

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA

Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha da goiaba-
serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)

Ana Paula dos Santos Silva

Florianópolis – SC

2017

Ana Paula dos Santos Silva

**Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha da goiaba-serrana
(*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
em Engenharia de Alimentos do Centro
Tecnológico da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do Título
de Bacharel em Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof. Dr. Ing. Haiko Hense
Coorientador: Ms. Pedro Henrique Santos

Florianópolis

2017

Ana Paula dos Santos Silva

**Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha da goiaba-serrana
(*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos

Local, 04 de julho de 2017.

Prof. Haiko Hense, Dr. Ing
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Pedro Henrique Santos, Ms.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Haiko Hense, Dr. Ing
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Kátia Suzana Andrade, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me acompanhar e iluminar o meu caminho, me ajudando a realizar todos os meus sonhos.

Aos meus pais, Leonardo e Neuris, por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava que fosse possível. Por todo o carinho, amor, paciência e incentivo. Por todo o suporte necessário para eu chegar até aqui.

Ao meu irmão, Diego Maurício, por ser meu exemplo, meu protetor e por sempre me motivar a continuar esta caminhada.

Ao meu orientador, Haiko, por ter dado a oportunidade de trabalhar com a goiaba-serrana e por toda a orientação necessária para a conclusão desse trabalho.

Ao meu coorientador, Pedro Henrique, por toda a paciência, disposição, companheirismo e dedicação que teve em transmitir os seus conhecimentos.

À minha parceira de trabalho e amiga Joana, por sua amizade, companheirismo e união em todos os momentos desse um ano de trabalho e dedicação. Serei eternamente grata e feliz por ter vivido essa etapa tão importante do curso contigo.

Ao meu namorado, Cleto, pela paciência, amor e carinho, sempre me ajudando a atingir os meus objetivos e acreditando nos meus sonhos.

As minhas amigas, Helena, por sempre me apoiar e saber me ouvir, dando os melhores conselhos e estando do meu lado por toda a graduação, a Jéssica Alberton, por todo o companheirismo, parceria, descontração e risadas em todos esses anos que moramos juntas.

A minha amiga, Jéssica Moraes por todo o suporte e conversas divididas neste último semestre de graduação.

Aos colegas do LATESC por dividirem as tardes de experimentos juntos e por sempre serem solícitos e gentis ao tirarem as minhas dúvidas.

À banca que se fez presente para contribuir com a avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares, por serem incentivadores e compreensivos nos momentos de ausência.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

A goiaba-serrana é uma fruta nativa do planalto meridional brasileiro e que apresenta uma série de propriedades bioativas, como propriedades antioxidantes e antimicrobianas, porém ainda é muito pouco conhecida pela população brasileira. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade antioxidante dos extratos da folha da goiaba-serrana obtidos por métodos de extração a baixa pressão. Os extratos foram obtidos em estudo paralelo através de aplicação dos métodos Soxhlet e Extração Assistida por Ultrassom (EAU), com uso de solventes etanol, água e a mistura etanol-água (50:50 v/v). Neste trabalho, a atividade antioxidante dos extratos foi analisada e determinada pelas técnicas de captura do radical DPPH, inibição do radical ABTS e redução do íon férrico (FRAP). Os principais resultados foram com relação ao método de captura do radical DPPH, no qual todos os resultados obtiveram valores de EC_{50} considerados “muito ativos”, destacando-se os valores obtidos pelas análises dos extratos adquiridos pelo solvente etanol-água. Para as análises de ABTS e FRAP, os melhores resultados foram da extração assistida por ultrassom sonda (1704,14 $\mu\text{M TEAC/g}$) e da extração por Soxhlet (285,40 $\mu\text{M Trolox/g}$), respectivamente e ambos com o solvente etanol-água. Concluindo, os resultados observados no presente trabalho apontam os extratos de goiaba-serrana como potenciais fontes de antioxidantes naturais e indicam uma possibilidade de aplicação em indústria de alimentos.

Palavras-chave: Goiaba-serrana. Antioxidantes. DPPH. ABTS. FRAP.

ABSTRACT

The pineapple guava is a native fruit of the highlands of southern Brazil and presents a series of bioactive properties, like antioxidant and antimicrobial properties, but is a fruit practically unknown to the Brazilian population. Therefore, the objective of the present work is to determine the antioxidant activity of pineapple guava leaf extracts obtained by low pressure extraction methods. The extracts were obtained in a parallel study through application of Soxhlet, US and UB, using ethanol, water and a mixture of ethanol-water (50:50 v/v) as solvents. In this study, the antioxidant activity (AA) of the extracts was determined by the techniques of free radical scavenging activity (DPPH), ABTS radical scavenging assay and Ferric Reducing/Antioxidant Potential (FRAP). The best antioxidants activity was showed by the free radical scavenging activity (DPPH), in which all the results obtained for EC₅₀ are considered "very active", highlighting the values obtained by the analyzes of the extracts acquired by the solvent ethanol-water. The analysis of ABTS and FRAP have the best results to US (1704.14 μ M TEAC / g) and Soxhlet (285.40 μ M Trolox / g), respectively and both with the ethanol-water solvent. In conclusion, the results observed in the present study point out the extractions of pineapple guava as potential sources of natural antioxidants and indicate a possibility of application in the food industry.

Keywords: Pineapple guava. Antioxidants. DPPH. ABTS. FRAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de goiaba-serrana dispostas em bandeja para secagem em estufa com circulação forçada de ar	29
Figura 2 - Gráfico da concentração do extrato da goiaba-serrana <i>versus</i> a atividade antioxidante em porcentagem para a amostra obtida pelo método Extração Assistida por Ultrassom Sonda e solvente etanol.	35
Figura 3 - Imagem da análise da atividade antioxidante pelo método DPPH da amostra da folha da goiaba-serrana obtida pelo método de Extração Assistida por Ultrassom Sonda e solvente etanol-água.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos realizados sobre a goiaba-serrana na Universidade Federal de Santa Catarina.....	21
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antioxidante da casca da goiaba-serrana obtida pelo método de captura do radical DPPH, inibição do radical ABTS e redução do íon férrico (FRAP).....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
DPPH	1,1-diphenil-2-picryl hydrazil
EC ₅₀	Concentração efetiva de extrato para 50% de AA
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Potential
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
UB	Extração assistida por Ultrassom Banho
US	Extração assistida por Ultrassom Sonda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. JUSTIFICATIVA	16
1.2. OBJETIVOS	16
1.2.1. Objetivos Gerais	16
1.2.2. Objetivos Específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. GOIABA-SERRANA (<i>Acca sellowiana</i> (O.BERG) BURRET))	18
2.2. ANTIOXIDANTES	22
2.3. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES	23
2.3.1. Método de captura do radical DPPH	25
2.3.2. Método de inibição do radical ABTS	26
2.3.3. Método de redução do íon férrico (FRAP)	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. MATERIAIS	29
3.2. MÉTODOS	30
3.2.1. Método de captura do radical DPPH	30
3.2.2. Método de inibição do radical ABTS	30
3.2.3. Método de redução do íon férrico (FRAP)	31
3.2.4. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH	34
4.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS	38
4.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (FRAP)	39
5. CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret, conhecida popularmente como feijoa, goiaba-da-serra, goiabeira-do-mato, goiabeira-serrana, entre outros, é uma planta da família Myrtaceae e nativa do planalto meridional brasileiro, Paraguai, Uruguai e Norte da Argentina (Mattos, 1986). A Myrtaceae é uma das maiores famílias da flora brasileira, contendo cerca de 130 gêneros e 4000 espécies, dos quais 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies estão presentes no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005). Apesar da goiaba-serrana ser uma planta nativa do Brasil, esta espécie é pouquíssimo conhecida no país. No entanto, a goiaba-serrana é muito cultivada na Colômbia e na Nova Zelândia, sendo estes dois os seus maiores produtores (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001).

De acordo com Weston (2010), o fruto da goiaba-serrana é doce, a sua polpa ao redor das sementes é bastante suculenta, enquanto que a pele é azeda e amarga. Na Nova Zelândia a goiaba-serrana já é utilizada na produção de vitaminas, vinho, iogurtes, bebidas, compotas e gelados (WESTON, 2010).

