



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SIMONE ROCHA LEONCIO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) E AVALIAÇÃO NA PREVENÇÃO DA  
OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

**LARANJEIRAS DO SUL - PR  
2019**

**SIMONE ROCHA LEONCIO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
PITANGUEIRA (*EUGENIA UNIFLORA L.*) E AVALIAÇÃO NA PREVENÇÃO  
DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção de  
grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos  
da Universidade Federal da Fronteira Sul

Professor Orientador: Dr. Luciano Tormen

**LARANJEIRAS DO SUL - PR**

**2019**

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Leoncio, Simone Rocha

Obtenção e caracterização de extratos das folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora L.*) e avaliação na prevenção da oxidação lipídica. / Simone Rocha Leoncio. -- 2019.

33 f.

Orientador: Professor Doutor Luciano Tormen.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR , 2019.

1. Pitanga, Capacidade antioxidantes, Rancidez oxidativa.. I. Tormen, Luciano, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**SIMONE ROCHA LEONCIO**

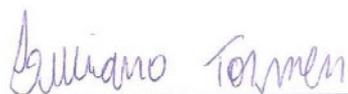
**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) E AVALIAÇÃO NA PREVENÇÃO DA  
OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul-PR.

Orientador: Professor Dr. Luciano Tormen

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 16 / 12 / 2019

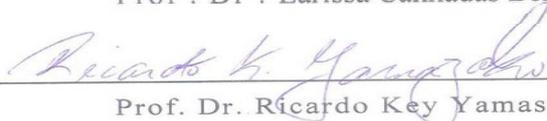
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Luciano Tormen



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Canhadas Bertan



Prof. Dr. Ricardo Key Yamasaki

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me dado força e saúde para superar as dificuldades.

A universidade Federal da Fronteira Sul, pela oportunidade e infraestrutura para desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas também o caráter e afetividade durante o processo de formação profissional.

Ao meu orientador Luciano Tormen pelos ensinamentos, paciência e suporte, no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Aos meus pais, irmãos e amigos que de alguma forma me deram incentivo e apoio durante a graduação.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## **Resumo**

Neste trabalho foram obtidos extratos da folha de pitanga, *Eugenia uniflora L.*, com extrator Soxhlet usando etanol, metanol, acetona e hexano como solventes com o intuito de avaliar qual extrato tem melhor capacidade antioxidante e melhor atuação na prevenção da oxidação do ácido linoleico através do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Todos os extratos foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico, além da identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada com base no método do radical DPPH e através da redução do íon férrico (FRAP). Os resultados mostraram que a natureza do solvente influencia significativamente no rendimento do extrato, demonstrando tendência de aumento no rendimento com aumento da polaridade do solvente, sendo o extrato em metanol com 28% de rendimento, seguido do extrato em etanol com 22%, e o menor rendimento foi obtido em n-hexano com 7%. O teor de compostos fenólicos variou na faixa de 118 - 25 mg AG/g de extrato, sendo o extrato em etanol que obteve o melhor resultado. Ficou evidente por meio da análise por cromatografia a presença diversificada polifenóis como catequina, ácido gálico, epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p cumárico, resveratrol e mirecitina. A capacidade antioxidante dos extratos apresentou alta correlação com o conteúdo de fenóis totais, apresentando variação de acordo com o solvente utilizado, sendo que a capacidade antioxidante dos extratos em etanol, acetona e metanol foi similar a do antioxidante sintético BHT. Os extratos em etanol, metanol e acetona se destacaram na prevenção da oxidação do ácido linoleico mesmo quando aplicados em menor concentração (200 ppm), resultados na mesma ordem de grandeza obtido com o antioxidante artificial BHT na mesma concentração dos extratos. O extrato em n-hexano se destacou apenas na maior concentração, 1000 ppm. Os resultados obtidos mostram o potencial antioxidante das folhas de pitanga na redução da oxidação lipídica sendo mais uma alternativa para indústria de alimentos.

**Palavras chaves:** pitanga, capacidade antioxidante, rancidez oxidativa.

## **Abstract**

In this work extracts of pitanga leaf, *Eugenia uniflora L.*, were obtained in Soxhlet extractor with ethanol, methanol, acetone and n-hexane as solvents in order to evaluate which extract has better antioxidant capacity and better action in the prevention of linoleic acid oxidation through the thiobarbituric acid reactive substances content. All extracts were evaluated for total phenolic compound content by spectrophotometric method, as well as identification and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity of the extracts was determined based on the DPPH radical method and through the ferric ion reduction (FRAP). The results showed significantly influences of solvent nature in the extract yield, showing a tendency of increase with solvent polarity, being the methanol extract with 28% yield, followed by the ethanol extract with 22%, and the lower yield with n-hexane, 7%. The content of phenolic compounds varied in the range of 118 - 25 mg AG / g of extract, the ethanol extract obtained the highest result. Chromatographic analysis revealed the polyphenol presence such as catechin, gallic acid, epicatechin, caffeic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, resveratrol and mirecithin. The antioxidant capacity of the extracts showed a high correlation with the total phenol content, varying according to the solvent used, and the antioxidant capacity of the extracts in ethanol, acetone and methanol was similar to the synthetic antioxidant BHT. The extracts in ethanol, methanol and acetone stood out in preventing the linoleic acid oxidation even when applied at lower concentration (200 ppm), results in the same order as those obtained with the artificial antioxidant BHT at the same concentration of the extracts. The n-hexane extract stood out only at the highest concentration, 1000 ppm. The results show the antioxidant potential of pitanga leaves in the reducer of lipid oxidation being another alternative for the food industry.

**Key words:** pitanga, antioxidant capacity, oxidative rancidity.

## Sumário

1. Introdução .....	9
1.1. Pitanga, <i>Eugenia uniflora L.</i> .....	9
1.2. Oxidação de lipídios .....	10
1.3. Antioxidantes .....	12
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Materiais .....	16
3.1.1. Reagentes e matéria prima .....	16
3.2. Métodos .....	17
3.2.1. Colheita .....	17
3.2.2. Sanitização .....	17
3.2.3. Secagem .....	18
3.2.4. Moagem.....	18
3.2.5. Obtenção de extratos secos de folhas da pitangueira .....	19
3.3. Caracterização do extrato de Folha de pitanga .....	19
3.3.1. Determinação de Fenólicos Totais .....	19
3.3.2. Identificação e quantificação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC.....	20
3.3.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH.....	20
3.3.4. Determinação da capacidade de redução do íon férrico.....	21
3.3.5. Peroxidação lipídica do ácido linoléico - TBARS .....	21
4. Resultados e Discussões .....	22
4.1 Obtenção e caracterização dos extratos .....	22
4.2. Identificação e quantificação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC .....	24
4.3. Capacidade antioxidante pelo sequestro do DPPH e redução do íon férrico.....	26
4.4. Avaliação do potencial antioxidante do extrato de folha da <i>Eugenia Uniflora L.</i> contra a oxidação do ácido linoléico.....	27
5. Conclusões.....	29
6. Referências .....	30

## 1.Introdução

### 1.1. Pitanga, *Eugenia uniflora* L.

A crescente demanda por novos produtos a base de compostos e/ou extratos oriundos de fontes naturais em substituição a corantes, conservantes e outros de origem artificial tem levado as pesquisas científicas a procura por princípios ativos inovadores, conduzindo a indústria buscar por plantas nativas (ALMEIDA et al., 2012). Dentre estas plantas nativas, encontramos a *Eugenia uniflora* L. que vem sendo estudada por ter perspectivas de exploração comercial, devido múltiplos usos para a indústria alimentícia, cosméticos e farmacêutica com aplicação na medicina popular (CORADIN et al., 2011).

