA, D.M. LOPEZ-MARQUEZ, I. CRESPO-FERRER, B. GALLO AND F. VICENTE. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal Chromatography A**, v. 1154, p. 87-96, 2007.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução n. 899**, de 29 de maio de 2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**, 18a.edição, Washington, DC, 2005.

AOCS (Association of Official Chemists). **Official Methods of Analysis**, 18a.edição, Washington, DC, 2004.

ARNOUS, A.; MARKIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal Food Composition Analysis**, v.15, p. 655-665, 2002.

ARRANZ, S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., & SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia*L.): contribution of oil and defatted matter. **European Food Research and Technology**, 227, 425-431, 2008.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BIESAGA, 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, 2505-2512, 2011.

BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açázero (*Euterpe oleracea*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, n.20, p. 388-390, 2000.

BORGES, G. S. C. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de frutos de jussara (*Euterpe edulis*)**. 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

BORGES, G. S. C.; V., F. G. K. ; COPETTI, C.; GONZAGA, L.V. ; ZAMBIAZI, R.; FILHO, J. ; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, p. 1-12, 2011a.

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K. ; COPETTI, C.; GONZAGA, L.V.; FETT, R. Optimization of extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of (*Euterpe edulis*) using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44, p. 708-715, 2011b.

BORGES, G.S.C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; FILHO-MANCINI, J.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC- ESI- MS/MS. **Food Research International**, v. 51, 363 -369, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie- LWT**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Instrução Normativa nº01, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de açai. On-line. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2798.htm>. Acesso em: 18 jul. 2008.

CALLEGARI, P. **Extração da polpa de açai a partir dos frutos do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) na Mata Atlântica**. 2003. 40f. Trabalho de Conclusão (Curso de Agronomia), Centro de Ciências Agrárias,

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CARVALHO, M.; FERREIRA, P. J.; MENDES, V. S., SILVA, R., PEREIRA, J. A.; JERÓNIMO, C.; SILVA, B. M. Human câncer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 441-447, 2010.

CAVALCANTI, M. R. I.; LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 136, 1160-1164, 2013.

CHAN, C.; YUSOFF, R.; NGOH, G.; KUNG, F. Microwave assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6213-6225, 2011.

CHENG, X.; WAN, J.; LI, P.; QI, L. Ultrasonic/ microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus*. **Journal of Chromatography A**, v.1218, 5774-5786, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESALQ/FAEPE, 2. Ed., 2005. 785p.

DAO, T.; NGUYEN, T.; GUILLARME, D.; et al. High throughput liquid chromatography with sub-2 μm particles at high pressure and high temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 1167, p. 76 – 84, 2007.

DAR., M. Y.; SHAH, W.A.; MANZOOR, A. R.; QURISHI, Y.; HAMID, A.; QURISHI, M.A. Chemical composition, *in vitro* cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1606-1611, 2011.

DARTORA, N.; SOUZA, L.M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-DAD-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453 – 1461, 2011.

DE BRITO, E. S., DE ARAÚJO, M. C. P., ALVES, R. E., CARKEET, C. C., CLEVIDENCE, B., & NOVOTNY, J. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara e guarabiju. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389-9394, 2007.

DEIANA, M.; CORONA, G.; INCANI, A.; LORU, D.; ROSA, A.; ATZERI, A.; MELIS, M. P.; DESSI, M. A. Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 3008-3016, 2010.

DEL- POZO INSFRAN, D., TALCOTT, S.; BRENES, C. H. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I. LAJOLO, F. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

EMBRAPA – CNPF. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina**. Curitiba, 1998.

EPAGRI, **Zoneamento Agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina**. 1998. Disponível em: <http://www.epagri.rctsc.br/zoneamentoagroambiental>>. Acesso em: 18 novembro 2009.

GALLORI, S., BILIA, A. R., BERGONZI, M. C., BARBOSA, W. L. R., & VINCIERI, F. F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Cromatographia**, v. 59, p. 739-743, 2004.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulp from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, p. 207-214, 2008.

GIADA, M. R. L.; MANCINI-FILHO, J..Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus*, L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International Journal Food Science and Nutrition**, v.1, p. 1-7, 2008.