O aumento do cultivo e a exploração da goiaba-serrana no Brasil pode torná-la uma nova alternativa de frutos com propriedades nutracêuticas desejáveis à população brasileira. Para que esse aumento ocorra, pesquisadores da Epagri, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) vêm desenvolvendo uma série de pesquisas básicas e aplicadas, contribuindo para a implementação e exploração econômica desta espécie em regiões de altitude no Sul do Brasil. (AMARANTE; SANTOS, 2011).

De acordo com Beyhan, Elmastas e Gedikli (2010), a fruta da goiaba-serrana tanto seca como fresca e as folhas da mesma apresentam grande capacidade antioxidante, sendo que, a atividade antioxidante da folha da goiaba-serrana é maior do que a do seu fruto.

O interesse por estudos com antioxidantes naturais vem crescendo nos últimos anos, devido ao aumento da importância do conhecimento das propriedades antioxidantes dos alimentos (BOROSKI et al, 2015). Segundo Boroski et al (2015), esse aumento continua crescendo em virtude dos benefícios vinculados ao consumo dessas substâncias tanto para a saúde quanto para a indústria de alimentos. Em consequência, profissionais de diversas áreas como: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Bioquímica, Medicina, Agronomia, Química, Zootecnia, entre outras, têm pesquisado as diferentes colocações dos antioxidantes.

Houve também um progresso significativo em relação a atividade antioxidante na promoção da saúde em humanos e dos possíveis mecanismos que essas substâncias possuem na prevenção de doenças (GIADA; FILHO, 2006). A importância quanto ao estudo dos antioxidantes é devido, também, ao fato de que os compostos antioxidantes podem impedir a ação dos radicais livres e aumentar a vida útil dos alimentos, adiando o processo de peroxidação lipídica, o qual é uma das principais razões da degradação de produtos alimentares e farmacêuticos durante o seu processamento e armazenamento (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2006).

Atualmente os antioxidantes mais utilizados pelas indústrias são os antioxidantes BHA, BHT, galato de propilo e terc butil hidroquinona (TBHQ). Sendo que os antioxidantes sintéticos como o BHA e BHT são suspeitos de serem responsáveis por danos no fígado e carcinogênese (WICHI, 1988).

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente, antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, pois tem como uma de suas funções o aumento da vida útil de diversos produtos. Entretanto, estas substâncias não são benéficas aos seus consumidores e podem acarretar em diversas doenças. Em consequência, a busca pelos antioxidantes naturais vem crescendo cada dia mais. A atividade antioxidante dos alimentos e matrizes vegetais também é de grande interesse nutricional, pois vem sendo relacionada à prevenção de várias doenças. Visando esta substituição na indústria de alimentos e outros benefícios dos antioxidantes, este estudo tem como uma de suas finalidades obter maiores informações que ajudem no conhecimento do potencial de aplicação da folha da goiaba-serrana como fonte de antioxidantes naturais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Determinação da atividade antioxidante de extratos das folhas da goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) obtidos por extrações à baixa pressão (Soxhlet, Extração

Assistida por Ultrassom com uso de Sonda e com uso de Banho), visando suas possíveis aplicações nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial antioxidante do extrato das folhas da goiaba-serrana;
- b) Determinar o melhor método de extração à baixa pressão das folhas de goiaba-serrana com base na atividade antioxidante.
- c) Determinar o melhor solvente nos métodos de extração à baixa pressão das folhas de goiaba-serrana com base na atividade antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana* (O. BERG) BURRET))

A goiaba-serrana tem o seu centro de origem localizado no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Norte da Argentina (MATTOS, 1986). Este fruto pertence à família das Myrtaceae, ou seja, a goiaba-serrana pertence à mesma família que outras plantas como a goiabeira comum, a jabuticabeira, a pitangueira, entre outras (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001). A maturação da goiaba-serrana tem início em abril ou maio, porém pode variar de acordo com o local. Enquanto que a floração se dá em outubro e novembro, também variando de acordo com o local (MATTOS, 1986).

Em países como o Uruguai, essa espécie é conhecida como guayabo-verde ou guayabo-del-país. Na língua inglesa é denominada feijoa ou pineapple-guava. Enquanto que os indígenas, que habitavam a região sul do continente, a chamavam de Quirina, kanêkryne, Nyandua-pishá ou Guarobi (que na língua tupi-guarani quer dizer ‘fruto verde mesmo quando está maduro’) (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001).

De acordo com Mattos (1986), inicialmente o gênero *Feijoa* possuía duas espécies *bergianas*, no qual eram classificadas como *Orthostemon* Berg. No entanto, como este já existia na família Gentianaceae, Berg criou o gênero *Feijoa* em 1859, transferindo as duas espécies existentes até então. No mesmo ano, Kiarskou resolveu criar a terceira espécie, posteriormente conhecida como *sellowiana* Berg.

Os frutos da goiaba-serrana são classificados como pseudofruto do tipo pomo, tem o formato oblongo, apresenta a polpa com cor gelo. As características da casca podem ser lisa, semirrugosa ou rugosa, o fruto apresenta diâmetro entre 3-8 cm, comprimento de 4-10 cm e peso de 20-250 g com rendimento de polpa de 15-50%. Sendo assim, o fruto da goiaba-serrana tem atributos semelhantes ao da goiabeira comum (*Psidium guajava* L.), distinguindo-se em apresentar casca verde e não comestível, com polpa de sabor singular doce-acidulado e aroma penetrante (AMARANTE; SANTOS, 2011). Outra característica semelhante à goiaba comum, é que a goiaba-serrana também é uma boa fonte de vitamina C, baixa em calorias e rica em minerais e fibras (WESTON 2010). A quantidade de vitamina C encontrada na goiaba-serrana pode ser também comparada à quantidade que é encontrada na laranja (SANTOS, 2009).

Outra importante característica do fruto é apresentar atividade antibactericida, antioxidante e antialérgica, sendo que a presença de flavonoides auxilia na atividade

imunológica. Estudos farmacológicos comprovaram que os flavonoides contidos no fruto atuam seletivamente, provocando apoptose em células tumorais mieloides, em casos de leucemia (AMARANTE; SANTOS, 2011). Além disso, a casca e a polpa produzem um óleo volátil altamente aromático, que tem excelente potencial como um material aromatizante de alimentos. (WESTON, 2010).

As sementes da goiaba-serrana se apresentam em numerosa quantidade em cada fruto com um bom poder germinativo, porém estas sementes devem ser semeadas assim que forem extraídas dos frutos. As características da semente são: tamanhos entre 1,5 – 2 mm, reniformes e branco-amareladas (MATTOS, 1986). Já as folhas da goiaba-serrana apresentam-se opostas, curto pecioladas, ovadas, face superior brilhante, verde-escuras e glabras (MATTOS, 1986). Muito do potencial farmacológico da planta goiabeira tem-se concentrado nas folhas (WESTON, 2010).

Em 1890, o botânico Eduard André levou a goiaba-serrana para a França, onde se tornou conhecida, espalhando-se para diversos países. Logo, boa parte do que é consumido em São Paulo e Brasília, por exemplo, são goiabas-serranas importadas das Colômbia ou Nova Zelândia (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001).

A goiaba-serrana pode ser utilizada como planta ornamental e na produção de frutos utilizados na fabricação de geleias e bebidas, além de serem consumidos frescos. Essas designações para a goiaba-serrana já acontecem muito na Colômbia, Estados Unidos e Nova Zelândia. Nesses países há também a utilização da essência da fruta, que é extraída e usada na elaboração de chocolates, biscoitos, sorvetes e outras guloseimas (SANTOS, 2009). No Brasil, os poucos que conhecem e utilizam a goiaba-serrana usam-na para artesanato, venda dos frutos, suco, licor, caipirinha e cachaça e a grande maioria a utiliza para chás e doces (SANTOS, 2009).

Como a goiaba-serrana ainda é pouco conhecida no Brasil, e por isso ainda é considerada uma espécie silvestre ou do mato, as suas plantas não apresentam um padrão, mas sim, uma grande variabilidade genética. Ou seja, cada planta pode apresentar frutos diferentes de outros pés, tanto no sabor quanto no tamanho. Conseqüentemente, é possível encontrar plantas mais resistentes ou de melhor qualidade, no entanto, há uma grande dificuldade de comercialização, pois a espécie para ser comercializada necessita de um mínimo padrão de qualidade desejável (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001).