A arbórea *Eugenia uniflora* L. é uma espécie conhecida popularmente como pitangueira, pertence ao gênero *Eugenia* e da família Myrtaceae, que possui mais de 500 espécies nativas que crescem naturalmente em regiões subtropicais, das quais cerca de 400 se encontram no Brasil e na América Latina, com altura de 4 a 10 m, de copa estreita, tronco liso, de cor pardo clara (CORADIN, 2011). Seus frutos e folhas, apresentam elevada presença de compostos como flavonóides, taninos, curzerenos, dentre outros, sendo que os taninos e flavonóides são conhecidos como polifenóis, que possuem atividade antioxidante comprovada, são solúveis em água e em solventes orgânicos polares, além de conferirem a adstringência a muitos frutos e plantas (RODRIGUES et al., 2010).

De acordo com Miguez et al., (2018), os frutos maduros da pitangueira contêm alto teor de vitamina C, vitamina A, riboflavina (B12), niacina (B3) e carboidratos (cerca de 38%) sendo os principais a maltose, lactose e frutose. Os frutos imaturos apresentam alto conteúdo de polifenóis, os quais se reduzem com a maturação. No entanto, os carotenóides aumentam com a maturação, evidenciada com o surgimento da coloração laranja-avermelhada (CORADIN, 2011).

Os extratos da folha da *eugenia uniflora* L. tem demonstrado ser eficientes no tratamento de diabetes e obesidade, pois age na inibição da digestão de açúcares e gorduras, reduzindo a absorção gastrointestinal destes nutrientes (ALMEIDA et al., 2012). O extrato hidroalcoólico das folhas exibiu ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Echechiria coli*, *Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicali*, além de ter demonstrado atividade antioxidante (DINIZ, 2013).

De acordo com Ministério da Saúde e Anvisa (2015), os principais constituintes químicos encontrados nas folhas da pitanga foram taninos (eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2), flavonóides e óleo volátil. Estes apresentam atividade antioxidante atribuída principalmente a presença de compostos da família dos polifenóis. Os polifenóis mais comuns são os tocoferóis e flavonóides, relacionados a estes estão as cumarinas, os derivados do ácido cinâmico, as chalconas, os diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos.

Os frutos e folhas da pitangueira podem ser considerados alimentos funcionais por apresentarem substâncias que trazem benefícios à saúde, como a presença dos compostos fenólicos, da vitamina C e entre outros. A grande maioria destes compostos tem efeito antioxidante, atuam como sequestrantes de radicais livres (PESSANHA, 2010). Os óleos essenciais presentes na folha de pitanga se destacam devido aos aromas, sendo empregados na indústria de alimentos como flavorizantes e aromatizantes (SILVA, 2012).

## **1.2. Oxidação de lipídios**

A definição do termo oxidação, é a incorporação de oxigênio em uma estrutura, ou mais precisamente pode ser a conversão para um derivado com menor número de elétrons por meio de uma substância química (agente oxidante) que recebe elétrons, levando a formação de radicais livres como um efeito colateral (ALVES et al., 2010).

Podem ser classificadas como radicais livres as moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos altamente instáveis que contêm uma configuração de um ou mais elétrons desemparelhados nas camadas de valência, sendo assim quimicamente muito reativas e com meia-vida curta. Os radicais livres quimicamente ativos apresentam um número ímpar de elétrons, entre eles o ânion superóxido, o radical hidroxila, os metais de transição, o ácido nítrico e o ozônio (RAMALHO, JORGE, 2006).

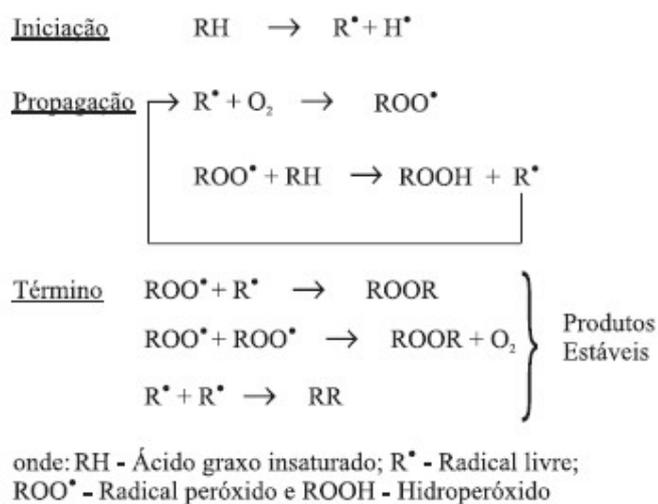
Os lipídios são formados por uma mistura de mono, di e triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. Grande parte destas substâncias é oxidável em diferentes graus, de maneira que as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo são os ácidos graxos insaturados (RAMALHO, JORGE, 2006).

A peroxidação lipídica é a principal causa de deterioração dos ácidos graxos presente em alimentos, é a precursora de desenvolvimento de gosto e aroma desagradável, resultando na depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores (ALVES et al., 2010).

Essas alterações também podem afetar a qualidade nutricional, devido a degradação de vitaminas lipossolúveis e dos ácidos graxos essenciais, além da integridade e segurança dos alimentos, com a formação de compostos poliméricos que são potencialmente tóxicos (RAMALHO, JORGE, 2006).

A oxidação de lipídios insaturados é iniciada a partir da insaturação das cadeias na presença de oxigênio, sendo uma reação de radicais livres em cadeia. A velocidade da oxidação de lipídios está relacionada ao grau de insaturação do ácido graxo, presença de pró e antioxidantes, condições de armazenamento, como temperatura, umidade, oxigênio e luz (REIS, 2013).

A autooxidação dos lipídios está fortemente associada a reação com oxigênio, sendo conhecido como o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (SANTOS, 2009). Este processo segue uma sequência de reações interrelacionadas que se dividem em três fases: iniciação, propagação e término (RAVELLI, 2011), conforme apresentado na Figura 1.



Fonte: Ramalho e Jorge, 2006.

**Figura 1.** Mecanismo oxidação lipídica.

A fase de iniciação ou indução é favorecida por luz e calor. Esta etapa decorre do ataque do oxigênio molecular nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados ocorrendo a retirada de um átomo de hidrogênio, levando a formação de um radical livre (FERRARI, 1998).

