



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-BIOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

EIDLA MIKAELLE MACIEL DO NASCIMENTO

**VERIFICAÇÃO DAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTE E DE  
INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -GLICOSIDASE E DETERMINAÇÃO DOS TEORES  
FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DOS FRUTOS DE *Malpighia glabra* L.  
(MALPIGHIACEAE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

CRATO, CE  
2013

EIDLA MIKAELLE MACIEL DO NASCIMENTO

**VERIFICAÇÃO DAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTE E DE  
INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -GLICOSIDASE E DETERMINAÇÃO DOS TEORES  
FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DOS FRUTOS DE *Malpighia glabra* L.  
(MALPIGHIACEAE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do Título de Mestre em Bioprospecção Molecular (Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:  
Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Co-orientador:  
Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Eidla Mikaelle Maciel do Nascimento

Dissertação apresentada em:

Examinadores:

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Orientador)**  
**Departamento de Química-Biológica - URCA**

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Avaliador interno)**  
**Departamento de Química-Biológica - URCA**

---

**Prof. Dr. Jefferson Queiroz Lima (Avaliador externo)**  
**Instituto Federal do Ceará - IFCE**

---

**Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Júnior (Suplente)**  
**Departamento de Química-Biológica - URCA**

*Às pessoas que mais amo...*

*...minha mãe, Maria Gleci...  
...meu pai, Cicero Lobo...  
...meu noivo John Weibert...*

*que sempre acreditaram em mim, me apoiando e incentivando...  
vocês fazem parte da minha vida, e contribuíram de maneira especial para a realização de  
mais essa etapa em minha vida...*

*obrigada pelo apoio incondicional...  
e pela PACIÊNCIA, algo muito necessário para os que estão à minha volta...*

*Amo todos vocês!!!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Apreendi que na vida nada se conquista sozinho. Algumas pessoas nos ajudam ao longo do difícil e complicado caminho das conquistas, já outros dividem conosco a alegria de ter conseguido vencê-las; há também os que estão presentes em todas as etapas, lutando conosco e comemorando as vitórias. A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

Em primeiro lugar, a Deus, luz que guia o meu caminho, sempre me ajudando nas horas difíceis, além de estar presente nos momentos felizes, enfim, presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada meu Deus por ter possibilitado a minha entrada nesse programa de mestrado, pois foi uma experiência muito importante na minha vida, obrigada também por ter me dado a oportunidade de conhecer muitas pessoas, além de estreitar laços com outras com as quais já convivía desde a graduação.

Aos meus pais, Maria Gleci e Cicero Lobo, pelo esforço enorme para que eu tivesse uma formação, e mais do que isso, para que eu continuasse na vida acadêmica. Obrigada mesmo por tudo! Amo vocês!

Ao meu noivo, John Webert, pela compreensão da minha ausência em alguns momentos, e por sempre me incentivar a continuar nesse caminho, sempre reafirmando: “você vai conseguir, calma!”. Muito obrigada, meu amor!

À minha avó, pela força e incentivo aos estudos.

Ao meu avó materno, Francisco Correia, obrigada por todos os ensinamentos. Tenho muita saudade! E aos meus avós paternos, Maria Lobo e Joaquim Januário, que apesar de não tê-los conhecido, tenho certeza que estão muito felizes!

Aos meus tios e tias, obrigada pelo carinho e pelo incentivo.

Aos meus primos, sempre perto, alguns mais distantes. Muito obrigado!

Aos amigos do LPPN: Fábio Galvão, Neyrilane Torquato, Camila Nobre, Erlânio Sousa e Walmir Emanuel, pela paciência, apoio e incentivo sempre, além da grande ajuda no decorrer desse trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos de turma do mestrado: Ronaldo, Laura, Daniele, Sarah, Alisson, Delmacia, Mayara, Damiana, Ana Luiza, Ivna, Simoni e Héverton; obrigado pela convivência, apoio e amizade. Sentirei falta de vocês!

Aos amigos: Carla Karine, Samara Brito, Stefano Barreto, Thiago Almeida. Saudades, espero logo vê-los. Obrigada pelo apoio, carinho. Vocês conseguem me acalmar quando a situação está difícil. Obrigada!

À amiga Helenicy Veras, pelo apoio, incentivo e a certeza de que tudo daria certo, e deu, por isso estamos aqui! Obrigada!

Ao meu Orientador, Prof. Galberto, pela confiança depositada em mim, por acreditar que seria possível a execução desse trabalho, além do apoio e incentivo para continuar no meio acadêmico. Muito obrigado!

A professora Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, pelo apoio e incentivo sempre! Obrigado!

A todos os amigos dos outros laboratórios, em especial, Laura Hévila e Daniele Oliveira, pela amizade, força, incentivo, companhia, consolo, enfim, tudo que precisei nesse tempo todo desde que nos conhecemos. Lembrar que estudamos juntas e que estamos chegando ao fim de mais uma etapa, alívio e desespero!

Ao Laboratório de Fitoquímica da UFSM pelas análises em CLAE, principalmente a Aline Augusti Boligon e a Margareth Linde Athayde por terem realizado as análises. Muito obrigado!

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Irwin Alencar e Prof. Diniz Maciel, e aos membros da banca de defesa: Prof. Irwin Alencar, Prof. Jefferson Queiroz, por terem aceitado o convite para avaliar esse trabalho. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular pelos conhecimentos transmitidos. As aulas foram muito proveitosas.

Aos coordenadores e as secretárias deste programa, Andeciele Rolim e Maria Lenira pela disponibilidade e compromisso com o programa e com os alunos. Obrigado!

Aos funcionários do bloco dos laboratórios, Fernando, Marcos e Seu Luiz, pelo apoio e pelo bom humor sempre!!! Sentirei saudades...

Ao Sr. Celino por ter permitido que a coleta fosse realizada em sua plantação, muito obrigado!

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima coordenado pela Profa. Arlene Pessoa da Silva, pela identificação da espécie em estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

**Cora Coralina**

## Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 Glicosidase.....	18
3.2 Informações botânicas da família Malpighiaceae e Gênero <i>Malpighia</i> .....	18
3.3 <i>Malpighia glabra</i> L. e outras espécies do gênero <i>Malpighia</i> .....	19
3.4 Vitamina C ou ácido ascórbico .....	24
3.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Material vegetal .....	26
4.2 Preparação das amostras .....	27
4.3 Prospecção fitoquímica.....	28
4.4 Quantificação de compostos por CLAE .....	29
4.4.1 Química, aparelhos e procedimentos em geral.....	29
4.4.2 Quantificação de compostos por CLAE.....	29
4.5 Determinação de fenóis totais.....	30
4.6 Determinação de flavonóides totais.....	31
4.7 Determinação da acidez titulável e pH .....	31
4.8 Determinação do teor de vitamina C .....	32

4.8.1 Procedimento para a curva padrão .....	32
4.8.2 Procedimento para a leitura da amostra .....	32
4.8.3 Cálculo do teor de ácido ascórbico .....	33
4.9 Atividade quelante de Fe (II) .....	33
4.10 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	33
4.11 Avaliação do potencial antioxidante por TBARS.....	34
4.11.1 Preparo do fosfolípídeo de ovo .....	34
4.11.2 Ensaio TBARS .....	34
4.12 Avaliação do potencial inibitório frente à enzima <i>α-glicosidase</i> .....	35
4.13 Análises estatísticas .....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 Rendimento das amostras .....	36
5.2 Prospecção fitoquímica.....	36
5.3 Quantificação de compostos por CLAE .....	37
5.4 Teor de fenóis e flavonóides totais .....	40
5.5 Teor de acidez e pH .....	42
5.6 Teor de vitamina C .....	42
5.7 Atividade quelante .....	43
5.8 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	44
5.9 Atividade antioxidante por TBARS.....	46
5.10 Atividade inibitória frente à enzima <i>α-glicosidase</i> .....	48
6. CONCLUSÕES .....	50
REFERÊNCIAS .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da vitamina C (a), tiamina (b), riboflavina (c), niacina (d), $\beta$ -caroteno (e) e quercetina (f).....	21
Figura 2. Local de coleta do material em estudo: Juazeiro do Norte - CE. (Fonte: adaptado de <i>google maps</i> ). .....	26
Figura 3. Coleta e seleção dos frutos de <i>M. glabra</i> L. (a) – Coleta dos frutos; (b) – Imagem da espécie estudada; (c) – Seleção e acondicionamento do material; (d) – Estágio de maturação “intermediário”; (e) – Estágio de maturação “maduro”; (f) – Estágio de maturação “verde”. .....	27
Figura 4. Representação da cromatografia líquida de alta eficiência de compostos fenólicos e flavonóides a partir das frações metanólicas de <i>Malpighia glabra</i> : fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos maduros (a), fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos intermediários (b) e fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos verdes (c). Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), epicatequina (pico 5), rutina (pico 6), quercitrina (pico 7), a quercetina (pico de 8) e campferol (pico de 9). .....	37
Figura 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do perfil de carotenóides em amostras de <i>Malpighia glabra</i> . Maduro (a), intermediário (b) e verde (c). Tocoferol (pico 1) e $\beta$ -caroteno (pico 2), detecção por UV foi em 450 nm. ....	39
Figura 6. Atividade quelante de ferro das polpas de <i>M. glabra</i> L. ....	43
Figura 7. Atividade antioxidante das polpas de <i>M. glabra</i> L. pelo método DPPH. ....	44
Figura 8. Propriedade antioxidante de diferentes frações de <i>M. glabra</i> : (a) Fração MeOH do estágio de maturação maduro; (b) Fração MeOH do estágio de maturação intermediário; (c) Fração MeOH do estágio de maturação verde. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolípídeos de ovo foi determinada na ausência ou na presença de $Fe^{2+}$ (20 $\mu$ M). Os valores são expressos como média $\pm$ DP efetuadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs basal; ** $p < 0,01$ vs basal; *** $p < 0,001$ vs basal; * $p < 0,05$ vs $Fe^{2+}$ induzido; ** $p < 0,01$ vs $Fe^{2+}$ induzido; *** $p < 0,001$ vs $Fe^{2+}$ induzido. ....	47
Figura 9. Percentual de inibição das frações MeOH da polpa liofilizada dos frutos de <i>M. glabra</i> nos três estágios de maturação. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários presentes nas polpas de <i>M. glabra</i> .....	36
Tabela 2. Composição de ácidos fenólicos e flavonóides de <i>Malpighia glabra</i> .....	38
Tabela 3. Composição de carotenóides <i>Malpighia glabra</i> .....	40
Tabela 4. Teores de fenóis e flavonóides totais nas frações MeOH das polpas de <i>M. glabra</i> .	41
Tabela 5. Valores de acidez e pH das polpas de <i>M. glabra</i> nos três estágios de maturação. ...	42
Tabela 6. Teor de vitamina C em frutos de acerola ( <i>M. glabra</i> ) nos três estágios de maturação. .....	43
Tabela 7. Valores de CI <sub>50</sub> para a atividade quelante nos três estágios de maturação.....	44
Tabela 8. Valores da concentração inibitória a 50% (CI <sub>50</sub> ) e a 90% (CI <sub>90</sub> ) para as polpas de <i>M. glabra</i> obtidos por meio da reação com radical livre DPPH.....	45
Tabela 9. Valores de CI <sub>50</sub> das frações MeOH de acerola ( <i>M. glabra</i> ). .....	46
Tabela 10. Valores de CI <sub>50</sub> para a fração metanólica de cada um dos estágios de maturação da acerola ( <i>M. glabra</i> ) e acarbose frente à inibição de $\alpha$ -glicosidase. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>AA</b>	atividade antioxidante
<b>ACN</b>	acetonitrila
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>AG</b>	ácido gálico
<b>AGEs</b>	( <i>Advanced Glycation end-products</i> ) produtos finais da glicação avançada
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentração efetiva capaz de inibir 50%
<b>CE<sub>90</sub></b>	concentração efetiva capaz de inibir 90%
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentração inibitória de 50%
<b>CI<sub>90</sub></b>	concentração inibitória de 90%
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DAD</b>	diodo
<b>DHA</b>	dehidroascorbato
<b>DHAR</b>	dehidroascorbato redutase
<b>DPPH</b>	( <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> ) 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>HIV</b>	( <i>Human immunodeficiency virus</i> ) vírus da imunodeficiência humana
<b>LOD</b>	Limite de detecção
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação
<b>LPPN</b>	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
<b>MDA</b>	malondialdeído
<b>MDHAR</b>	monodehidroascorbato redutase
<b>MeOH</b>	metanol
<b>P.A</b>	Pureza analítica
<b>PNF-G</b>	( <i>p-nitrophenyl-<math>\alpha</math>-D-glucopyranoside</i> ) <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>TBARS</b>	( <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>URCA</b>	Universidade Regional do Cariri
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta visível

## RESUMO

*Malpighia glabra* L., popularmente conhecida por acerola ou cereja peruana, é um arbusto exótico de pequeno porte originário da América Central, mas têm-se difundido para a América do Norte, América do Sul, Ásia e Índia. É indicada no tratamento de enfermidades, tais como influenza (gripe), dengue e suas complicações, além de apresentar diversas propriedades: adstringente, antianêmica, antidiarreica, antiescorbútica, antifúngica, anti-inflamatória, aperiente, cicatrizante, mineralizante, nutritiva e vitaminizante. Apresenta um fruto de polpa suculenta útil na dieta humana por seu alto teor de vitamina C. Nesse trabalho, frutos de *M. glabra* em diferentes estágios de maturação foram analisados quanto a acidez titulável e pH; a partir das frações metanólicas classes de metabólitos secundários foram evidenciadas, além do teor de fenóis e flavonoides, capacidade quelante de ferro (II), atividade antioxidante por DPPH e TBARS, quantificação de compostos por CLAE, e inibição de  $\alpha$ -glicosidase; e, a partir das polpas liofilizadas, foi determinado o teor de vitamina C e a prospecção fitoquímica. Os resultados obtidos mostraram que os valores de pH observados foram menores para a polpa dos frutos verdes e, à medida que as amostras sofreram o processo de amadurecimento, o pH foi aumentando, dados esses inversamente correlacionados a acidez titulável, os quais foram diminuindo à medida que os frutos amadureceram. A prospecção fitoquímica das polpas liofilizadas revelou classes de compostos como taninos, fenóis e flavonoides, sendo que para as duas últimas, a polpa dos frutos verdes mostrou maior teor desses compostos, resultado semelhante ao encontrado para o teor de vitamina C, no qual a polpa dos frutos verdes também apresentou maior quantidade dessa substância. Em relação à atividade quelante, a fração metanólica da polpa dos frutos verdes, apresentou maior atividade (17,85%), seguido dos frutos intermediários (14,87%) e dos frutos maduros (6,91%), assim como no ensaio da atividade antioxidante por DPPH; quanto aos resultados pelo método de TBARS, a fração metanólica dos frutos maduros apresentou menor  $CI_{50}$  quanto ao nível basal, demonstrando o melhor resultado, porém, quanto aos valores obtidos quando utilizando o ferro como indutor da peroxidação, a fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos verdes mostrou a menor  $CI_{50}$ . Em relação à percentagem de inibição do teste que avaliou a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, não houve variação significativa entre as amostras testadas, sendo que a fração metanólica dos frutos maduros mostrou-se ligeiramente superior aos estágios intermediário e verde, apesar de que a menor  $CI_{50}$  foi observada para a fração metanólica dos frutos verdes. Quanto ao resultado da análise de compostos por CLAE, os compostos rutina e quercetina apresentaram picos com as maiores áreas nas três amostras testadas e, com relação aos carotenoides, o  $\beta$ -caroteno se destacou nas análises.