O cultivo comercial da goiaba-serrana começou a ser estimulado em Santa Catarina a partir de 2007, quando houve o lançamento de quatro novos tipos de cultivares, entre eles os

cultivares Alcântara, Helena, Nomante e Mattos Epagri/Estação Experimental de São Joaquim (SANTOS, 2009). A Universidade Federal de Santa Catarina, em parceria com a Epagri, de Santa Catarina, tentando resolver o problema da variabilidade genética e assim, conseqüentemente, da comercialização da goiaba-serrana, elaboram um projeto de estudo sobre a planta e vêm examinando vários desses problemas, fazendo a seleção e o melhoramento convencional e realizando pesquisas para se conseguir multiplicar vegetativamente a goiabeira. Alguns resultados desse trabalho já foram apresentados, como o lançamento das primeiras variedades adaptadas para locais de altitudes maiores que 1200 m (VOLPATO; DONAZZOLO; NODARI; 2001).

Estudo realizado por Mendes e Araújo (2011), constatou que atividade antioxidante determinada pelo método DPPH do extrato da folha da goiaba-serrana, obtido por maceração por 48 horas com etanol 96%, apresentou EC_{50} de 4,90 mg/mL e capacidade redutora de íons férricos de $161,0 \pm 2,7$ mg de ácido ascórbico/g de extrato. A seguir, no quadro 1, é apresentado o nome, autor e ano de alguns dos estudos sobre a goiaba-serrana realizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

Quadro 1: Estudos realizados sobre a goiaba-serrana na Universidade Federal de Santa Catarina.

Autor	Ano	Descrição	Título da Pesquisa
Pedro Henrique Santos	2017	Tese em andamento (Doutorado) - Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos	Obtenção de extratos bioativos de casca e Folha de feijoa (<i>acca sellowiana</i> (o. Berg) Burret) por métodos à baixa e alta pressão
Vanessa Samara Petry	2015	TCC (Graduação) - Centro de Ciências Agrárias. Curso de Agronomia.	Escurecimento enzimático, compostos fenólicos totais e atividade da polifenol oxidase na polpa de cinco genótipos de Feijoa (<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret)
Denise Olkoski	2014	Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais	Filogeografia e dinâmica da diversidade genética de <i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret (Myrtaceae)
Getúlio Torteli	2013	Projeto acadêmico (Graduação) - Campus Curitibanos. Ciências Rurais.	Controle do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em plantas de goiaba-serrana (<i>Acca sellowiana</i>) (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) com óleo essencial de <i>Eucalypto viminalis</i>
Joel Donazzolo	2012	Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais	Conservação pelo uso e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha - RS
Hugo Pacheco de Freitas Fraga	2012	Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.	Efeitos da 5-azacitidina na embriogênese somática de <i>Acca sellowiana</i> (O. Berg.) Burret e nos níveis de metilação do DNA
Karine Louise dos Santos	2005	Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.	Bases genéticas de características de importância agrônômica em goiabeira-serrana (<i>Acca sellowiana</i>)
Gabriela Claudia Cangahuala Inocente	2002	Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciência Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais	Embriogênese somática e sementes sintéticas em <i>Feijoa sellowiana</i> Berg.: sistema referência e aspectos morfo-histológicos e bioquímicos
Suzana Stefanello	2000	Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias.	Elucidação de pontos de controle da embriogênese somática em goiabeira serrana (<i>Feijoa sellowiana</i> Berg)
Lirio Luiz Dal Vesco	1998	Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas	Indução e controle da embriogênese somática <i>in vitro</i> na goiabeira serrana (<i>Feijoa sellowiana</i> Berg)

Fonte: Site da Biblioteca Universitária da UFSC – Repositório.

2.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que se apresentam naturalmente ou são intencionalmente adicionadas aos alimentos com a finalidade de retardar o fenômeno de oxidação, mantendo as suas características sensoriais intactas (ORDONEZ, 2005). O antioxidante pode vir a agir, teoricamente, de inúmeras formas: 1) quando se liga competitivamente com o oxigênio, retardando a etapa de iniciação, interrompendo a etapa de propagação destruindo; 2) ligando-se aos radicais livres, com a inibição dos catalisadores; 3) estabilizando os hidroperóxidos (OETTERRER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO; 2006). Essas ações dos antioxidantes podem vir a ocorrer tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos (BOROSKI et al, 2015).

Os radicais livres quando presentes em sistemas biológicos podem afetar os lipídios, as lipoproteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, podendo vir a acarretar doenças cardiovasculares, inflamatórias, câncer e arteriosclerose. Enquanto que os radicais livres em alimentos afetam os lipídios e proteínas, resultando em menor qualidade lipídica e de proteínas, menor qualidade nutricional, menor segurança alimentar, formação de produtos tóxicos e a diminuição da vida útil do alimento (BOROSKI et al, 2015). Os radicais livres são formados pelo processo respiratório e pelas inúmeras reações oxidativas das células aeróbicas. (SILVA et al, 2010).

Devido à alta quantidade de compostos que possuem reconhecida capacidade antioxidante, tornou-se necessária a classificação dos mesmos. Sendo assim, a classificação geral mais encontrada divide os antioxidantes quanto a sua origem em naturais ou sintéticos. Os antioxidantes naturais, como o próprio nome diz, são obtidos de fontes naturais, e não em laboratório, dentre eles apresentam-se as enzimas, vitaminas e compostos fenólicos (BOROSKI et al, 2015). De acordo com Araújo (2008), os antioxidantes sintéticos, em geral, são compostos fenólicos contendo vários graus de substituto de alquila, enquanto que os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos, lactona, quinona e os polifenóis.

Os antioxidantes sintéticos devem atender pré-requisitos para, deste modo, poderem ser utilizados na indústria de alimentos. Como exemplo, os antioxidantes não devem ser tóxicos, devem apresentar alta atividade em baixas concentrações, concentrarem-se na superfície da fase graxa do alimento e devem resistir a todo o processamento do alimento, contribuindo para a estabilidade final do produto (OETTERRER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Além do mais, há todo um monitoramento da quantidade e do uso dessa

classe de antioxidantes quando adicionada aos alimentos. No Brasil, este controle é feito pelo Ministério da Saúde.

Segundo Shibamoto e Bjeldames (1996), o ácido L-ascórbico ou vitamina C, que está amplamente presente nos vegetais, é um exemplo de substância que é utilizada como antioxidante. Outro exemplo é o tocoferol, também conhecido como vitamina E. Os óleos vegetais naturais não são rapidamente oxidados por causa da presença deste tocoferol.

Os antioxidantes também são classificados com base em suas funções, podendo ser antioxidantes primários ou secundários. Antioxidante primário atua bloqueando a ação dos radicais livres, doando hidrogênio ou elétrons e convertendo-os em produtos estáveis (ARAÚJO, 2008). Os antioxidantes secundários atuam por diferentes mecanismos, que incluem complexação com metais, seqüestro de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (GORDON, 1990).

Os antioxidantes também agem em diferentes níveis no processo de oxidação das moléculas de lipídios. Eles atuam fazendo com que a concentração de oxigênio diminua, e assim, evita-se a fase de iniciação da oxidação. Outro método em que os antioxidantes atuam é quando quelam os íons metálicos e decompõe produtos primários a compostos que não são radicais (SHAHIDI, 1996).

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Analisar a eficiência dos antioxidantes em alimentos é um atividade complexa, por isso exige a utilização de diferentes metodologias para determinar o efeito antioxidante em diferentes aspectos sob diversos substratos. Sendo assim, os resultados necessitam ser representados e analisados de acordo com o método analítico aplicado (BOROSKI et al, 2005).

Observa-se que é crescente a busca de metodologias analíticas sensíveis, baratas e que apresentem especificidade, linearidade, precisão e robustez para avaliar o *status* antioxidante *in vitro* e *in vivo* de diferentes amostras (TOMEI; SALVADOR, 2007).