O oxigênio pode receber ou doar elétrons o que gera uma desordem eletrônica que converte a molécula de oxigênio em um radical livre de alta reatividade química

(RAMALHO, JORGE, 2006), que adicionar-se ao radical livre ocorre a formação de diferentes tipos de produtos intermediários como, peróxidos, alcóxidos, epóxidos os quais são os produtos primários de oxidação (REIS, 2013).

Na etapa da propagação o processo ocorre de forma auto catalítica, onde os produtos primários possuem propriedades radicalares, quando estabilizados subtraem hidrogênios de ácidos graxos, transformando-os em radicais livres de ácidos graxos. Durante esta fase, a formação de peróxidos adquire velocidade até que todo oxigênio ou ácido graxo insaturado seja consumido. Portanto ao ocorrer a retirada de um hidrogênio de cada molécula de ácido graxo não oxidado pelo radical peróxido, ocorre a formação de produtos como hidroperóxidos, que são decompostos imediatamente após sua formação, em radicais livres. Para o favorecimento das reações na etapa de propagação, é necessário o auxílio de metais catalisadores, especialmente os bivalentes, em estado livre (Fe, Cu, Ni, Co, Cd e Zn) (REIS, 2013).

Na terminação, a estrutura destes radicais depende da composição dos ácidos graxos. A medida que são formados, os radicais livres atuam como propagadores da reação (RAMALHO, JORGE, 2006). Os hidroperóxidos são muito instáveis e se decompõem a partir da cadeia hidrocarbônica, por meio da fragmentação, rearranjo e transferência de átomos, formando produtos secundários de oxidação (alguns potencialmente tóxicos), como aldeídos, peróxidos, cetonas, hidrocarbonetos, alcoóis e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de baixa massa molecular e voláteis, que causam alterações da cor, sabor e consistência, conferindo o aroma de ranço aos alimentos (REIS, 2013).

Os óleos e/ou gorduras nos alimentos são fontes de ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, tem grande importância na alimentação por fornecerem energia, além de contribuírem para o sabor e a maciez dos alimentos (TAKEMOTO et al., 2009).

### **1.3. Antioxidantes**

De acordo com Custódio (2014), antioxidante são substâncias que retardam a velocidade e impedem as reações que causam alteração oxidativa no alimento. Segundo Boroski et al., (2015), o aumento dos estudos para o conhecimento das propriedades de antioxidantes naturais em alimentos vem crescendo em virtude dos benefícios já identificados para a indústria alimentícia e para a saúde dos consumidores.

A atividade antioxidante dos alimentos reduz o risco de certas alterações, inibindo e retardando a ação dos radicais livres, além disso, compostos com atividade antioxidante aumentam a vida útil dos alimentos através da inibição ou retardação da peroxidação lipídica, a qual é uma das principais reações da degradação dos alimentos, mantendo as suas características sensoriais durante o processamento e armazenamento (ORDÓÑEZ, 2005).

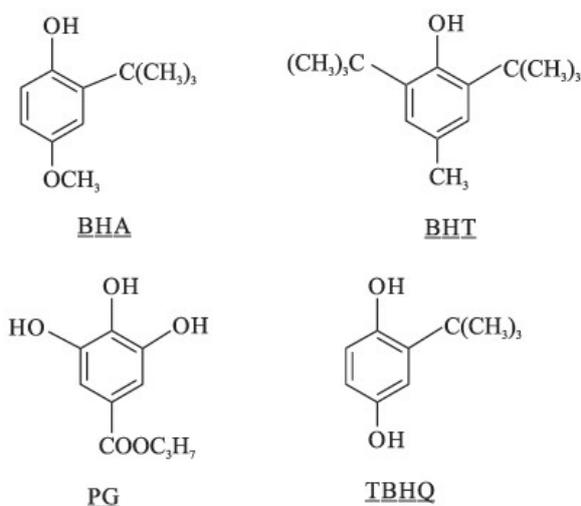
A classificação geral dos antioxidantes se divide em naturais ou sintéticos. Os antioxidantes naturais, são obtidos a partir de fontes naturais, dentre esses apresentam-se as enzimas, vitaminas, compostos fenólicos, lactonas e quinonas. Os antioxidantes sintéticos, são compostos artificiais, sintetizados em laboratório como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila e *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) (RAMALHO, JORGE, 2006). Também podem ser classificados com base em suas funções, podendo ser antioxidantes primários ou secundários. Os antioxidantes primários agem bloqueando a ação dos radicais livres convertendo-os em produtos estáveis, doando hidrogênio ou elétrons (ARAÚJO, 2008). Enquanto que, os secundários atuam por diferentes mecanismos como por exemplo complexação de metais, sequestro de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares, desativação de oxigênio singlete e a absorção da radiação ultravioleta. Além disso, no processo de oxidação de lipídios os antioxidantes também atuam em diferentes níveis, fazendo com que diminua a concentração de oxigênio, e assim, evitando a fase de iniciação da oxidação (OETTERER *et al*, 2006).

Os radicais livres presentes em sistemas biológicos podem vir afetar os lipídios, as lipoproteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, podendo assim acarretar doenças. Enquanto que os radicais livres presentes em alimentos podem interferir nos lipídios, proteínas e vitaminas, resultando em menor qualidade lipídica e proteica, além de menor qualidade nutricional, podendo levar a formação de produtos tóxicos, prejudicar as características sensoriais e diminuir a vida útil do alimento (OETTERER *et al*, 2006).

Atualmente, os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria de alimentos por promover o aumento da vida de prateleira dos produtos (RAMALHO, JORGE, 2006). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o BHA BHT, galato de propila (PG) e TBHQ. Estes são considerados aditivos alimentares por serem utilizados para prevenir ou retardar a oxidação lipídica. A estrutura fenólica destes compostos (Figura 2) concede a doação de um próton a um radical livre,

interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres, e regenerando a molécula do acilglicerol (RAMALHO, JORGE, 2006). Deste modo, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Todavia, estes radicais são capazes de se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2009).

No Brasil, as legislações vigentes permitem a adição, em óleos e gorduras de BHA e TBHQ no limite máximo de 200 mg/kg, BHT, galatos de propila, dodecila e octila no limite de 100 mg/kg e, na margarina um limite de 200 mg/kg de BHA, BHT, TBHQ e galato de propila (TAKEMOTO *et al.*, 2009).



Fonte: Ramalho, Jorge, 2006.

**Figura 2:** Estrutura fenólicas dos antioxidante sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos.

Estas substâncias tiveram seu uso aprovado em alimentos após estudos que comprovaram e habilitaram seu uso dentro de um limite relacionado a ingestão diária (TAKEMOTO *et al.*, 2009). Entretanto, pesquisas toxicológicas têm mostrado indícios de que antioxidantes sintéticos apresentam efeito carcinogênico (RAMALHO, JORGE, 2006). Em virtude disto, a busca por antioxidantes naturais vem crescendo cada vez mais a fim de substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, buscando diminuir a quantidade utilizada nos alimentos (NETO, 2019). Além disso, tem se buscado conhecer mais os antioxidantes naturais devido ao grande interesse nutricional, pois os mesmos estão relacionados à prevenção de doenças (OETTERER *et al.*, 2006).