**Palavras-chave:** *Malpighia glabra*,  $\alpha$ -glicosidase, TBARS, DPPH, quelação de ferro.

## ABSTRACT

*Malpighia glabra* L., popularly known as acerola cherry or Peruvian, is a small exotic shrub originally from Central America, but have spread to North America, South America, Asia and India. It is indicated for the treatment of diseases such as influenza (flu), breakbone fever and its complications, and presents several properties: astringent, antianemic, antidiarrheal, antiscorbutic, antifungal, anti-inflammatory, aperiente, healing, mineralizing, nourishing and vitaminizant. It has a very juicy fruit with pulp that is useful in the human diet for its high content of vitamin C. In this work, the fruits of *M. glabra* in different stages of maturation were analyzed for titratable acidity and pH; fractions from methanolic secondary metabolites were found in addition to the content of phenols and flavonoids, chelating capacity of iron (II), antioxidant activity by DPPH and TBARS compounds quantification by HPLC, and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and, as lyophilized pulp was determined the content of vitamin C and phytochemical. The results showed that the pH values observed were lower than for the pulp of the fruits and green, as the samples were subjected to the ripening process, the pH was increased, these data are inversely correlated with acidity, which decreased as the fruits matured. The phytochemical screening of the freeze-dried pulps revealed classes of compounds such as tannins, phenols and flavonoids, and for the last two, the pulp of green fruits showed higher levels of these compounds, a result similar to that found for the content of vitamin C, in which the pulp green fruit also had higher amounts of this substance. Regarding chelating activity, the methanolic fraction of the pulp of green fruits, higher activity (17.85%), followed by intermediate fruits (14.87 %) and mature fruits (6.91 %), as well as the test antioxidant activity by DPPH, as to the results by the method of TBARS, the methanolic fraction of the ripe fruits showed lower IC<sub>50</sub> as the baseline, showing the best result, however, as the values obtained when using the iron as peroxidation inducer, the fraction lyophilized methanolic pulp of green fruits showed the lowest IC<sub>50</sub>. Regarding the percentage inhibition of the test evaluated the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, no significant variation among the strains, and the methanolic fraction of the mature fruit was found to be slightly higher than the intermediate stages and green although the lower IC<sub>50</sub> was observed for the methanolic fraction of green fruit. As the result of analysis of compounds by HPLC, compounds rutin and quercetin showed peaks with the largest areas in the three samples tested and, with respect to carotenoids, the  $\beta$ -carotene is highlighted in the analysis.

**Keywords:** *Malpighia glabra*,  $\alpha$ -glucosidase, TBARS, DPPH, iron chelation.

## 1. INTRODUÇÃO

Frutos e seus produtos derivados têm mostrado um impacto positivo sobre diversas doenças crônicas, incluindo obesidade, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (JURANIC *et al.*, 2005; ZAFRA-STONE, 2007). Esses frutos têm demonstrado conteúdo de micro- e macronutrientes tais como vitaminas, minerais e fibras, no entanto, suas propriedades biológicas têm sido largamente atribuídas aos seus níveis elevados de vários compostos fenólicos, assim como as sinergias interativas entre seus componentes fitoquímicos naturais (SEERAM, 2008; SZAJDEK *et al.*, 2008).

A avaliação da atividade antioxidante tem sido de fundamental importância considerando sua relevância para a saúde humana. Estudos apontam o uso de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco, podendo ser utilizado como coadjuvante no tratamento de diversas doenças (SILVA *et al.*, 2005). Segundo Stohs (1995) e Valavanidis e colaboradores (1995), há evidências que reforçam a importância de estudos referentes às espécies reativas de oxigênio e radicais livres, os quais estão associados a determinadas doenças (“Doenças relacionadas ao estilo de vida”) como cancro, aterosclerose e doença cardíaca coronária, entre outras. Portanto, o consumo de alimentos que tem substâncias capazes de combater esses radicais livres, é considerado importante na prevenção de tais doenças. Por isso, a pesquisa sobre substâncias com potencial antioxidante em alimentos ganhou atenção renovada (KANEYUKI *et al.*, 1999). Segundo Jenkis e colaboradores (2002), o *diabetes mellitus* é caracterizado por hiperglicemia crônica, e está associado a um alto risco de doenças cardiovasculares, podendo aumentar também o risco de complicações micro e macrovasculares.

Os efeitos patológicos dos AGEs estão associados a capacidade de alterar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Diversos estudos sugerem que estas complicações são causadas pela formação de produtos finais da glicação avançada (*Advanced Glycosilation End-Product* – AGEs) (NJOROGE *et al.*, 1988; YAMADA *et al.*, 1994; OYA *et al.*, 1999; THORMALLEY *et al.*, 1999; GOPALKRISHNAPILLAI *et al.*, 2003). Os AGEs promovem, por meio da geração de radicais livres, o estresse oxidativo; e através da formação de ligações cruzadas com proteínas, ou interações com receptores celulares, estes provocam alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. A contribuição dos AGEs para o desenvolvimento e a progressão das complicações diabéticas encontra-se bem evidenciada na literatura (JAKUS *et al.*, 2004; AHMED, 2005; BIERHAUS *et al.*, 1998)

A inibição da captação de glicose no intestino, pode auxiliar pacientes com diabetes a controlar o nível de glicose no sangue, no estado pós-prandial. Assim, substâncias que inibem a amilase e as glicosidase têm sido estudadas, sendo que algumas dessas substâncias têm sido usadas para o desenvolvimento de medicamentos a fim de tratar à *diabetes mellitus* (HARA & HONDA, 1990; KOBAYASHI *et al.*, 2000).

Existem vários relatos indicando que esses compostos, além de prevenir o estresse oxidativo, são também capazes de inibir a  $\alpha$ -amilase e a *sacarase* (HARA & HONDA, 1990; DEGUCHI *et al.*, 1998). Os polifenóis são muito conhecidos devido ao seu potencial antioxidante, portanto, importantes compostos da dieta humana (YANG *et al.*, 2001; HERTOOG, 1996; KNEKT *et al.*, 1997). Segundo Murakami e colaboradores (1995) e Kawagishi e colaboradores (2001), as plantas são geralmente consideradas as melhores fontes naturais de polifenóis e/ou vitamina C. Por estas razões, os polifenóis vêm sendo estudados para atuar na prevenção da hiperglicemia, assim como, na formação dos AGEs (HANAMURA *et al.*, 2005).

Os flavonóides, uma classe de fenóis (ZUANAZZI *et al.*, 2007), representam um grande grupo de compostos fenólicos com papéis fisiológicos na reprodução de plantas e de mecanismos de defesa contra microorganismos e fotooxidação (HUBER *et al.*, 2008). Além de seu papel na fisiologia vegetal, os flavonóides estão associados à promoção da qualidade da saúde como mostram os estudos, que o consumo dessa substância leva a prevenção de problemas cardiovasculares e câncer em humanos (NEUHOUSER *et al.*, 2004; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2011; NAGAPRASHANTHA *et al.*, 2011), além do seu alto potencial antioxidante (HUBER *et al.*, 2008), como inibidores enzimáticos e atividade anti-neoplásica (TAPAS *et al.*, 2008).

A vitamina C ou ácido ascórbico desempenha várias funções no metabolismo humano. Atua favorecendo o aumento da resistência orgânica, estimula o crescimento, interfere no metabolismo do ferro, da glicose e de outros glicídios, além de ser importante na saúde das gengivas e dentes (TOCCHINI *et al.*, 1984). O consumo de itens que contêm alto teor de vitamina C é particularmente indicado para indivíduos gestantes e lactantes, crianças, adolescentes e portadores de processos infecciosos como gripes, inflamações e sangramento das gengivas (BRAVERMAN, 1967; TOCCHINI *et al.*, 1984). O consumo da acerola é indicado também para doenças hepáticas e vesícula biliar (GONZAGA *et al.*, 1996).

*Malpighia glabra* (Malpighiaceae), popularmente conhecida como acerola, é uma fruta encontrada da América Central até o norte da América do Sul (CAMPELO *et al.*, 1998).

Passou a ser uma boa opção na dieta alimentar de pessoas com hábitos saudáveis, uma vez que ficou comprovado que seu suco contém de 40 a 80 vezes mais vitamina C do que o suco de limão ou laranja, fontes tradicionais desta vitamina (BRAVERMAN, 1967). No entanto, poucos estudos têm sido publicados sobre o conteúdo fitoquímico e alterações químicas durante a maturação da acerola (NOGUEIRA *et al.*, 2002; HANAMURA *et al.*, 2008; MEZADRI *et al.*, 2008).

Portanto, frente aos dados apresentados, este trabalho tem como objetivo determinar alguns padrões físico-químicos como acidez titulável, pH; determinar teor de fenóis, flavonóides e vitamina C; verificar o potencial quelante de Fe (II); avaliar a atividade antioxidante por DPPH e TBARS, assim como o potencial inibitório frente à enzima *glicosidase*; e quantificar compostos por CLAE.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar as capacidades antioxidantes e inibição de  $\alpha$ -*glicosidase* e determinar teor de fenóis, flavonoides, carotenoides e vitamina C dos frutos de *Malpighia glabra* L., pertencente à família Malpighiaceae em três estágios de maturação.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter a fração metanólica das polpas;
- Realizar prospecção fitoquímica das polpas liofilizadas dos três estágios de maturação;
- Verificar a atividade antioxidante da fração metanólica de cada estágio de maturação, pelo método de sequestro de radical livre DPPH e TBARS dos frutos em diferentes estágios;
- Quantificar fenóis totais e flavonoides nas frações metanólicas em cada uma das amostras de *M. glabra*;
- Determinar o teor de vitamina C nas polpas liofilizadas de *M. glabra*;
- Verificar o possível potencial quelante com Fe (II) das três frações obtidas;
- Determinar o pH e a acidez titulável dos frutos *in natura*;
- Avaliar o potencial inibitório da fração metanólica dos três estágios de maturação frente à enzima *glicosidase*;
- Quantificar ácidos fenólicos e carotenóides por CLAE.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Glicosidase

As glicosidases são enzimas envolvidas numa variedade de processos bioquímicos com importância especial para a biotecnologia, indústria de alimentos, e farmacologia (COMPAIN *et al.*, 2007; LEGLER, 1990; ERICKSON *et al.*, 1973). Essas enzimas são vitais para os sistemas vivos e estão envolvidas em processos biológicos diversos, incluindo distúrbios, doenças metabólicas (DAVIES *et al.*, 2005; ZECHEL *et al.*, 2000; DAVIES *et al.*, 1995; McCARTER *et al.*, 1994), reconhecimento célula-célula ou célula-vírus, respostas imunológicas, crescimento celular, e infecções virais e parasitárias (DWEK, 1996; ASANO, 2003).

A busca por inibidores de *glicosidase*, fortes e seletivos, é objeto de intensa pesquisa de muitos grupos sintéticos e naturais envolvidos em um número crescente de patologias que requerem estruturas inovadoras capazes de inibir seletivamente e fortemente estas enzimas terapêuticamente relevantes. As estruturas promissoras mais estudadas até agora são os iminoaçúcares, dois análogos de açúcar no qual um átomo de nitrogênio está substituindo o oxigênio endocíclico. Essas moléculas são capazes de modular funções celulares, e resultados promissores já foram obtidos (DESCHAMP *et al.*, 2012).

A inibição controlada de glicosidase apresenta-se potencialmente importante para o tratamento de muitas doenças, tais como diabetes, infecções virais, como HIV, câncer, cancro, certas formas de hiperlipoproteinemia e obesidade (VARKI *et al.*, 1999; ASANO *et al.*, 2000; HERSCOVICS, 1999; KAMEDA *et al.*, 1984; ROBINSON *et al.*, 1991; FUJISAWA *et al.*, 2005; PILI *et al.*, 1995; HUMPHRIES *et al.*, 1986; SHIMIZU *et al.*, 1990; SOU *et al.*, 2001).

Existem vários inibidores de glicosidase que ocorrem naturalmente, tais como a acarbose (DWEK, 1996), swainsonina (ASANO, 2003), e 1-desoxinojirimicina (VARKI *et al.*, 1999), dos quais a acarbose foi utilizada para o tratamento oral de diabetes tipo II (DONG *et al.*, 1996; HOLMAN *et al.*, 1999; JACOB, 1995; PISTIA-BRUEGGEMAN *et al.*, 2001; SCHMIDT *et al.*, 1977).

#### 3.2 Informações botânicas da família Malpighiaceae e Gênero *Malpighia*

A família Malpighiaceae está representada por 75 gêneros e 1.300 espécies, com distribuição tropical e subtropical (SOUZA & LORENZI, 2008). O gênero *Malpighia* inclui

30 espécies de arbustos e pequenas árvores, que fornecem flores e frutos em diferentes estágios e tem longos períodos de frutificação durante todo o ano (SPEIRS & BRADY, 1991).

Cerca de 80% dos gêneros e 90% das espécies ocorre na região que abrange o Caribe, sul dos Estados Unidos, até a Argentina (ANDERSON & ANDERSON, 2010).

No Brasil, ocorrem 38 gêneros e aproximadamente 300 espécies. A família é facilmente reconhecida devido à presença de nectários extraflorais distribuídos aos pares nas bases das sépalas, na maioria das espécies (SOUZA & LORENZI, 2008). Além disso, apresenta grande potencial econômico, como fonte de produtos alimentícios, ornamentais, medicinais, madeireiros, além de outros (RIBEIRO *et al.*, 1999).

### **3.3 *Malpighia glabra* L. e outras espécies do gênero *Malpighia***

*Malpighia glabra* L., popularmente conhecida por acerola ou cereja peruana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), é um arbusto exótico com até 3 metros de altura (ALMEIDA *et al.*, 2010). É originária da América Central, mas, devido à sua boa adaptação ao solo e clima, têm-se difundido para a América do Norte, América do Sul e, recentemente, introduzida em áreas subtropicais de todo o mundo, incluindo Ásia e Índia (ASSIS *et al.*, 2008; VENDRAMINI *et al.*, 2000; ASENJO, 1980). É indicada popularmente no tratamento de várias enfermidades, tais como influenza (gripe) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007a), dengue e suas complicações (CARTAXO *et al.*, 2010); e diversas propriedades: adstringente, antifúngico e antianêmico, bem como sua capacidade nutricional e teor de vitaminas (NUNES *et al.*, 2011).

Os frutos amadurecem de *M. glabra* rapidamente após a colheita (VENDRAMINI *et al.*, 2000), e quando maduros, apresentam polpa muito suculenta (GOMEZ *et al.*, 1999; JOHNSON, 2003) que, além de ser muito apreciada, também é útil na dieta humana (ASSIS *et al.*, 2008) por seu alto teor de vitamina C (Figura 1a): uma porção de 100 g da fruta fresca fornece 28,76% de vitamina A e 2,033% da dose diária recomendada de vitamina C necessária para um adulto (NUNES *et al.*, 2011); uma vez que o teor dessa vitamina nesse fruto excede de 30 a 100 vezes a vitamina C presentes em laranjas (MEZADRI *et al.*, 2008; DEMBITSKY *et al.*, 2011). Além disso, apresentam valores significativos de tiamina (Figura 1b), riboflavina (Figura 1c), niacina (Figura 1d), além de proteínas, e sais minerais, principalmente ferro, cálcio e fósforo (MEZQUITA *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm avaliado o teor de carotenóides e bioflavonóides devido à sua propriedade antioxidante (MEZQUITA *et al.*, 2000). Entre os carotenóides identificados, o  $\beta$ -

caroteno (Figura 1e) apresenta-se em maior teor (40-60% do total de carotenóides). Em relação aos flavonóides, os principais componentes deste fruto são antocianinas (LIMA *et al.*, 2003) e flavonóis. No trabalho desenvolvido por Hanamura e colaboradores (2005), foram identificadas duas antocianinas (cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo) e um flavonóide (quercetrina) a partir de *M. emarginata* DC. (Figura 1f). Efeitos inibitórios frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase foram observados para os três compostos, porém não-potentes, exceto para quercetrina que apresentou 60% de inibição.

Atualmente, a acerola pode ser considerada uma fruta tropical de grande valor econômico e nutricional, visto que pode ser utilizado para preparar os mais diversos produtos tais como gelatina, sucos, bebidas suaves, néctar, iogurtes, refrigerantes, doces, e podem ser congelados sem perder o teor de vitamina C, entre vários outros produtos (BICAS *et al.*, 2011). Além da vitamina C, a acerola contém outros componentes funcionais benéficos à saúde humana, tais como os fenóis (HANAMURA *et al.*, 2005). Possui ainda grande potencial na indústria alimentícia como fonte de vitamina C e fenóis, podendo ser usada como suplemento nutricional ou como aditivo para aumentar o valor nutricional de outros produtos (NOGUEIRA *et al.*, 2002; HANAMURA *et al.*, 2008).