Devido ao grande número de compostos químicos diferentes existentes, sendo um deles os compostos fenólicos, atualmente diversos ensaios são desenvolvidos para a avaliação da capacidade antioxidante de amostras, nos quais pode ser determinada a habilidade dos

antioxidantes em sequestrar espécies reativas geradas no meio reacional, ou a eficácia em que os antioxidantes provocam a inibição da peroxidação lipídica por meio de quantificação dos produtos da decomposição da peroxidação lipídica ou medição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante que será testado. Como cada método de análise de antioxidantes tem a sua própria escala de valores, a comparação entre os diferentes métodos não pode ser feita em valores absolutos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

A causa pela qual a separação e o estudo individual de cada substância antioxidante seja inviável e de alto custo é a complexidade da composição dos alimentos. Em consequência, os pesquisadores devem realizar métodos rápidos para a determinação da eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças. Porém, estes métodos ainda precisam ser aperfeiçoados, pois os testes realizados *in vitro* não são condizentes com as situações reais (HUANG et al, 2005).

Quando a avaliação da atividade antioxidante se trata dos sistemas alimentares, a avaliação da eficiência dos antioxidantes é no sentido de proteger os alimentos da oxidação relacionada com a deterioração dos alimentos, como por exemplo, em óleos e gorduras, ou também, pode se tratar da perda do valor vitamínico. Ou seja, em frutas, vegetais e bebidas, a medida da atividade antioxidante indica o seu potencial frente à oxidação (ANTOLOVICH et al, 2002).

Segundo Mezdri (2005), um antioxidante pode atuar protegendo os lipídios contra o estresse oxidativo, como também pode antecipar o dano de outras moléculas biológicas. Conseqüentemente, é necessário considerar o objetivo do estudo, além de estabelecer questões o qual servirão de guia na avaliação da eficácia antioxidante, quando se analisa a capacidade antioxidante de uma amostra. Ainda de acordo com Mezdri (2005), não é possível medir a atividade antioxidante real de uma determinada amostra, pois não há um sistema perfeito para isso.

Atualmente a formação de radicais livres é a base da maioria dos métodos de análise da atividade antioxidante *in vitro*. Estes radicais livres podem ser causados pela adição de diversos tipos de compostos cromógenos, como por exemplo, os compostos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) ou DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila) (ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001; ANTOLOVICH et al, 2002), que serão utilizados neste trabalho.

Além dos diversos métodos de avaliação da atividade antioxidante, há também a possibilidade de aplicação de diversos tipos de solventes para a extração de compostos antioxidantes em vegetais, no qual o solvente utilizado e a polaridade do mesmo podem afetar

a transferência de elétron e de átomos de hidrogênio que é o aspecto-chave na extração de polifenóis e conseqüentemente na capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Sendo assim o tipo de solvente utilizado na extração é um fator muito importante a ser considerado.

Como este estudo avalia a atividade antioxidante em matrizes vegetais, que apresentam polifenóis na sua composição e tem caráter polar, este trabalho optou por utilizar solventes de polaridade moderada a alta, sendo eles o etanol (índice de polaridade = 5,2) e a água (índice de polaridade = 9,0), além da mistura etanol-água (50:50 v/v), com índice de polaridade = 7,1 (MARKOM et al, 2007).

2.3.1 Método do Sequestro do Radical DPPH

A molécula de 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) é definida como um radical livre estável, por causa do deslocamento do elétron desemparelhado pela molécula. Como consequência deste deslocamento, a molécula atinge a tonalidade violeta (ALVES et al, 2010).

Este método de análise se fundamenta na medida da capacidade antioxidante de uma substância em conseguir sequestrar o radical DPPH, reduzindo este a uma hidrazina. A hidrazina é atingida quando ocorre a mudança na coloração, a qual passa de violeta para amarelo pálido. Isto ocorre quando uma determinada substância que está agindo como doadora de átomos de hidrogênio é acrescentada a uma solução de DPPH (ALVES et al, 2010).

Atualmente, este método tem sido muito aplicado em diversas amostras como, por exemplo, em frutas, vegetais, plantas medicinais, ervas aromáticas, temperos, cereais, leguminosas, chás, folhas, cogumelos e algas, por ser um método fácil de ser aplicado, além de apresentar uma alta sensibilidade (BOROSKI et al, 2015).

Comercialmente o DPPH se apresenta em forma de um sólido preto e a sua metodologia empregada é altamente utilizada e destacada entre os demais tipos de análises de atividade antioxidante pela inibição do radical. A sua facilidade de aplicação se justifica porque o radical livre pode ser obtido sem preparação prévia, sendo somente necessária a dissolução do composto em metanol ou etanol que acarretará na sua formação (BOROSKI et al, 2015).

A quantidade remanescente do DPPH determina o decaimento e a absorbância que serão encontrados, e variam significativamente com os diferentes tipos e concentrações de antioxidantes. Hoje em dia, o EC_{50} , que tem como objetivo determinar a eficiência antirradical por meio da quantidade de antioxidante necessária para inativar em 50% a concentração inicial do radical DPPH (SANCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURACALIXTO, 1998).

Quando este método é utilizado, alguns fatores devem ser considerados, sendo eles: o pH e o tipo de solvente, a acessibilidade estérica do DPPH, o qual é um fator limitante da reação, e o tempo de reação. Alguns pontos negativos referentes a este ensaio são em relação ao DPPH não ser encontrado em sistemas biológicos, ou seja, é um método não representativo do comportamento *in vivo*. Além do fato de que carotenoides presentes na amostra e a sua turbidez podem interferir significativamente nos resultados (BOROSKI et al, 2015)

2.3.2 Método de Inibição do Radical ABTS

Segundo Arnao (2000), o radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), mais conhecido como $ABTS^{\bullet+}$, pode ser produzido por enzimas como a peroxidase ou quimicamente, com dióxido de manganês, persulfato de potássio ou ABAP (2,2'-azobis- (2-amidinopropano) HCl). Na metodologia desenvolvida por Re et al. (1999) o radical $ABTS^{\bullet+}$, que é gerado por uma reação química com persulfato de potássio, pode atingir a formação de mais de 60% de radicais livres depois de 16 horas de incubação. Os resultados obtidos por esse método para as análises de antioxidantes devem ser equiparados ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), o qual é um antioxidante sintético e hidrossolúvel, similar à vitamina E, e expressos em TEAC (quantidades equivalentes a Trolox) (RICE-EVANS, MILLER e PAPAGANDA, 1996).

O princípio desse método consiste na geração do $ABTS^{\bullet+}$, que tem uma coloração azul esverdeada, por meio da reação com o persulfato de potássio, no qual possui uma absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Quando o antioxidante é adicionado à solução, ocorre a redução do radical $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS, promovendo assim a perda da cor azul esverdeado do meio reacional. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al, 1999).

As vantagens do método $ABTS^{\bullet+}$ são o fato de ser simples e fácil de ser aplicado e o fato de poder ser avaliado em diferentes faixas de pH, o que torna essa metodologia

importante para o conhecimento do efeito do pH em mecanismos oxidantes. Porém, como qualquer outro método, existem as desvantagens. Nesse caso, a limitação do método reside no fato de ele não ser um representante das biomoléculas e nem mesmo ser encontrado em nenhum sistema biológico. Outro ponto de desvantagem é que termodinamicamente, qualquer componente que apresentar um potencial redutor menor que o radical ABTS•+, pode reagir com o mesmo (MAGALHÃES et al, 2008).

2.3.3 Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

O FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) é o método de análise de antioxidante pela determinação do poder de redução do íon ferro. Este método é baseado na capacidade de produção do íon Fe^{2+} (íon ferroso) formado a partir da redução do íon Fe^{3+} (íon férrico), presente no complexo 2,4,6tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie & Strain, 1999). Ou seja, o complexo $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ quando presente a uma substância antioxidante redutora e em um meio ácido, recebe um elétron e reduz-se a $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. Assim que esta redução acontece, há uma mudança na coloração da mistura de reação, apresentando intensa coloração azul e cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

Este teste mede indiretamente a atividade antioxidante total da amostra a ser analisada, e de acordo com os resultados, quanto maior a intensidade da coloração e conseqüentemente da absorbância medida, maior será a capacidade redutora pela formação do complexo ferroso $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. o que significa um elevado potencial antioxidante (BOROSKI et al, 2015).

De acordo com Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), o ensaio FRAP é um método simples e reprodutível, que pode ser utilizado em estudos da atividade antioxidante de plasma ou antioxidantes em extratos e bebidas alimentares. Os autores ressaltam também que além do mais, este método pode ser aplicado ao estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas. Por fim, o FRAP é uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros.