Os antioxidantes mais frequentemente encontrado nos vegetais, são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Estes

compostos possuem variadas propriedades benéficas, que podem ser atribuídas a sua capacidade antioxidante agindo tanto na fase de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo que os produtos intermediários formados são relativamente estáveis devido a ressonância apresentada pelo anel aromático destas substâncias. Além disso, estas classes de compostos possuem ação quelante de metais, os quais podem promover reações de oxidação ou ainda catalisar tais reações. Os compostos fenólicos mais estudados são o ácido cafeico, o ácido gálico e o ácido elágico tendo sido mostrado que são capazes de inibir o processo de peroxidação lipídica (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2009).

Os flavonóides são pigmentos naturais existente nos vegetais, e não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, visto que devem ser adquiridos através da ingestão de alimentos ou de suplementos nutritivos que os contenham (RODRIGUES et al., 2010). Além disto, atuam em compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos, como antioxidante na inativação dos radicais livres, pois possuem a capacidade de doar átomos de hidrogênio que são capazes de inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Os flavonóides mais pesquisados são a quercitina, a miricetina, a rutenina e a naringenina (FLAMBÓ, 2013). Os fenóis possuem estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples, o que confere o poder antioxidante (ANGELO, 2007).

De todos os compostos com atividade antioxidante estudados, somente alguns podem ser usados em produtos alimentícios. Para que possam ser utilizados, os antioxidantes não podem ser tóxicos, precisam apresentar alta atividade em baixas concentrações (OETTERER *et al*, 2006), não devem causar efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor, ter compatibilidade com alimento, ser de fácil aplicação, possuir estabilidade durante as condições de processamento e armazenamento (RAVELLI, 2011).

As principais alterações que ocorrem em óleos e gorduras são decorrentes de reações químicas que levam à deterioração, de maneira que, os antioxidantes, artificiais ou naturais, em baixas concentrações, podem prevenir e controlar algumas reações de oxidação, eliminando ou diminuindo os radicais livres ou agindo como agentes redutores. Assim, o interesse por antioxidantes naturais tem aumentado entre os consumidores e a comunidade científica, devido a sua ação no alimento evitando a deterioração e para a saúde humana na prevenção de diversas doenças, promovendo melhor qualidade de vida.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar os extratos das folhas da pitangueira e investigar seus efeitos na prevenção da oxidação de ácidos graxos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Obter os extratos da folha de pitanga com extrator Soxhlet usando acetona, etanol, hexano e metanol como solventes.
- Determinar o rendimento de obtenção dos extratos em cada solvente e o teor de compostos fenólicos totais.
- Identificar os fenóis presentes, através da cromatografia líquida de alta eficiência.
- Medir a capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina), e a capacidade redutora do íon férrico.
- Testar a eficiência dos extratos na prevenção da oxidação do ácido linoleico por meio da análise substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Materiais**

#### **3.1.1. Reagentes e matéria prima**

Na realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: Água destilada, hipoclorito de sódio P.A 98%, ácido clorídrico P.A 37%, álcool etílico 99%, carbonato de Sódio P.A/ACS 99,5%, reativo Folin-Ciocalteu 2 mol L<sup>-1</sup>, ácido gálico anidro P.A 98%, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 99%, acetato de sódio trihidratado P.A 99%, acetona P.A, álcool metílico P.A 99,9%, n-Hexano P.A 98,5%, ácido acético glacial P.A 98%, cloreto férrico hexahidratado P.A., TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina), 2,6 Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), Tween 40, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, hidróxido de sódio P.A, trolox 99%, 1,1,3,3-tetraetoxipropano 96%, ácido linoleico 98%, ácido fórmico P.A, metanol 99% grau HPLC, cloreto férrico P.A.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Colheita

As folhas da pitangueira foram colhidas no mês de junho do ano de 2019, de forma manual, em uma propriedade rural do município de Laranjeiras do Sul- PR, da espécie arbórea *Eugenia uniflora L.*. Após a colheita as folhas foram selecionadas e descartadas as que apresentavam defeitos e em seguida foram sanitizadas. A Figura. 3 apresenta a seleção das folhas da pitangueira.



**Figura 3.** Seleção manual das folhas *in natura* da arbórea pitangueira.

Fonte: O autor

### 3.2.2. Sanitização

A higienização e sanitização das folhas da pitangueira foi realizada com solução de hipoclorito de sódio na concentração de  $10 \text{ mL L}^{-1}$ , deixando as folhas imersas por 15 min. Após a imersão em hipoclorito de sódio as folhas foram removidas da solução e imersas em água destilada para o enxágue, realizando-se este processo três vezes consecutivos para a retirada de todo o resíduo de hipoclorito de sódio, sendo posteriormente removido o excesso de água por drenagem. A Figura 4 (A) e (B) apresenta o processo de lavagem e drenagem das folhas respectivamente.



**Figura 4.** Lavagem das folhas de pitanga (A) e drenagem da água residual das folhas (B).

Fonte: O autor

### 3.2.3. Secagem

As folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (Odontobras, modelo AL-102/480) à 60°C até massa constante e posteriormente armazenadas ao abrigo da luz, em sacos plásticos. A Figura 5 mostra as folhas da pitanga durante o processo de secagem (A), e posteriormente as folhas de *Eugenia uniflora L.* desidratadas (B).



**Figura 5.** Folhas durante o processo de secagem (A) e após a secagem (B)

Fonte: O autor

### 3.2.4. Moagem

Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas tipo Willye, até obter um pó uniforme. A granulometria foi padronizada usando peneira de malha mesh 20. Após a moagem as amostras foram armazenadas em vidro âmbar, na temperatura ambiente e estocadas em local escuro. A Figura 6 apresenta as folhas moídas.



**Figura 6.** Folhas de pitanga moídas.

Fonte: O autor.

### **3.2.5. Obtenção de extratos secos de folhas da pitangueira**

O extrato da folha de pitanga foi obtido através do extrator Soxhlet (Marconi, modelo MA-487/8) utilizando como solventes etanol, metanol, n-hexano e acetona. A temperatura do sistema foi ajustada de acordo com a temperatura de ebulição de cada solvente para manter o gotejamento constante dos solventes durante a extração. O tempo de extração foi de aproximadamente 8 horas. Após a extração, o solvente de cada extrato foi removido em evaporador rotativo (Quimis, modelo Q344M1) sob vácuo a 50°C até massa constante.

### **3.3. Caracterização do extrato de folha de pitanga**

#### **3.3.1. Determinação de fenóis totais**

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método *Folin Ciocauteau*. Uma porção de cada extrato foi dissolvida em etanol. Uma alíquota de 0,50 mL da solução do extrato foi transferida para um balão de 25 mL e adicionado sobre o extrato diluído 3,0 mL de água destilada, 4,0 mL de solução de *Folin Ciocauteau* 10% (v/v) e, entre 30 segundos a 8 minutos, foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). O volume foi completado com água destilada, a mistura homogeneizada e protegida da Luz. Os frascos foram mantidos em repouso, na ausência de luz, por 2 h e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 201) em comprimento de onda de 765 nm descontando o valor do branco de cada medida. Uma curva padrão foi realizada com ácido gálico (AG) nas concentrações de 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg de AG/L. Os resultados foram expressos em mg AG / g de extrato. Essa análise foi realizada em triplicata.