GIUSTI, M.M., & WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: R. E. Wrolstad, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, pp. 1-13. New York: John Wiley and Sons. 2001.

GORDÓN, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. C. DE; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; MATTIETTO, R. A.; FRIEDRICH, M.; DA MATTA, V. M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, 256-263, 2012.

GRUZ, J.; AYAZ, F. A.; TORUN, H. and STRNAD, M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, v.124,p. 271-277, 2011.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.111, p. 789-794, 2008.

HASSIMOTO, N. M. A., GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 2928 – 2935, 2005.

HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Eds.) *Euterpe edulis* Martius – (**Palmiteiro**) **biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p.1-22.

HOGAN, S., CHUNG, H., ZHANG, L., LI, J., LEE, Y., DAI, Y., et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanins-rich extract from açai. **Food Chemistry**, 118, 208–214, 2010.

HONZEL, D.; CARTER, S. G.; REDMAN, K. A.; SCHAUSS, A.G.; ENDRES, J. R.; JENSEN, G. S. Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 8319-8325, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 1841-1856, 2005.

HUNG, P. V.; HATCHER, D. W.; BARKER, W. Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1896-1901, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. PEVS 2011: produtos madeireiros de florestas plantadas, com R\$ 13,0 bi, lideram valor da produção florestal brasileira (R\$ 18,1 bi). Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2011. Acessado em 15 de dezembro de 2012.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p. 1821-1835, 2011.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G. et al. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 8326-8333, 2008.

KALILI, K. M.; VILIERIS, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 834- 876, 2011.

KANG, J.; Li, Z.; TONG, W.; GITTE, J. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 610-617, 2010.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G., WU, X. Bioactives of açai (*Euterpe precatória* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, 3, 671-677, 2012.

KEVERS, C.; FALKOWSKI, M.; TABARAT, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J.; & PINCEMAIL, J. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.8596-8603, 2007.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 30, p. 330 – 334, 1982.

LIAZID, A.; GUERRERO, R.F.; CANTOS, E.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grapes skins. **Food Chemistry**, v. 124, 1238-1243, 2011.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J.G.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleraceae* Mart. (açai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, p. 53-64, 2005.

LIU, R.H.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 4311-4314, 2005.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; ZHANG, M. GAO, Y.; MA, C.; WANG, Z. Improved extraction and identification by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 2441-2446, 2010.

MAC FADDEN, J. **A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmito (*Euterpe edulis Martius*) na Mata Atlântica**. 2005. 100 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

MALDANER, L.; JARDIM I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p.214-222, 2008.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P.C. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Eds.) ***Euterpe edulis Martius – (Palmito) biologia, conservação e manejo***. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p. 23-38.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 45, 594-598, 1968.

MARTINS-CORDER, M. P. et al. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis Martius*. **Revista Árvore**, v.30, n.5, p 693-699, 2006.

MATILLA, P.; HELLSTROM, J.; TÖRRÖNEN, R. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7193-7199, 2006.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, 27, 1254-1555, 1992.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 48, 91, 1971.

MULABAGAL, V. & CALDERÓN, A. I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials. **Food Chemistry**, v.134, 1156-1164, 2012.

NACZK, M. & SHAHIDI, F. 1989. The effect of metanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. **Food Chemistry**, v. 31, 159-164, 1989.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açai extraído com enzimas e hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

NEO, Y.; ARIFFIN, A.; TAN, C.; TAN, Y. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil pal (*E. guineensis*) fruit extracts. **Food Chemistry**, v.122, p. 353-359, 2010.

NOVÁKOVÁ, L.; SPÁČII, Z.; SEIFRTOVÁ, M.; OPLETAL, L.; SOLICH, P. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. **Talanta**, v.80, 1970 - 1979, 2010.

OKE, F.; ASLIM, B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 128, p. 613-618, 2011.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.; MACIÁ, A.; REGUANT, J.; ANGLÉS, N.; MORELLÓ, J.; MOTILVA, M. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.298 – 305, 2010.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, 115, 4, p.1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, 115, 4, p.1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**, v.118, p.17-25, 2010.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT S.; TALCOTT, S. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.4631-4636, 2008b.