De acordo com Moon e Shibamoto (2009), o único inconveniente deste método é que o sistema de teste deve ser aquoso. Por conseguinte, o antioxidante de referência deve ser um solúvel em água, tal como ácido ascórbico, ácido úrico ou Trolox.

Segundo Frankel & Meyer (2000), a principal desvantagem desta abordagem é que a capacidade de redução medida, não corresponde necessariamente a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, não é fornecida informação sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes. Sendo assim, é importante realizar as análises de atividade antioxidante pelo método FRAP relacionando a outros métodos, constatando assim, a correlação com outras técnicas (BOROSKI et al, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

As folhas da goiaba-serrana, matéria-prima utilizada neste trabalho, foram adquiridas na Estação Experimental da Epagri, na cidade de São Joaquim, Santa Catarina. Todas as folhas deste estudo foram colhidas em Agosto de 2016 e encaminhadas para o Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC.

Assim que chegaram no laboratório, as folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 50°C por um período de 10 horas, até atingirem um peso constante. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas de aço inox (Marconi, Piracicaba) com malha de 20 mesh. O material moído foi armazenado em temperatura de -18°C em embalagens de polietileno.

Os extratos da folha da goiaba-serrana foram obtidos por três diferentes métodos a baixa pressão: 1) Soxhlet (6 horas de extração); 2) Extração Assistida por Ultrassom com uso de sonda, técnica adaptada de Cheok et al. (2013), tempo de extração de 10 minutos e potência de 250 W; 3) Extração Assistida por Ultrassom com uso de banho, a técnica aplicada foi adaptada de Vinatoru (2001), tempo de extração de 30 minutos.

As extrações foram realizadas com três diferentes solventes: água, etanol e uma mistura água-etanol 50-50%.

Figura 1 - Folhas da goiaba-serrana dispostas em bandejas da estufa com circulação forçada.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Método do Sequestro do Radical DPPH

O teste de determinação da atividade antioxidante pelo método 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mensor et al (2001). A técnica consiste na reação do radical livre DPPH 0,03mM com o extrato, em solução etanólica, por 30 minutos.

Os extratos da folha da goiaba-serrana foram diluídos em seus solventes e em seguida as concentrações crescentes (5, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 mg/mL) do extrato, foram adicionada a solução etanólica de DPPH. Para cada concentração foi preparado um branco correspondente. Em seguida, após 30 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, efetuou-se a leitura da absorbância pelo espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, Brasil) a 517 nm.

Os valores medidos da absorbância das concentrações dos extratos foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da Equação 1.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (1)$$

Sendo: A $Abs_{amostra}$ a absorbância da amostra, Abs_{branco} a absorbância do branco da amostra e a $Abs_{controle}$ a absorbância do controle.

Com os resultados obtidos da equação 1, foi possível realizar a curva da atividade antioxidante em função da concentração do extrato da goiaba-serrana, e assim calculado por regressão linear a concentração necessária para a obtenção do EC_{50} , ou seja, 50% da atividade antioxidante. As concentrações utilizadas foram de 5 - 25 mg/mL, pois nesta faixa a curva apresentou um comportamento linear. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.2.2 Método de Inibição do Radical ABTS

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), foi descrita

por RE et al (1999) e adaptada por Nenadis et al (2004). O antioxidante utilizado como referência foi o Trolox, vitamina E sintética; (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA), que foi diluído em etanol e em seguida estocado como solução padrão. O Trolox foi utilizado para a construção da curva analítica do método.

O radical ABTS foi produzido pela reação de 5 mL de ABTS 7 mM (solução mãe) com 88 μ L de solução de persulfato de potássio 140 mM. Esta mistura ficou armazenada no escuro e em refrigeração, por no mínimo 16 horas antes da realização das análises. No dia das análises, a solução do radical ABTS foi diluída em etanol até a absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm.

A solução mãe de extrato foi preparada diluindo 0,005g do extrato em 5 mL do seu solvente de extração, os quais foram: etanol, água e etanol:água [50:50 v/v]. Em seguida, as concentrações de 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL da solução de estoque foram preparadas, e transferiu-se 30 μ L de cada concentração para tubos de ensaio com 3 mL do radical ABTS. Após 6 minutos de reação, realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, Brasil) a 734 nm.

A partir dos resultados das leituras da absorbância, foi possível calcular a curva gerada pelas devidas concentrações realizada e assim, determinar a equação da reta. Com a equação da reta gerada, deve-se substituir o valor da absorbância de 1000 μ mol.L⁻¹ do padrão Trolox e obter o valor para o termo X das abscissas, que equivale à diluição da amostra (mg/L) correspondente a 1 mM de Trolox.

A partir deste resultado, foi realizada a divisão dos mesmos por 1000, a fim de se ter os valores em g. Por fim, o resultado final é calculado pela divisão de 1000 (μ M) pelo valor de X(g), obtendo o valor final, expresso em μ M Trolox/ g de extrato.

3.2.3 Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

A metodologia utilizada para a identificação dos compostos redutores de íons de ferro foi descrita por Benzie e Strain (1993), e com modificações de Arnous et al (2002). Os reagentes utilizados foram: HCl 0,05 mM, ácido cítrico 5 mM, solução de FeCl₃ 3 mM em ácido cítrico (cloreto férrico anidro) e TPTZ (2, 4, 6 – trifidril-s-tiazina): 0,0780 g e m 250 mL HCl 0,05.

A solução mãe de extrato foi preparada pela diluição de 0,01 g do extrato em 1 mL do seu solvente de extração (etanol, água e etanol:água [50:50 v/v]). O preparo do meio reacional foi realizado pela adição de 200 µL da solução de cloreto férrico 3M para os 4 tubos de ensaio, sendo 3 tubos por amostra (triplicatas) e 1 tubo de ensaio para o branco. Em seguida, pipetou-se 200 µL do extrato da amostra a cada tubo, com exceção do branco, no qual se adicionou 200 µL do solvente utilizada na amostra. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado nas amostras e no branco 3,6 mL de TPTZ, seguida pela agitação em vortex e imersão em banho frio por 10 minutos, no fim, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro 620 nm.

Os resultados foram calculados a partir da equação 2.

$$C_{\mu mol/L} = \frac{(Abs - Absb) - A}{B} \quad (2)$$

Onde A e B são os coeficientes da curva padrão, Abs a absorbância da leitura da amostra e Absb a absorbância do branco.

O cálculo da atividade antioxidante foi realizado pela equação 3:

$$C_{\mu mol/g amostra} = \frac{C_{\mu mol/L}}{C_{Solução\ mãe}} \quad (3)$$

Onde:

- $C_{\mu mol/g amostra}$ = concentração equivalente ao Trolox.
- $C_{\mu mol/L}$ = concentração da solução obtida da equação 2.
- $C_{Solução\ mãe}$ = concentração da solução mãe de extrato.

3.2.4 Análise Estatística

Os resultados da atividade antioxidante obtidos para os diferentes tipos de extração a baixa pressão com os determinados solventes foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), com o auxílio do software Assistat (versão 7.7). Caso exista diferença significativa ao nível de 5 % de

significância, pode-se dar continuidade aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos.

Sendo assim, o teste de Tukey foi aplicado para os três métodos de análise de atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos rendimentos obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos da folha da goiaba-serrana são apresentados a seguir para os métodos de captura do radical DPPH, de inibição do radical ABTS e de redução do íon férrico (FRAP). As atividades antioxidantes dos extratos das folhas foram comparadas com o valor da atividade antioxidante do antioxidante sintético BHT. Os valores do BHT para os métodos DPPH e ABTS foram determinados por Cruz (2016).

Tabela 1 - Atividade antioxidante da casca da goiaba-serrana obtida pelo método de captura do radical DPPH, inibição do radical ABTS e redução do íon férrico (FRAP).