### 3.3.2. Identificação e quantificação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Os extratos foram dissolvidos em etanol e filtrados em filtro seringa de PTFE com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise foi realizada injetando no cromatógrafo volumes de 1  $\mu\text{L}$  com fase móvel A 1,2 mL/min mantendo a coluna (C18) de 25 cm de comprimento em 40<sup>o</sup>C. O gradiente da fase móvel (99,9% água, 0,1% de ácido fórmico, fase móvel A; 99,9% metanol, 0,1% ácido fórmico, fase móvel B) para a eluição dos fenóis foi conduzido segundo a tabela 1. A identificação e quantificação foi realizada usando detector por arranjo de diodos, com soluções padrão dos seguintes compostos: ácido gálico, (-) catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido transferúlico, resveratrol, quercetina e mirecitina.

**Tabela 1:** Programa do gradiente de eluição para fase móvel B.

Etapa	Tempo (min)	Concentração fase móvel B (%)
1	0,01	14
2	16	55
3	16,01	100
4	17	100
5	17,01	14
6	20	14

### 3.3.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH

A determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH, foi realizada pela metodologia proposta por Rufino et al (2007). Uma alíquota de cada extrato foi dissolvida em etanol sendo posteriormente preparado mais duas diluições de cada extrato. De cada diluição do extrato foi transferido 0,1 mL para frasco de polipropileno com 3,9 mL de solução estoque do DPPH 60 mmol L<sup>-1</sup> em metanol, sendo que essas soluções (extrato e DPPH) foram preparadas em triplicata. Após o decorrido o tempo necessário para ocorrer a reação do radical DPPH com a amostra foi medida a absorbância de cada mistura em 514 nm. Uma curva de calibração de Trolox foi preparada e medida a absorbância em 514 nm após o mesmo tempo decorrido para a reação do DPPH com os extratos. A capacidade de sequestro do radical DPPH foi expressa como sendo a massa em grama g de extrato/ g de DPPH.

### **3.3.4. Determinação da capacidade de redução do íon férrico**

Para a determinação da capacidade de redução do íon férrico seguiu o método descrito por (Rufino et al., 2006). Uma alíquota de cada extrato foi dissolvida em etanol sendo posteriormente preparado mais duas diluições de cada extrato. De cada diluição do extrato foi transferido 0,1 mL para frasco de polipropileno, 0,2 mL de água destilada e 2,7 mL de solução FRAP (25 mL de tampão acetato 300 mmol/L, pH 3,6, 2,5 mL de solução 2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina (TPTZ) 10 mmol/L em 40 mmol/L de HCl e 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> 20 mmol/L em solução aquosa), essas soluções de extrato e solução FRAP foram preparadas em triplicata. Após o decorrido o tempo necessário para ocorrer a reação foi medida a absorbância de cada mistura em 595 nm. Uma curva de calibração com Trolox foi reparada cuja absorbância também foi medida em 595 nm. O potencial antioxidante foi expresso em equivalente de padrão Trolox (grama) por grama de extrato.

### **3.3.5. Peroxidação lipídica do ácido linoleico - TBARS**

A avaliação da peroxidação lipídica do ácido linoleico foi realizada através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, utilizando a metodologia utilizada por Santos (2009).

Foram preparadas soluções dos extratos da folha da pitanga dissolvidos em etanol nas concentrações de 1000 e 5000 ppm, e do antioxidante artificial BHT com concentração de 1000 ppm em etanol, além de uma solução controle com etanol. Foi transferido para tubo de ensaio de vidro 0,8 mL da emulsão de ácido linoleico (1% de ácido linoleico e 1% de Tween 40 dissolvidos em água destilada) e 0,2 mL da solução de extrato (volume final da mistura de 1 mL), sendo o mesmo realizado para o controle e BHT. Para obter a concentração final de 200 ppm de extrato foi usada a solução estoque de 1000 ppm), para a concentração final de 1000 ppm de extrato foi usada a solução estoque de 5000 ppm). As misturas foram homogeneizadas durante 1 minuto em vortex e incubados em estufa com circulação de ar forçado a 50°C por 24 horas.

Após a incubação foi adicionado aos tubos de ensaio 3 mL da solução reativa de ácido tiobarbitúrico (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e HCl 0,25 mol/L e 0,05% de BHT) e homogeneizado em vortex e incubadas por 30 minutos em banho de água fervente. Após a incubação, a mistura foi resfriada até temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm. Em seguida a absorbância foi medida em 535 nm. Uma curva de calibração com 1,1,3,3-

tetraetoxipropano (TAP) foi preparada e absorvância medida também em 535nm. Os resultados foram expressos em mmol de malonaldeído.

## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Obtenção e caracterização dos extratos

Na Tabela 2 são mostrados os resultados de rendimento, teor de compostos fenólicos totais, todos os resultados (exceção do rendimento) são mostrados como sendo a média ( $n = 3$ )  $\pm$  intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

**Tabela 2:** Rendimento e teor de compostos fenólicos totais, em diferentes extratos de pitanga.

<b>Extrato</b>	<b>Rendimento do extrato e porcentagem(m/m)</b>	<b>Compostos fenólicos totais (mg AG/g de extrato)</b>
<b>Etanol</b>	22	154 $\pm$ 9
<b>Hexano</b>	7	25 $\pm$ 1
<b>Metanol</b>	28	118 $\pm$ 7
<b>Acetona</b>	12	114 $\pm$ 4

Quando se trata de processos industriais o rendimento do material obtido apresenta grande relevância, uma vez que o processo está relacionado a custos e viabilidade econômica. Na análise dos dados da Tabela 2, os solventes que apresentaram maior rendimento na extração foi o metanol com 28% seguido do etanol com 22% e os que os proporcionaram menor rendimento foi a acetona e n-hexano com valores de 12% e 7%, respectivamente. Diferenças de rendimento estão diretamente relacionadas com a polaridades dos solventes e as características químicas da amostra. Os resultados mostram que os compostos presentes nas folhas da *Eugenia uniflora L.*, tem maior afinidade com solventes polares, e conseqüentemente estes solventes permitem obter maior rendimento. Estes resultados podem ser diretamente relacionados com a composição das folhas de pitanga, mostrando que nelas predominam compostos de polaridade intermediária, semelhante a do metanol e etanol, e que compostos de polaridade baixa, semelhantes a acetona são menos abundantes, e os apolares, semelhantes ao n-hexano têm abundância ainda menor.

