

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

HÉVERTON MENDES ARAÚJO

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E TEORES DE COMPOSTOS
FENÓLICOS, FLAVONÓIDES, VITAMINA C E VOLÁTEIS DE *Psidium guajava*
EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

CRATO, CE

2013

HÉVERTON MENDES ARAÚJO

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E TEORES DE COMPOSTOS
FENÓLICOS, FLAVONÓIDES, VITAMINA C E VOLÁTEIS DE *Psidium guajava*
EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para a 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

CRATO, CE

2013

HÉVERTON MENDES ARAÚJO

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E TEORES DE COMPOSTOS
FENÓLICOS, FLAVONÓIDES, VITAMINA C E VOLÁTEIS DE *Psidium guajava*
EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA EM 25/07/2013
RESULTADO: APROVADO

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior (Avaliador Interno)
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Jefferson Queiroz Lima (Avaliador Externo)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará- IFCE

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Suplente)
Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO, CE

2013

Aos meus pais Aílton e Flávia
Aos meus irmãos Hudson e Bianca
Aos meus familiares e amigos

AGRADECIMENTOS

À Deus por me presentear com a vida, com uma família amorosa, com a capacidade de pensar e vontade de vencer.

À meus pais, Aílton e Flávia pelo amor, carinho, educação e pela aposta que em mim fizeram, sem medo da derrota em momento algum. Devo a eles o que sou.

Aos meus irmãos mais novos, Hudson e Bianca, pessoas especiais sempre ao meu lado me incentivando e apoiando nas minhas decisões.

À minha família, fonte de amor e ensinamentos honrados que levarei por toda a vida.

Aos meus amigos de infância, Ana Lys, Augusto, Carlos Henrique, Lorena, Natália e Paula pelo apoio de sempre, por compartilharem desde os 10 anos de idade a difícil tarefa que é estudar e por tantos momentos de união e diversão que tivemos e teremos.

Aos meus amigos João, Jônatas, Filipe, Gabriel, Gustavo pelas noites e noites de intensa curtidão.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Galberto Martins da Costa, pela oportunidade que me deu ao aceitar me orientar ainda na seleção e após, pelo acolhimento, conversas, conselhos, formação e paciência.

Ao meu co-orientador Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes pela parceria firmada que foi fundamental para realização deste trabalho

À minha amiga e uma das grandes responsáveis pela minha conclusão do curso de mestrado Eidla Mikaelle Maciel do Nascimento, não conto as vezes em que você me ajudou e esteve ao meu lado nos melhores e também nos momentos mais estressantes. Paciência não faltou além de muito companheirismo.

Aos meus amigos e companheiros de LPPN, Professora Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Camila Miris, Camila Nobre, Erlânio Oliveira Sousa, Fábio Fernandes Galvão Rodrigues, George Souza Feitoza, Leonardo Brasil, Neyrilane

Torquato, Professora. Sandra Mara Duavy, Valéria Cristina, Victor Alves, Walmir Emanuel Miranda Cunha.

À minha turma de mestrado, Alison, Ana Luiza, Damiana, Daniele, Delmacia, Eidla, Ivna, Laura, Mayara, Ronaldo, Sara, Simone pela amizade e ajuda durante todo esse tempo de curso.

À Professora Margareth Linde Athayde e Aline Augusti Boligon do Laboratório de fitoquímica da Universidade Federal de Santa Maraia.

A Universidade Regional do Cariri por me proporcionar uma formação a nível de pós-graduação na minha cidade natal, motivo de muito orgulho para mim.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isto é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

(Carl Sagan)

RESUMO

O combate à formação de espécies reativas de oxigênio é fundamental a saúde humana. Formados naturalmente na mitocôndria durante os processos de respiração celular, o seu excesso é prejudicial e está associado ao surgimento de doenças crônicas. Como mecanismo de defesa, o organismo dispõe de substâncias antioxidantes responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio, exemplificadas por enzimas e vitaminas. Além destes, em produtos de origem natural já foram identificados compostos com tal atividade tornando-os fonte alternativa de obtenção. A goiabeira (*Psidium guajava*), planta comum no Cariri cearense, assim como em todo o mundo, contém alta concentração de compostos bioativos e em muitas comunidades suas partes são usadas com fins terapêuticos. Estudos descrevem ações antioxidante, antimicrobiana e antidiarreica de extratos obtidos das folhas, mas informações a respeito das atividades dos frutos e comparação destes em diferentes estágios de maturação (verde, intermediário e maduro) são escassos. O presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes quantificando os teores de compostos fenólicos, flavonóides, vitamina C e voláteis dos frutos de *Psidium guajava* em diferentes estágios de maturação. Os teores de compostos fenólicos para os frutos verde, intermediário e maduro foram, respectivamente, 22,41, 34,61 e 32,92 mg de Ácido gálico/g fração. Os teores de flavonóides para os frutos verde, intermediário e maduro foram, respectivamente, 2,83, 5,1 e 5,65 mg de Rutina/g fração. Os teores de ácido ascórbico para os frutos verde, intermediário e maduro foram, respectivamente, 0,48, 0,38 e 0,21 mg de Ácido ascórbico/g fração. A composição química do óleo essencial indicou a presença de 14 compostos sendo majoritários o α -terpineol, 1,8-cineol e β - cariofileno. A análise por CLAE identificou a presença de ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, campferol e campferol glicosilado, tocoferol, licopeno e β -caroteno. A atividade antioxidante realizada pelo método do DPPH apontou o fruto maduro como de melhor resultado, ao passo que, a quelação de íons Fe^{2+} apresentou maior porcentagem para o fruto verde. Os resultados obtidos pelo peroxidação lipídica não foram satisfatórios.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, estágios de maturação, óleo essencial, atividade antioxidante.

Abstract

The combat formation of reactive oxygen species is essential to human health. Naturally formed in mitochondria during the process of cellular respiration, its excess is harmful and is associated with the development of chronic diseases. As a defense mechanism, the body has antioxidants substances responsible for the neutralization of reactive oxygen species, exemplified by enzymes and vitamins. In addition, in natural products have been identified compounds with antioxidant activity making them an alternative source of obtaining. Guava (*Psidium guajava*), a Cariri cearense common plant, as well as throughout the world, has a high concentration of bioactive compounds. In many communities, their parts are used for therapeutic purposes. Studies describe antioxidant, antimicrobial and antidiarrheal activities of extracts obtained from the leaves but information about the fruits activities and comparison of these at different stages of ripening (green, intermediate and mature) are scarce. The present study aims to evaluate the antioxidant properties quantifying the content of phenolic compounds, flavonoids, vitamin C and volatile compounds of *Psidium guajava* fruits in different stages of maturation. The total phenolic content in unripe, intermediate and ripe fruits were, respectively, 22.41, 34.61 and 32.92 mg of Galic Acid/g fraction. The total flavonoids content in unripe, intermediate and ripe fruits were, respectively, 2.83, 5.1 and 5.65 mg of Rutin/g fraction. The ascorbic acid content in unripe, intermediate and ripe fruits were, respectively, 0.48, 0.38 and 0.21 mg of Ascorbic Acid/g fraction. The chemical composition of the essential oil indicated the presence of 14 compounds and the majority are α -terpineol, 1,8-cineole and β - caryophyllene. HPLC analysis identified the presence of gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid epicatechin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin, kaempferol and campeferol glycosylated, tocopherol, lycopene and β -carotene. The antioxidant activity performed by the DPPH method showed the ripe fruit as best result, whereas chelation of Fe^{2+} had a higher percentage for the unripe fruit. The results for lipid peroxidation were not satisfactory.

Keywords: *Psidium guajava*, stages of maturations, essential oil, antioxidant activity.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1: Redução do O_2 com ganho de 4 elétrons até formação da água. São formadas EROS como intermediários entre as reações. 25
- Esquema 2: Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica. 32
- Esquema 3: Sincronia de atuação entre as enzimas antioxidantes. O $O_2^{\bullet-}$ formado na fosforilação oxidativa é dismutado pela SOD formando H_2O_2 . As enzimas CAT e GSH-Px reduzem o H_2O_2 formado a H_2O e O_2 . A enzima GSH-Px oxida GSH a GSGS que posteriormente é reduzida pela GSH-Rd dependente de NADPH. 34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura básica flavonóides. 38
- Figura 2: Partes aéreas de *Psidium guajava*. A- Árvore inteira; B- Tronco, galhos e folhas; C- Folhas e flores D- Galhos com folhas e frutos intermediários. 43
- Figura 3: Frutos de *Psidium guajava* em três estágios de maturação A- Verde; B- Intermediário; C-Maduro. 55
- Figura 4: Corte transversal dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação: A- Verde; B- Intermediário; C- Maduro. A coloração das polpas varia da cor branca no estágio verde passando por rosa no estagio intermediário até a cor vermelha no estágio maduro. 56
- Figure 5: Perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde (a), Intermediário (b) e Maduro (c) para fenóis e flavonóides. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), epicatequina (pico 5), rutina (pico 6), quercitrina (pico 7), isoquercitrina (pico 8), quercetina (pico 9), campferol (pico 10) e campeferol glicosilado (pico 11). 61
- Figura 6: Estruturas químicas dos compostos identificados nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde, Intermediário e Maduro. 62
- Figura 7: Perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde (a), Intermediário (b) e Maduro (c) para carotenóides. Tocoferol (pico 1), licopeno (pico 2), β -caroteno (pico 3). 64
- Figura 8: Estruturas químicas dos carotenóides identificados nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde, Intermediário e Maduro. 65
- Figura 9: Gráficos resultantes da análise da peroxidação lipídica induzida e as propriedade antioxidante das frações metanólicas dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro dos frutos de *Psidium guajava*. 73

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares “p” do oxigênio nos estados excitado singleto ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental tripleto ($^3\Sigma_g^-$). | 27 |
| Tabela 2: Rendimentos dos processos de liofilização e fracionamento | 53 |
| Tabela 3: Classes de metabólitos secundários identificados. | 55 |
| Tabela 4: Valores de pH e acidez titulável para os frutos de <i>Psidium guajava</i> nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro | 56 |
| Tabela 5: Teor de Ácido ascórbico em diferentes estágios de maturação. | 57 |
| Tabela 6: Teor de Fenóis e Flavonóides Totais em diferentes estágios de maturação. | 58 |
| Tabela 7: Composição de fenóis e flavonoides de das frações metanólicas de frutos de <i>Psidium guajava</i> nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro. | 63 |
| Tabela 8: Composição de carotenóides das frações metanólicas de frutos de <i>Psidium guajava</i> nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro. | 66 |
| Tabela 9: Composição química (%) do óleo essencial das folhas de <i>Psidium guajava</i> . | 68 |
| Tabela 10: Valores da concentração inibitória a 50% (CI ₅₀ µg/mL) para as frações metanólicas dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro de <i>Psidium guajava</i> obtidos por meio de reação com o radical livre DPPH. | 69 |
| Tabela 11: Porcentagem de Fe ²⁺ quelado pela fração metanólica dos frutos de <i>Psidium guajava</i> no estágio de maturação verde, intermediário e maduro. | 70 |