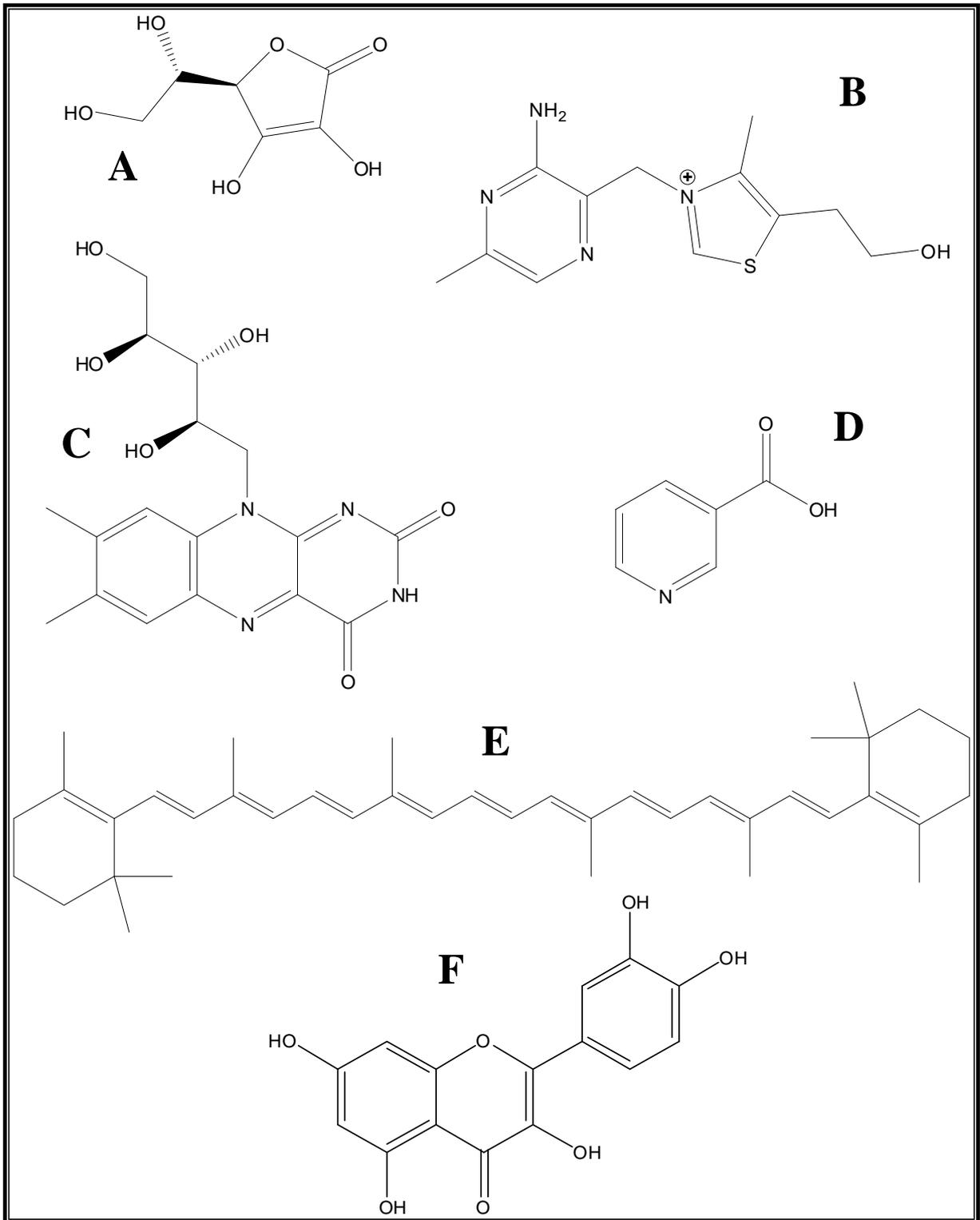


Figura 1. Estruturas químicas da vitamina C (a), tiamina (b), riboflavina (c), niacina (d),  $\beta$ -caroteno (e) e quercetina (f).

De acordo com Uchida e colaboradores (2011), a vitamina C proveniente da acerola (*M. emarginata*) foi mais bem absorvida no plasma após a ingestão do suco se comparado ao ácido ascórbico comercializado, assim como foi observado uma menor eliminação de vitamina C, proveniente da acerola, na urina quando comparado ao ácido ascórbico comercializado. Dados semelhantes foram observados por Vinson & Bose (1988).

O Brasil é o maior produtor mundial de acerola e concorre principalmente no setor de mercado de produtos naturais, disputando a preferência dos consumidores (MEZADRI *et al.*, 2006), pois a vitamina C produzida por esta fruta é mais bem absorvida do que o ácido ascórbico sintetizado por muitos animais, exceto os seres humanos e outros seres (ARAÚJO *et al.*, 1994; NISHIKIMI *et al.*, 1988).

A composição química da acerola varia entre cultivares com as condições ambientais e com a fase de maturação da fruta (VENDRAMINI *et al.*, 2000; KAWAGUCHI *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2012). Alguns autores verificaram os constituintes voláteis desse fruto (SCHIPPA *et al.*, 1993; PINO *et al.*, 2001), no entanto, outro grupo de pesquisadores relacionou o efeito dos três diferentes estágios de maturação sobre a composição química de outra variedade de acerola (*M. puniceifolia* L.) e os resultados obtidos foram um número crescente de compostos observados e identificados, à medida que o fruto sofre o processo de maturação (VENDRAMINI *et al.*, 2000).

Resíduos de frutas também apresentaram resultados eficazes referentes a algumas atividades biológicas, como no trabalho descrito por Correia e colaboradores (2012). Nesse trabalho, os resíduos (sementes, cascas e polpas residuais) da acerola (*M. emarginata* DC.), jambolão (*Syzygium cumin*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e cajá-umbú (*Spondias* sp.), foram avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* e inibição de  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase. Dentre as espécies estudadas nesse trabalho, a acerola (*M. emarginata* DC.) mostrou maior teor de fenóis e ácido ascórbico, seguido por jambolão e pitanga. Em relação à inibição enzimática, todas as espécies estudadas apresentaram inibição frente às enzimas estudadas, sendo o melhor resultado para a acerola frente à  $\alpha$ -glicosidase. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.

De acordo com Kawaguchi e colaboradores (2007), a aceronidina, um flavonóide isolado dos frutos verdes da acerola (*M. emarginata* DC.) apresentou atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, inibição de  $\alpha$ -amilase e mostrou o melhor resultado quanto à inibição de  $\alpha$ -glicosidase quando comparado a outros flavonóides testados: taxifolia, catequina, isoquercetina e quercetina.

No trabalho desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2012), frutos de acerola (*M. emarginata* DC.) em quatro estágios de maturação foram processados para obtenção da polpa, e congeladas a -20°C por 30 dias. As polpas apresentaram valores significativamente elevados quanto ao teor de vitamina C, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Trabalho semelhante foi realizado por Singh e colaboradores (2012), no qual o extrato metanólico de *M. glabra* apresentou a maior atividade antioxidante com 98,77%, e mostrou, ainda, um elevado teor de fenóis e ácido ascórbico.

Uma série de estudos tem sido realizada a fim de investigar o teor de compostos fenólicos e carotenóides presentes em frutos (PRIOR *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999), mas apesar do grande potencial comercial da acerola, poucos relatos têm sido publicados sobre o conteúdo fitoquímico e alterações químicas durante a maturação dos frutos (LIMA *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Nunes e colaboradores (2011), foram verificadas a capacidade antígeno-tóxica e atividade antioxidante da acerola (*M. glabra* L.) em dois estágios de maturação (verde e maduro). O estágio verde apresentou melhor atividade antioxidante (método DPPH) que os frutos maduros, assim como o nível de vitamina C. O estágio verde também mostrou o maior potencial de proteção ao DNA, protegendo-o contra o estresse oxidativo, porém nenhum dos estágios de maturação impediu o crescimento de um tumor no teste de citotoxicidade.

Os benefícios da acerola à saúde estão associados com sua capacidade antioxidante e os níveis elevados de ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis. A capacidade antioxidante é principalmente devido ao seu teor em vitamina C e seu conteúdo de polifenóis (RIGHETTO *et al.*, 2005; MEZADRI *et al.*, 2008).

Foi demonstrado por Hanamura e colaboradores (2008), que um extrato bruto de polifenóis de acerola foi capaz de clarear manchas oriundas da irradiação de luz ultravioleta sobre a pigmentação da pele, *in vivo*, e o efeito foi parcialmente atribuído à inibição da melanogênese por meio da inibição da atividade da tirosina em melanócitos. Além disso, uma fração polifenólica bruta de acerola teve um efeito preventivo contra a hiperglicemia no estado pós-prandial, e o mecanismo deste efeito pode envolver a supressão do transporte intestinal da glicose e a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. No entanto, os efeitos terapêuticos desta fração de acerola em ratos hiperglicêmicos se mostraram insignificantes (HANAMURA *et al.*, 2006). A atividade anti-inflamatória também foi observada em acerola por Kawaguchi e colaboradores (2007).

Os efeitos tóxicos do extrato rico em polifenóis da acerola foram avaliados em ratos através de ensaios toxicológicos orais, e estes mostraram que não houve nenhuma diferença significativa associada à administração oral do extrato (HANAMURA *et al.*, 2008).

Extratos de frutas mostraram capacidade de inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos de ratos devido à inibição da expressão induzível da síntese do óxido nítrico e de eliminação de radicais (WAKABAYASHI *et al.*, 2003). Além disso, o pré-tratamento com extrato de acerola inibiu a iniciação de carcinogênese no pulmão de camundongos, mostrando atividade citotóxica específica a tumor (NAGAMINE *et al.*, 2002), sugerindo sua possível aplicação para a terapia do câncer. Ainda, a acerola também apresenta propriedade antifúngica (CACERES, 1993).

De acordo com Liu e colaboradores (2013), foi demonstrada a inibição da enzima acetilcolinesterase a partir de três compostos isolados de *M. emarginata*, mostrando um efeito inibidor com  $CI_{50}$  variando entre 10,3 e 28,7  $\mu$ M.

### **3.4 Vitamina C ou ácido ascórbico**

O ácido ascórbico é de fundamental importância para a saúde humana (WEBER *et al.*, 1996) e tem inúmeras funções metabólicas que, são em grande parte, dependente de sua propriedade redutora potente (LINSTER *et al.*, 2007). Além disso, atua como co-fator em reações catalisadas por várias oxigenases dependentes de metais. Sua depleção no organismo provoca escorbuto com pele seca, fadiga e sangramento (UCHIDA *et al.*, 2011).

A vitamina C é a principal proteção antioxidante contra o dano oxidativo celular (OLIVEIRA *et al.*, 2012), devido a sua capacidade de sequestrar radicais superóxido em reações intra- e extracelulares (LEVINE *et al.*, 1999).

Muitos animais podem sintetizar o ácido ascórbico *in vivo*, no entanto, outros, tais como os seres humanos e outros seres, perderam a capacidade de produzir ácido ascórbico devido a uma mutação em um gene da lactose oxidase, essencial para a síntese do ácido ascórbico (NISHIKIMI *et al.*, 1988). Consequentemente, os animais que não podem sintetizar o ácido ascórbico devem adquiri-lo através da dieta alimentar (UCHIDA *et al.*, 2011).

Nas plantas, o ácido ascórbico desempenha um papel importante na resposta ao estresse, bem como no crescimento e desenvolvimento e é um dos metabólitos altamente abundantes que limpam as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante os processos fisiológicos (CONKLIN, 2001).

O ácido ascórbico também está envolvido nos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos ambientais e danos oxidativos, e tem sido implicado na regulação da divisão celular e de expansão (SMIRNOFF, 1996; KATO & ESAKA, 2000).

O ácido ascórbico é oxidado a monodehidroascorbato, que se dissocia para formar dehidroascorbato (DHA), que é estável a um pH alcalino. Monodehidroascorbato redutase (MDHAR; EC 1.6.5.4) e dehidroascorbato redutase (DHAR; EC 1.8.5.1) são enzimas conhecidas por desempenhar um papel protetor em plantas mantendo ascorbato em sua forma reduzida (ELTAYEB *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2008).

### **3.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)**

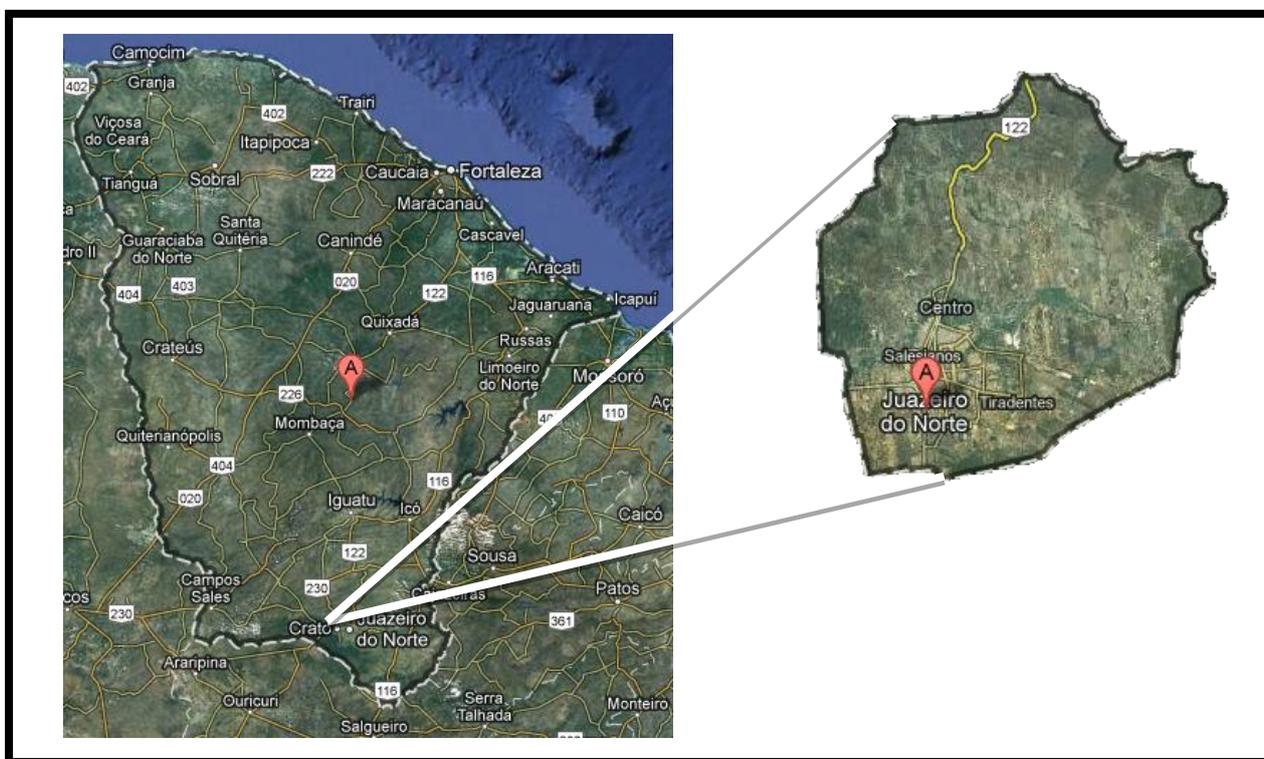
EROs são reduzidas e neutralizadas pelos antioxidantes, que desempenham um papel essencial, não só para manter a produção e eliminação de EROs em equilíbrio durante condições de não-estresse, mas também na determinação do nível de estresse oxidativo (TORRES *et al.*, 2006).

Ao longo do desenvolvimento, os frutos sofrem vários processos bioquímicos, mudanças fisiológicas e estruturais que irão determinar as suas propriedades antioxidantes. Estudos envolvendo reações evidenciando espécies reativas de oxigênio (EROs) são intrínsecas a maturação dos frutos e senescência porque promovem um processo oxidativo que contribui para a deterioração geral do metabolismo celular (JIMENEZ *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2006). Portanto, o aumento nos níveis de EROs durante o amadurecimento da fruta pode ser atribuída a alterações nos níveis de componentes antioxidantes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Os frutos de *Malpighia glabra* foram coletados em diferentes estágios de maturação: maduro (2346,0 g), intermediário (2250,0 g) e verde (3230,0 g). A coleta foi realizada em setembro de 2012 no Sítio Brejo Seco ( $7^{\circ}14'17''S$   $39^{\circ}15'41''W$ ), zona rural a sudeste da cidade de Juazeiro do Norte, estado do Ceará, Brasil (Figura 2). Uma exsicata foi preparada e enviada ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA, onde foi registrada sob nº 9570.



**Figura 2.** Local de coleta do material em estudo: Juazeiro do Norte - CE. (Fonte: adaptado de *google maps*).

A partir dos frutos *in natura* foram realizadas as análises de pH e acidez; das polpas liofilizadas foram realizados determinação do teor de vitamina C e prospecção fitoquímica; e, a partir das frações metanólicas, foram realizados a determinação do teor de fenóis e flavonóides e atividade antioxidante pelo método DPPH, Quelação de Fe (II) e TBARS, além da avaliação da inibição enzimática e quantificação de compostos por CLAE.