Diniz (2013) obteve extratos das folhas de pitanga por diversos métodos. Pelo método convencional de extração das folhas da *eugenia uniflora L.* com o etanol e água obteve rendimentos de 18,43 e 27,28% respectivamente. Com extração por leito fixo e sequencial de leito fixo com etanol, obteve um rendimento global 15,9 e 20% e para a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> obteve 5% de rendimento global. No estudo o autor apontou que a tendência do aumento de rendimento com a polaridade do solvente. Portanto, o menor rendimento no estudo de Diniz (2013) foi obtido com a extração supercrítica, que está restrito a extração de substâncias apolares, ou seja, de baixa polaridade e o extrato aquoso foi o que obteve maior rendimento seguido do etanólico. Estas diferenças de rendimento em relação a literatura podem ser explicadas pelo fato da concentração de compostos pode variar consideravelmente, pois depende de fatores como a idade, desenvolvimento da planta, temperatura, altitude, nutrientes, condições de coleta, estocagem, entre outros.

Quanto a presença de fenóis, o extrato que apresentou maior teor foi o obtido em etanol, com  $154 \pm 9$  mg ácido gálico/g de extrato, seguido dos extratos em metanol e acetona que apresentaram valores bem próximos de  $118 \pm 7$  e  $114 \pm 4$  mg ácido gálico/g de extrato respectivamente. No entanto, o extrato em n-hexano apresentou  $25 \pm 1$  mg ácido gálico/g de extrato, sendo o solvente que menos extraiu fenóis das folhas de pitanga.

Comparando os resultados podemos afirmar que nas amostras existem fenóis com estruturas muito variadas, desde os mais polares até os menos polares. Os resultados obtidos evidenciam que a maioria dos compostos fenólicos presentes têm caráter polar, visto isto também no estudo de Diniz (2013). Portanto nota-se que a variação na concentração de fenóis nos extratos está diretamente relacionada com a estrutura dos compostos fenólicos presentes na amostra, que são extraídos de acordo com a afinidade com o solvente.

Oliveira (2016) determinou o teor de compostos fenólicos em extratos de galhos de *E. uniflora* obtidos por extração sólido-líquido assistida por ultrassom utilizando hexano como solvente, obtendo 146,1 mg ácido gálico/g amostra, conteúdo relativamente alto se tratando da fração obtida por um solvente de baixa polaridade, mas em geral, as folhas de pitanga apresentam majoritariamente fenóis de maior polaridade.

Diniz (2013) obteve para os extratos de *E. uniflora L.* o conteúdo de fenóis para o método convencional de 150 mg ácido gálico/g extrato em etanol. Já resultados para leito fixo e o sequencial de leito fixo valores de 160 mg ácido gálico/g extrato e 245

mg ácido gálico/ g extrato que envolvem o solvente etanol. Já usando a extração supercrítica e a extração aquosa de bancada obteve um conteúdo bem menor de fenóis, 32,70 e 105 mg ácido gálico/g extrato respectivamente. Gupta e colaboradores (2009) determinaram o teor de compostos fenólicos em extrato aquoso e metanólico das folhas de pitanga, obtendo 8,75 e 16,80 mg de ácido gálico/g respectivamente.

#### 4.2. Identificação e quantificação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Além da determinação de fenóis totais foi realizada a análise cromatográfica dos extratos com padrões de dez fenóis (catequina, ácido gálico, epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p cumárico, ácido transferúlico, resveratrol, quercetina e mirecitina) a fim identificar quais são principais fenóis presentes nas amostras e sua concentração. Os resultados desta análise são mostrados abaixo, na Tabela 3.

**Tabela 3:** Concentração de fenóis (mg/g de extrato) nos extratos de *E. uniflora*.

	Extratos			
	Metanol	Etanol	N-hexano	Acetona
Ácido gálico	7,9 ± 0,4	12,8 ± 2,7	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
(-) Catequina	< LOD	< LOD	< LOD	1,8 ± 0,1
Epicatequina	4,8 ± 0,3	4,9 ± 0,1	< LOQ	1,5 ± 0,1
Ácido Cafeico	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	< LOD	< LOD
Ácido Vanílico	< LOD	< LOD	< LOD	0,3 ± 0,1
Ácido p-Cumárico	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	< LOD	< LOD
Ácido transferúlico	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Resveratrol	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	< LOD	< LOD
Quercetina	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD
Mirecitina	< LOD	< LOD	< LOD	7,6 ± 0,1

(< LOD) menor que limite de detecção, (< LOQ) menor que o limite de quantificação.

Na tabela 4 são apresentados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) que foram definidos pelos parâmetros das curvas de calibração considerando a diluição das amostras.

**Tabela 4:** Limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) dos compostos fenólicos presente nos extratos.

	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
Ácido gálico	0,01	0,2
(-) Catequina	0,2	0,5
Epicatequina	0,2	0,7
Ácido cafeico	0,08	0,3
Ácido vanílico	0,06	0,2
Ácido p-Cumárico	0,05	0,2
Ácido transferrúlico	0,02	0,08
Resveratrol	0,05	0,2
Quercetina	0,05	0,2
Mirecitina	0,02	0,06

Os resultados mostram que somente a quercetina e ácido transferrúlico não foram detectados em nenhum dos extratos e que o ácido gálico e a epicatequina foram detectados e quantificados na maior parte dos extratos, sendo os fenóis desta lista mais comuns e abundantes na folha de pitanga. Além disso, os resultados cromatográficos mostraram que no extrato obtido com n-hexano se detectou o menor número de fenóis, o que está de acordo com o resultado de fenóis totais, no qual foi obtida a menor concentração. Schumacher (2015) realizou a identificação de compostos antioxidantes em HPLC sendo identificado ácido elágico, ácido gálico e rutina nos extratos das folhas de pitanga, porém os componentes estudados estavam mais concentrados nos extratos em etanol, metanol e acetona quando comparado com o extrato aquoso.

Ministério da saúde e Anvisa (2015), por meio da análise com HPLC e ressonância magnética também quantificou e identificou os compostos presentes na fração butanólica das folhas da *Eugenia uniflora L.* entre estes a quercetina, a miricetina (fenóis majoritários), ácido gálico, açúcares isolados como a arabinose, galactose, e glicose, ou associados aos constituintes como a miricetina-ramnosídeo, quercetina-ramnosídeo, miricetina-hexose-galeto, quercetina-hexose-galto, quercetina-ramnosil-galato.

Outros estudos referentes a extratos das folhas da arbórea, encontraram a presença de compostos mono e triterpenoides como mitocitrina, esteróides, taninos,

antraquinonas, fenóis, cineol, hiperosídeo e a presença de óleo essencial. No extrato metanólico da polpa dos frutos foram identificados vários compostos fenólicos como a miricetina e derivados da quercetina, como a quercitrina, isoquercitrina, além da cianidina, entre outros (MELO et al, 2007), (SANTOS, 2012) e (PROBST, 2012).

A variabilidade das características químicas de *Eugenia uniflora L.* reflete diretamente das influências ambientais a que a planta está exposta. Pois de acordo com análises, os componentes principais presentes na planta mostram a ocorrência de altos teores de taninos hidrolisáveis durante as estações de chuvosas, e de flavonóides em épocas de estação secas. Estes fatos atestam que as mudanças climáticas são capazes de modificar as concentrações de fenóis em pitanga (MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA, 2015).