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1: Obtenção dos óleos essenciais das folhas e obtenção dos extratos aquosos das polpas de *Psidium guajava* nos três estágios de maturação. 44
- Fluxograma 2: Obtenção das frações metanólicas das polpas liofilizadas de *Psidium guajava* em três estágios de maturação. 45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeitos de diferentes concentrações das frações metanólicas dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro de *Psidium guajava* frente ao radical DPPH.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| AA | Ácido ascórbico |
| AG | Ácido gálico |
| Asc ^{•-} | Ascorbila |
| AscH ⁻ | Ascorbato |
| CAT | Catalase |
| CE ₅₀ | Concentração efetiva capaz de inibir 50% |
| CG/EM | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DNA | Desoxyribonucleic acid (Ácido desorribonucléico) |
| D.P. | Desvio padrão |
| DPPH | 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) |
| ERNS | Espécies reativas de nitrogênio |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| GS-SG | Glutaciona dissulfito |
| GS [•] | Glutaciona na forma oxidada |
| GSH-Px | Glutaciona peroxidase |
| GSH-Rd | Glutaciona redutase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| IR | Índice de retenção |
| LH | Cadeia poli-insaturada fosfolipídica |
| L [•] | Radical fosfolipídico |

| | |
|-------------------|---|
| LOH | Espécie reativa de origem fosfolipídica |
| LOO• | Radical peroxil derivado de fosfolipídio |
| LPO | Lipoperoxidação |
| LPPN | Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais |
| MDA | Malondialdeído |
| NADP ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato oxidado |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato reduzido |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| RL | Radicais livres |
| rpm | Rotações por minuto |
| RUT | Rutina |
| P.A. | Pureza analítica |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBARS | Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| tR | Tempo de retenção |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Resumo | I |
| Abstract | II |
| Lista de Esquemas | III |
| Lista de Figuras | IV |
| Lista de Tabelas | V |
| Lista de Fluxogramas | VI |
| Lista de Gráficos | VII |
| Lista de Símbolos e Abreviaturas | VIII |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 Objetivo Geral | 23 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 24 |
| 3.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio | 24 |
| 3.1.1 Oxigênio singleto | 27 |
| 3.1.2 Radical superóxido | 27 |
| 3.1.3 Peróxido de hidrogênio | 28 |
| 3.1.4 Radical hidroxil | 28 |
| 3.1.5 Óxido Nítrico | 29 |
| 3.2 Estresse Oxidativo | 30 |
| 3.2.1 Alvos celulares das EROS | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Defesas Antioxidantes | 32 |
| 3.3.1 Antioxidantes enzimáticos | 33 |
| 3.3.1.1 Glutationa reduzida | 33 |
| 3.3.1.2 Superóxido dismutase | 34 |
| 3.3.1.3 Catalase | 34 |
| 3.3.1.4 Glutationa peroxidase | 35 |
| 3.3.1.5 Glutationa redutase | 35 |
| 3.3.2 Antioxidantes não enzimáticos | 35 |
| 3.3.2.1 Vitamina C | 36 |
| 3.3.2.2 Compostos fenólicos e flavonóides | 37 |
| 3.4 <i>Psidium guajava</i> | 40 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 Material Vegetal | 43 |
| 4.2 Preparação dos Extratos | 44 |
| 4.3 Obtenção do Óleo Essencial das Folhas | 46 |
| 4.4 Análises Físico-Químicas | 46 |
| 4.4.1 Determinação do pH e acidez | 46 |
| 4.4.2 Prospecção fitoquímica | 46 |
| 4.4.3 Análise da composição química do óleo essencial em CG/EM | 47 |
| 4.4.4 Determinação de fenóis totais | 47 |
| 4.4.5 Determinação de flavonóides totais | 48 |
| 4.4.6 Determinação de ácido ascórbico | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5 Análise por CLAE | 49 |
| 4.5.1 Química, aparelhos e procedimentos em geral | 49 |
| 4.5.2 Quantificação de compostos fenólicos por CLAE | 49 |
| 4.5.1 Quantificação de compostos carotenóides por CLAE | 50 |
| 4.6 Atividade Antioxidante | 51 |
| 4.6.1 Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) | 51 |
| 4.6.2 Capacidade de quelação de íons Fe^{2+} | 51 |
| 4.6.3 Determinação da inibição da peroxidação lipídica | 52 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 5.1 Rendimentos | 53 |
| 5.2 Análises Físico-Químicas | 54 |
| 5.2.1 Prospecção fitoquímica | 55 |
| 5.2.2 pH e acidez | 56 |
| 5.2.3 Teor de ácido ascórbico | 57 |
| 5.2.4 Teores de fenóis e flavonóides totais | 58 |
| 5.2.5 Análise por CLAE Composição química do óleos essencial | 59 |
| 5.2.6 Composição Química do Óleo Essencial | 67 |
| 5.3 Atividade Antioxidante | 68 |
| 5.3.1 DPPH | 68 |
| 5.3.2 Quelação de íons Fe^{2+} | 70 |
| 5.2.3 Peroxidação lipídica | 71 |
| 6. CONCLUSÕES | 73 |

1 INTRODUÇÃO

A medicina vem evoluindo rapidamente a nível molecular impulsionada pelo desenvolvimento nanotecnológico. Os investimentos nesta área tem como meta o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos de doenças crônicas, visto que, o entendimento destes é a chave para um processo de cura. Neste contexto, as doenças neurodegenerativas exemplificadas por doença de Parkinson, Esclerose Múltipla e doença de Alzheimer possuem destaque por suas etiologias relacionarem-se a uma produção anormal de compostos altamente reativos, os radicais livres (BIANCHI *et. al.*, 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em organismos aeróbios, as reações de oxidação estão envolvidas na obtenção de energia, fagocitose, regulação do crescimento e sinalização celular, síntese de substâncias importantes, etc; processos em que os radicais livres são produzidos naturalmente. O desequilíbrio entre a produção fisiológica de radicais livres e a concentração de antioxidantes culmina na indução da peroxidação de fosfolípidios, mutações na molécula de DNA e interações com proteínas, carboidratos e enzimas, alterando suas funções (BARREIROS *et. al.* 2006; PEREIRA *et. al.* 2009).

Para manter a homeostase, os humanos possuem um sistema de defesa contra radicais livres formado principalmente por enzimas e substâncias endógenas, capazes de neutralizá-los impedindo o desenvolvimento dos seus efeitos prejudiciais. Apesar de eficaz, este sistema não está completo e necessita de suplemento de antioxidantes exógenos oriundos da alimentação (FANHANI *et. al.* 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PEREIRA *et. al.* 2009).

Desde a década de 80, a busca por compostos de origem natural que possam vir a substituir os sintéticos vem ganhando força. Produtos alimentícios e farmacêuticos são exemplos que recebem aditivo de antioxidantes sintéticos, os quais sofrem restrições quanto ao seu uso por apresentarem frequentemente potencial carcinogênico e modificador das atividades hepáticas. Os materiais vegetais despontam como uma fonte alternativa aos antioxidantes sintéticos de onde podemos extrair compostos com tal atividade e que causam menores riscos a saúde (DEGÁSPARI *et. al.* 2004; FERREIRA *et. al.* 2007; PEREIRA *et. al.* 2009; VELLOSA *et. al.* 2007).

A família *myrtaceae* destaca-se entre todas as famílias botânicas pelo seu tamanho, possui mais de 3 mil espécies agrupadas em cerca de 140 gêneros. Difunde-se por todo o mundo ocupando principalmente áreas de clima tropical, subtropical e temperado (WILSON *et. al.* 2001). O gênero *Psidium* possui distribuição original do sul do México até o sul da Argentina, passando pelo Caribe e chegando aos arquipélagos de Galápagos e ilhas Revillagigedo. No Brasil, suas espécies distribuem-se da Amazônia até o Rio Grande do Sul (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008). Engloba cerca de 100 espécies (GOVAERTS *et. al.* 2008) amplamente distribuídas em todos os biomas brasileiros (caatinga, cerrado, campos rupestres, floresta amazônica, atlântica, decíduais, restingas e outros) (BRANDÃO *et. al.* 2002).

A espécie de maior relevância na família *myrtaceae* é a *Psidium guajava*, popularmente, conhecida como goiabeira (FRANZON, 2009). A ela, atribui-se grande importância econômica em vários países. Seus frutos são consumidos frescos ou na forma de doces, sucos, sorvetes e etc. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para o tratamento de disenterias e como cicatrizante. Estudos realizados com extratos obtidos das folhas comprovaram atividades antioxidante, antimicrobiana e antidiarréica, assim como, estudos realizados com extratos obtidos dos frutos comprovaram atividade hipoalergênica (CAMPOS, 2010).

Neste trabalho foram abordadas as propriedades antioxidantes da goiabeira relacionando-as a compostos derivados do seu metabolismo secundário. Extratos aquosos dos frutos em estágios de maturação verde, intermediário e maduro, foram analisados quanto ao teor de fenóis, flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, quelante de ferro e TBAS. Foi extraído o óleo essencial das folhas e determinado a composição química. Os estudos foram desenvolvidos com a finalidade de auxiliar no tratamento de doenças crônicas desencadeadas por radicais livres além de consolidar os frutos e folhas da goiabeira, com comprovada atividade antioxidante como afirma Gutierrez (2008), como um nutracêutico de fácil acesso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades antioxidantes, teores de compostos fenólicos, flavonóides, vitamina C e voláteis de *Psidium guajava* em diferentes estágios de maturação colhidos no Cariri cearense.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a polpa de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro;
- Determinar o pH e acidez titlável das polpas;
- Obter as folhas de *Psidium guajava*;
- Obter óleos essenciais das folhas;
- Identificar a composição química dos óleos essenciais por CG/EM;
- Obter extratos aquosos das polpas;
- Obter frações metanólicas dos extratos aquosos;
- Realizar a prospecção fitoquímica das frações metanólicas;
- Identificar e quantificar a composição química das frações metanólicas por CLAE;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonóides totais e vitamina C;
- Verificar o potencial antioxidante, *in vitro*, por sequestro de radical livre DPPH, quelação do ferro e inibição da lipoperoxidação de fosfolipídios pelo método TBAS.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

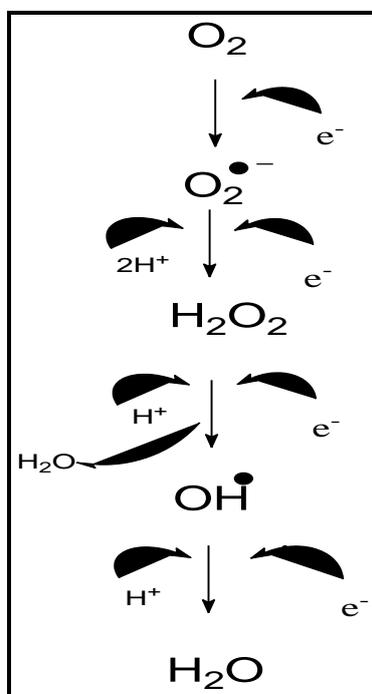
No início do século XX, o modelo atômico de Rutherford-Bohr apresentou o átomo e sua configuração energética, distribuída em 7 níveis (K, L, M, N, O, P, Q) e 4 subníveis (s, p, d, f) formados por orbitais atômicos preenchidos por até 2 elétrons. Em algumas espécies químicas, a associação dos pares não ocorre naturalmente ou é desfeita por influência de outras espécies aumentando a reatividade química (SALA *et. al.*, 2007).