Método de extração	Solvente	EC ₅₀ (µg/mL) ^{1,2}	ABTS (µM TEAC/g) ^{1,3}	FRAP (µM/g) ^{1,4}
UB	Etanol	17,0 ± 0,1 ^c	956 ± 43 ^{cd}	276 ± 5 ^{abc}
UB	Etanol-Água	12,9 ± 0,5 ^d	738 ± 30 ^d	285 ± 4 ^a
UB	Água	26 ± 1 ^a	716 ± 25 ^d	264 ± 7 ^{cd}
US	Etanol	15,4 ± 0,1 ^c	1546 ± 135 ^{ab}	278 ± 5 ^{ab}
US	Etanol-Água	12,8 ± 0,6 ^d	1704 ± 121 ^a	280 ± 4 ^{ab}
US	Água	18,2 ± 0,2 ^b	1396 ± 130 ^b	267 ± 2 ^{bcd}
Soxhlet	Etanol	18,0 ± 0,1 ^b	1127 ± 107 ^c	261 ± 4 ^d
Soxhlet	Etanol-Água	12,0 ± 0,6 ^d	1538 ± 116 ^{ab}	285 ± 9 ^a
Soxhlet	Água	12,3 ± 0,1 ^d	1681 ± 23 ^a	269 ± 2 ^{bcd}
BHT		67	5238 ± 236	

¹Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras, no nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$);

²Resultado expresso em EC₅₀ (µg/mL);

³Resultado expresso em µM TEAC/g extrato (µM atividade antioxidante em equivalente Trolox por grama de extrato) (TEAC).

⁴Resultado expresso em µM equivalente ao Trolox/g extrato.

4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

O método da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), foi escolhido para este estudo por ser um método, segundo Ionita (2005), bastante útil em uma série investigações, no qual inclui a determinação das propriedades

antioxidantes de amins, fenóis ou compostos naturais, como as vitaminas, extratos vegetais e medicamentos, além da inibição de reações hemolíticas. Este método, de acordo com Yokozawa et al (1998), é suficientemente sensível para detectar concentrações baixas dos princípios ativos.

A atividade antioxidante das amostras da folha da goiaba-serrana obtidas pelos resultados do método DPPH foram expressos em EC_{50} e estão exibidos na Tabela 1.

O valor de EC_{50} foi calculado na faixa de concentração de 5 a 25 mg/mL, à qual pertence a concentração de 50% de atividade antioxidante (AA), por regressão linear, já que a curva de concentração de extrato ($\mu\text{g/mL}$) versus AA (%) assemelha-se à uma linha reta nessa faixa, como pode ser visto na Figura 2 para a amostra Ultrassom Sonda com solvente etanol.

Figura 2 – Gráfico da concentração do extrato da goiaba-serrana *versus* a atividade antioxidante em porcentagem para a amostra obtida pelo método Extração Assistida por Ultrassom Sonda e solvente etanol.

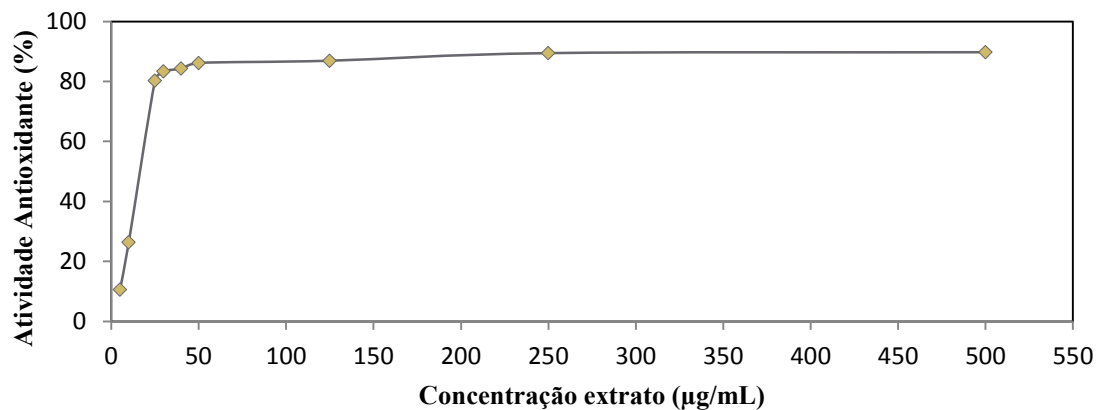
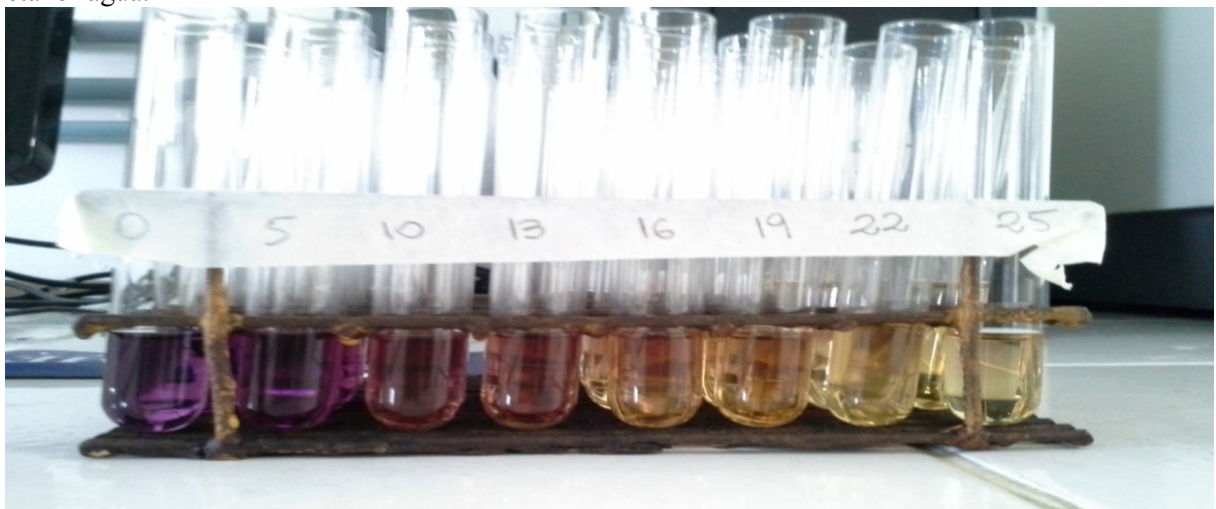


Figura 3 - Imagem da análise da atividade antioxidante pelo método DPPH da amostra da folha da goiaba-serrana obtida pelo método Extração Assistida por Ultrassom com uso de Sonda e solvente etanol-água.



Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Villaño et al (2007), O valor de EC_{50} é inversamente proporcional à capacidade antioxidante de um composto, uma vez que o EC_{50} expressa a quantidade de antioxidantes necessária para diminuir a concentração de radicais em 50%. Ou seja, quanto menor for o valor do EC_{50} , menor a concentração necessária para que se tenha 50% da atividade antioxidante e maior a atividade antioxidante de um composto.

Os valores dos resultados obtidos pelo EC_{50} podem ser considerados: muito ativos (EC_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$), moderadamente ativos (EC_{50} entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), levemente ativos (EC_{50} entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e inativos (EC_{50} maiores que 200 $\mu\text{g/mL}$), segundo Reynertson; Basile; Kennelly (2005). Com isso, pode-se concluir, analisando os resultados da Tabela 1, que os valores de EC_{50} , para os três diferentes métodos de extração e para os três diferentes solventes utilizados, encontram-se dentro da classificação de antioxidantes muito ativos.

Com relação aos extratos obtidos por Soxhlet, quando utilizou-se a mistura etanol-água como solvente, obteve-se o menor valor de EC_{50} , sendo 12,0 $\mu\text{g/mL}$, e para o solvente água, obteve-se 12,3 $\mu\text{g/mL}$, o que para o teste de análise estatística segundo Tukey, indica que não há diferença significativa entre os solventes. O valor obtido pelo solvente etanol, 18,0 $\mu\text{g/mL}$, foi o maior valor de EC_{50} . Sabendo que o índice de polaridade dos solventes utilizados é: etanol 5,2, água 9,0 e etanol-água 7,1, pode-se concluir que, os antioxidantes ativos nesse teste são preferencialmente mais polares, pois tiveram afinidade maior com o solvente etanol-água e água ao etanol.