## 4.2 Preparação das amostras

Os frutos foram selecionados e separados de acordo com o estágio de maturação (maduro, intermediário e verde) (Figura 3d, 3e, 3f). A trituração para obtenção das polpas ocorreu em liquidificador industrial sem adição de água, exceto para a fração verde, na qual foram adicionadas 100 mL de água destilada para facilitar o processo. Após essa etapa, o material obtido foi filtrado e submetido a congelamento em freezer.

As amostras congeladas foram submetidas à liofilização - processo que possibilita a retirada completa de água da amostra. O resíduo obtido chamado de polpa liofilizada foi, então, submetido à extração com metanol a frio sob agitação constante por 30 minutos com agitador magnético, posteriormente, submetida à evaporação em evaporador rotativo até a obtenção do resíduo sólido chamado de fração metanólica (Fração MeOH). A fração MeOH obtida a partir de cada estágio de maturação foi utilizada para a realização dos ensaios.



**Figura 3.** Coleta e seleção dos frutos de *M. glabra* L. (a) – Coleta dos frutos; (b) – Imagem da espécie estudada; (c) – Seleção e acondicionamento do material; (d) – Estágio de maturação “intermediário”; (e) – Estágio de maturação “maduro”; (f) – Estágio de maturação “verde”.

### 4.3 Prospecção fitoquímica

As polpas liofilizadas (maduro, intermediário e verde) foram submetidas a uma série de testes utilizando reagentes específicos segundo método descrito por Matos (1997), visando a elucidação de classes de metabólitos secundários como flavonóides, alcalóides, taninos e esteróides. Esse método baseia-se na observação visual de variação e/ou intensificação colorimétrica e/ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos nas soluções das amostras.

Para a realização do ensaio, 300 mg das frações metanólicas foram, separadamente, diluídas ou parcialmente diluídas em 30 mL de etanol 70%. Em seguida, alíquotas de 3 mL foram distribuídas em tubos de ensaio e seguiu-se como mostrado no esquema abaixo:

<b>TESTE PARA FENÓIS E TANINOS</b>		
<b>TUBO</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>	<b>RESULTADOS</b>
Tubo 1	Adição de 3 gotas de FeCl <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Coloração variável entre azul e vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste branco for negativo (água+cloreto férrico);</li><li>• Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos condensados (catéquicos ou flobabênicos);</li></ul>
<b>TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONÓIDES</b>		
<b>TUBOS</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>	<b>RESULTADOS</b>
Tubo 2	Acidular a pH 3 como HCl 1%	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cor vermelha – presença de antocianinas e antocianidinas; chalconas e auronas;</li><li>• Se a coloração não variar – presença de flavonas, flavonóis e xantonas; flavononóis.</li></ul>
Tubo 3	Alcalinizar a pH 8,5 com NaOH 5%	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cor lilás – presença de antocianinas e antocianidinas;</li><li>• Se a coloração não variar – presença de flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; flavononóis.</li></ul>
Tubo 4	Alcalinizar a pH 11 com NaOH 5%	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cor azul-púrpura – presença de antocianinas e antocianidinas;</li><li>• Cor amarela – presença de flavonas, flavonóis e xantonas;</li><li>• Cor vermelho púrpura – presença de chalconas e auronas;</li><li>• Cor vermelho-laranja – presença de flavononóis.</li></ul>
<b>TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVONONAS</b>		
<b>TUBOS</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>	<b>RESULTADOS</b>
Tubo 5	Acidular a pH 1-3 com HCl 1%. Em seguida aqueça-o com auxílio de uma lâmpada de álcool por 2-3 minutos, cuidadosamente.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cor vermelha – presença de leucoantocianidinas;</li><li>• Cor pardo-amarelada – presença de catequinas;</li><li>• Se a coloração não variar – presença de flavononas.</li></ul>
Tubo 6	Alcalinizar a pH 11 com NaOH 5%. Em seguida aqueça-o com auxílio de uma lâmpada de álcool por 2-3 minutos, cuidadosamente.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se a coloração não variar – presença de leucoantocianidinas e catequinas;</li><li>• Cor vermelho-laranja – presença de flavononas.</li></ul>

## 4.4 Quantificação de compostos por CLAE

### 4.4.1 Química, aparelhos e procedimentos em geral

Todos os reagentes utilizados foram de pureza com grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido caféico, acetonitrila e acetato de etila, foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, quercetrina, rutina e campferol, catequina, epicatequina, tocoferol e  $\beta$ -caroteno foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan), destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT, com bombas alternadas ligadas ao desgaseificador DGU 25A5 com integrador CBM 20A, UV-VIS com detector DAD (diodo) SPD M20A e software LC 1,22 SP1.

### 4.4.2 Quantificação de compostos por CLAE

As análises cromatográficas de alta eficiência com fase reversa das frações metanólicas dos frutos, foram realizadas utilizando colunas C18 (4,6 mm x 250 mm) com partículas medindo 5  $\mu$ m de diâmetro. A fase móvel foi água contendo ácido acético a 2% (A) e metanol (B) e o gradiente de composição foi de: 5% de B durante 2 minutos, 25% (B) até 10 minutos, e 40%, 50%, 60%, 70% e 80% de B a cada 10 minutos, seguindo a metodologia descrita por Sabir e colaboradores (2012). As frações metanólicas de *Malpighia glabra* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro foram dissolvidos em etanol na concentração de 20 mg/mL. A presença de nove compostos fenólicos foi investigada: ácido elágico, ácido gálico, ácido caféico, epicatequina e catequina, e os flavonóides quercetina, rutina, quercetrina e campferol. A identificação desses compostos foi realizada pelo método do padrão pelo qual é realizada a comparação dos seus tempos de retenção e através do espectro de absorção UV comparando-os à compostos de padrão comercial. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 40  $\mu$ L. A amostra e fase móvel foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m (Millipore), e em seguida desgaseificada por banho de ultra-sons antes da utilização. As soluções de padrões referências foram preparadas em fase móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,030-0,250 mg/mL, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, rutina e campferol e, 045-0,500 mg/mL para os ácidos gálico, caféico e elágico.

A quantificação foi realizada por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 257 nm para o ácido gálico, a 280 nm para a catequina e epicatequina, 325 nm para ácidos elágico e caféico, e 365 para a quercetina, quercitrina, campferol e rutina. Os picos foram confirmados por cromatografia comparando o seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 600 nm). Curva de calibração para o ácido gálico:  $Y = 13591x + 1187,5$  ( $r = 0,9996$ ), ácido caféico:  $Y = 11748x + 1340,3$  ( $r = 0,9997$ ), ácido elágico:  $Y = 14073x + 1285,6$  ( $r = 0,9993$ ); catequina:  $Y = 12547x + 1337,4$  ( $r = 0,9993$ ), epicatequina:  $Y = 11958x + 1329,7$  ( $r = 0,9990$ ); rutina:  $Y = 12756x + 1163,8$  ( $r = 0,9991$ ), a quercetina:  $Y = 11891x + 1241,6$  ( $r = 0,9985$ ); quercitrina:  $Y = 12694x + 1351,0$  ( $r = 0,9989$ ) e o campferol:  $Y = 13657x + 1341,8$  ( $r = 0,9999$ ). Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

Para a análise dos carotenóides, foi utilizada uma coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) de fase reversa, com partículas de 5 $\mu$ m de diâmetro. A fase móvel consistiu em misturas de ACN: H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) com 0,25% de trietilamina (A) e com AcOEt 0,25% com trietilamina (B). O gradiente iniciado com 90% de (A) a 0 min e 50% de (A) em 10 min. A percentagem de uma diminuição de 50% em 10 min a 10% de (A) em 20 min. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 40  $\mu$ L. Os sinais foram detectados a 450 nm, seguindo o método descrito por Janovik e colaboradores (2012), com algumas modificações.

Soluções de padrões referências (tocoferol e  $\beta$ -caroteno) foram preparadas em fase móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,035-0,350 mg/mL. As amostras de *Malpighia glabra* foram analisadas a uma concentração de 10 mg/mL, e os carotenóides foram identificados e quantificados nas frações metanólicas de *Malpighia glabra* por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV com a solução padrão. Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

O Limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas analíticas independentes, tal como definidos por Boligon e colaboradores (2012). LOD e LOQ foram calculados como  $\sigma$  3,3 e  $10 / s$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e  $S$  é o declive da curva de calibração.

#### **4.5 Determinação de fenóis totais**

A concentração de fenóis totais foi determinada através da adição de 50  $\mu$ L de cada uma das soluções previamente preparadas, em várias concentrações (250, 100, 50, 25, 10, 5

µg/mL) para cada um dos estágios de maturação, juntamente com 200 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* na concentração de 10%, seguido da adição de 400 µL de carbonato de sódio a 7,5%. As soluções foram incubadas a 45°C por um período de 15 minutos sem luminosidade, e as absorvâncias foram mensuradas a 765 nm em espectrofotômetro. O ácido gálico (AG) foi utilizado como padrão de comparação de composto fenólico (SINGLETON *et al.*, 1999). A média das leituras dos testes foi utilizada e os resultados expressos em microgramas de AG por miligrama de extrato.

#### 4.6 Determinação de flavonóides totais

O flavonóide utilizado como padrão foi a rutina estabelecendo a curva de calibração (20 – 1 µg/mL) em etanol P.A. Os padrões ou soluções das amostras foram adicionados em volumes variados de forma que as concentrações variassem entre 250 a 1000 µg/mL. As amostras e aos padrões foram adicionados 600 µL de etanol P.A, 40 µL de cloreto de alumínio a 10%, 40 µL de acetato de sódio (1 M) e água destilada q.s.p. 2 mL.

Um teste branco foi realizado adicionando o mesmo volume das amostras e do etanol, porém o volume do cloreto de alumínio e do acetato de sódio foi substituído pelo mesmo volume de água, além do volume (q.s.p.) já previsto anteriormente.

Após a incubação, à temperatura ambiente durante 45 minutos sem luminosidade, a absorvância da reação foi medida em espectrofotômetro em 415 nm. A média das três leituras foi utilizada e o teor de flavonóides totais foi expresso como microgramas de equivalência de rutina/miligrama da amostra (KOSALEC *et al.*, 2004).

#### 4.7 Determinação da acidez titulável e pH

Foram adicionados 5 mL da polpa homogeneizada, de cada um dos estágios de maturação, em 50 mL de água destilada e verificado o pH em potenciômetro digital. Em seguida, adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M sob agitação constante até surgimento de coloração rosa persistente por 30 segundos. Os valores obtidos foram, individualmente, utilizados para cálculo da acidez em mL de solução (BRASIL, 2005).

$$\text{Acidez em mL de solução} = \frac{V \times f \times 100}{P \times C}$$

V= nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

f= fator de correção da solução de hidróxido de sódio

P= massa da amostra em g ou volume pipetado em mL

C= correção para solução de NaOH (10 se NaOH for 0.1 M: 100 se NaOH for 0.01 M)

## **4.8 Determinação do teor de vitamina C**

A colorimetria fundamenta-se na medição da extensão com que a solução de 2,6-diclorofenol é descolorida pelo ácido ascórbico presente em extratos de amostra e soluções padrões de ácido ascórbico (LEME JÚNIOR *et al.*, 1950).

Para preparar a solução de ácido oxálico a 2% foram utilizados 2 g de ácido oxálico diluídos em 100 mL de água destilada. Essa solução foi utilizada para o preparo da solução estoque de ácido ascórbico (100 mg de ácido ascórbico dissolvidos com solução de ácido oxálico 2% em q.s.p. 100 mL) e para obtenção da solução de trabalho de ácido ascórbico a uma concentração de 40 µg/mL (4 mL da solução estoque de ácido ascórbico foram diluídos com solução de ácido oxálico 2% em q.s.p. 100 mL).

Para obter a solução de trabalho do corante 2,6-diclorofenol indofenol, primeiramente foi preparada uma solução estoque do corante (100 mg do corante e 84 mg de bicarbonato de sódio em água destilada aquecida a 85-95°C q.s.p. 100 mL), então, em seguida, essa solução foi filtrada e 25 mL foram tomados e ajustados a 500 mL com água destilada.

Para preparar as amostras, 50 g da polpa liofilizada de cada um dos estágios de maturação foi homogeneizada com solução de ácido oxálico 2% produzindo 100 mL do macerado.

### **4.8.1 Procedimento para a curva padrão**

Foram pipetados volumes variados (1, 2, 3, 4 e 5 mL) da solução de trabalho de ácido ascórbico e ajustado o volume de 5 mL com solução de ácido oxálico a 2%. Em seguida, a cada tubo, foram adicionados 10 mL da solução de trabalho do corante. A leitura foi realizada entre 15 a 20 segundos após a adição do corante a um comprimento de onda ajustado para 518 nm. O espectrofotômetro foi calibrado a 100% de transmitância usando um branco contendo 5 mL de ácido oxálico 2% e 10 mL de água destilada.

### **4.8.2 Procedimento para a leitura da amostra**

Um volume de 5 mL ou menos da solução das amostras foi adicionado em um tubo e neste, um volume de 5 mL foi ajustado com solução de ácido oxálico 2%, em seguida, foi adicionado 10 mL da solução de trabalho do corante e a leitura foi realizada em espectrofotômetro assim como na curva padrão.

### 4.8.3 Cálculo do teor de ácido ascórbico

Após os ensaios, os valores obtidos foram substituídos na fórmula abaixo para calcular o valor em miligramas de ácido ascórbico/100 (g ou mL) de amostra:

$$\text{mg de ác. ascórbico/100 g ou mL de amostra} = \frac{\text{conc. ác. ascórb.} \times \text{vol. produzido} \times 100}{\text{mL da sol. de amostra no tubo} \times 1000 \times \text{peso da amostra}}$$

### 4.9 Atividade quelante de Fe (II)

A capacidade para quelar Fe (II) foi determinada usando o método modificado descrito por Puntel *et al.* (2005). O teste foi realizado com adição de 150 µL de FeSO<sub>4</sub> (2mM) em uma mistura de reação contendo 168 µL de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), 218 µL de solução salina e as soluções das amostras (fração MeOH diluída em água destilada) variando de 250 a 5 µg/mL. A mistura de reação foi incubada, ao abrigo da luz, durante 5 minutos antes da adição de 13 µL de 1,1-O-fenantrolina 0,25%.

Dois testes brancos foram realizados no qual o primeiro consistiu de amostra e fenantrolina, e o segundo, de amostra e ferro (II). A absorbância foi subsequentemente medida em 510 nm em espectrofotômetro (BATOOL *et al.*, 2010) e a capacidade quelante das amostras foi expressa em percentagem (%).

### 4.10 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O potencial antioxidante da fração MeOH de cada estágio, foi avaliada utilizando o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), descrito por Mensor e colaboradores (2001). Nesse ensaio, 300 µL da fração MeOH de cada amostra (250 – 5 µg/mL) foram adicionados em 1500 µL de DPPH (0,3 mM) e 1200 µL de etanol P.A.

Um teste em branco foi realizado adicionando-se 2700 µL de etanol P.A em 300 µL das amostras em diferentes concentrações. Como controle negativo foi utilizada a mistura de 1500 µL da solução de DPPH com 2700 µL de etanol P.A, e como controle positivo utilizou-se 300 µL das soluções de ácido ascórbico (250 – 5 µg/mL), 1500 µL da solução de DPPH e 1200 µL de etanol P.A.

A elevada habilidade de uma amostra em retirar o radical livre estável DPPH está relacionado com a atividade antioxidante da mesma (DUARTE-ALMEIDA, 2006). A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a atividade antioxidante de uma amostra pode

ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução de DPPH, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (NUNE *et al.*, 2008). Após o tempo de reação, sem luminosidade de 30 minutos, as absorvâncias foram lidas com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 518nm.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase, obtendo-se assim à concentração das amostras que promovesse a diminuição para a metade 50% e redução de 90% da concentração inicial de DPPH, definida respectivamente como Concentração Efetiva (CE<sub>50</sub>) e (CE<sub>90</sub>) (MENSOR *et al.*, 2001).

$$\%AA = 100 - (((Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \div \text{controle negativo}) \times 100)$$

#### **4.11 Avaliação do potencial antioxidante por TBARS**

Quando ocorrem danos à camada lipídica há a produção de diversos subprodutos, entre eles espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como malondialdeído (MDA). O método utilizado emprega como parâmetro a leitura de absorvâncias das soluções das amostras e fosfolipídeos com ácido tiobarbitúrico, uma vez que essa solução apresenta coloração invisível na faixa de cor rósea (532 nm). Todos os testes foram acompanhados de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de MDA para realizar o cálculo do fator de correção dos testes.