O conceito de radical livre baseia-se na distribuição eletrônica. Entende-se por radical livre átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Este conceito é bastante abrangente e engloba tanto estruturas elementares como é o caso do átomo de hidrogênio, grande parte dos íons metálicos e o oxigênio molecular, como moléculas de alto peso molecular que sofreram uma oxidação com perda eletrônica. Com o objetivo de destacar os radicais livres danosos e acrescentar as espécies químicas que não possuem elétrons desemparelhados, foi introduzida a designação espécies reativas, que atualmente tem sido mais utilizada que a expressão radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; QUEIROZ *et. al.*, 2005).

As reações que produzem espécies reativas envolvem transferência de elétrons entre os reagentes, o que caracteriza as reações de oxi-redução. Também são formadas por absorção de radiação e por catálise enzimática. A entidade que fornece um elétron sofre um processo chamado de oxidação e é dita agente redutor. Por outro lado, quem ganha o elétron sofre um processo chamado de redução e é dita agente oxidante (ATKINS, 2004). O elétron não emparelhado ou a presença de átomos fortemente eletronegativos nos produtos formados aumenta a instabilidade química e tendência em reagir com outra espécie que esteja próxima, fato que explica a principal característica das espécies reativas que é a alta reatividade (ROVER JÚNIOR *et. al.*, 2001).

As espécies reativas podem ter origem endógena e exógena. As principais fontes endógenas são os peroxissomos, as enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e citocromo P-450 e a mitocôndria enquanto que, as principais fontes exógenas são as radiações ionizantes e UV e substâncias tóxicas como as encontradas em cigarros, bebidas, alimentos (FILIPPIN *et. al.* 2008).

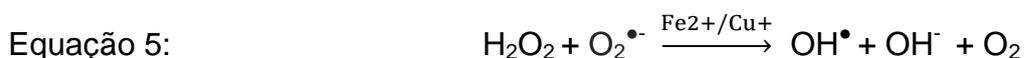
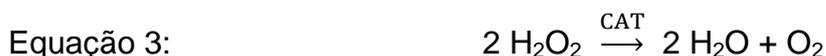
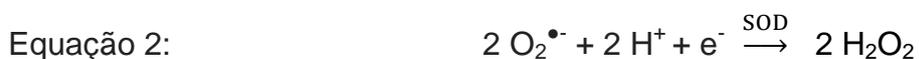
Biologicamente, as espécies reativas de oxigênio (EROS) são as mais importantes. Em baixas concentrações participam de funções fisiológicas vitais para os eucariotos como a proliferação celular, biossíntese, quimiotaxia, respiração celular, apoptose e defesa contra microrganismos invasores (FRIDOVICH, 1999; OKTYABRSKY, *et. al.* 2007). Todos estes eventos necessitam de energia para que aconteçam e é justamente neste processo de obtenção que formam-se as EROS na mitocôndria, organela celular responsável pela produção de energia. Do início ao fim da fosforilação oxidativa, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução com ganho de 4 elétrons resultando na produção de água (H_2O). Durante as etapas do processo, são formadas as EROS superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil (OH^{\bullet}) como mostrado no Esquema 1 (AGARWAL *et. al.*, 2005; AL GHOLEH *et. al.*, 2011; KOWALTOWSKI, *et. al.* 2009).



Esquema 1: Redução do O_2 com ganho de 4 elétrons até formação da água. São formadas EROS como intermediários entre as reações (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A redução de uma molécula de O_2 por um elétron origina o $O_2^{\bullet-}$ (Equação 1). Após adição de mais um elétron e dois prótons (H^+), catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), processo chamado dismutação, forma-se o H_2O_2 (Equação 2). A enzima SOD encontra-se em concentrações bem elevadas nas células dos eucariotos e rapidamente catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$, desempenhando papel importante na redução das concentrações da espécie reativa de oxigênio em questão. O H_2O_2 é uma molécula com relativa estabilidade, é permeável a membrana da mitocôndria passando através das proteínas transmembranares aquaporinas e atua no citosol como sinalizadora, interferindo no ciclo celular. Sua concentração é controlada pela enzima catalase (CAT) que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Equação 3) (KOWALTOWSKI, *et. al.* 2009; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O peróxido de hidrogênio restante não degradado pela CAT ganha outro elétron e na presença de H^+ , íons cobre (Cu^+) ou ferro (Fe^{2+}), reage formando o OH^{\bullet} . A reação é conhecida como Reação de Fenton. (Equação 4). O OH^{\bullet} também pode formar-se pela reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , reação catalisada por íons metálicos e conhecida como Reação de Haber-Weiss (Equação 5). O OH^{\bullet} é a espécie reativa de oxigênio formada mais reativa, podendo reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima. A redução total do O_2 para formação de H_2O completa-se com o ganho de um quarto elétron e H^+ pelo OH^{\bullet} . (KOWALTOWSKI, *et. al.* 2009; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



3.1.1 Oxigênio Singleto ($^1\text{O}_2$)

É a espécie reativa de oxigênio no estado excitado da molécula de O_2 . O estado excitado é alcançado quando há ganho de energia. Existem dois estados do oxigênio singleto: o estado $^1\Delta_g$ apresenta dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui energia de 22,5 Kcal acima do estado fundamental e meia vida em solventes aquosos de 10^{-6} s. O estado $^1\Sigma_g^+$ tem um elétron em cada orbital “p” com spins opostos, energia de 37,5 Kcal acima do estado fundamental e tempo de meia-vida de 10^{-11} s (Tabela 1) (RONSEIN *et. al.*, 2006).

O estado $^1\Sigma_g^+$ tem um tempo de meia-vida muito curto em meio aquoso sendo rapidamente desativado ao estado $^1\Delta_g$ que é o mais importante biologicamente com participação em certos eventos bioquímicos, mas com poucas doenças relacionadas a ele (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RONSEIN *et. al.*, 2006; SEIFRIZ, 2012).

Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares “p” do oxigênio nos estados excitado singleto ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental tripleto ($^3\Sigma_g^-$) (RONSEIN *et. al.*, 2006).

| Estado | Orbitais “p” | Energia (Kcal/mol) | Tempo de meia-vida |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| $^1\Sigma_g^+$ | $\uparrow \quad \downarrow$ | 37,5 | 10^{-11} |
| $^1\Delta_g$ | $\uparrow\downarrow$ | 22,5 | 10^{-6} |
| $^3\Sigma_g^-$ | $\uparrow \quad \uparrow$ | --- | --- |

3.1.2 Radical Superóxido

O radical superóxido forma-se quando um elétron é ganho pelo O_2 (Equação 1, pag. 25). É um radical pouco reativo, apresenta apenas um elétron desemparelhado e não tem capacidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo somente nos compartimentos onde é produzido (ANDRADE *et. al.* 2010). Está presente em quase todas as células aeróbias e em células fagocitárias (neutrófilos,

monócitos, macrófagos e eosinófilos) quando estas reconhecem antígenos ou moléculas sinalizadoras. Em solução aquosa, comporta-se como fraco agente oxidante apesar de algumas reações secundárias terem sido observadas em sistemas biológicos geradores deste radical. Em solventes orgânicos, apresenta alta reatividade e comporta-se como forte agente redutor (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

3.1.3 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical pela ausência do elétron desemparelhado na última camada. Comporta-se como uma espécie reativa de oxigênio bastante deletéria, é importante pela participação nas reações de formação do OH^\bullet . Tem meia-vida longa, atravessa camadas lipídicas, pode reagir com membranas eritrocitárias e com proteínas ligadas ao ferro. É tóxico para as células e na presença de íons ferro, sua toxicidade é potencializada aumentando de 10 a 1000 vezes. As atividades oxidante e redutora são consideradas fracas na ausência de íons metálicos de transição. (ARUOMA *et. al.* 1998; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SEIFRIZ, 2012).

3.1.4 Radical Hidroxil

De acordo com Arouma (1998), o radical hidroxil é considerado a espécie reativa de oxigênio mais reativa formada em sistemas biológicos. Com tempo de meia-vida de 10^{-9} s é um agente oxidante extremamente agressivo, reagindo com a maioria das moléculas biológicas. Forma-se por fissão da ligação entre os átomos oxigênicos da molécula de H_2O_2 . A quebra pode ser provocada por radiação, choques ou por reação com íons metálicos de acordo com a Reação de Fenton (Equação 4, pg. 25) e Reação de Haber-Weiss (Equação 5, pag. 25) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; NORDBERG; ARNER, 2001).

A combinação rápida do OH^\bullet com metais ou outros radicais nas imediações de sua produção confirma a sua reatividade. Se for produzido próximo a uma molécula de DNA, poderão ocorrer modificações na ordem das bases púricas e

pirimídicas, levando a inativação ou a mutação do DNA caso o reparo não aconteça. Pode ocorrer também oxidação dos grupos sulfidrilas (-SH) e pontes dissulfeto (-SS-) com inativação de proteínas e enzimas além de causar oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas plasmáticas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A melhor caracterização do dano biológico causado por radical OH^\bullet é a capacidade de estimular reações em cadeia junto aos fosfolípidios das membranas celulares, processo conhecido como lipoperoxidação (LPO). Este ataque é possibilitado quando os OH^\bullet são produzidos próximos às membranas celulares. O início ocorre com a retirada pelo OH^\bullet de um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica dos fosfolípidios, formando uma molécula de H_2O e um radical molecular de fosfolípido instável. O elétron perdido junto com o átomo de hidrogênio confere ao radical formado característica de espécie reativa. Moléculas vizinhas sofrerão ataque e conseqüente oxidação, iniciando-se uma cadeia de reações envolvendo os fosfolípidios culminando na destruição da estrutura membranar. (SEIFRIZ, 2012).

3.1.5 Óxido nítrico

Assim como as espécies reativas de oxigênio, tem sido creditada à mitocôndria a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNS), destacando-se o óxido nítrico (NO). Formado a partir da família das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), utilizam como substrato o aminoácido L-arginina e como moléculas doadoras de elétrons o NADPH, sua síntese é modulada pela concentração de cálcio e citocinas envolvidas em eventos inflamatórios (BROWN, 2007).

Em altas concentrações, o NO torna-se altamente reativo originando outras ERNS. Como a oferta de gás oxigênio e EROS é grande na mitocôndria, o NO formado reage diretamente com uma molécula de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzindo o peroxinitrito (ONOO^-) (Equação 6). Altamente reativo e danoso ao corpo humano, o ONOO^- atua causando a oxidação ou nitração de biomoléculas e degradando-se para formar outras espécies reativas como o OH^\bullet e dióxido de nitrogênio (NO_2) (BROWN, 2007).