Dois tipos de Extração Assistida por Ultrassom foram analisados neste trabalho, o Ultrassom Banho e o Ultrassom Sonda. Segundo Luque-García e Castro (2003), apesar do banho ser o aparelho mais utilizado, este apresenta uma desvantagem em relação ao sonda. No banho pode ocorrer a perda de uniformidade na distribuição da energia ultrassônica, onde apenas uma pequena fração do volume total líquido nas imediações da fonte de ultrassom cavita. As sondas, em contrapartida, garantem uma cavitação mais eficiente no líquido, pois apresentam como vantagem a localização da energia na zona da amostra.

Esta vantagem do ultrassom sonda sobre o ultrassom banho foi confirmada neste estudo com os extratos da folha da goiaba-serrana, no qual todos os valores obtidos pelos três diferentes solventes tiveram um EC_{50} menor no ultrassom sonda, ou seja, obtiveram uma maior atividade antioxidante em relação ao ultrassom banho.

De acordo com Luque-García e Castro (2003), quando se compara a extração com ultrassom com a extração com Soxhlet, a extração com ultrassom apresenta certas vantagens como: o aumento da polaridade do sistema devido à cavitação, o que aumenta a eficiência da

extração; a extração de compostos que sofrem degradação nas condições de operação da extração com Soxhlet e o reduzido tempo de operação em relação à mesma técnica de Soxhlet. No entanto, neste estudo, esta afirmação somente foi comprovada quando o solvente utilizado foi o etanol, pois os valores de EC_{50} apresentaram maior valor para o Soxhlet etanol do que US e UB banho. No entanto, para os solventes etanol e etanol-água, o melhor método de extração de acordo com os valores da Tabela 1, é o Soxhlet.

Quando se compara os valores de EC_{50} de cada solvente com as três diferentes extrações é possível verificar pelo teste de análise estatística que não há diferença significativa com o solvente etanol-água com os seus métodos de extração, ou seja os valores de EC_{50} = 12,0 $\mu\text{g/mL}$ para o Soxhlet, EC_{50} = 12,9 $\mu\text{g/mL}$ para o UB e EC_{50} = 12,8 $\mu\text{g/mL}$ US são estatisticamente iguais, além de serem os menores valores obtidos para EC_{50} com relação a todas as amostras analisados. Com isso, pode-se concluir que o melhor solvente utilizado, independentemente do método de extração, foi a mistura etanol-água. O que está em conformidade com Oroian; Escriche (2015), cujo estudo diz que o processo de extração é facilitado quando realizado por uma mistura entre água e solvente orgânico, visto que diversos compostos de interesse são solúveis apenas em um dos solventes.

O valor de EC_{50} para todos os extratos, no qual apresentaram valores abaixo de 26 $\mu\text{g/mL}$, são melhores que o apresentado por Cruz (2016) para o antioxidante sintético BHT (67 $\mu\text{g/mL}$).

Vários pesquisas com métodos de avaliação da atividade antioxidante já foram realizadas com diversas folhas da família da Myrtarceae, uma delas é o de Silva et al (2013) que realizou estudos com o extrato das folhas da goiabeira macerada com etanol 70% e constatou que a planta apresentou atividade antioxidante, com 72,25% de inibição do radical livre DPPH. O estudo concluiu também que a boa atividade pode ser atribuída a presença de compostos polifenólicos como flavonóides e taninos condensados. Enquanto que Donati et al (2009) analisou a atividade antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston pelo método DPPH e constatou que o extrato preparado através de percolação, sendo empregado como solvente etanol a 70%, apresentou EC_{50} de 5,68 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS

Os valores obtidos da atividade antioxidante dos extratos da folha da goiaba-serrana obtidos pelo método de captura do radical ABTS nas extrações à baixa pressão estão expressos na Tabela 1. Os extratos são medidos em termos de poder do sequestro de radicais, expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox.

Observando os valores da Tabela 1, pode-se observar que o maior valor absoluto de atividade antioxidante observado pelo método ABTS foi do extrato obtido pelo método de extração assistida por ultrassom sonda usando o solvente etanol-água (50:50 v/v) no qual o resultado foi de 1704 $\mu\text{M TEAC/g}$. De acordo com o teste Tukey este valor é estatisticamente igual aos resultados apresentados pela Extração com Soxhlet e solvente etanol-água e água e Extração assistida por Ultrassom Sonda e solvente etanol.

Pode-se observar também pelos resultados, que o método de extração ultrassom banho foi o que apresentou menores valores de atividade antioxidante, o que aconteceu também com o resultado da atividade antioxidante pelo método DPPH. O que pode ser explicado novamente por Luque-García e Castro (2003), no qual diz que a extração assistida por ultrassom banho apresenta duas desvantagens com relação a extração assistida por ultrassom sonda, sendo elas: a falta de uniformidade na distribuição de energia de ultrassom (apenas uma pequena fração do volume total de líquido na vizinhança imediata da fonte de ultrassom experimenta cavitação); E, o declínio do potência com o tempo, de modo que a energia fornecida aos banhos seja desperdiçada.

Os resultados dos métodos de extração Soxhlet e Extração assistida por Ultrassom Sonda não apresentaram diferença significativa segundo a análise estatística obtida pelo teste de Tukey entre os extratos de Soxhlet com o solvente água (1681 $\mu\text{M TEAC/g}$), Soxhlet com o solvente etanol-água (1538 $\mu\text{M TEAC/g}$), Extração assistida por Ultrassom Sonda com o solvente etanol (1546 $\mu\text{M TEAC/g}$) e Extração assistida por Ultrassom Sonda com o solvente etanol-água (1704 $\mu\text{M TEAC/g}$). Conclui-se que a alta temperatura no qual os extratos obtidos pelo método Soxhlet são submetidos, não foram estatisticamente significativos quando relacionados a atividade antioxidante pelo método ABTS, ou seja a alta temperatura em que os extratos são submetidos no método Soxhlet não afetou negativamente os resultados da atividade antioxidante.

Não foi possível pelo método ABTS determinar o melhor solvente independente das extrações, pois cada tipo de extração obteve o maior resultado de atividade antioxidante para

um solvente diferente, sendo o melhor solvente para a Extração assistida por Ultrassom Banho o etanol (956 $\mu\text{M TEAC/g}$), para a Extração assistida por Ultrassom Sonda etanol-água (1704 $\mu\text{M TEAC/g}$) e para o Soxhlet a água (1681 $\mu\text{M TEAC/g}$).

Uma das desvantagens do método ABTS, é que segundo Magalhães et al (2008), termodinamicamente, qualquer componente que apresente um potencial redox menor que o radical ABTS pode reagir com o mesmo. Esta desvantagem do método pode ter contribuído para o resultado impreciso deste estudo. Além do fato que o método ABTS considera os compostos tanto lipofílicos quanto hidrofílicos.

No estudo realizado por Souza (2013), foram feitas extrações com 80% de etanol, acidulado com 0,5% (v/v) de HCl concentrado em base seca, de folhas pertencentes a família da Myrtarceae, sendo elas: pitangueira, jabuticabeira, goiabeira e araçazeiro. A maior atividade antioxidante analisada no trabalho foi a da folha de guabiroba (13439,45 $\mu\text{M Trolox/g}$), e no qual foi quase cinco vezes maior do que o menor valor, exibido pela acerola (3040,85 $\mu\text{M Trolox/g}$). Estes resultados não podem ser comparados com os deste estudo pois apresentam métodos de extração e solventes diferentes.

De acordo com a tabela 1, os resultados apresentados pelo método ABTS para os extratos da folha da goiaba-serrana, para todos os extratos, os valores ficaram abaixo do que o apresentado por Cruz (2016) para o antioxidante sintético BHT (5238 $\mu\text{M TEAC/g}$).

4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (FRAP)

De acordo com Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), a eficiência antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas. Observaram também que a utilização de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra a ser analisada. A propriedade de poder de redução indica que o composto antioxidante é um doador de elétrons e pode reduzir os intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica (GÜLÇİN, 2010).

De acordo com a tabela 1, pode-se avaliar que o maior valor de atividade antioxidante pelo método FRAP resultou da extração por Soxhlet com o solvente etanol-água. Com isso podemos novamente concluir que as altas temperaturas aplicadas na metodologia

desse método não prejudicaram a avaliação da atividade antioxidante tanto para o solvente etanol-água quanto para os demais solventes utilizados (etanol e água).