##### **4.11.1 Preparo do fosfolipídeo de ovo**

Foi preparada uma solução de gema de ovo (solução de hexano: álcool isopropílico (3:2)) na proporção de 1 g para 10 mL. Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até obtenção de resíduo seco. Para os ensaios de TBARS, foi utilizado 0,05 g do resíduo seco em 10 mL de água destilada.

##### **4.11.2 Ensaio TBARS**

A produção de TBARS foi determinada utilizando método modificado de Sabir & Rocha (2008). Os homogeneizados obtidos com fosfolipídeos de ovo, diferentes concentrações das amostras, e água destilada (q.s.p. 500µL), foram pré-incubados a 37°C

durante 1 h na presença ou ausência de ferro (20µM) como agente indutor de peroxidação lipídica. A reação de cor foi realizada pela adição, após pré-incubação, de 500 µL de tampão ácido acético e 500 µL de TBA 0,6% dissolvido em água. As misturas de reação, incluindo uma série de diluições de 0,03 mM MDA padrão, foram incubadas 100°C por 1 h e, devido a turbidez da reação, foi realizado uma partição com butanol (1,5 mL). Em seguida, os tubos foram centrifugados para a completa separação da fase butanólica. A leitura da absorbância foi realizada após o resfriamento dos tubos utilizando a fase butanólica (sobrenadante) em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm.

#### 4.12 Avaliação do potencial inibitório frente à enzima $\alpha$ -glucosidase

O ensaio para avaliar a inibição de  $\alpha$ -glucosidase foi realizado de acordo com o método proposto por Li *et al.* (2009), citado por Zhou *et al.* (2012), com algumas modificações. Para realização do ensaio, 200 µL das soluções a serem testadas foram diluídas em tampão fosfato 10mM, e 200 µL de  $\alpha$ -glucosidase 0,04 U/mL diluída em tampão fosfato 10 mM (pH 6,80), homogeneizadas e incubadas a 37°C por 5 minutos em banho metabólico. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (PNF-G) e incubados, novamente, a 37°C por 30 minutos em banho metabólico. Em seguida, foram adicionados 500 µL de carbonato de sódio 0,1 M para parar a reação. A absorbância foi subsequentemente medida em 405 nm em espectrofotômetro. Foi testado controle contendo a mesma mistura de reação exceto o mesmo volume de tampão fosfato, adicionado em vez da solução teste. A acarbose foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações testadas para as amostras.

$$\text{INIBIÇÃO (\%)} = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100\%$$

$A_1$  = absorbância do controle

$A_2$  = a absorbância da amostra

#### 4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o programa ANOVA, seguido do teste de Tukey por comparação múltipla quando apropriado com valores de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento das amostras

O rendimento obtido para a polpa liofilizada dos frutos maduros, intermediários e verdes foram 6,11, 3,31 e 3,81%, respectivamente.

Para o fracionamento com metanol, foram utilizadas 10 g de cada material liofilizado. Em relação ao rendimento da fração MeOH dos frutos maduros, intermediários e verdes, os valores obtidos foram de 80,03, 85,95 e 94,36%, respectivamente.

### 5.2 Prospecção fitoquímica

Algumas classes de compostos como taninos, fenóis e flavonóides foram evidenciadas, porém a nível qualitativo, podendo haver interferência de outras classes de compostos presentes na amostra (Tabela 1).

A muitos desses metabólitos são atribuídos diversas aplicações terapêuticas, como por exemplo, para os fenóis, como ácido caféico e ácido ferúlico, é atribuída a atividade antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2007). Para os flavonóides, frequentemente encontrados em frutos, são conferidas diversas atividades como antivirais, antioxidantes, entre outras (ZUANAZZI *et al.*, 2007).

Os efeitos dos constituintes de plantas sobre os organismos são quase sempre observados com base no conhecimento popular de uso tradicional e repetitivo. Sabe-se que os vegetais e frutas têm diferentes componentes fitoquímicos responsáveis por propriedades terapêuticas, como antioxidante, propriedades anticancerígenas e antimutagênicas (KUSAMRAN *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2006). Segundo Machado (1992) existe uma tendência para o aumento do consumo mundial de suco de frutas tropicais.

**Tabela 1. Metabólitos secundários presentes nas polpas de *M. glabra*.**

CLASSES DE METABÓLITOS	Fruto maduro	Fruto intermediário	Fruto verde
Taninos	-	+	+
Fenóis	+	-	-
Flavonóides	+	+	+
Alcalóides	-	-	-

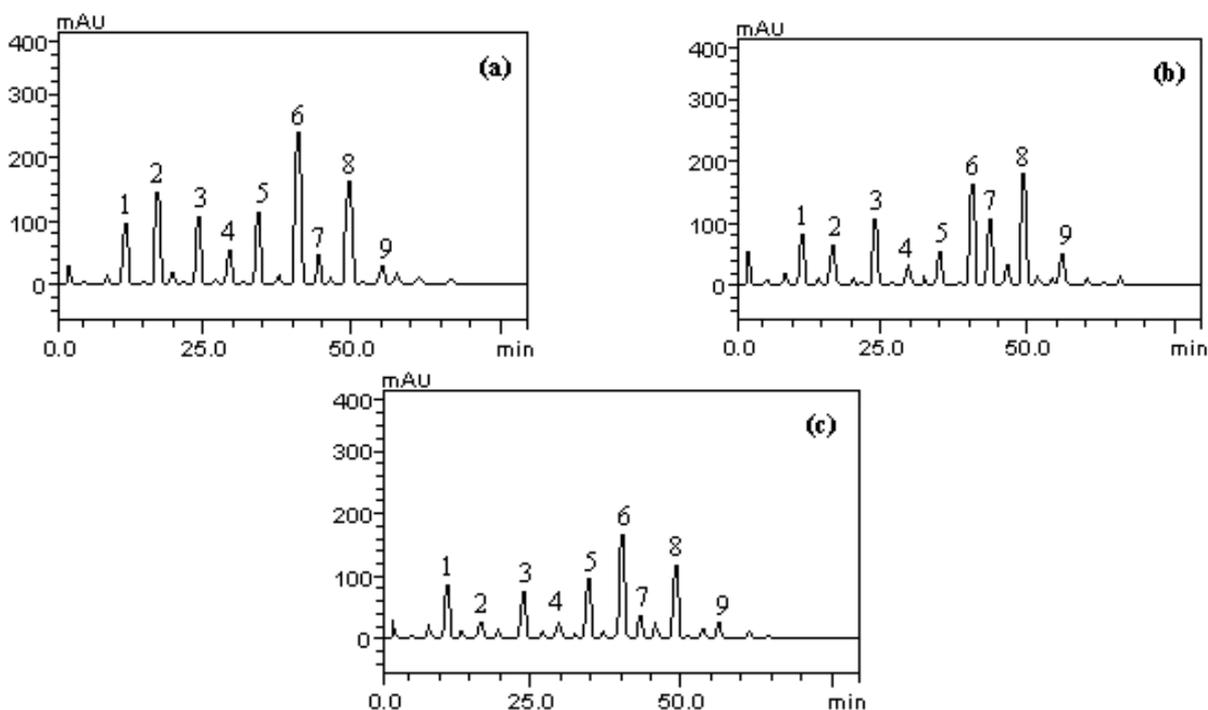
(+) presença; (-) ausência.

### 5.3 Quantificação de compostos por CLAE

O perfil de CLAE das frações metanólicas de *Malpighia glabra* também foi adquirido. As amostras de *Malpighia glabra* contêm outros compostos minoritários, além de ácido gálico (tempo de retenção  $t_R=12,65$  min, pico 1), catequina ( $t_R = 16,80$  min, pico 2), ácido cafeico ( $t_R = 24,93$  min, pico 3), ácido elágico ( $t_R = 29,85$  min, pico 4), epicatequina ( $t_R = 34,76$  min, pico 5), rutina ( $t_R = 42,05$  min, pico de 6), quercitrina ( $t_R = 44,57$  min, pico de 7), a quercetina ( $t_R = 50,13$  min, pico de 8) e campferol ( $t_R = 55,19$  min, pico de 9).

A concentração de cada uma das substâncias encontradas demonstrou que o pico 6 apresentou maior quantidade na fração MeOH dos frutos maduros, enquanto que o pico 8, correspondente a quercetina, não mostrou diferença significativa na fração MeOH dos frutos maduros e intermediários. Para a Fração MeOH dos frutos verdes, o pico 6 (correspondente a rutina) mostrou-se mais elevado, seguido do pico 8 (quercetina) (Figura 4).

Foi possível verificar, de acordo com a Tabela 2, que os compostos que se apresentaram em maior quantidade nas três amostras testadas foram rutina e quercetina, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados.



**Figura 4.** Representação da cromatografia líquida de alta eficiência de compostos fenólicos e flavonóides a partir das frações metanólicas de *Malpighia glabra*: fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos maduros (a), fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos intermediários (b) e fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos verdes (c). Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), epicatequina (pico 5), rutina (pico 6), quercitrina (pico 7), a quercetina (pico de 8) e campferol (pico de 9).

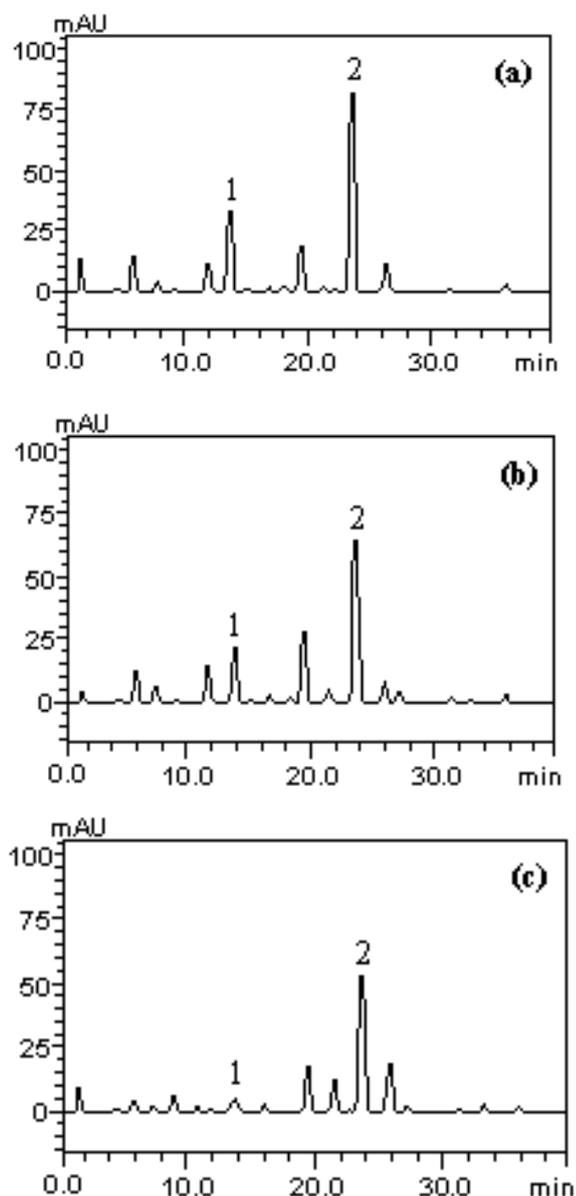
**Tabela 2. Composição de ácidos fenólicos e flavonóides de *Malpighia glabra*.**

<i>Compostos</i>	<i>Maduro</i>		<i>Intermediário</i>		<i>Verde</i>		<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	5,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,53	4,51 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,45	4,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,47	0,025	0,083
Catequina	8,71 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,87	3,96 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,39	1,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,11	0,019	0,062
Ácido caféico	6,82 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,68	5,63 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,56	4,59 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,45	0,007	0,023
Ácido elágico	2,53 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,25	1,72 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,17	1,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13	0,032	0,105
Epicatequina	7,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,70	2,53 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,25	5,21 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,52	0,039	0,128
Rutina	16,57 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,65	10,34 ± 0,02 <sup>f</sup>	1,03	10,18 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,01	0,011	0,034
Quercitrina	2,13 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,21	5,80 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,58	1,93 ± 0,04 <sup>e</sup>	0,19	0,015	0,049
Quercetina	11,78 ± 0,02 <sup>e</sup>	1,17	11,27 ± 0,03 <sup>f</sup>	1,14	6,01 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,60	0,008	0,029
Campferol	1,62 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,16	2,31 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,23	1,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,12	0,023	0,075

Resultados são expressos em média ± DP em triplicata. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a p <0,01.

Em relação aos carotenóides, outros compostos minoritários além do tocoferol (tR 13,85 min) e  $\beta$ -caroteno (tR 23,61 min) foram encontrados. A curva de calibração para o tocoferol foi:  $Y = 34721x + 1046,9$  ( $r = 0,9999$ ); e  $\beta$ -caroteno:  $Y = 27732x + 1156,8$  ( $r = 0,9988$ ).

O pico 2 correspondente ao  $\beta$ -caroteno apresentou maior quantidade nas três amostras testadas, sendo que o pico 1 apresentou quantidade significativa nas frações MeOH dos frutos maduros e intermediários, enquanto que na fração MeOH dos frutos verdes o pico 1 (tocoferol) apresentou uma quantidade mínima (Figura 5).



**Figura 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do perfil de carotenóides em amostras de *Malpighia glabra*. Maduro (a), intermediário (b) e verde (c). Tocoferol (pico 1) e  $\beta$ -caroteno (pico 2), detecção por UV foi em 450 nm.**

Os valores mostraram que o  $\beta$ -caroteno apresentou maior percentual nas três amostras testadas, sendo o maior valor encontrado para a fração MeOH dos frutos maduros. O percentual de tocoferol mostrou-se mais elevado para os frutos maduros, seguido dos frutos intermediários e verdes (Tabela 3).

**Tabela 3. Composição de carotenóides *Malpighia glabra*.**

<i>Compostos</i>	<i>Maduro</i>		<i>Intermediário</i>		<i>Verde</i>		<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Tocoferol	7,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,70	4,91 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,49	1,35 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,13	0,023	0,075
$\beta$ -caroteno	16,72 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	1,67	13,86 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,38	10,65 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,06	0,009	0,028

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  DP em triplicata. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .

Vários estudos têm avaliado o teor de carotenóides e bioflavonóides devido à sua propriedade antioxidantes (MEZQUITA *et al.*, 2000). O  $\beta$ -caroteno foi encontrado em acerola correspondendo entre 40-60% do total de carotenóides. No entanto, o conteúdo de  $\beta$ -caroteno observado nesse estudo foi bastante inferior ao observado por Hanamura e colaboradores (2005).

Ultimamente, uma série de estudos tem sido realizada a fim de investigar o teor de compostos fenólicos e carotenóides presentes em frutos (PRIOR *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Acredita-se que os benefícios à saúde, proporcionados pela acerola, estão associados com sua capacidade antioxidante e os níveis elevados de ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis.

#### 5.4 Teor de fenóis e flavonóides totais

Os resultados mostram que a polpa dos frutos verdes possui maior teor de compostos fenólicos (559,57 $\pm$ 7,14  $\mu\text{g AG/mg}$  polpa) e flavonóides (10,65 $\pm$ 0,09  $\mu\text{g Rutina/mg}$  polpa). As polpas dos frutos em estágio maduro e intermediário demonstraram valores similares de compostos fenólicos e flavonóides totais (Tabela 4).

No estudo realizado por Correia e colaboradores (2012), o teor de fenóis observado para a acerola foi de 8,84%, o que demonstra que o valor de fenóis obtido para a amostra de acerola abordada nesse estudo foi, novamente, muito superior à encontrada pelos autores. No

entanto, as amostras estudadas por Correia e colaboradores (2012) foram os resíduos obtidos a partir da fruta, fato que pode explicar um menor teor de fenóis quando comparado ao observado no presente estudo.

**Tabela 4. Teores de fenóis e flavonóides totais nas frações MeOH das polpas de *M. glabra*.**

Frutos	Fenóis (µg AG/mg polpa)	%	Flavonóides (µg Rut./mg polpa)	%
Maduro	437,05±7,12 <sup>a</sup>	43,7	7,13±0,07 <sup>a</sup>	0,71
Intermediário	455,86±9,92 <sup>a</sup>	45,5	7,26±0,20 <sup>a</sup>	0,72
Verde	559,57±7,14 <sup>b</sup>	55,9	10,65±0,09 <sup>b</sup>	1,06

Os resultados são expressos com médias ± DP (n=3) e médias seguidas por letras diferentes (a, b) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a µg de ácido gálico (AG)/mg polpa para fenóis e µg de rutina (Rut)/mg polpa para flavonóides.