3.2 Estresse Oxidativo

Células que apresentam o tipo de respiração aeróbia utilizam o gás oxigênio para desenvolvimento de tal atividade, como consequência, temos a formação das EROS de forma natural. A formação ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência eletrônica na cadeia de transporte de elétrons e durante a exposição a fatores exógenos como fumo, poluição e radiação. (BIANCHI *et. al.*, 1999; FERREIRA *et. al.*, 2007)

Situações em que há desequilíbrio entre produção de EROS e agentes antioxidantes, seja por aumento da produção endógena ou exógena ou por deficiência das defesas antioxidantes, caracterizam um estado de estresse oxidativo. (SIES, 1993). O surgimento e desenvolvimento de doenças como o câncer, Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, AVC, catarata, inflamações crônicas, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas e outras que afetam todos os sistemas tem sido associadas ao estresse oxidativo. (LÜ *et. al.*, 2010; RAHMAN *et. al.*, 2007).

3.2.1 Alvos celulares das EROS

A reação das EROS com proteínas provoca mudança estrutural, a adição de grupos estranhos à molécula causa mudanças conformacionais resultando na maioria das vezes em perda parcial ou total da função. Alguns aminoácidos apresentam estruturas menos protegida a oxidação, é geralmente nestes pontos que ocorrem os ataques originando um novo radical peptídico capaz de oxidar moléculas orgânicas vizinhas (LOBO *et. al.*, 2010).

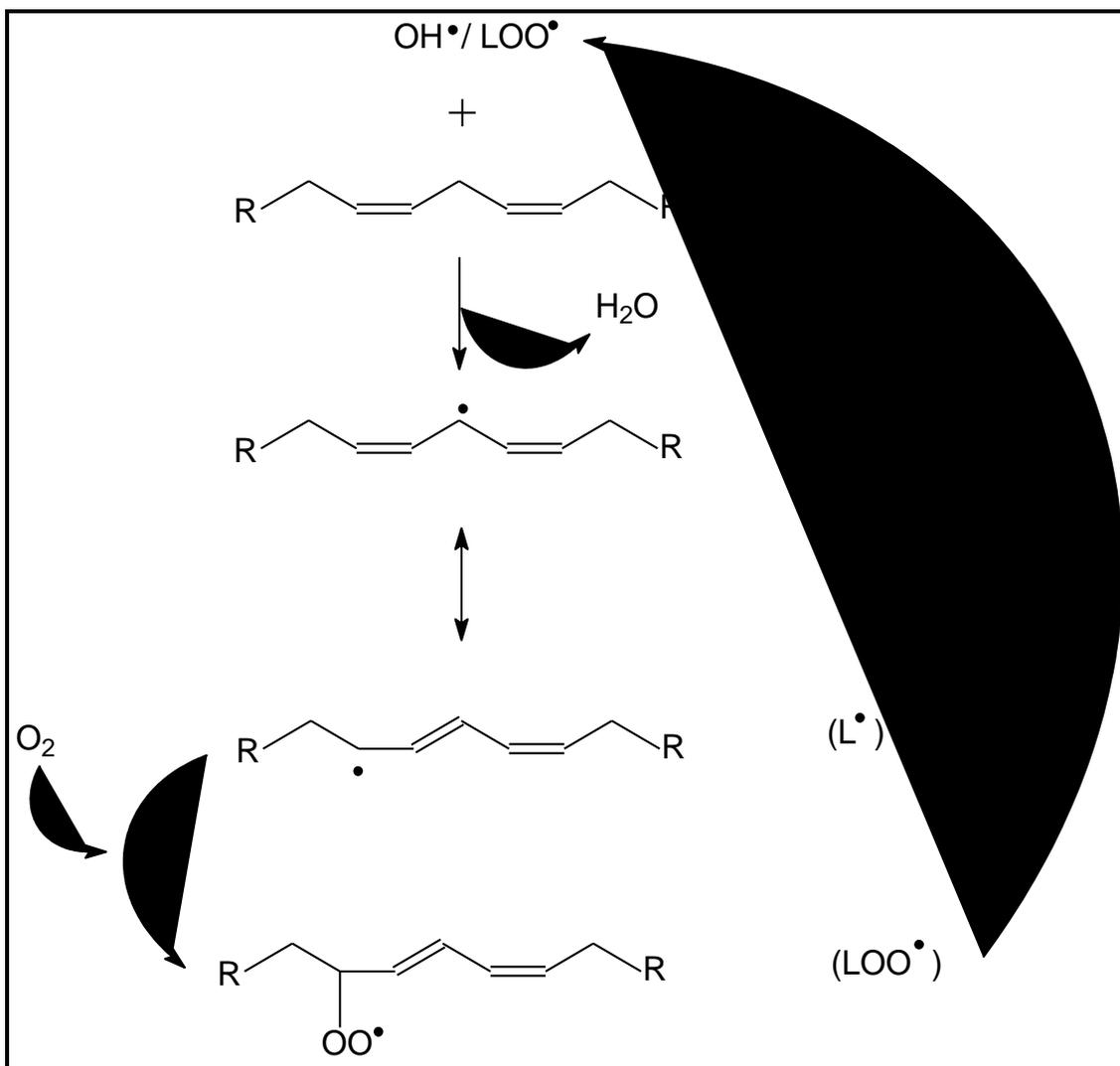
Os danos causado ao DNA envolvem oxidação da cadeia, mudança na ordem das bases nitrogenadas, modificação na função orgânica, quebra e mudança na configuração dos cromossomos. O OH[•] causa importante dano ao DNA por sua capacidade de reagir com qualquer componente do nucleotídeo (base nitrogenada, desoxirribose e o grupo fosfato) (DIZDAROGLU *et. al.*, 2002).

Em relação aos carboidratos, a formação das EROS durante a glicação pode contribuir para o dano glico-oxidativo. Durante as fases iniciais da glicação não

enzimática, a fragmentação dos carboidratos produz espécies reativas de cadeia curta, como os glicaldeídos, que são moléculas pequenas propensas a auto-oxidação, EROS. O resultado dessa reação pode formar o α ou β dicarbonil, ambos com atividade mutagênica (BENOV *et. al.*, 2003).

A mitocôndria é a organela responsável pela geração de energia através dos eventos da cadeia respiratória, conseqüentemente é na mitocôndria que ocorre a maior produção de EROS no organismo. Como a cadeia respiratória é mediada por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, os fosfolipídios são facilmente atacados pelas EROS formadas. (FERREIRA *et. al.*, 2007). O ataque aos fosfolipídios por EROS é denominado peroxidação lipídica e resulta em injúrias celulares tais como formação de radicais fosfolipídicos, alterações estruturais e da permeabilidade da membrana, perda de seletividade na troca iônica, rompimento e liberação do conteúdo de organelas. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

A peroxidação lipídica começa com a retirada de um átomo de hidrogênio de uma cadeia poli-insaturada fosfolipídica (LH) por intermédio de uma EROS, como por exemplo, OH^\bullet ou por radicais fosfolipídicos originários de outras peroxidações. O produto é um novo radical fosfolipídico ($\text{L}\bullet$) ou uma espécie reativa de origem fosfolipídica (LOH) juntamente com uma molécula de água. O $\text{L}\bullet$ interage com oxigênio molecular formando o radical peroxil ($\text{LOO}\bullet$). Se este radical não for neutralizado pelas defesas antioxidantes, ele rapidamente desencadeará novas reações com LH vizinhos propagando a peroxidação lipídica (Esquema 2) (FERREIRA *et. al.*, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LIMA; ABDALLA, 2001).



Esquema 2: Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (LIMA; ABDALLA, 2001).

3.3 Defesas Antioxidantes

A constante exposição do organismo humano aos radicais livres oriundos de varias fontes levou ao desenvolvimento de mecanismos capazes de equilibrar a produção quando necessário. Estas defesas são prova de um processo de evolução pelo qual os humanos passaram, visto que, a produção de EROS é fundamental a muitos processos vitais e também traz malefícios em outros.

Halliwell e Gutteridge (2007) conceituam antioxidantes como qualquer substância que, quando em baixas concentrações comparadas aquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daqueles substratos. Do

ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. (JUNIOR *et al.*, 1998).

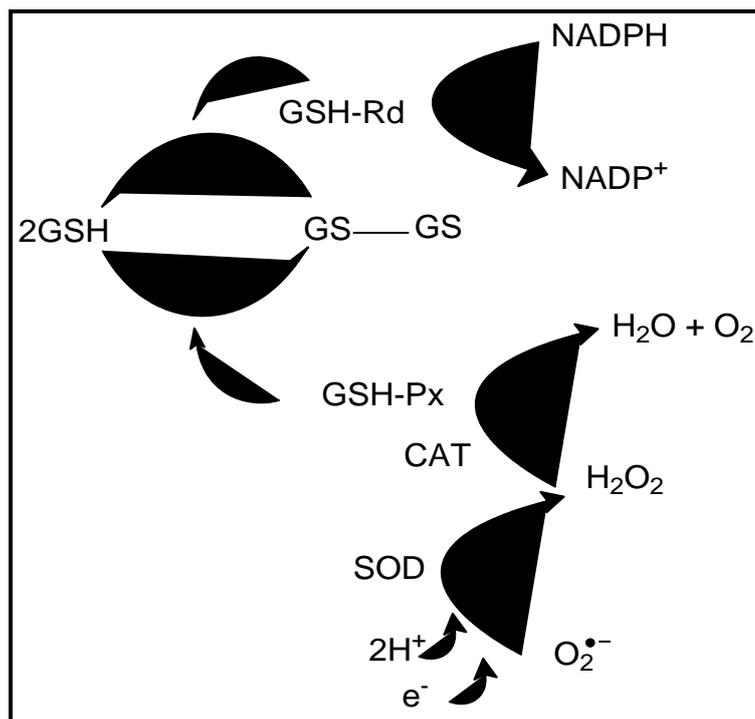
Os antioxidantes desempenham o seu papel na proteção do organismo de varias maneiras. O primeiro mecanismo de defesa contra radicais livres é a inibição da sua formação, bloqueando as reações com os íons de ferro e de cobre. Após produção, os antioxidantes podem interceptar as espécie reativas impedindo o ataque a proteínas, DNA, carboidratos e fosfolipídios. Com danos já instalados em biomoléculas, os antioxidantes podem repará-los e em situações emergenciais de grande produção de espécies reativas, o organismo recorre ao quarto mecanismo de proteção que é o aumento da síntese de enzimas e substâncias antioxidantes. (BIANCHI *et al.*, 1999).

3.3.1 Antioxidantes Enzimáticos

As defesas antioxidantes enzimáticas existem em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo tanto no meio intracelular como no meio extracelular. As enzimas antioxidantes atuam em duas linhas, como detoxificadoras de EROS antes que causem injúrias exemplificadas por glutathiona-reduzida (GSH), superóxido dismutase, catalase e glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e como reparadora das injúrias instaladas exemplificada por glutathiona-redutase (GSH-Rd) (VALKO *et al.*, 2007).