#### 4.3. Capacidade antioxidante pelo sequestro do DPPH e redução do íon férrico.

Na Tabela 4 são mostrados os resultados para capacidade antioxidante medida pelo método fundamentado no sequestro do radical DPPH e na capacidade de redução do íon ferro (FRAP). Todos os resultados são mostrados como sendo a média ( $n = 3$ )  $\pm$  intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

**Tabela 5:** Capacidade de sequestro do radical DPPH e capacidade de redução do íon férrico em diferentes extratos de pitanga.

Extrato	Capacidade de sequestro radical DPPH (g de extrato/g de DPPH)	Capacidade de redução íon ferro (g de Trolox/ g de extrato)
Etanol	0,61 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,03
Hexano	2,45 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,00
Metanol	0,46 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,04
Acetona	0,73 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,01
BHT	0,31 $\pm$ 0,01*	0,82 $\pm$ 0,05

\* Valores do antioxidante sintético BHT, pelo método do sequestro do radical DPPH, expressos em (g de BHT/g de DPPH).

Os resultados mostram que os extratos com maior conteúdo de compostos fenólicos, apresentaram maior atividade antioxidante, independentemente do método utilizado e que os dois métodos forneceram resultados que se correlacionam. Para o método fundamentado no radical DPPH, quanto menor o valor na Tabela 5, maior é a

capacidade de sequestro deste radical, enquanto que em relação a redução do íon ferro (método FRAP) quando maior o valor na Tabela 5, maior é a capacidade antioxidante.

Os valores da capacidade antioxidante entre os ensaios do radical DPPH e FRAP não apresentaram diferenças significativas entre os solventes com exceção do extrato em n-hexano, o qual apresenta baixa capacidade antioxidante. Essa observação com relação ao n-hexano era esperada visto que este é um solvente apolar e que extrai compostos apolares como terpenos e sesquiterpenos, os quais tem baixa ou nenhuma atividade antioxidante.

Outro aspecto que deve ser destacado é a capacidade antioxidante destes extratos comparado a algum antioxidante artificial. Neste trabalho foi obtido  $0,82 \pm 0,05$ g de Trolox/g de BHT e  $0,31 \pm 0,01$  g de BHT/g de DPPH para a capacidade antioxidante do BHT pelo método FRAP e DPPH respectivamente. Estes resultados mostram que a capacidade antioxidante do BHT é maior do que a dos extratos obtidos, mas está na mesma ordem de grandeza, mostrando que os extratos têm viabilidade como antioxidantes naturais, mesmo que não sejam purificados e sejam uma mistura de diferentes componentes.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com SANTOS (2013), o qual cita que a extração com solventes polares é a técnica mais utilizada para obtenção de extratos com compostos fenólicos e com atividade antioxidante sendo a acetona, metanol, etanol e água são os solventes mais empregados. Em estudo semelhante para sementes de pitanga de várias espécies também evidenciaram atividade antioxidante pelo método FRAP (MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA, 2015).

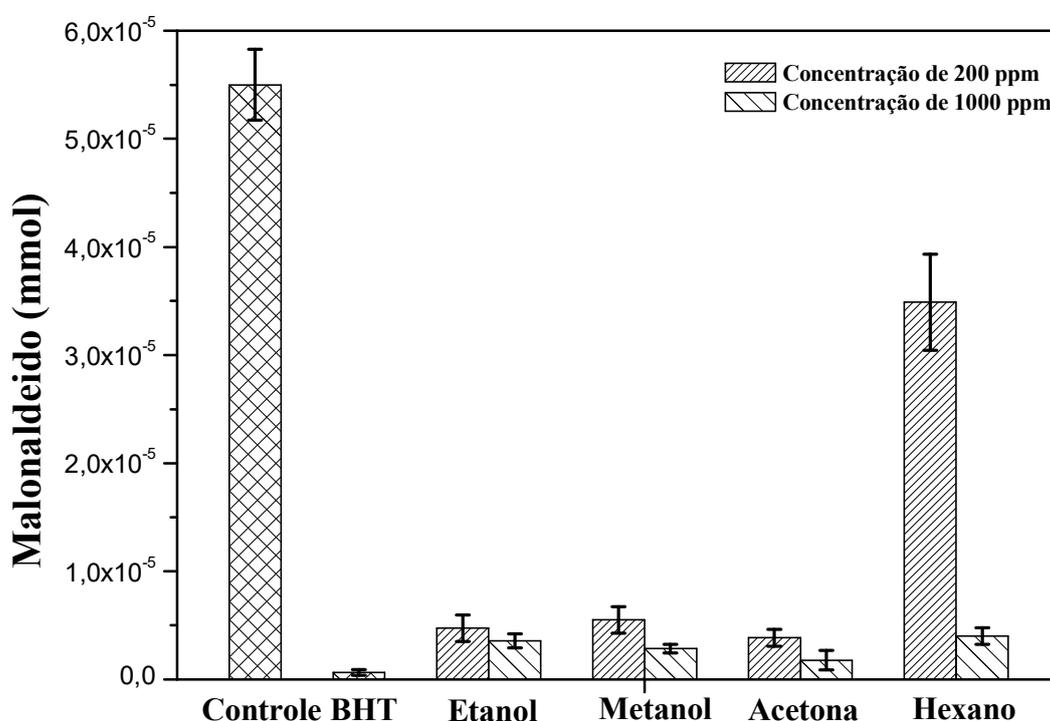
Schumacher (2015) em comparação com extratos aquoso, em etanol, em metanol e acetona, observou que o extrato aquoso apresentou maior capacidade antioxidante seguido dos extratos em metanol e acetona que não tiveram diferença estatística significativa, e com menor capacidade antioxidante o extrato obtido com etanol. Estes dados confirmam o potencial antioxidante dos extratos das folhas de *E. uniflora*.

#### **4.4. Avaliação do potencial antioxidante do extrato de folha da *Eugenia Uniflora L.* contra a oxidação do ácido linoleico**

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico se baseia na quantificação do principal aldeído formado durante a oxidação dos ácidos graxos e outros compostos carbonílicos, o malonaldeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico

formando um composto de coloração rosa, que pode ser determinado espectrofotometricamente (PIRES, 2014).

A fim de avaliar os extratos contra a oxidação de lipídios, foi mensurado a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) geradas a partir de uma quantidade definida de uma emulsão de ácido linoleico com extratos em duas diferentes concentrações (200 e 1000 ppm), sem extrato (controle) e com BHT (200 ppm) a fim de comparação. Na Figura 7 é mostrado como oscilou a quantidade de TBARs (expressa sob a forma de malonaldeído) formada na oxidação do ácido linoleico quando exposto aos extratos, sem extrato (controle) e com BHT.



**Figura 7:** Quantidade de malonaldeído (mmol) formado a partir do ácido linoleico após incubação com diferentes extratos.

Os resultados mostraram que independente da concentração do extrato, todos reduziram a oxidação do ácido linoleico em relação a formulação controle, principalmente os extratos em etanol, acetona e metanol, os quais já mostraram elevado teor de fenóis e alta capacidade antioxidante. Entretanto, o BHT foi que apresentou melhor resultado, ou seja, menor quantidade de malonaldeído formado, o que já era esperado, pois apresentou maior capacidade antioxidante.