Pode-se observar que o solvente etanol-água foi o que obteve os maiores valores de atividade antioxidante para os três métodos de extração utilizados neste trabalho, sendo eles: Extração assistida por Ultrassom Banho (285 $\mu\text{M Trolox/g}$), Extração assistida por Ultrassom Sonda (280 $\mu\text{M Trolox/g}$) e Soxhlet (285 $\mu\text{M Trolox/g}$). Utilizando a análise estatística, o teste de Tukey mostra que os três diferentes métodos de extração quando utilizado o solvente etanol-água são significativamente iguais.

Os resultados observados pela Extração assistida por Ultrassom Sonda e Ultrassom Banho tiveram o solvente água com o menor resultado, sendo eles 267 $\mu\text{M Trolox/g}$ e 264 $\mu\text{M Trolox/g}$, respectivamente. No entanto o Soxhlet apresentou o menor resultado para o solvente etanol (261 $\mu\text{M Trolox/g}$).

A folha da pitanga, também pertencente à família das Myrtarceae, foi estudada por Schumacher et al (2015), no qual avaliaram a atividade antioxidante pelo método FRAP da extração aquosa e da extração com etanol 60% . Sendo os resultados de $95,0 \pm 5,9 \mu\text{M FeSO}_3/\text{g}$ da amostra com solvente água e $64,2 \pm 1,9 \mu\text{M FeSO}_3/\text{g}$ da amostra com o solvente etanol.

5 CONCLUSÃO

Com este estudo pode-se concluir pelos três diferentes métodos de análise (DPPH, FRAP e ABTS), que a folha da goiaba-serrana apresenta uma alta atividade antioxidante, o que indica uma possibilidade de aplicação na indústria de alimentos.

De acordo com os três métodos de extração, o Soxhlet e US apresentaram resultados semelhantes nas três metodologias de atividade antioxidante, enquanto a UB apresentou o menor resultado principalmente pelo método ABTS. Sendo assim, as melhores técnicas de extração para a folha da goiaba-serrana são o Soxhlet e US.

Quando o objeto de estudo é o solvente utilizado nas extrações, é possível comprovar que o solvente com melhor resultado para os três tipos de extração, tanto na análise da atividade antioxidante pelo método DPPH, quanto pelo método FRAP, é a mistura etanol-água.

Os métodos DPPH e FRAP apresentaram resultados semelhantes, o que se pode concluir que os dois métodos possivelmente foram capazes de quantificar os mesmos compostos. O método ABTS, apresentou bons resultados de atividade antioxidante, e provavelmente quantificou compostos antioxidantes diferentes do método DPPH e FRAP.

Para trabalhos futuros, sugere-se que sejam feitas análises com cromatografia para a determinação dos compostos antioxidantes presentes nos extratos da goiaba-serrana, além de análise antimicrobiana e a avaliação do efeito dos compostos bioativos no organismo humano.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.; **Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos**, Quím. Nova vol.33 no.10 São Paulo 2010.
- AMARANTE, C .V. T.; SANTOS, K. L. **Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*)**. Rev. Bras. Frutic. vol.33 no.1 Jaboticabal Mar. 2011.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. **Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits**. Critical Review. Analyst, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. **Methods for testing antioxidant activity**. The analyst, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. **Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage**. Food Chemistry, v. 74, p. 423-427, 2001.
- ARNAO, M. B. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case**. Trends in Food Science & Technology, v. 11, p. 419-421, 2000.
- BENZIE, I., STRAIN, J **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay**. Analytical Biochemistry 239:70-76. 1996
- BENZIE, I., STRAIN, J. **Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration**. Methods in Enzymology, Academic Press 299: 15-27. 1999.
- BEYHAN, O.; ELMASTAS, M.; GEDIKLI, F. **Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae)**. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(11), pp. 1065-1072, 4 June, 2010.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R.; **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**, 1. ed. – Curitiba, Appris, 2015.
- CRUZ, Pollyanna Nogueira da. **Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*)**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M.. **Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, p. 89-94, 2009.

FRANKEL, E.N. and MEYER, A.S. **The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1925-1941, 2000.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana.** Publicativo UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GORDON, M. H. **The mechanism of antioxidant action in vitro;** Hudson, B. J. F., ed.; Elsevier Applied Science: London, 1990, cap. 1.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). Farmacognosia da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre- Florianópolis: Editora da Universidade, 2001. p.13-40.

GRAHAM, H. D. **Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols.** J. Agric. Food Chem., Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GÜLÇİN, I. **Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 11, p. 210-218, 2010.

HUANG D. J.; OU B.; PRIOR R. L., **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** J Agric Food Chem 2005;53:1841-1856.

IONITA, P. **Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?.** Chemical Papers, v. 59, n. 1, p. 11-16, 2005.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J., **Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*.** Food Chem. 97: 109-114, 2006.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. **Ultrasound: a powerful tool for leaching.** Trends in Analytical Chemistry, v. 22(1), p. 41-7, 2003.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. **Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.** Analytica Chimica Acta, v. 613, n.1, p. 1-19, 2008.

MARKOM, M. et al. **Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods.** Separation na Purification Technology, v. 52, n. 3, p. 487-496, 2007.

MATTOS, J.R. **A goiabeira serrana**. Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis Porto Alegre, 84 p. 1986.

MENDES, B. G.; ARAÚJO, M. E. M. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico de duas espécies vegetais da floresta ombrófila mista**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34, Florianópolis, 2011.

MENSOR, L. L. et al. **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method**. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 2, p. 127–130, mar. 2001.

MEZADRI, T. **Evaluación de la actividad antioxidante de frutos de acerola (Malpighia emarginata DC.) y sus derivados**. Sevilla, 2005. 209 p. Tesis de Doctorado – Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

NENADIS, N. et al. **Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 2004.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. Fillet. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 612p.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes**. *Química Nova*, São Paulo, v.32, n. 3, p.689-702, 2009.

ORDONEZ PEREDA, J. A. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2v. 2005.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. **Antioxidants: Characterization , natural sources , extraction and analysis**. v. 74, p. 10–36, 2015.

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

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. **Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3396-3402. 2000.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay**. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. **Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits**. *Ethnobotany Research & Applications*, v. 3, n. January, p. 025–035, 2005.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAPAGANDA, G. **Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933-956, 1996.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Chichester, v.76, n. 2, p.270-276, 1998.

SANTOS, K. L. dos, **Conhecimento popular e diversidade da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) na Serra Catarinense**. Florianópolis: Epagri, 29p - (Epagri. Boletim Didático, 83), 2009.

SCHUMACHER, N. S.; COLOMEU, T. C.; DE FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V. De C.; CAZARIN, C. B.; PRADO, M. A.; et al. **Identification and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* leaves. characterization of the anti-inflammatory properties of aqueous extract on diabetes expression in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD Mice)** *Antioxidants (Basel)* 2015;4:662–80.

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. Newfoundland: Aocs; 1996. p.1-11.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F., **Introduccion a la toxicologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1996. 203p.

SILVA, I. C. A. ; ALEIXO, A. A. ; FIGUEIREDO, A. P. ; ALEIXO, A. M. ; LEMUCHI, M. O. ; LIMA, L. A. R. S. . **Análise fitoquímica e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira)**. In: IV Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica e I Semana Científica de Biotecnologia, 2013, Divinópolis. BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports. Londrina: Universidade Federal de Londrina, 2013. v. 2. p. 76-78.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n° 3, p. 669-682, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 640p.

SOUZA, W. de. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. **Metodologias analíticas atuais para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais.** In: encontro latino americano de iniciação científica, 11., encontro latino americano de pós graduação, 7., 2007 Vale do Paraíba Anais. 2007.p1963-1967

VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M. S.; MOYA, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; **Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.** Talanta, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

VOLPATO, C. A.; DANAZZOLO, J.; NODARI, R. O. **Melhoramento participativo da goiabeira-serrana: uma parceria que dá frutas /** Florianópolis: UFSC/CCA, 2011.

WESTON, R. J. **Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae):** A review Food Chemistry 121 923–926, 2010.

WICHI H. P. **Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium.** Food Chem. Toxicol. 26: 717-723, 1988.

YOKOZAWA, T., CHEN, C.P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G.I., NISHIOKA, I.,. **Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** Biochem. Pharmacol. 56, 213–222, 1998.