3.3.1.1 Glutathiona reduzida

Presente na maioria das células, formada por glutamato, glicina e cisteína, é o principal tampão redox intracelular. Sua capacidade redutora é atribuída ao grupo sulfidril presente no aminoácido cisteína. No processo de neutralização, a GSH reage com uma espécie reativa e é oxidada com formação do radical GS•. Este radical irá reagir com outro radical GS• formando uma molécula de glutathiona-dissulfito (GS-SG). A GS-SG é substrato da GSH- Rd que promove a redução e restauração da enzima a forma original (Esquema 3) (FANG *et al.*, 2002).



Esquema 3: Sincronia de atuação entre as enzimas antioxidantes. O $O_2^{\bullet-}$ formado na fosforilação oxidativa é dismutado pela SOD formando H_2O_2 . As enzimas CAT e GSH-Px reduzem o H_2O_2 formado a H_2O e O_2 . A enzima GSH-Px oxida GSH a GSGS que posteriormente é reduzida pela GSH-Rd dependente de NADPH.

3.3.1.2 Superóxido dismutase

A SOD corresponde a uma família com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Encontramos duas formas da enzima que se diferenciam pelo íon componente do grupo prostético e local onde são encontradas. A SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol enquanto que a SOD-manganês está presente principalmente na mitocôndria. Ambas possuem atividade antioxidante visto que catalisam a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 na presença de H^+ (Reação 2) (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LIMÓN-PACHECO *et. al.*, 2009).

3.3.1.3 Catalase

A catalase é um hemeoproteína que contém ferro no seu centro catalítico e promove a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Atua na proteção da enzima GSH evitando sua oxidação mediada por H_2O_2 e a permanência por longo período na forma GS-GS. É encontrada em grande quantidade nos peroxissomos de células do

sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LIMÓN-PACHECO *et. al.*, 2009).

3.3.1.4 Glutationa peroxidase

É uma enzima que possui 4 átomos de selênio ligados ao aminoácido cisteína localizados no sitio ativo da enzima. Catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus respectivos álcoois. Estas reações ocorrem paralelamente a oxidação de GSH a GS-SG e redução H_2O_2 em H_2O e O_2 (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LIMÓN-PACHECO *et. al.*, 2009).

3.3.1.5 Glutationa redutase

Enzima que participa nas reações envolvendo a GSH e é responsável pela manutenção dos seus níveis plasmáticos. Após oxidação da GSH produzindo GS-SG, a enzima GSH-Rd é a responsável pela recuperação da forma GSH essencial a integridade do sistema de proteção antioxidante enzimático. A GSH-Rd é enzima que contém como cofator enzimático um derivado nucleotídico da riboflavina (flavoproteína) dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) (Esquema 3, pag. 33) (KOWALTOWSKI, *et. al.* 2009; SENTURK *et. al.*, 2009).

Todas estas enzimas atuam em sincronia *in vivo*. A atividade de SOD que dismuta o $O_2^{\bullet-}$, leva a formação de H_2O_2 , que é então detoxificado pela ação tanto da catalase como da GSH-Px. Nas reações de decomposição de H_2O_2 , a GSH-Px oxida GSH a GS-SG que posteriormente é reduzida pela GSH-Rd a GSH restaurando a enzima e mantendo os níveis plasmáticos normais (Esquema 3) (SILVA, 2012).

3.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

Apesar da eficiência das defesas antioxidantes enzimáticas, os humanos ainda dependem de outros defensores. A alimentação é uma fonte importante de moléculas antioxidantes que em geral estão em concentrações mais altas que as enzimas com mesma função. Estas moléculas apresentam algumas características em comum como tamanho pequeno, baixo peso molecular, distribuição tanto no

meio intracelular como no meio extracelular e quando oxidadas pelo ataque de espécies reativas, formam produtos pouco reativos (VASCONCELOS, *et. al.*, 2006).

Diferentes alimentos são estudados por possuírem compostos com atividade antioxidante, os principais nutrientes com essa função são o ácido ascórbico, os flavonóides e os compostos fenólicos. Eles atuam como moléculas suicidas, neutralizando as espécies reativas. A não reciclagem destas moléculas após neutralização implica na sua ingestão constante a fim de manter os níveis plasmáticos em uma faixa segura. A oferta de antioxidantes não enzimáticos é grande e sua disponibilidade já foi observada em alimentos de diversas categorias como temperos, frutas, hortaliças, cereais e sementes (ZIMMERMANN *et. al.*, 2008).

3.3.2.1 Vitamina C

O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C, está presente em frutas cítricas, tomates, melões, morangos, goiabas, etc. Em sistemas biológicos onde o pH é cerca de 7,4, o ácido ascórbico encontra-se na forma de ascorbato (AscH^-), ativa frente as EROS devido sua estrutura apresentar um H^+ facilmente retirável. Por se tratar de uma molécula com alta solubilidade em água, o AscH^- localiza-se nos compartimentos aquosos dos tecidos. A oxidação do AscH^- neutraliza as EROS e produz o radical ou ascorbila ($\text{Asc}^{\bullet-}$) (Equações 7 a 9) pouco reativo. Este radical é regenerado a AscH^- quando sofre uma reação de dismutação, decorrente de uma redução química ou uma redução enzimática (Equação 10) (CERQUEIRA, *et. al.*, 2007; VASCONCELOS, *et. al.*, 2006; ZIMMERMANN *et. al.*, 2008).



O ácido ascórbico é considerado o mais importante antioxidante em fluidos extracelulares, pois os íons $AsCH^+$ atuam eficientemente sobre as EROS produzindo espécies inofensivas com baixa reatividade e agem diretamente nas membranas celulares impedido o início da peroxidação lipídica. Outra função importante é a capacidade de regenerar a vitamina E que atua como antioxidante em compartimentos hidrofóbicos. Baseados nestas informações, muitos autores recomendam a ingestão de alimentos fonte de ácido ascórbico com o objetivo de evitar o estresse oxidativo e suas doenças decorrentes (MIQUEL *et. al.*, 2006).

3.3.2.2 Compostos fenólicos e flavonóides

Os compostos fenólicos formam um dos principais grupos de substâncias do reino vegetal. São produtos do metabolismo secundário tanto da via do ácido chiquímico como da via do acetato e geralmente são encontrados unidos a glicosídeos, o que lhes confere solubilidade em água. Mais de 8000 compostos fenólicos já foram identificados e apresentam como característica uma hidroxila ligada a um anel aromático. Outros grupamentos podem aparecer na estrutura molecular e partindo daí, os compostos fenólicos são divididos em categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, taninos, lignanas, ligninas e a principal, flavonóides (BRAVO, 1998; CROFT, 1998).

A presença de compostos fenólicos em plantas vem sendo muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológicas, entre as quais a atividade antioxidante. Esta é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila ligado ao anel aromático que influencia na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição agindo na etapa inicial e no decorrer do processo oxidativo. Após reação com espécies reativas, forma-se um radical fenoxila pouco estável que é rapidamente estabilizado por ressonância do anel aromático. (CERQUEIRA, *et. al.*, 2007; SOUSA *et. al.*, 2007).

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos existente na natureza e estão amplamente distribuídos nas plantas. Sua estrutura básica apresenta um núcleo flavona com 15 átomos de carbono arranjados em 3 anéis (C_6-

C₃-C₆) definidos com A, B, C sendo A e C aromáticos e o B central formado por um heterociclo oxigenado como mostrado na Figura 1 (VASCONCELOS, *et. al.*, 2006).

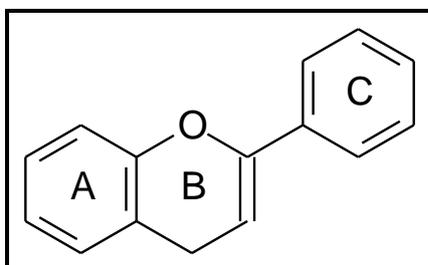


Figura 1: Estrutura básica flavonóides (DUTHIE *et. al.*, 2000).

Aproximadamente 4000 flavonóides já foram descritos organizados em várias classes, com destaque para as classes dos flavonóis, das flavonas, das catequinas, das flavononas, das antocianidinas e das isoflavonas. (COOK; SAMMAN, 1996; DUTHIE *et. al.*, 2000).

Juntamente com vitaminas C e E, os flavonóides estão relacionados com a inibição da peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas. Um diferencial dos flavonóides é a sua localização entre a fase aquosa e a bicamada fosfolipídica, comportamento permitido pelo caráter anfipático. Portanto, os flavonóides podem bloquear os radicais livres presentes no citosol momentos antes de ocorrer o ataque à membrana e também bloquear eventos já instalados da peroxidação dos fosfolipídios (HERTOG, *et. al.* 1993).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende de sua estrutura e pode ser determinada por quatro fatores: 1) reatividade como agente doador de elétrons e H⁺; 2) estabilidade do radical flavonoil formado; 3) capacidade de quelar metais de transição; 4) solubilidade e interação com membranas.

- 1) A atividade doadora de elétrons e H⁺ está relacionada com a quantidade de hidroxilas presentes nos ciclos. Quanto maior a quantidade de hidroxilas maior o seu potencial em doar elétrons e H⁺, conseqüentemente maior poder em reagir com espécies reativas (CAO *et. al.* 1997).

- 2) A estabilidade do radical flavonoil formado após reação é definida pela capacidade de migração do elétron desemparelhado resultante. Insaturações, grupamentos fortemente eletrofílicos e posição de grupos hidroxílicos podem interferir na estrutura de ressonância do anel aromático diminuindo a migração do elétron desemparelhado (RICE-EVANS *et. al.*, 1996).
- 3) A inativação de metais de transição, livres no meio biológico, é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que eles catalisam as reações de Fenton (Reação 4) e de Haber-Weiss (Reação 5). A quelação dos metais somente irá acontecer em flavonóides com hidroxilas na posição orto. A substituição de alguma hidroxila diminui o poder quelante principalmente por impedimento estérico (RICE-EVANS *et. al.*, 1996).
- 4) A solubilidade e capacidade de interagir com a membrana são propriedades que dependem exclusivamente da lipofilicidade das moléculas dos flavonóides. Como as espécies reativas tem como alvos as membranas celulares, uma certa quantidade de flavonóides deve estar presente na membrana com o objetivo de garantir a segurança dos fosfolipídios contra o ataque. A inserção de flavonóides na membrana participa também da modulação da fluidez o que dificulta a difusão de das espécies reativas diminuindo a cinética da peroxidação. (VAN ACKER, 1996 apud BARREIROS *et. al.*, 2006)

Apesar da grande capacidade antioxidante “*in vitro*”, sua eficiência “*in vivo*” depende de alguns fatores. Quando comparados com a absorção de vitaminas C e E, os flavonóides levam desvantagem, pois somente as moléculas que não estão ligadas ao açúcar conseguem atravessar a parede celular do intestino. Além da baixa biodisponibilidade, os flavonóides apresentam meia-vida plasmática de somente algumas horas limitando a sua ação somente ao sangue. (CAMMERER, 2012).