Além da vitamina C, a acerola contém outros componentes funcionais benéficos à saúde humana, tais como os fenóis (HANAMURA *et al.*, 2005). Segundo Sizer e colaboradores (2003), os flavonóides, assim como outros compostos, atuam como antioxidantes no organismo humano.

De acordo com Hanamura e colaboradores (2008), a quantidade de flavonóides em acerola diminui com o amadurecimento dos frutos, reduzindo, conseqüentemente, a atividade antioxidante, fato que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo. O mesmo foi observado por Oliveira e colaboradores (2012), sendo que a queda mais acentuada ocorreu durante o crescimento entre os estágios verde e maduro.

A propriedade antioxidante dos flavonóides tem chamado a atenção para a nutrição preventiva, pois constituintes alimentares são capazes de proteger contra danos oxidativos, além de contribuir para a prevenção das principais patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento e câncer (TAPAS *et al.*, 2008).

De acordo com Shwartz e colaboradores (2009), o declínio de fenóis pode ser devido à polimerização de fenóis pela enzima polifenol oxidase. Segundo Hanamura *et al.* (2005), a atividade antioxidante está fortemente correlacionada com o número de grupos hidroxila da estrutura polifenol.

## 5.5 Teor de acidez e pH

Os valores de pH obtidos foram tornando-se menores à medida que as amostras sofreram o processo de amadurecimento. Os valores para a acidez titulável foram crescentes no sentido maduro > intermediário > verde (Tabela 5).

Segundo Gonzaga Neto e colaboradores (1994) citado por Ferreira *et al.* (2009), o fruto de *M. glabra*, quando no estágio de maturação maduro apresenta, dentre outras características, menor acidez e menor teor de vitamina C. Esse dado corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a acidez para o fruto maduro foi de 19,10, valor inferior a acidez obtida para os frutos intermediários e verdes. Segundo Vendramini & Trugo (2000), a diminuição da acidez é resultado do consumo de ácidos orgânicos como substrato respiratório.

**Tabela 5. Valores de acidez e pH das polpas de *M. glabra* nos três estágios de maturação.**

Amostra	pH	Acidez
<b>Maduro</b>	3,39 ± 0,06 <sup>a</sup>	19,10 ± 0,15 <sup>a</sup>
<b>Intermediário</b>	3,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	21,11 ± 0,16 <sup>b</sup>
<b>Verde</b>	2,73 ± 0,02 <sup>b</sup>	22,07 ± 0,10 <sup>c</sup>

Os resultados são expressos com médias ± DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b, c) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a valores de pH, e acidez em percentagem.

Segundo Oliveira e colaboradores (2012), os valores de pH aumentaram ligeiramente durante a maturação da acerola, com pouca variação entre os clones, sugerindo que um saldo líquido foi criado devido a diferenças no grau de dissociação do ácido ascórbico, que diminui, e de outros ácidos orgânicos produzidos durante a maturação da fruta.

## 5.6 Teor de vitamina C

Os resultados obtidos mostraram que o teor de vitamina C foi maior na polpa liofilizada dos frutos verdes, seguido dos frutos intermediários e maduros (Tabela 6). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Jawaheer e colaboradores (2003). Segundo Jawaheer e colaboradores (2003) e Hanamura e colaboradores (2008), o teor de vitamina C, na maioria das frutas, tende a diminuir durante o amadurecimento e, de acordo com Butt (1980), esta diminuição está relacionada com a ação da enzima chamada ascorbato oxidase. Segundo Sizer e colaboradores (2003), a vitamina C, assim como outros compostos, como flavonóides, atuam como antioxidantes no organismo humano.

**Tabela 6. Teor de vitamina C em frutos de acerola (*M. glabra*) nos três estágios de maturação.**

mg AC/100 g acerola	Estágio de maturação		
	Maduro	Intermediário	Verde
	76,49 ± 5,26 <sup>a</sup>	167,29 ± 1,67 <sup>b</sup>	171,18 ± 2,14 <sup>b</sup>

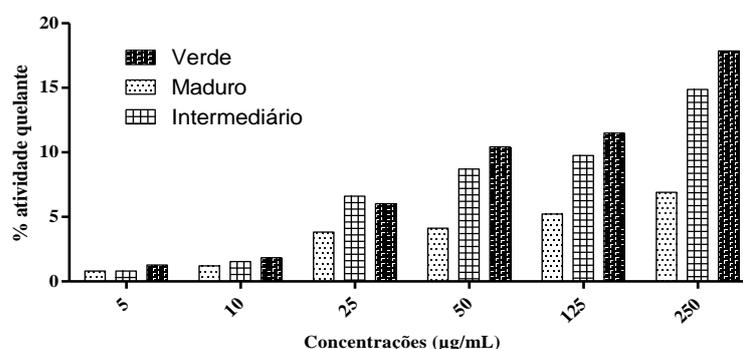
Os resultados são expressos com médias ± DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico (AC)/mg de fração metanólica dos frutos de acerola para cada um dos estágios de maturação.

De acordo com Asenjo e colaboradores (1960), a atividade da enzima ascorbato oxidase é maior na fruta madura se comparada à fruta verde, o que pode explicar as perdas no decorrer da maturação. Vendramini & Trugo (2000) mostraram que a acerola verde apresenta mais vitamina C, e que, quercetina e rutina, foram detectadas e níveis similares nos dois estágios de maturação (verde e maduro), portanto, os dois últimos não parecem influenciar efetivamente na diferença dos percentuais de atividade entre os estágios de maturação.

Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram observados por Oliveira e colaboradores (2012), sendo que uma redução no teor de vitamina C, assim como o de fenóis, resulta, conseqüentemente, em uma menor atividade antioxidante total.

## 5.7 Atividade quelante

Os dados obtidos mostraram que a fração MeOH da polpa no estágio verde, apresentou maior atividade quelante (17,85%), seguido da fração MeOH dos frutos intermediários (14,87%) e maduros (6,91%). As frações MeOH dos frutos maduros e intermediários apresentaram diferença significativa em todas as concentrações exceto na concentração de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , nas demais a porcentagem de atividade quelante se mantém quase que constante ou há pequenas variações (Figura 6).



**Figura 6. Atividade quelante de ferro das polpas de *M. glabra* L.**

Em relação aos valores de  $CI_{50}$ , houve diferença significativa nos diferentes estágios de maturação, porém os valores calculados foram bastante elevados indicando uma baixa atividade quelante ( $< 20\%$ ) (Tabela 7). É importante ressaltar que não há relatos na literatura quanto à atividade quelante de ferro para *M. glabra*.

**Tabela 7. Valores de  $CI_{50}$  para a atividade quelante nos três estágios de maturação.**

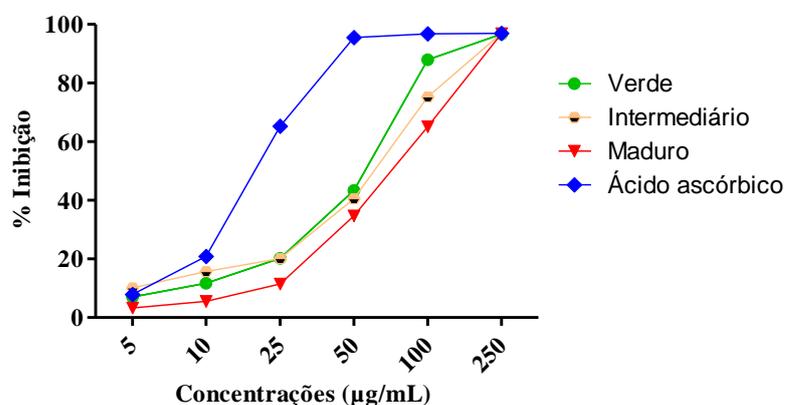
Estágio de maturação	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Maduro	$>250$ ( $2205,10 \pm 0,01^a$ )
Intermediário	$>250$ ( $931,58 \pm 0,01^b$ )
Verde	$>250$ ( $753,80 \pm 0,01^c$ )

Os resultados são expressos com médias  $\pm$  DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b, c) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a  $CI_{50}$  expressa em  $\mu\text{g/mL}$ .

Segundo Carvalho e colaboradores (2007), os compostos fenólicos tem a propriedade de complexação com metais, sendo que essa capacidade pode ser importante em diversos sistemas biológicos. Além disso, esses compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como ferro e manganês. Esse fato justifica a melhor atividade quelante para a fração MeOH da polpa liofilizada dos frutos verdes, uma vez que esta possui teor de fenóis superior aos outros estágios de maturação (Tabela 4).

## 5.8 Atividade antioxidante pelo método DPPH

Os resultados obtidos mostraram que o maior sequestro de radical livre DPPH foi para a polpa dos frutos verdes, porém quando comparado ao ácido ascórbico houve diferença acentuada nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ; nas demais houve variação, porém em menor proporção (Figura 7).



**Figura 7. Atividade antioxidante das polpas de *M. glabra* L. pelo método DPPH.**

Os valores de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  foram calculados, mostrando uma atividade antioxidante efetiva contra o radical livre DPPH, sendo o menor valor, ou seja, a melhor atividade, para a fração metanólica da polpa liofilizada dos frutos verdes, porém ainda superior ao valor encontrado para o ácido ascórbico (Tabela 8).

**Tabela 8. Valores da concentração inibitória a 50% ( $CI_{50}$ ) e a 90% ( $CI_{90}$ ) para as polpas de *M. glabra* obtidos por meio da reação com radical livre DPPH.**

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Madura	$46,20 \pm 1,24^a$	$87,33 \pm 1,04^a$
Intermediária	$39,57 \pm 0,64^b$	$83,34 \pm 1,07^b$
Verde	$38,33 \pm 1,14^b$	$78,90 \pm 0,64^c$
Ácido ascórbico	$13,94 \pm 0,06^c$	$66,64 \pm 0,53^d$

Os resultados são expressos com médias  $\pm$  DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b, c, d) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  expressa em  $\mu\text{g/mL}$ .

No estudo realizado por Franke e colaboradores (2005), a vitamina C, um agente antioxidante conhecido, aumentou a capacidade da acerola em reduzir a ação oxidante do peróxido de hidrogênio em células de ratos, protegendo o DNA. As propriedades benéficas da fruta para a manutenção da saúde humana e prevenção de doenças foram previamente atribuídas aos antioxidantes (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000; HUNG *et al.*, 2004; TULIPANI *et al.*, 2011). De acordo com Menichini *et al.* (2009), o teor de compostos fitoquímicos como antioxidantes é influenciado por vários fatores: condições climáticas, genótipo, técnicas de cultivo, colheita e estágio de maturação (PARK *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006), o que pode justificar o fato de que a atividade antioxidante realizada nesse estudo variou para os diferentes estágios de maturação. Segundo Hanamura e colaboradores (2005), frutas tropicais são consideradas notáveis por causa da qualidade e quantidade de compostos bioativos, tais como antioxidantes, devido à sua exposição a forte luz solar. De acordo com Singh e colaboradores (2012), o conteúdo de fenóis, taninos, antocianinas e carotenóides tem correlação positiva com a atividade antioxidante.

No entanto, o sistema de defesa antioxidante é constituído por um conjunto complexo de compostos enzimáticos e não-enzimáticos, que não devem ser estudados individualmente devido à prováveis efeitos sinérgicos e antagônicos entre eles (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000; HUNG *et al.*, 2004; TULIPANI *et al.*, 2011).

## 5.9 Atividade antioxidante por TBARS

Com base nos valores de  $CI_{50}$  calculados, ficou evidenciado que, dentre as amostras testadas, a fração MeOH da polpa liofilizada dos frutos maduros mostrou menor  $CI_{50}$  quanto ao nível basal, demonstrando, conseqüentemente, o melhor resultado. Quanto aos valores obtidos quando utilizando o ferro como indutor da peroxidação, dentre as amostras testadas, a fração MeOH da polpa liofilizada dos frutos verdes mostrou a menor  $CI_{50}$ , portanto, o melhor resultado obtido quando utilizando o ferro para induzir a peroxidação (Tabela 9).

**Tabela 9. Valores de  $CI_{50}$  das frações MeOH de acerola (*M. glabra*).**

	Basal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Induzido com $\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Maduro</b>	137,02 $\pm$ 10,06 <sup>a</sup>	112,54 $\pm$ 5,61 <sup>a</sup>
<b>Intermediário</b>	178,44 $\pm$ 7,31 <sup>b</sup>	128,02 $\pm$ 4,64 <sup>a</sup>
<b>Verde</b>	143,48 $\pm$ 8,13 <sup>a</sup>	78,63 $\pm$ 11,06 <sup>b</sup>

Os resultados são expressos com médias  $\pm$  DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a  $CI_{50}$  expressa em  $\mu\text{g/mL}$  na presença ou ausência de  $\text{Fe}^{2+}$ .

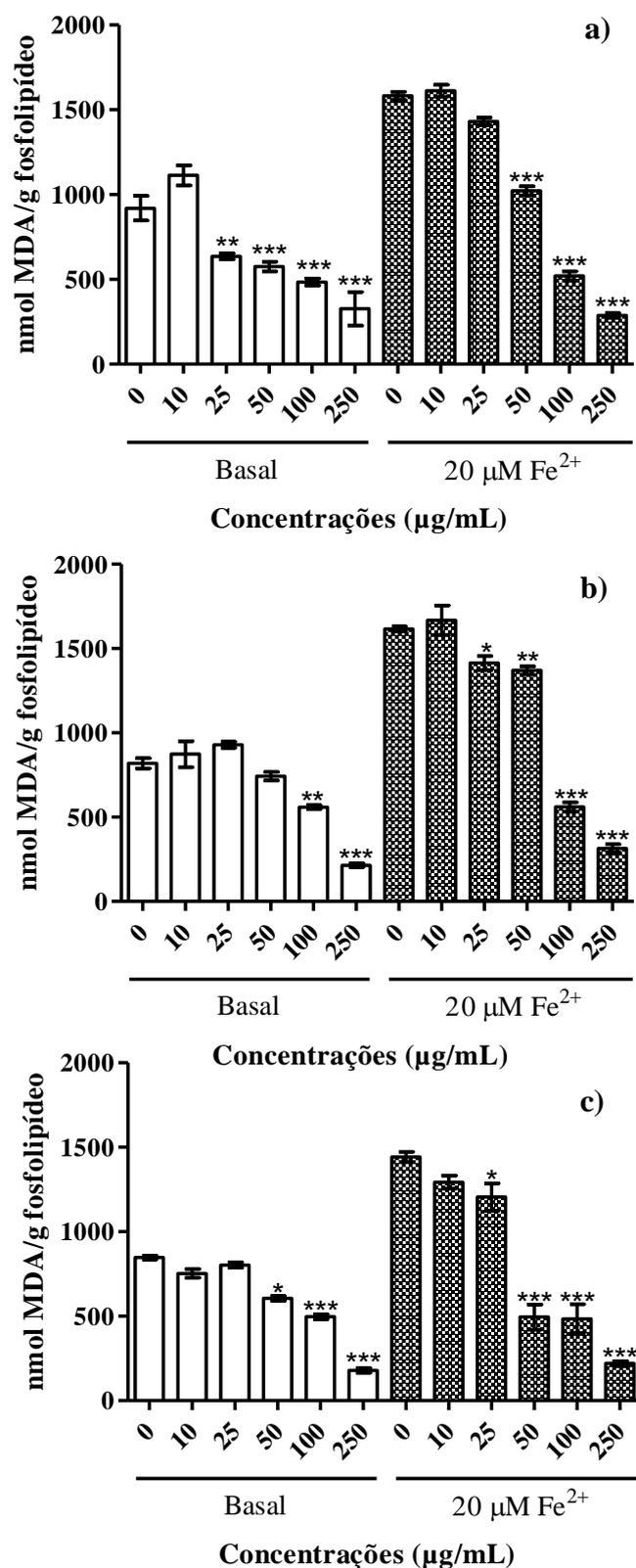
A avaliação da atividade antioxidante através do mecanismo de peroxidação lipídica, utilizando o fosfolípido de ovo, apresentou uma efetiva redução tanto para os níveis basais quanto para o induzido por ferro (Figura 8).

Segundo Oliveira e colaboradores (2012), a redução no teor de vitamina C é inversamente correlacionada com a peroxidação lipídica, indicando que a maturação da acerola é caracterizada por um estresse oxidativo gradual.

De acordo com Yang e colaboradores (2008), os lipídios da membrana celular são altamente susceptíveis à oxidação por EROs e, assim, o estresse oxidativo iria induzir a acumulação de produtos de peroxidação lipídica com MDA.