PACHECO-PALENCIA, L.A; MERTENS-TALCOTT S.; TALCOTT, S. Absorption and biological activity of phytochemical rich extracts from açai (*Euterpe oleracea*) pulp and oil in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3593-3600, 2008a.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURO-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PRADA, F.; AYALA-DIAZ, I. M.; DELGADO, W.; RUIZ-ROMERO, R.; ROMERO, H. M. Effect of fruit ripening on content and chemical composition of oil from three oil palm cultivars (*Elaeis guineensis* Jacq.)

grown in Colombia. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10136 – 10142, 2011.

RAFFERTY, J. L.; SIEPMANN, J.I.; SCHURE, M. R. Mobile phase effects in reversed-phase liquid chromatography: A comparison of acetonitrile/water and methanol/water solvents as studied by molecular simulation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2203 – 2213, 2011.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978. 320 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Belém:EDUFPA, 2000.313p.

ROGEZ, H., D. R. POMPEU, S.N. T., AKWIE, Y. LARONDELLE. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: a comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, doi: 10.1016/j.jfca.2011.03.015 (2011).

ROSA, A.; ATZERI, A.; DEIANA, M.; MELIS, M. P.; INCANI, A; CORONA, G; et al. Protective effect of vanilloids against *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in vero cells culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 3546-3555, 2008.

ROSS, K. A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 113, p. 336-344, 2009.

ROSSO.V.V. et. al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291-299, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; de BRITO, E.S. PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S.M., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., ALVES, R. E., BRITO, E. S., OLIVEIRA, M. S. P., et al. Açai (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100 – 2106, 2011.

SANABRIA, N.; SANGRONIS, E. Caracterización Del açai o manacá (*Euterpe oleracea* Mart): um fruto del Amazonas. **Archivos Latino Americanos**, v. 57, p. 94-99, 2007.

SCHAUSS, A. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of freeze-dried Amazonian Palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8604-8610, 2006b.

SCHAUSS, A.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and others bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8598-8603, 2006a.

SCHILLER, C. D.; KAINZ, A., MYNETT, K., GESCHER, A. Assessment of viability of hepatocytes in suspension using the MTT assay. **Toxicology in vitro**, 6, p. 575-578, (1992).

SCHIRMANN, G. S. **Composição em ácidos graxos do açai (*Euterpe edulis*) de diversas regiões de Santa Catarina**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

SCHRECKINGER, M. E., LOTTON, J., LILA, M. A., & MEJIA, E. G. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal Medicinal Food**, 13 (2), 233-246, (2010).

SCHULTZ, J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açaí de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius e influência de diferentes métodos de pasteurização sobre o açaí de *Euterpe edulis*.** 2008. 54f. Trabalho de Conclusão (Curso de Agronomia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SILVA, J. L. V. F. **Análise econômica da produção e transformação em ARPP, dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. em açaí no município de Garuva, Estado de Santa Catarina.** 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

SILVA, M. G. P. C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004..**Anais...CD ROOM**, Florianópolis, SC, 2004.

SILVA, R. G. C. S.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Cromatografia líquida capilar: estado da arte aplicações. **Química Nova**, v. XY, p 1-9, 2011.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SPÀCIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 26, p. 189 - 199, 2008.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

SUÁREZ, M.; MACIÀ, A., ROMERO, M., MOTILVA, M. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. **Journal of Chromatography A**, v.1214, p. 90-99, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**.3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 719p.

TALCOTT, S. T., PACHECO-PALENCIA, L. A., & TALCOTT, S. M. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), **Journal Agriculture and Food Chemistry**, 56, 4631-4636, 2008.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, v. 100, p.81-90, 2007.

VIDAL, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PAVAN, R.; LIMA, A.; FALLARERO, A.; BATISTA, A.E.; MANCINI-FILHO, J.. Actividad antioxidante y polifenoles de lãs algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. **Ars; Pharmaceutical.**, v. 50, n.1, p. 24-31, 2009.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recents advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Food Science & Technology**, v. 17, 300-312, 2006.

WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 8418-8426, 2008.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p. 8896-8907, 2007.