3.4 *Psidium guajava*

Psidium guajava, conhecida popularmente no Brasil como goiaba, é considerada nativa do México e mundialmente distribuída. Ocupa áreas tropicais e subtropicais adaptada a variadas condições climáticas com preferência pelos climas mais secos. Tem importância econômica em muitos países sendo o seu cultivo destinado principalmente ao consumo “*in natura*” e a industrialização (GUTIERREZ *et. al.*, 2008).

É uma árvore frutífera de pequeno porte, copa aberta medindo até 7 metros de altura. Apresentam caules tortuosos, irregulares, lisos e revestidos por uma casca que passa por constante processo de descamação. As folhas são opostas, oblongas, subcoriáceas e aromáticas. As flores são brancas e agrupam-se em até 3 nas axilas da folhas, apresentam bractéolas lineares a pouco triangulares, esparsamente pubescentes, cálice cônico no botão, fechado, rasgando irregularmente quando o botão se abre, persistindo ou caindo em 3 partes. Os frutos são carnudos de cor amarela quando maduros, formato globoso com 3 a 6 centímetros de diâmetro, mesocarpo comestível onde estão inseridas inúmeras sementes (LANDRUM *et. al.* 1995; MATOS, 2002)

O uso medicinal é muito antigo, registros de comunidades indígenas mexicanas trazem o decocto das folhas como um remédio usado no tratamento da tosse e também para tratamento de problemas digestivos associados a forte diarreia. Estudos etnofarmacológicos recentes mostram o uso da goiaba como anti-inflamatório, contra diabetes, hipertensão, cáries dentárias, como antipirético e como cicatrizante (GUTIERREZ *et. al.*, 2008) No Brasil, frutos maduros e folhas são usados para o tratamento da anorexia, cólera, diarreia, problemas do sistema gastrointestinal, disenteria, insuficiência gástrica, inflamação na mucosa gástrica, problemas de pele, de garganta e corrimento vaginal (HOLETZ *et. al.*, 2002).

Quimicamente, os frutos caracterizam-se por apresentarem pequenas quantidades de carboidratos (13,2%), gorduras (0,53%) e proteínas (0,88%) e abundante quantidade de água (84,9%) (MEDINA; PAGANO, 2003). Cálcio, fósforo, ferro e manganês são metais encontrados assim como a vitamina A, Vitamina C, e vitamina B3 (CONWAY, 2002; FUJITA *et. al.*, 1985; HERNANDEZ, 1971; IWU, 1993

apud GUTIERREZ *et. al.*, 2008). O fruto verde é indigesto, rico em taninos, tem atividade adstringente e causa constipação sendo utilizado nos casos de diarreia (JAIN *et. al.*, 2003). A casca dos frutos é rica em ácido ascórbico, concentração que decresce à medida que aproxima-se o centro do fruto (WILSON *et. al.*, 2006).

Embora a goiabeira tenha diversas indicações terapêuticas na medicina popular e a constituição química dos seus extratos tenha sido extensivamente investigada, poucas informações sobre as propriedades farmacológicas de frutos em diferentes estágios de maturação são encontradas.

A atividade antidiarreica apresentada pelos frutos maduros foi relacionada por Coutiño (2001) com o isolamento de uma lectina capaz de se ligar a *Escherichia coli*, comum causadora de diarreia, impedindo a adesão da bactéria à parede intestinal, prevenindo a infecção e consequente diarreia. Neira e Ramirez (2005) relataram também atividade frente à *Escherichia coli* que foi inibida pelo extrato etanólico obtido dos frutos, resultados que dão suporte a utilização pela medicina popular para diarreias causadas por bactérias.

Efeitos hepatoprotetores foram testados em fígados de ratos. Pré-tratamento com ácido asiático isolado de frutos de goiaba foi capaz de aumentar os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) além de aumentar a condensação nuclear e multiplicação dos hepatócitos e prevenir o depósito de lipídios segundo Gao *et. al.* (2006).

Os efeitos antioxidantes são atribuídos a presença de vários compostos fenólicos como a rutina, quercetina, ácido gálico, ácido cafeico e guavina presente em folhas e em frutos. A atividade do ácido ascórbico é bem superior a apresentada pelos estudos da atividade antioxidante envolvendo frutos de *Psidium guajava*, mas o extratos obtidos dos frutos são fonte de compostos antioxidantes naturais. JIMENEZ, *et. al.*, 2001; THAIPONG, *et. al.*, 2005).

Efeitos hipoglicemiantes foram observados com a administração via oral do suco do fruto no estágio de maturação maduro em ratos saudáveis e em ratos diabéticos, embora a duração do efeito foi menos potente quando comparada com os medicamentos clorpropamida e metformina. Foram observado também efeitos

anti-hipertensivos e antiglicação das lipoproteínas. (CHANG, 1982; CHENG; YANG, 1983; HSIEH, *et. al.*, 2005)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Folhas e frutos nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro de *Psidium guajava* foram coletados no mês de outubro de 2012 no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, campus Crato, localizado na Rodovia CE 292, Km 15, Bairro Gisélia Pinheiro no município de Crato-CE, sob as coordenadas 7°20'52.28"S, 39°44'79.51"W. A exsicata da planta foi preparada e depositada sob o número de registro 9482 no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA.

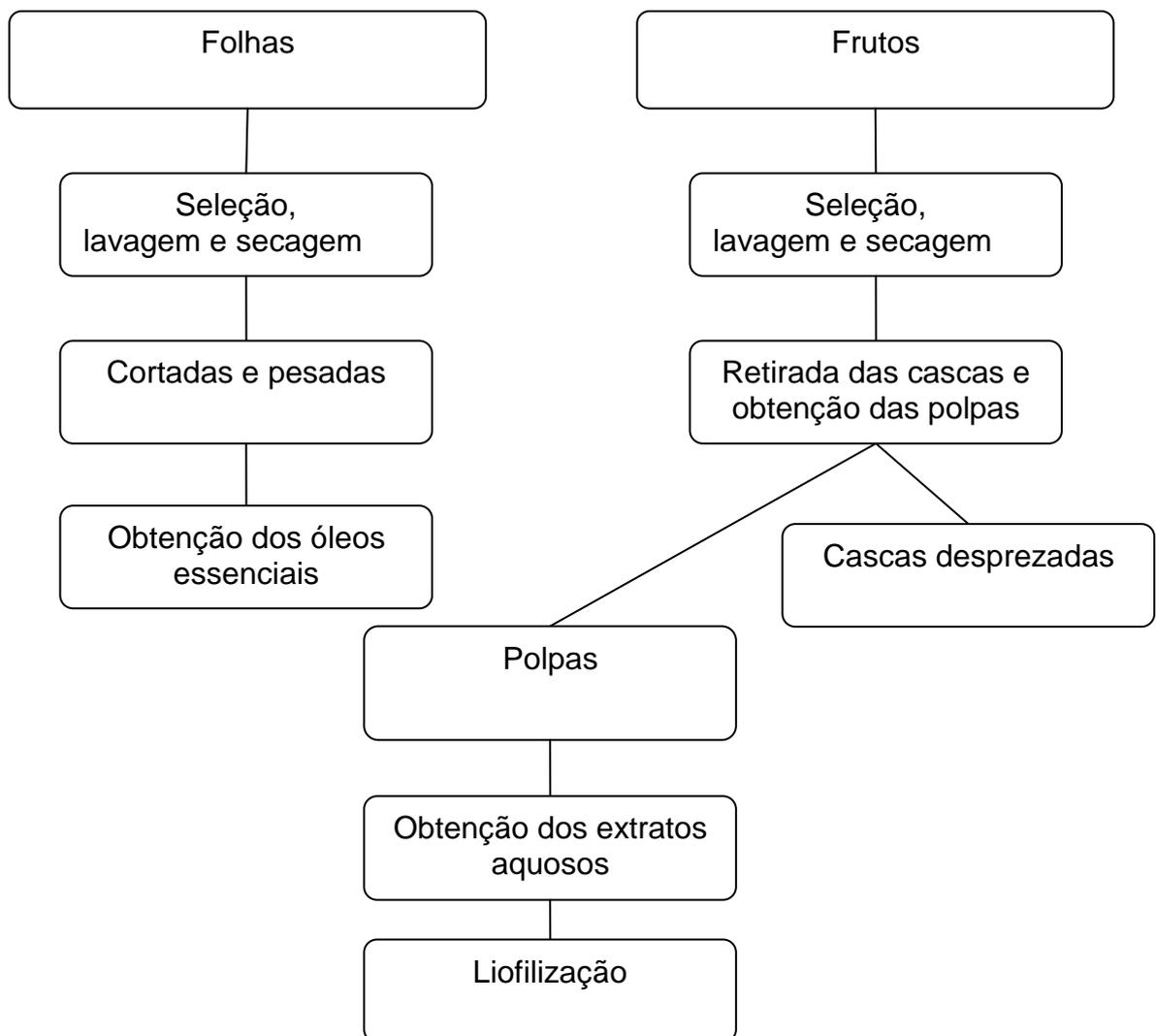


Figura 2: Partes aéreas de *Psidium guajava*. A- Árvore inteira; B- Tronco, galhos e folhas; C- Folhas e flores D- Galhos com folhas e frutos intermediários (Fonte: Autor).