Uma vez que o grau de peroxidação lipídica pode ser utilizado como um indicador de estresse oxidativo, segundo Oliveira e colaboradores (2012), seria esperado que esse estresse aumentasse à medida que os frutos amadurecessem, resultando na perda da integridade da membrana. Então, essas informações corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, uma vez que, a produção de MDA aumentou à medida que os frutos sofreram o processo de maturação, pelo menos à nível de indução com ferro.

É importante ressaltar que não há relatos na literatura junto da verificação da atividade antioxidante pelo método de TBARS, baseado na produção de MDA.



**Figura 8. Propriedade antioxidante de diferentes frações de *M. glabra*: (a) Fração MeOH do estágio de maturação maduro; (b) Fração MeOH do estágio de maturação intermediário; (c) Fração MeOH do estágio de maturação verde. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada na ausência ou na presença de Fe<sup>2+</sup> (20µM). Os valores são expressos como média ± DP efetuadas em triplicata. \*p<0,05 vs basal; \*\*p<0,01 vs basal; \*\*\*p<0,001 vs basal; \*p<0,05 vs Fe<sup>2+</sup> induzido; \*\*p<0,01 vs Fe<sup>2+</sup> induzido; \*\*\*p<0,001 vs Fe<sup>2+</sup> induzido.**

### 5.10 Atividade inibitória frente à enzima $\alpha$ -glicosidase

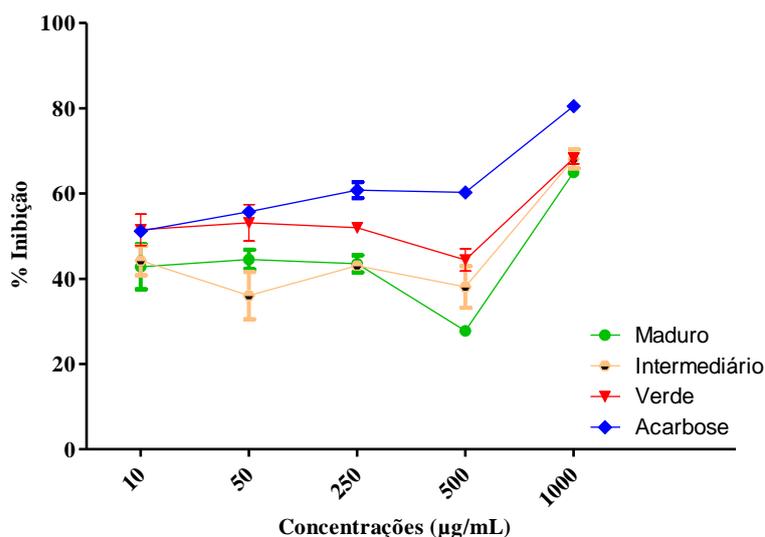
Os valores de  $CI_{50}$  calculados para as frações MeOH das polpas liofilizadas de cada estágio de maturação, mostrou que a  $CI_{50}$  mais significativa foi a encontrada para os frutos verdes, seguido dos frutos intermediários e maduros (Tabela 10).

**Tabela 10.** Valores de  $CI_{50}$  para a fração metanólica de cada um dos estágios de maturação da acerola (*M. glabra*) e acarbose frente à inibição de  $\alpha$ -glicosidase.

Amostra	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$
Acarbose	$< 10 (1,12 \pm 0,56)^a$
Maduro	$666,5 \pm 12,02^b$
Intermediário	$530,0 \pm 14,14^c$
Verde	$83,63 \pm 19,36^d$

Os resultados são expressos com médias  $\pm$  DP e médias seguidas por letras diferentes (a, b, c, d) diferem-se por teste Tukey a  $p < 0,05$ . Os dados são equivalentes a  $CI_{50}$  expressa em  $\mu\text{g/mL}$ .

Em relação à percentagem de inibição, não houve variação significativa entre as amostras testadas, sendo que a fração MeOH dos frutos maduros mostrou-se ligeiramente superior aos estágios intermediário e verde (Figura 9), apesar de que a melhor  $CI_{50}$ , ou seja, o menor valor foi observado para a fração MeOH dos frutos verdes.



**Figura 9.** Percentual de inibição das frações MeOH da polpa liofilizada dos frutos de *M. glabra* nos três estágios de maturação.

Alguns trabalhos tem relatado atividade semelhante como em Hanamura e colaboradores (2005), no qual duas antocianinas (cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo) e um flavonóide (quercetina), isolados de *M. emarginata* apresentaram efeitos inibitórios frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase, porém não-potentes, exceto para quercetina que apresentou 60% de inibição.

Outro estudo avaliou os resíduos de frutas, dentre elas a acerola (*M. emarginata* DC.). Correia e colaboradores (2012), nesse trabalho a acerola apresentou maior conteúdo de compostos bioativos, capacidade antioxidante *in vitro* e inibição de  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase. Também mostrou maior teor de fenóis e ácido ascórbico.

De acordo com Kawaguchi e colaboradores (2007), a aceronidina, um flavonóide isolado dos frutos verdes da acerola (*M. emarginata* DC.) apresentou atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, inibição de  $\alpha$ -amilase e mostrou o melhor resultado quanto à inibição de  $\alpha$ -glicosidase quando comparado a outros flavonóides testados: taxifolia, catequina, isoquercetina e quercetina. Além disso, uma fração polifenólica bruta de acerola teve um efeito preventivo contra a hiperglicemia no estado pós-prandial. No entanto, os efeitos terapêuticos desta fração de acerola em ratos hiperglicêmicos se mostraram insignificantes (HANAMURA *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que há poucos relatos a cerca dessa atividade referente a essa espécie, e menos ainda quando se trata de diferentes estágios de maturação.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos frutos de *M. glabra* foi possível obter as polpas de cada um dos estágios de maturação com características visualmente distintas. E a partir da polpa, o processo de liofilização das polpas, a fim de obter um resíduo seco, também foi bem sucedido.

A obtenção das frações metanólicas dos frutos de cada estágio de maturação permitiu a seleção de constituintes químicos polares presentes nos frutos, a fim de se obter resultados mais eficientes.

Através da prospecção fitoquímica das polpas liofilizadas foi possível indicar a presença de algumas classes de metabólitos secundários como flavonóides e taninos.

Os valores de pH obtidos foram menores para a polpa dos frutos verdes e, à medida que as amostras sofreram o processo de amadurecimento, os valores de pH foram tornando-se maiores. Os valores de acidez titulável diminuíram à medida que os frutos amadureceram.

Foi observado que a fração MeOH dos frutos verdes possui maior teor de compostos fenólicos e flavonóides quando comparados aos demais estágios de maturação. As polpas dos frutos no estágio maduro e intermediário demonstraram valores similares de compostos fenólicos e flavonóides totais.

A polpa no estágio maduro apresentou maior atividade antioxidante (DPPH) que as polpas dos frutos intermediários e verdes. A atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH mostrou que o maior sequestro foi para a polpa dos frutos verdes, quando comparado ao ácido ascórbico. A menor  $CI_{50}$  obtida foi para os frutos verdes, porém com valor ainda muito superior a  $CI_{50}$  do ácido ascórbico.

A quantificação do teor de vitamina C mostrou-se diferente nas polpas liofilizadas em cada estágio de maturação, apoiando as atividades biológicas demonstradas.

Utilizando fosfolipídeos de ovo, todas as amostras apresentaram capacidade em reduzir a peroxidação, sendo os melhores resultados observados para o nível induzido com ferro.

Em relação à inibição de  $\alpha$ -glicosidase, todas as amostras apresentaram inibição acima de 60% na maior concentração testada, no entanto, a menor  $CI_{50}$  foi encontrada para os frutos verdes.

Através da análise por CLAE, nove compostos entre ácidos fenólicos e flavonóides foram identificados nas três amostras, sendo predominante em todas elas a presença de

rutina e quercetina. Dois carotenóides também foram identificados, sendo o  $\beta$ -caroteno predominante nas três amostras.

Com base nas informações obtidas nesse estudo assim como em vários outros, embora o estágio de maturação mais consumido pelas pessoas seja a fruta no estágio maduro, os frutos no estágio verde são os que apresentam maior teor de compostos bioativos e, conseqüentemente, melhores atividades biológicas.

## REFERÊNCIAS

AHMED, N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 67(1), 3-21, 2005.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114, 325–354, 2007a.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, 113, 156–170, 2007.

ALEXANDRINO, V. H. D.; SOUSA, J. S.; BASTOSI, M. N. C. Estudo taxonômico da família Malpighiaceae Juss. das restingas de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, 6 (3), 335-347, 2011.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 127, 674–684, 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; DEKANSKI, D.; RISTIC, S.; RADONJIC, N. V.; PETRONJEVIC, N. D.; GIAMPIERI, F.; ASTOLFI, P.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; TULIPANI, S.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. **PLoS One**, 6 (10), 1–11, 2011.

ANDERSON, W. R. & C. ANDERSON, 2010. **Herbarium University of Michigan Family Description – Malpighiaceae**. Disponível em: <<http://lsa.umich.edu/herb/malpigh/index.html>>. Acesso em: 24 jun 2013.

ARAÚJO, P. S. R.; MINAMI, K. Acerola. Campinas: **Fundação Cargill**, 1994.

ASANO, N. **Glycobiology**, 13, 93R–104R, 2003.

ASANO, N.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; FLEET, G. W. J. **Tetrahedron: Asymmetry**, 11, 1645–1680, 2000.

ASENJO, C. F.; PENALOZA, A.; MEDINA, P. Characterization of ascorbase present in the fruit of the *Malpighia puniceifolia* L. **The FASEB Journal**, 19, 1–1, 1960.

ASENJO, C.F. Acerola. In: Nagy, S., Shaw, P.E. (Eds.), *Tropical and Sub-tropical Fruits: Composition, Properties and Uses*. **AVI Publications Inc., Westport, CN**, 341–374, 1980.

ASSIS, S. A.; FERNANDES, P. F.; MARTINS, A. B. G.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Acerola: Importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, 63, 93–101, 2008.

BATOOL, F.; SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T.; SHAH, A.H.; SAIFY, Z.S.; AHMED, S.D. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: a commonly used spice from Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, 42 (6), 4299-4311, 2010.

BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**, 44, 1843–1855, 2011.

BIERHAUS, A.; HOFMAN, M.A.; ZIEGLER, R.; NAUROTH, P.P. AgEs and their interaction with AgE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. the AgE concept. **Cardiovascular Research**, 37(3), 586-600, 1998.

BOLIGON A.A.; SAGRILLO M.R.; MACHADO, L.F.; FILHO, O.S.; MACHADO, M.M.; DA CRUZ, I.B.M.; ATHAYDE, M.L. Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. **Molecules**, 17, 5757-5769, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos/Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.-Brasília: **Ministério da Saúde**, 2005.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducción a la bioquímica de los alimentos**. Barcelona: Omega, 1967.

BRAZDOVA, B.; TAN, N. S.; SAMOSHINA, N. M.; SAMOSHIN, V. V. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexane dicarboxylic acids. **Carbohydrate Research**, 344, 311–321, 2009.

BUTT, V. S. **Direct oxidases and related enzymes**. In: Stumpf PK, Conn EE (eds), *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Academic, New York, v. 2, p 81–123, 1980.

CACERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 40, 207–213, 1993.

CAGNONI, A. J.; UHRIG, M. L.; VARELA, O. Synthesis of pentopyranosyl-containing thiodisaccharides. Inhibitory activity against  $\beta$ -glycosidases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, 6203–6212, 2009.

CAMPELO, E.C.S.; MARTINS, M.H.B.; CARVALHO, I.T.; PEDROSA, E.M.R. Teores de vitamina “C” em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas. **B. CEPPA**, Curitiba, 16 (1), 107-113, 1998.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 131, 326–342, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In Coordenação: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

CHOUBDAR, N.; BHAT, R. G.; STUBBS, K. A.; YUZWA, S.; PINTO, B. M. Synthesis of 2-amido, 2-amino, and 2-azido derivatives of the nitrogen analogue of the naturally occurring glycosidase inhibitor salacinol and their inhibitory activities against O-GlcNAcase and NagZ enzymes. **Carbohydrate Research**, 343, 1766–1777, 2008.

COMPAIN, P., MARTIN, O. R., Eds. Recent reviews on glycosidase inhibitors: Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications; Wiley: Chichester, 2007.

CONKLIN, P. L. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Plant, Cell & Environment**, 24, 383–94, 2001.

CORREIA, R. T.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, 18 (6), 539-547, 2012.

DAVIES, G. J.; GLOSTER, T. M.; HENRISSAT, B. **Current Opinion in Structural Biology**, 15, 637, 2005.

DAVIES, G. J.; HENRISSAT, B. **Structure**, 3, 853, 1995.

DEGUCHI, Y.; OSADA, K.; UCHIDA, K.; KIMURA, H.; YOSHIKAWA, M.; KUDO, T.; YASUI, H.; WATANUKI, M. Effects of extract of Guava leaves on the development of diabetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects. *Nippon Nōeigekagaku kaishi* (in Japanese), 72, 923-931, 1998.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, 44, 1671–1701, 2011.

DESCHAMP, J.; MONDON, M.; NAKAGAWA, S.; KATO, A.; ALONZI, D. S.; BUTTERS, T. D.; ZHANG, Y.; SOLLOGOUB, M.; BLÉRIOT, Y. Towards a stable neuromycin analog with a D-manno configuration: Synthesis and glycosidase inhibition of D-manno-like tri- and tetrahydroxylated azepanes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 20, 641–649, 2012.

DODDI, V. R.; KANCHARLA, P. K.; REDDY, Y. R.; KUMAR, A.; VANKAR, Y. D. Synthesis of fused pyran-carbahexopyranoses as glycosidase inhibitors. **Carbohydrate Research**, 344, 606–612, 2009.

DONG, W. L.; JESPERSEN, T.; BOLS, M.; SKRYDSTRUP, T.; SIERKS, M. R. **Biochemistry**, 35, 2788–2795, 1996.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; FENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Dql**, 26(2), 452, 2006.

DWEK, R. A. **Chemical Reviews**, 96, 683–720, 1996.

ELTAYEB, A. E.; KAWANO, N.; BADAWI, G. H.; KAMINAKA, H.; SANEKATA, T.; MORISHIMA, I. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. **Plant Physiology**, 127, 57–65, 2006.

ELTELIB, H. A.; BADEJO, A. A.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). **Journal of Plant Physiology**, 168, 619–627, 2011.

ERICKSON, J. S.; RADIN, N. S. J. Some aspects of the influence of lipophilic groups upon the glycosidase inhibitory activity was studied in: **The Journal of Lipid Research**, 14, 133–137, 1973.

FERREIRA, R. M. A.; SOUZA, P. A.; QUEIROZ, R. F.; PONTES FILHO, F. S. T. Ponto de Colheita da Acerola visando a Produção Industrial de Polpa. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura**, 4 (2), 13-16, 2009.

FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. **Mutation Research**, 583, 75–84, 2005.

FUJISAWA, T.; IKEGAMI, H.; INOUE, K.; KAWABATA, Y.; OGIHARA, T. **Metabolism**, 54, 387, 2005.

GOMEZ, P.; REYNES, M.; DORNIER, M.; HEBERT, J. P. The West Indian cherry: A valuable and natural source of vitamin C. **Fruits**, 54, 247–260, 1999.

GONZAGA, N.; AMARAL, M. G.; SAUERESSIG, M. E. Enxertia por garfagem e borbulhia em acerola sobtelado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 31, 635–638, 1996.

GOPALKRISHNAPILLAI, B.; NADANATHANGAM, V.; KARMAKAR, N.; ANAND, S.; MISRA, A. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advance glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes. **Diabetes**, 52, 1041-1046, 2003.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H.; Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 69 (2), 280-286, 2005.

HANAMURA, T.; MAYAMA, C.; AOKI, H.; HIRAYAMA, Y.; SHIMIZU, M. Antihyperglycemic effect of polyphenols from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70, 1813–1820, 2006.

HANAMURA, T.; USHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and agriculture**, 88, 1813–1820, 2008.

HARA, Y.; HONDA, M. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. **Agricultural and Biological Chemistry**, 54, 1939-1945, 1990.

HERSCOVICS, A. In: **Comprehensive Natural Products Chemistry**; Pinto, B. M., Barton, D. H. R., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Eds.; Elsevier: UK, v. 3, 1999.

HERTOG, M.G.L. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. **Proceeding sof the Nutrition Society**, 55, 385-397, 1996.