Outro aspecto a ser destacado é que para os extratos em metanol, etanol e acetona não houve grande diferença nos resultados quando comparadas as duas concentrações, mas para o extrato obtido com n-hexano houve grande diferença, sendo que na maior concentração formou menor quantidade de malonaldeído (quantidade próxima a dos outros extratos). Os resultados mostram que ocorreu inibição significativa da peroxidação lipídica, demonstrando resultado antioxidante efetivo. Nos casos em que foi aplicada a maior concentração de extratos (1000 ppm) a quantidade de malonaldeído formada é próxima ao obtido na amostra com BHT.

Resultados semelhantes mostram que antioxidantes naturais de uva agem em patê de frango segundo Pereira (2015), extratos de chá verde agem em hambúrgueres Pires (2014) e extratos de erva mate também previnem a oxidação lipídica em hambúrgueres de frango (FERREIRA et al., 2011), a mistura alecrim / chá verde / BHA age positivamente evitando a oxidação de ovo integral pasteurizado seco (CARVALHO, 2017).

Com relação a este trabalho vale destacar que os extratos obtidos, que são misturas de muitas substâncias, possivelmente algumas sem atividade antioxidante, apresentou efeito semelhante ao BHT (usados em concentrações semelhantes) que é uma substância pura, usada intensivamente pela indústria alimentícia como antioxidante. Isso mostra que extratos naturais tem grande potencial para uso em alimentos substituindo ou reduzindo a quantidade de antioxidantes artificiais. Entretanto segundo a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006), somente os antioxidantes sintéticos tem limites para seu uso nos produtos alimentícios, já para os antioxidantes naturais não há uma legislação vigente.

## **5. Conclusão**

Os resultados obtidos para o rendimento e atividade antioxidante e compostos fenólicos nos extratos estão diretamente relacionados entre si e com o solvente utilizado. Os extratos em metanol e etanol, foram os que apresentaram maior atividade antioxidante, sendo que os extratos em metanol, acetona e etanol retardaram de maneira semelhante a oxidação do ácido linoleico independente da concentração. Já o extrato em n-hexano apresentou menor teor de compostos fenólicos, menor capacidade antioxidante e apenas mostrou ser efetivo na prevenção da oxidação do ácido linoleico na maior concentração testada (1000 ppm). De acordo com análises cromatográfica da HPLC, os compostos

fenólicos majoritários presentes nas folhas foram o ácido gálico e a epicatequina. Tendo em vista a preocupação atual com efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos podem causar ao organismo, observa-se que os extratos de folha de pitanga apresentaram resultados relevantes reduzindo grande parte da deterioração oxidativa, além de poder ser utilizado como suplemento alimentar pela indústria de alimentícia e farmacêutica.

## 6. Referências

- ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. **Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas.** *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, 8 (1), 177-193, 2012.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos.** *Química Nova*, 33 (10), 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1), 2007.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática.** 4. ed. Viçosa: Ed: UFV, 2008.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Revista de Nutrição*, 12 (2), 1999.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes – Princípios e métodos analíticos.** Curitiba: Ed. Appris, 2015.
- CALADO, J.C.P.; ALBERTÃO, P. A.; DE OLIVEIRA, E. A.; LETRA, M. H. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; e MARCUCCI, M. C. **Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Fruit, Vegetables and Other Types of Food.** *Agricultural Sciences*, 6, 2015.
- CARVALHO, M. G.; FILHO, A. T. **Aplicação da metodologia de superfície de resposta na otimização da mistura de antioxidantes com efeito sobre a estabilidade lipídica do ovo atomizado.** *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 35 (1), 2017.
- CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul.** Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2011.

CUSTÓDIO, H. N. **Estudo do processo de extração das frações volátil e fixa de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa L.*)**. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2014.

DINIZ, T. T. G. **Obtenção de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora L.*) e de alecrim pimenta (*Lippia sidoides Cham.*) por extração sequencial em leito fixo usando CO<sub>2</sub> supercrítico, etanol e água**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de campinas – Campinas, 2013.

FERRARI C. K. B. **Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas**. Revista de Nutrição. 11 (1), 1998.

FERREIRA, N.J.; MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.B.; WEST, C.; OLIVEIRA, A.L. **Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora L.*): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavor intensity of the fruit**. Food Chemistry, 124, 2011.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

GUPTA, A. D.; PUNDEER, V.; BANDE, G.; DHAR, S.; RANGANATH, I. R.; KUMARI, G. S. **Evaluation of antioxidant activity of four folk antidiabetic medicinal plants of India**. Pharmacologyonline, 1, 2009.

MIGUES, I.; BAENAS, N.; GIRONÉS-VILAPLANA, A. CESIO, M. V.; HEIZEN, H.; MORENO, D. A. **Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of *Eugenia uniflora L.* (Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations**. Foods, 7 (5), 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. **A provou o Regulamento Técnico Mercosul de Atribuição de Aditivos, e seus Limites em Alimentos**. Diário Oficial, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA. **Monografia da espécie *Eugenia uniflora L.* (pitangueira)**, Brasília, 2015.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIN, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. **Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora L.* (Brazilian Pitanga) leaf essential oil**. Journal of Brazilian Chemical Society, 18, 2007.

NETO, B. R. S. **A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde**. Ponta Grossa: Editora Atena, 2019.

OLIVEIRA, T. C. **avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora de extrato de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) visando aplicações cosméticas.** Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos alimentos e processos.** Porto Alegre. Artmed. v. 1. 2005.

PEREIRA, D. **Desenvolvimento de microcápsulas bioativas de coprodutos de suco e vinho da uva visando sua aplicação como antioxidante natural em patê de carne de frango.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

PESSANHA, F. F. ***Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira.** Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 2010.

PIRES, M. A. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2014.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** Química Nova, 29 (4), 2006.

RAVELLI, D **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial.** Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2011.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI T. M.; PEREZ E. **Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR.** Biosaúde, 12 (1), 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica:**

**determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP).** Fortaleza: EMBRAPA. 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** Fortaleza: EMBRAPA. 2007.

SANTOS, R. D.; MIGLIORANZA, L. H. S. **Compostos fenólicos de ervas *Lamiaceae* na estabilidade oxidativa da manteiga e avaliação da toxicidade de extrato de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.).** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

SANTOS, D. N. E. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SANTOS, K. K. A.; ROLÓN, H. M.; VEGA, C. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. **Antileishmanial in vitro activity of *Eugenia uniflora* and *Momordica charantia*. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*.** Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, 34 (1), 2013.

SCHUMACHER, N. S. G. **Caracterização da propriedade antiinflamatória dos componentes do extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora* sobre a expressão do diabetes, no modelo experimental de diabetes espontâneo tipo 1 (camundongos NOD).** Dissertação (mestrado) – Faculdade de ciências Médicas, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SILVA, S. B. **Estudo da extração do óleo de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) vermelha e roxa empregando os solventes CO<sub>2</sub> e n - propano em altas pressões.** Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

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

TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. **validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por clae/uv.** Química Nova, 32 (5), 2009.