4.2 Preparação dos Extratos

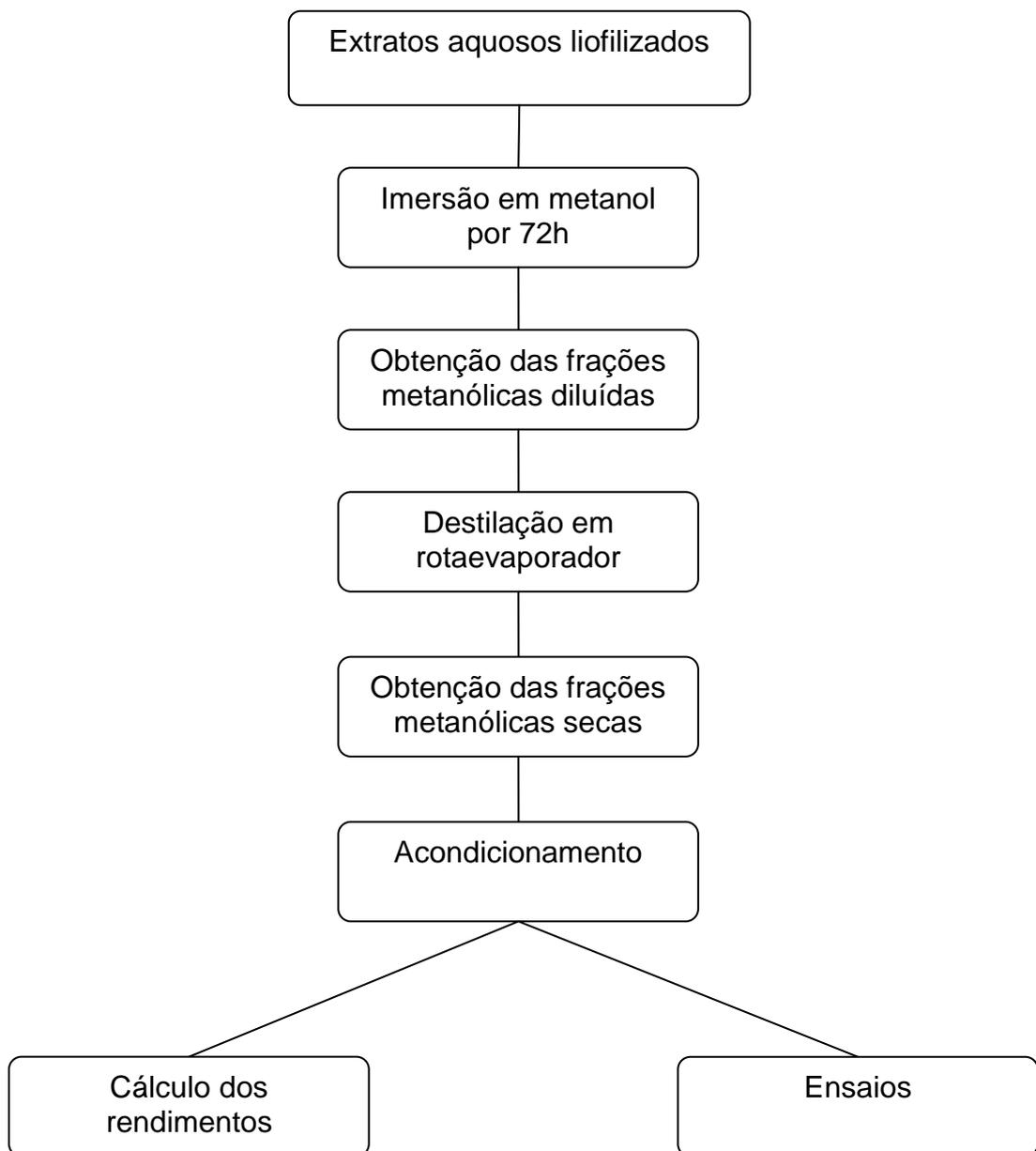
Os materiais vegetais coletados foram selecionados, lavados e secos à temperatura ambiente. Após secagem, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços e pesadas procedendo para a obtenção dos óleos essenciais. Os frutos foram descascados e as polpas retiradas, cortadas em pequenos pedaços e trituradas junto com água destilada para preparo do extrato aquoso. Os extratos aquosos foram congelados e armazenados à temperatura de -18°C para posterior liofilização. (fluxograma 1).

Fluxograma 1: Obtenção dos óleos essenciais das folhas e obtenção dos extratos aquosos das polpas de *Psidium guajava* nos três estágios de maturação.



Para obtenção das frações metanólicas, os extratos aquosos liofilizados foram imersos em metanol P.A. para extração a frio por 72 horas, segundo metodologia descrita por Matos (1988). As frações metanólicas diluídas obtidas foram filtradas e destiladas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada entre 80-90°C, o restante do metanol foi evaporado em banho-maria (Fluxograma 2). Após secagem do solvente, foi feito o acondicionamento adequado, cálculo dos rendimentos e realização dos ensaios.

Fluxograma 2: Obtenção das frações metanólicas das polpas liofilizadas de *Psidium guajava* em três estágios de maturação.



4.3 Obtenção do Óleo Essencial das Folhas

As folhas foram selecionadas, lavadas e secas. Após secagem, foram cortadas em pequenos pedaços, pesadas e adicionadas em balão de vidro de 5 litros. Foi adicionado cerca de 2,5 litros de água destilada e iniciado o aquecimento até ebulição que durou 2 horas. Assim, o material vegetal foi submetido ao processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado segundo metodologia descrita por Gottlieb (1960). Os rendimentos foram calculados com base na massa do óleo obtido em relação à massa inicial (1750g) do material submetido à extração. Após coleta do óleo essencial, foi realizado a secagem do mesmo, adicionando-se uma quantidade de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e armazenamento em frasco de vidro âmbar a $\pm 4^\circ \text{C}$ até o momento das análises.

4.4 Análises Físico-Químicas

4.4.1 Determinação do pH e acidez

Foram utilizadas as polpas dos frutos frescos para a determinação do pH pelo método potenciométrico segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985) e a acidez total titulável foi determinada pelo método acidimétrico utilizando uma solução de NaOH a 0,1 M segundo metodologia A.O.A.C (1990).

4.4.2 Prospecção fitoquímica

A avaliação fitoquímica das frações metanólicas foi realizada de acordo com a metodologia de Matos (1997). Os testes foram baseados na observação visual da mudança colorimétrica e/ou formação de precipitado após adição de reagentes específicos nas soluções das frações metanólicas.

4.4.3 Análise da composição química do óleo essencial em CG/EM

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas utilizando um equipamento Shimidzu, Série QP2010. A coluna capilar usada foi do tipo Rtx-5MS medindo 30 mm de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,25 mm de espessura do filme. O gás hélio foi usado como carreador a uma velocidade de 1,5 mL/min. A temperatura do injetor foi de 250° C e no detector foi de 290° C. A temperatura da coluna variou inicialmente de 60 a 180° aumentando 5° C/min, em seguida variou de 180 a 280° C aumentando 10° C/min.

O óleo essencial foi diluído na proporção de 1:200 em clorofórmio sendo 1 mL injetado. O espectrofotômetro de massas foi ajustado para uma energia de ionização de 70eV. A identificação dos componentes individuais foi baseada na sua fragmentação de espectro de massa de acordo com a sua biblioteca espectral NIST Mass 08, índices de retenção e comparação com dados publicados (ADAMS, 2001; ALENCAR *et. al.*, 1984; ALENCAR *et. al.*, 1990; STENHAGEN; ABRAHAMSON; MCLAFFERTY, 1974).

4.4.4 Determinação de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado em procedimentos descritos por Singleton *et. al.* (1999). Concentrações variadas das frações metanólicas foram misturadas com 200 µL de solução de Folin-Ciocalteu a 10% e 400 µL de solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada a 45°C e reagiu ao abrigo da luz durante 15 minutos. O branco foi concomitantemente preparado usando-se água destilada ao invés das amostras. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 765 nm. O mesmo procedimento foi repetido para o ácido gálico que foi utilizado como padrão de comparação de compostos fenólicos.

4.4.5 Determinação de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada pelo método espectrofotométrico do cloreto de alumínio baseado em procedimentos descritos por Venkatachalam *et. al.* (2012). Concentrações das frações metanólicas foram preparadas em água destilada e misturadas com 40 µL de solução de acetato de sódio 0,1M e 40 µL de uma solução de cloreto de alumínio a 10%. A mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 45 minutos e reagiu ao abrigo da luz. O branco foi concomitantemente preparado usando-se água destilada ao invés das amostras. A absorbância foi medida um comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi repetido para obtenção da curva padrão com rutina.

4.4.6 Determinação de ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico foi determinada pelo método espectrofotométrico segundo Leme Junior e Malavolta (1958). 10 gramas de polpa liofilizada nos três estágios de maturação foram imersas em solução de ácido oxálico a 2%. Após 24 horas de extração, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para continuidade dos testes. Em tubos de ensaio foram adicionados volumes crescentes do sobrenadante (200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL e 1000 µL) e completados com solução de ácido oxálico até formar um volume final de 1000 µL. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 418nm, 20 segundos após adição de 2000 µL de solução corante de 2,6-diclorobenzenoindofenol 0,25 mg/mL. O branco foi concomitantemente preparado usando-se ácido oxálico e solução do corante. Todo o teste foi realizado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O mesmo procedimento foi repetido para obtenção da curva padrão com ácido ascórbico.

4.5 Análise por CLAE

4.5.1 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 cafeico, acetonitrila e acetato de etila foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, rutina e campferol, tocoferol, licopeno e β -caroteno obtidas 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 degaseificador DGU 25A5 com integrador CBM 20^a, UV-VIS com detector DAD (diodo) SPD M20A e software LC 1,22 SP1.

4.5.2 Quantificação de compostos fenólicos 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 μ m de diâmetro. A fase móvel continha na solução A, água e 2% de ácido acético e na solução B, metanol. A composição do gradiente foi de 5% de B nos primeiros 2 minutos mudando para a obtenção de 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% de B nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos, respectivamente, segundo a metodologia descrita por Laghari *et al.* (2011). As frações metanólicas de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro foram dissolvidos em etanol na concentração de 2,4 mg/mL. A presença de seis compostos fenólicos foi investigada: ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico e os flavonóides quercetina, rutina 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 0,6 mL/min, injetando um volume de 40 μ L e o comprimento de ondas de 254 nm para o ácido gálico, 325 nm para o ácido cafeico e ácido clorogênico, e 365 nm para quercetina rutina e campferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas por

membrana (Millipore) com poros de 0,45 μm , e desgaseificadas por ultra-som antes de serem utilizadas.

As soluções padrões de referência foram preparadas na fase móvel do CLAE a um intervalo de concentração entre 0,020 – 0,200 mg/mL para campferol, quercetina e rutina; e 0,050 – 0,250 mg/mL para o ácidos gálico, ácido cafeico e ácido clorogênico. Os picos de cromatograma foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os padrões de referência e por espectros de diiodo (200 a 400nm). Todas as avaliações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

4.5.3 Quantificação de compostos carotenóides por CLAE

As análises cromatográficas de alta eficiência com fase reversa das frações metanólicas dos frutos, foram realizadas utilizando colunas C_{18} (4,6 mm x 250 mm) com partículas medindo 5 μm de diâmetro. A fase móvel continha uma mistura de acetonitrila e água na proporção de (9:1, v/v), com 0,25% de trietilamina na solução A e na solução B acetato de etila com 0,25% de trietilamina. A composição inicial do do gradiente foi de 90% de A chegando a 50% no final de 10 min. No final de 20 min, a porcentagem de a era de 20%. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 40 μL . Os sinais foram detectados a 450 nm, seguindo o método descrito por Janovik *et. al.*, (2012) com ligeiras modificações As soluções de referência (padrões de tocoferol, licopeno e β -caroteno) foram preparadas na fase móvel com concentrações variando de 0,035-0,350mg/mL. As frações metanólicas de *Psidium guajava* foram analisadas na concentração de 10mg/mL e a identificação e quantificação dos carotenóides foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-VIS com a solução padrão. Todas as operações de cromatografia foram realizados a temperatura ambiente e em triplicata

4.6 Atividade Antioxidante

4.6.1 Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)

A capacidade antioxidante das frações metanólicas pelo método espectrofotométrico do sequestro do radical DPPH foi realizada segundo Mensor *et al.* (2001). Foram preparadas soluções das frações metanólicas nas concentrações de 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL e 2,5 µg/mL utilizando-se como solvente metanol P.A. As soluções foram misturadas com 1500 µL de solução de DPPH 0,3 mM e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos, e reagiram ao abrigo da luz. O branco foi concomitantemente preparado usando-se água e metanol P.A ao invés das amostras. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 517nm. O mesmo procedimento foi repetido para obtenção da capacidade antioxidante do ácido ascórbico que foi tomado como controle positivo.