HOLMAN, R. R.; CULL, C. A.; TURNER, R. C. **Diabetes Care**, 22, 960–964, 1999.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Aliment Nutrition**, 19 (1), 97–108, 2008.

HUMPHRIES, M. J.; MATSUMOTO, K.; WHITE, S. L.; OLDEN, K. **Cancer Research**, 46, 5215, 1986.

HUNG, H. C.; JOSHIPURA, K. J.; JIANG, R.; HU, F. B.; HUNTER, D.; SMITH-WARNER, S. A.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, 96, 1577–1584, 2004.

JACOB, G. S. **Current Opinion in Structural Biology**, 5, 605–611, 1995.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, 53(2), 131-42, 2004.

JANOVIK V.; BOLIGON A.A.; ATHAYDE M.L. Antioxidant activities and HPLC/DAD analysis of phenolics and carotenoids from the barks of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Research Journal of Phytochemistry**, 6 (4), 105-112, 2012.

JAWAHEER, B.; GOBURDHUM, D.; RUGOO, A. Effect of processing and storage of guava into jam and juice on ascorbic acid content. **Plant Foods for Human Nutrition**, 51, 1–12, 2003.

JENKIS, D. J.; KENDALL, C. W.; AUGUSTIN, L. S.; MARTINI, M. C.; AXELSEN, M.; FAULKNER, D.; VIDGEN, E.; PARKER, T.; LAU, H.; CONNELLY, P. W.; TEITEL, J.; SINGER, W.; VANDENBROUCKE, A. C.; LEITER, L. A.; JOSSE, R. G. Effect of wheat bran on glycemic control and risk factors for cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 25, 1522-1528, 2002.

JIMENEZ, A.; GOMEZ, J. M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40, 515–520, 2002.

JOHNSON, P. D. Acerola (*Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L., *Malpighia emarginata* DC.): Agriculture, production and nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, 91, 67–75, 2003.

JURANIC, Z.; ZIXACK, Z. Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. **BioFactors**, 23, 207–211, 2005.

KAMEDA, Y.; ASANO, N.; YOSHIKAWA, M.; TAKEUCKI, M.; YAMAGUCHI, T.; MATSUI, K.; HORII, S.; FUKASE, H. J. **Antibiotics**, 37, 1301, 1984.

KANEYUKI, T.; NODA, Y.; TRABER, M. G.; MORI, A.; PACKER, L. Superoxide anion and hydroxyl radical scavenging activities of vegetable extracts measured using electron spin resonance. **Biochemistry and molecular biology international**, 47, 979-989, 1999.

KATO, N.; ESAKA, M. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. **Planta**, 210, 1018–22, 2000.

KAWAGISHI, H.; FUKUMOTO, Y.; HATAKEYAMA, M.; HE, P.; ARIMOTO, H.; MATSUZAWA, T.; ARIMOTO, Y.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; SUGIYAMA, K. Liver injury suppressing compounds from Avocado (*Persea americana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2215-2221, 2001.

KAWAGUCHI, M.; TANABE, H.; NAGAMINE, K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2''-glycosidic linkage from green mature acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 71 (5), 1130-1135, 2007.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELIÖVAARA, M.; TEPPONEN, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, 146, 223-230, 1997.

KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, M.; SATSU, H.; ARAI, S.; HARA, Y.; SUZUKI, K.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 5618-5623, 2000.

KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELINIAK, S.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharmaceutica**, 54, 65–72, 2004.

- KUSAMRAN, W. R.; TEPSWAN, A.; KUPRADINUN, P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. **Mutation Research**, 402, 247–258, 1998.
- LEGLER, G. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 48, 319–384, 1990.
- LEME JUNIOR, J.; MALAVOLTA. Determinação fotométrica do ácido ascórbico. **Anais da E. S. A. “Luiz de Queiroz”**, 1950.
- LEVINE, M.; RUMSEY, S. C.; DARUWALA, R.; PARK, J. B.; WANG, Y. **JAMA**, 281, 1415-1423, 1999.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, 23, 101–103, 2003.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G.; MUSSER, R. S.; LIMA, D. E. S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, 90, 565–568, 2005.
- LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E. **FEBS Journal**, 274, 1-22, 2007.
- LIU, J.P.; PENG, X. R.; LI, X. Y.; LI, T. Z.; ZHANG, W. M.; SHI, L.; HAN, J.; QIU, M. H. Norfriedelins A-C with acetylcholinesterase inhibitory activity from acerola tree (*Malpighiaemarginata*). **Organicletters**, 15 (7), 1580-1583, 2013.
- MACHADO, U. D. Nordeste-EMBRAPA: Relatório: Avaliaçãoe proposições. **Sindicato Nacional dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário**, Brasília, 1992.
- MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 50 (1), 5–18, 2000.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, Edições UFC, 2 ed., 1997.

MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. **Current Opinion in Structural Biology**, 4, 885, 1994.

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M. R.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; DE CINDIO, B.; HOUGHTON, P. J.; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, 114, 553–560, 2009.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15 (2), 127-130, 2001.

MEZADRI, T.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. El fruto de la acerola: composición y posibles usos alimenticios. **Archivos Latinoamericanos Nutrición**, 56, 101–109, 2006.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 282–290, 2008.

MEZQUITA, P. C.; VIGOA, Y. G. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en ácido ascórbico. **Alimentaria**, 1, 113–125, 2000.

MEZQUITA, P.C.; VIGOA, Y.G. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en ácido ascórbico. **Alimentaria**, 1, 113–125, 2000.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumorpromoting activity of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43, 2779-2783, 1995.

NAGAMINE, I.; AKIYAMA, T.; KAINUMA, M.; SATOH, H.; YAMADA, K.; YANO, T.; SAKURAI, H. Effect of acerola cherry extract on cellproliferation and activation of Ras signal pathway at the promotion stage of lung tumorigenesis in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 48, 69–72, 2002.

NAGAPRASHANTHA, L. D.; VATSYAYAN, R.; SINGHAL, J.; FAST, S.; ROBY, R.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**, 82, 1100– 1109, 2011.

NAKAMURA, Y. K.; SUGANUMA, E.; KUIJAMA, N.; SATO, K.; OHTSUKI, K. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 62, 1161–1165, 1998.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**, 50, 1–7, 2004.

NISHIKIMI, M.; KOSHIZAKA, T.; OZAWA, T.; YAGI, K. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 267, 842-846, 1988.

NJOROGE, F.G.; FERNANDES, A.A.; MONNIER, V.M. Mechanism of formation of the putative advanced glycosylation end product and protein cross-link 2-(2-furoyl)-4 (5)-(2-furanyl)-1*H* imidazole. **The Journal of Biological Chemistry**, 263, 10646-10652, 1988.

NOGUEIRA, M. E. I.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I.; LONGO, M. C.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro**, 20, 361–366, 2006.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; SILVA-JR, F. S. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37 (4), 463–470, 2002.

NUNE, X.P.; MESQUITA, R.F.; SILVA, D.A.; LIRA, D.P.; COSTA, V.C.O.; SILVA, M.V.B.; XAVIER, A.L.; DINIZ, M.F.F.M.; AGRA, M.F. Constituintes químicos, avaliação

das atividades citotóxicas e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18 (1), 718-723, 2008.

NUNES, R. S.; KAHL, V. F. S.; SARMENTO, M. S.; RICHTER, M. F.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RODRIGUES, F. A. R.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; MARTINEZ, M. M.; FERRONATTO, S.; FERRAZ, A. B. F.; SILVA, J. Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at different stages of ripeness. **Plant Foods for Human Nutrition**, 66, 129-135, 2011.

NUNES, R. S.; SILVA, K. V. F.; SARMENTO, M. S.; RICHTER, M. F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; MARTINEZ, M. M.; FERRAZ, A. B. F.; SILVA, J. Genotoxic and antigenotoxic activity of acerola (*Malpighia glabra* L.) extract in relation to the geographic origin. **Phytotherapy research: PTR (Unidade: PROPPG)**, 2012.

OLIVEIRA, L. S.; MOURA, C. F. H.; BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; MIRANDA, M. R. A. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*Malpighia emarginata* D.C) clones. **Journal of agricultural and food chemistry**, 60, 7957-7964, 2012.

OYA, T.; HATTORI, N.; MIZUNO, Y.; MIYATA, S.; MAEDA, S.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. Methylglyoxal modification of protein. **The Journal of Biological Chemistry**. 274, 18492-18502, 1999.

PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; KANG, S. G.; DRZEWIECKI, J.; NAMIESNIK, J.; HARUENKIT, R.; et al. In vitro studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 57, 107–122, 2006.

PILI, R.; CHANG, J.; PARTIS, R. A.; MUELLER, R. A.; CHREST, F. J.; PASSANITI, A. **Cancer Research**, 55, 2920, 1995.

PINO, J. A.; MARBOT, R. Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 5880–5882, 2001.

PISTIA-BRUEGGEMAN, G.; HOLLINGSWORTH, R. I. **Tetrahedron**, 57, 8773–8778, 2001.

PRIOR, R. L., CAO, G., MARTIN, A., SOFIC, E., MCEWEN, J., O'BRIEN, C., LISCHNER, N., EHLENFELDT, M., KALT, W., KREWER, G., & MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(7), 2686–2693, 1998.

PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain *in vitro*. **Neurochemical Research**, 30 (2), 225-235, 2005.

RIBEIRO, J. E. L. S., M. J. G. HOPKINS, A. VICENTINI, C. A. OTHERS, M. A. S. COSTA, J. M. BRITO, M. A. D. SOUZA, L. H. P. MARTINS, L. G. LOHMANN, P. A. C. L. ASSUNÇÃO, E. C. PEREIRA, C. F. SILVA, M. R. MESQUITA & L. C. PROCÓPIO. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central: 1-816. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, 1999.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M.; CARRARO, F. Chemical and antioxidant activity of juices from mature and immature acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Food Science and Technology International**, 11:315–321, 2005.

ROBINSON, K. M.; BEGOVIC, M. E.; RHINEHART, B. L.; HEINEKE, E. W.; DUCEP, J. B.; KASTNER, P. R.; MARSHALL, F. N.; DANZIN, C. **Diabetes**, 40, 825, 1991.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 1999.

SABIR S.M.; AHMAD S.D.; HAMID, A.; KHAN, M.Q.; ATHAYDE, M.L. SANTOS, D.B.; BOLIGON, A.A.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, 741-747, 2012.

SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct *in vitro* antioxidant and *in vivo* hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, 111, 845-851, 2008.

SCHIPPA, C.; GEORGE, G.; FELLOUS, R. Constituents volatils de l'acérola. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 113, 81–84, 1993.

SCHMIDT, D. D.; FROMMER, W.; JUNGE, B.; MULLER, W.; WINGENDER, W.; TRUSCHEIT, E.; SCHAFTER, D. *Naturwissenschaften*, 64, 535–536, 1977.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; MEJIA, E. G. Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 233–246, 2010.

SEERAM, N. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 627–629, 2008.

SHIMIZU, H.; TSUCHIE, H.; YOSHIDA, K.; MORIKAWA, S.; TSURUOKA, T.; YAMAMOTO, H.; USHIJIMA, H.; KITAMURA, T. *AIDS*, 4, 975, 1990.

SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YAAKOV, I.; MATITYAHU, I.; BAR-ILA, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during thematuration and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry*, 115, 965–973, 2009.

SILVA C. G., HERDEIRO R. S., MATHIAS C. J., PANEK A. D., SILVEIRA C. S., RODRIGUES V. P., RENNÓ M. N., FALCÃO D. Q., CERQUEIRA D. M., MINTO A. B. M., NOGUEIRA F. L. P., QUARESMA C. H., SILVA J. F. M., MENEZES F. S., ELEUTHERIO E. C. A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52, 229-233, 2005.

SINGH, D. R.; SINGH, S.; SALIM, K. M.; SRIVASTAVA, R. C. Estimation of phytochemicals and antioxidant activity of underutilized fruits of Andaman Islands (India). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63 (4), 446-452, 2012.

SINGH, D. R.; SINGH, S.; SALIM, K. M.; SRIVASTAVA, R. C. Estimation of phytochemicals and antioxidant activity of underutilized fruits of Andaman Islands (India). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(4), 446-52, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 299, 152-178, 1999.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N. Nutrition: concepts and controversies, 9th. **European Diabetes Nursing**. Thompson Wadsworth, Belmont, 2003.

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**, 78, 661–9, 1996.

SOU, S.; TAKAHASHI, H.; YAMASAKI, R.; KAGECHIKA, H.; ENDO, Y.; HASHIMOTO, Y. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 49, 791, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II: 1-704. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 2008.

SPEIRS, J.; BRADY, C. J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Australian Journal of Plant Physiology**, 18, 519–532, 1991.

STEVENS, R.; BURET, M.; DUFFÉ, P.; GARCHERY, C.; BALDET, P.; ROTHAN, C. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. **Plant Physiology**, 143, 1943–53, 2007.

STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 6, 205-228, 1995.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health promoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 63, 147–156, 2008.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 7, 1089–1099, 2008.

THORMALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochemical Journal**, 344, 109-116, 1999.

TOCCHINI, R. P.; MORI, E. E. M.; FERREIRA, V. L. P. Efeito do processamento térmico e do tipo de embalagem na qualidade do suco de laranja concentrado e pasteurizado. **Bulletin ITAL**, Campinas, 21 (1), 61-71, 1984.

TORRES, C. A.; ANDREWS, P. K. Developmental changes in antioxidant metabolites, enzymes, and pigments in fruit exocarp of four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes:  $\beta$ -carotene, high pigment-1, ripening inhibitor and 'Rutgers'. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44 (11-12), 806-818, 2006.

TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; BUSCO, F.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. **Food Chemistry**, 128, 180-186, 2011.

UCHIDA, E.; KONDO, Y.; AMANO, A.; AIZAWA, S.; HANAMURA, T.; AOKI, H.; NAGAMINE, K.; KOIZUMI, T.; MARUYAMA, N.; ISHIGAMI, A. Absorption and excretion of ascorbic acid alone and in acerola (*Malpighia emarginata*) juice: comparison in Healthy Japanese subjects. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 34 (11), 1744-1747, 2011.

VALAVANIDIS, A.; RALLIS, M.; PAPAIOANNOU, G.; XENOS, M.; KATSAROU, A. Studies *in vivo* by electron spin resonance of free radical mechanisms implicated in UV-induced skin photocarcinogenesis. **International Journal of Cosmetic Science**, 17, 157-163, 1995.

VARKI, A.; CUMMING, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1999.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, 71, 195-198, 2000.

VINSON, J. A.; BOSE, P. Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 48 (3), 601-604, 1988.

WAKABAYASHI, H.; FUKUSHIMA, H.; YAMADA, T.; KAWASE, M.; SHIRATAKI, Y.; SATOH, K.; TOBE, T.; HASHIMOTO, K.; KURIHARA, T.; MOTOHASHI, N.;

SAKAGAMI, H. Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by Barbados cherries, a fruit of *Malpighia emarginata* DC. **Anticancer Research**, 23, 3237–3241, 2003.

WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 66, 19-30, 1996.

WU, Y.; YANG, J.-H.; DAI, G.-F.; LIU, C.-J.; TIAN, G.-Q.; MA, W.-Y.; TAO, J.-C. Stereoselective synthesis of bioactive isosteviol derivatives as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, 1464–1473, 2009.

YAMADA, H.; MIYATA, S.; IGAKI, N.; YATABE, H.; MIYAUCHI, Y.; OHARA, T.; SAKAI, M.; SHODA, H.; OIMOMI, M.; KASUGA, M. Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, 269, 20275-20280, 1994.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.-T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21, 381-406, 2001.

YANG, Z.; ZHENG, Y.; CAO, S. Effect of high oxygen atmosphere storage on quality, antioxidant enzymes, and DPPH-radical scavenging activity of Chinese bayberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 176–181, 2009.

ZAFRA-STONE. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. **Nutrition Molecular & Research Food**, 51, 675–683, 2007.

ZECHEL, D. L.; WITHERS, S. G. **Accounts of Chemical Research**, 33, 11, 2000.

ZHANG, X.; KOO, J.; EUN, J. B. Antioxidant activities of methanol extracts and phenolic compounds in Asian pear at different stages of maturity. **Food Science and Biotechnology**, 15 (1), 44-50, 2006.

ZHOU, H.; XING, J.; LIU, S.; SONG, F.; CAI, Z.; PI, Z.; LIU, Z.; LIU, S. Screening and Determination for Potential  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors from Leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by Using UF-LC/MS and ESI-MS. **Phytochemical Analysis**, 24, 315-323, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In Coordenação: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.