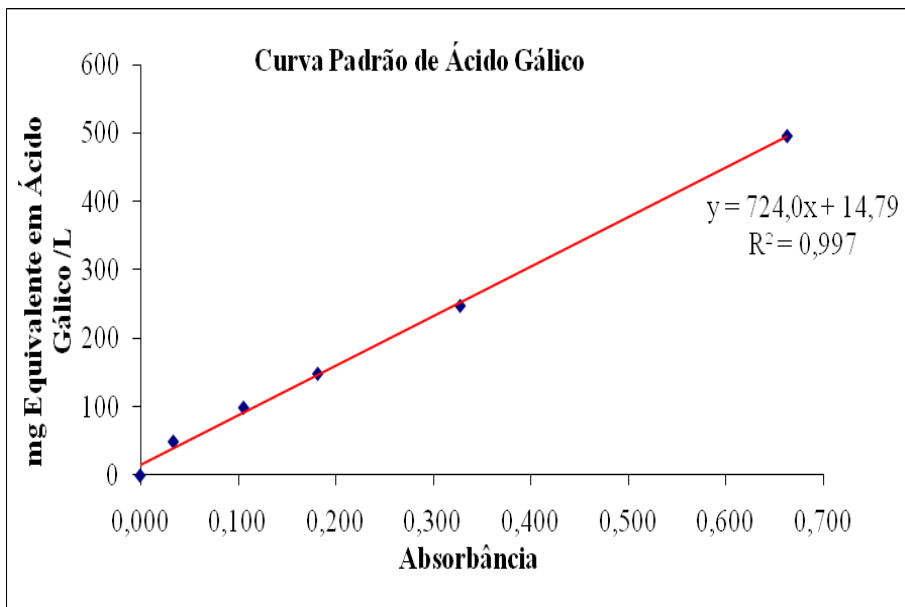
WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International** (2011), doi: 10.1016/j.foodres.2011.09015.

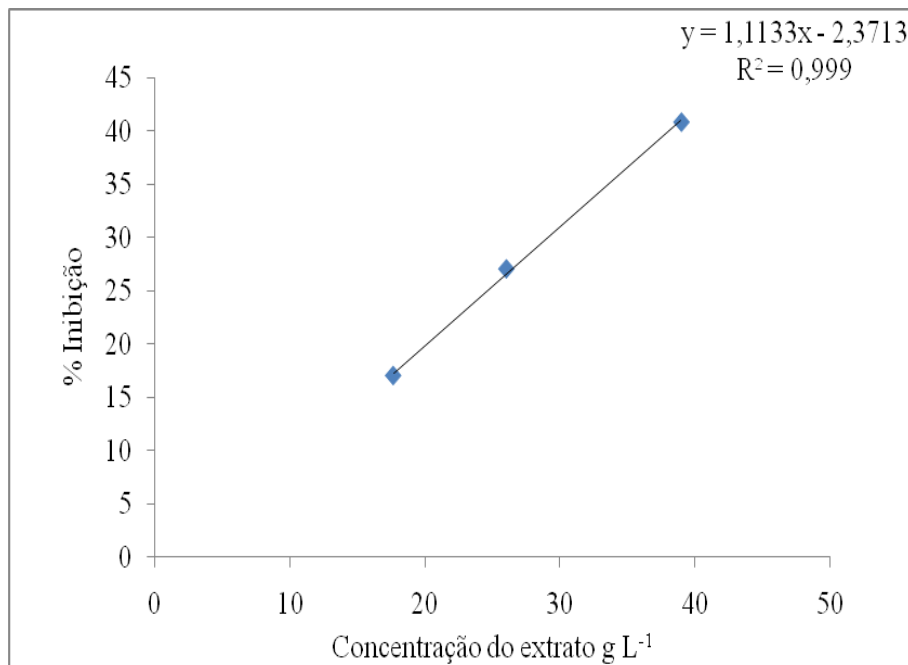
XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A. G.; BADGER, T. M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WU, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF-KB activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 1184-1191, 2012.

ZADERNOWSKI, R. M.; NACZK, M. & NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2118-2124, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A -Curva padrão de ácido gálico, utilizado no método de Folin-Ciocalteu para determinação de fenólicos totais.



APÊNDICE B - Curva do extrato de juçara *versus* a inibição do radical DPPH

APÊNDICE C – Curva padrão de Trolox, utilizado no método do poder de redução do ferro (FRAP)