4.6.2 Quelante de íons Fe²⁺

A capacidade das frações metanólicas extraídas dos frutos de *Psidium guajava* para quelar íons Fe²⁺ foi determinada usando-se o método descrito por Puntel *et al.* (2005) com algumas modificações realizadas. O teste foi realizado com adição de 150 µL de sulfato ferroso (FeSO₄) 2 mM 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 com concentrações nas concentrações de 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL e 2,5 µg/mL utilizando-se como solvente água destilada. 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 continha as soluções das amostras nas mesmas concentrações utilizadas no teste e a solução de 1,1-O-fenantrolina 0,25%. O segundo, continha as soluções das amostras nas mesmas concentrações utilizadas no teste e a solução de FeSO₄ também utilizada no teste. A absorbância foi subsequentemente medida a 510 nm em espectrofotômetro

(BATOOL *et al.*, 2010) e a capacidade quelante das amostras foi expressa em porcentagem (%) (BATOOL *et al.*, 2010).

4.6.3 Determinação da inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida dos produtos oriundos da oxidação dos lipídios que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre eles, o malondialdeído (MDA). A metodologia utilizada nessa investigação usa como parâmetro a leitura das absorvâncias das soluções contendo os extratos, os fosfolipídios e o ácido tiobarbitúrico.

Os fosfolipídios forma obtidos de gema de ovo. Foi preparada uma solução de gema de ovo na proporção de 1 g para 10 ml de uma mistura de solventes contendo hexano e álcool isopropílico na proporção de 3:2 respectivamente (PUNTEL *et al.*, 2007). A produção de TBARS foi determinada utilizando um método modificado de Ohkawa *et al.*, (1979), As soluções das frações metanólicas das polpas de *Psidium guajava* nas concentrações de 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL foram misturadas junto com a solução dos fosfolipídios de ovo e água deionizada (volume total de 500 µL) e pré-incubadas durante 1 hora em uma temperatura de 37° C. Após este periodo, 500 µL de tampão ácido acético e 500 µL de TBA 0,6% foram adicionados à mistura reacional e levados para nova incubação a 100° C durante 1 hora. Finalizada a incubação, foi adicionado 1,5 mL de btanol P.A. e a mistura submetida a centrifugação a 2000 rpm durante 2 minutos. A curva padrão obedeceu o mesmo procedimento que o teste sendo retirados a solução de fefolipídio e as soluções das frações metanólicas e substituidos por uma solução de MDA 320 500 µM. A absorvancia foi medida em um comprimento de onda de 532nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as análises realizadas foram feitas a partir das folhas e das polpas de *Psidium guajava* nos estados de maturação verde, intermediário e maduro. Das folhas foi extraído o óleo essencial e determinada sua composição química. Das polpas dos frutos nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro foram determinados o pH e acidez titulável, os teores de compostos fenólicos, flavonóides e ácido ascórbico, e feita a quantificação de compostos por CLAE e verificação da atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical livre DPPH, quelação de íons Fe^{2+} e TBARS.

5.1 Rendimentos

No processo de liofilização das polpas, 392,54 g da polpa verde, 603,28 g de polpa no estágio intermediário e 596,86 g de polpa madura foram liofilizadas obtendo-se, ao final do processo, respectivamente, 55,97 g e rendimento de 14,26%, 61,05 g e rendimento de 10,12%, 59,56 g e rendimento de 9,98%. No fracionamento com metanol P.A, 5 g das polpas liofilizadas obtidas foram utilizadas resultando após o processo em 1,455 g e rendimento de 29,1% para o estágio verde, 1,336 g e rendimento de 26,73% para o estágio intermediário e 1,242 g e rendimento de 24,84% para o estágio maduro. (Tabela 3).

Tabela 2: Rendimentos dos processos de liofilização e fracionamento.

| Rendimentos | | |
|----------------------|--------------|---------------|
| Amostras | Liofilização | Fracionamento |
| Goiaba Verde | 14,26% | 29,1% |
| Goiaba Intermediária | 10,12% | 26,73% |
| Goiaba Madura | 9,98% | 24,84% |

5.2 Análises Físico-Químicas

Os frutos imaturos apresentaram casca de cor verde escuro e consistência rígida (Figura 3-A) e polpa com cor branca predominante (Figura 4-A). Para os frutos intemédiarios, a cor da casca apresentou tom mais claro de verde e rigidez diminuída em relação ao fruto verde (Figura 3-B), quanto a polpa, houve aparecimento de coloração na cor rosa (Figura 4-B). No estágio maduro, a casca apresentou cor amarela e textura macia ao toque, com consistência mole e aparência frágil (Figura 3-C), a polpa apresentou coloração vermelha (Figura 4-C) e um odor agradável que a diferencia dos estágios mais imaturos que não apresentam tal característica.



Figura 3: Frutos de *Psidium guajava* em três estágios de maturação A- Verde; B- Intermediário; C- Maduro.

As mudanças observadas nos três estágios de maturação decorrem dos processos metabólicos que envolvem o amadurecimento dos frutos, este é caracterizado pela produção autocatalítica de etileno, que funciona como molécula sinalizadora induzindo aumento da síntese de enzimas. A variação na cor das cascas é determinada pela concentração de clorofila. Os frutos verdes apresentam maior quantidade de clorofila que decresce com o amadurecimento assim como a intensidade de coloração chegando a mudar para amarelo no fruto maduro. A mudança de coloração das polpas está associada à atividade enzimática com produção de licopeno que aumenta durante o amadurecimento. A rigidez dos frutos é atribuída a presença de pectinas presentes na parede celular. Durante o

amadurecimento há aumento da síntese de poligalacturonase e pectinametilsterase, enzimas que atuam solubilizando as pectinas determinando assim a diminuição da rigidez. (AZZAROLI *et. al.*, 2004; BRADY, 1987; PEREIRA *et. al.*, 2006).

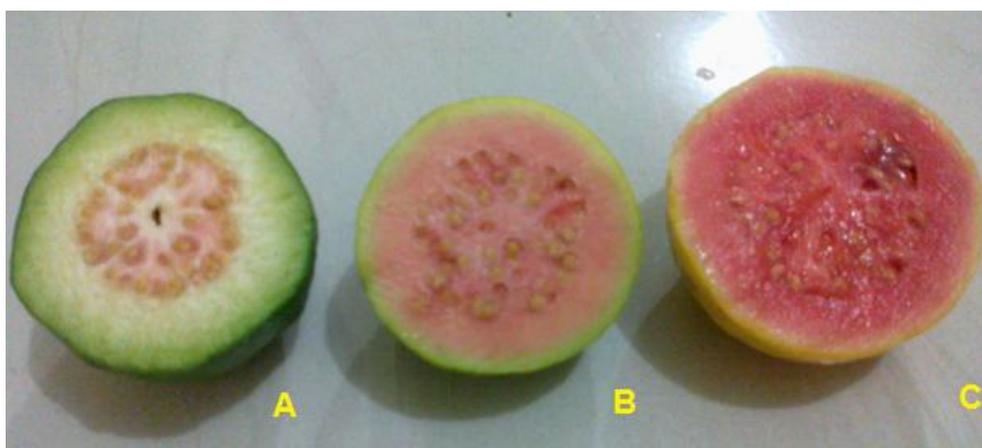


Figura 4: Corte transversal dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação: A- Verde; B- Intermediário; C- Maduro. A coloração das polpas varia da cor branca no estágio verde passando por rosa no estágio intermediário até a cor vermelha no estágio maduro

5.2.1 Prospecção fitoquímica

A análise dos dados referente à prospecção fotoquímica das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro, revelaram a presença de algumas classes de metabólitos secundários, como flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas, flavononas (Tabela 3).

Tabela 3: Classes de metabólitos secundários identificados.

| Frações metanólicas | Metabólitos | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Verde | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| Intermediário | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| Madura | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |

1 = Tanino pirrogálicos; 2 = taninos condensados; 3 = antocianinas; 4 = antocianidinas; 5 = flavonas; 6 = flavonóis; 7 = xantonas; 8 = chalconas; 9 = auronas; 10 = leucoantocianidinas; 11 = catequinas; 12 = flavononas; 13 = alcaloides; + = presença; (-) = ausência.

Apesar de não ter sido constatada a sua presença pela prospecção fitoquímica, os taninos estão presentes em frutos no estágio de maturação verde. A esta classe de metabólitos secundários, é atribuída a adstringência que os frutos apresentam. (JAIN *et. al.*, 2003 apud GUTIERREZ *et. al.*, 2008). Soares *et. al.*(2008) identificou a presença de compostos voláteis das funções orgânicas aldeído e éster além de monoterpenos e sesquiterpenos em frutos nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro e relaciona-os com o odor e sabor.

5.2.2 pH e acidez titulável

Os dados correspondentes aos valores de pH e acidez titulável para os frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, Intermediário e maduro estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 4: Valores de pH e acidez titulável para os frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro.

| Características Físico-Químicas dos Frutos | | |
|--|------|----------------------|
| Amostras | pH | Acidez titulável (%) |
| Goiaba Verde | 4,04 | 13,70% |
| Goiaba Intermediária | 4,14 | 9,15% |
| Goiaba Madura | 4,41 | 7,32% |

Foi observado um aumento do pH durante o amadurecimento e uma diminuição da acidez titulável. Estes resultados estão similares aos encontrados por YOUSUF *et. al.* (1988) e Bashir *et. al.* (2003) em seus estudos. Lee *et. al.* (2010) lista os ácidos málico e cítrico presentes nos frutos como importantes na acidez dos

frutos. O ácido cítrico é o componente majoritário entre todos os ácidos orgânicos e a redução de sua concentração durante o amadurecimento, associada ao aumento da concentração de açúcares (galactose e frutose), está relacionada adiminuição da acidez apresentada pelos frutos. Esta mesma relação pode ser feita ao observamos o comportamento do ácido áscorbico nos frutos. A diminuição da sua concentração à medida que o fruto amadurece tambme influencia no aumento do pH e diminuição da acidez titulável.(TABELA XX)

5.2.3 Teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico alcança maiores valores nos frutos ainda verdes decrescendo à medida que o fruto amadurece. Bashir *et. al.* (2003) apresenta valores semelhantes ao teor de ácido ascórbico durante a maturação assim como valores maiores encontrados na casca em relação a polpa dos frutos.

Tabela 5: Teor de Ácido ascórbico em diferentes estágios de maturação.

| Teor de Ácido Ascórbico nas Frações Metanólicas | |
|---|----------------------------------|
| Amostras | Ácido Ascórbico (mg AA/g fração) |
| Goiaba Verde | 0,48a ± 0,17 |
| Goiaba Intermediário | 0,38b ± 0,14 |
| Goiaba Madura | 0,21c ± 0,16 |

Dados mostram médias ± D.P. valores médios de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$.

5.2.4 Teores de fenóis e flavonóides totais

As concentrações de fenóis, flavonóides das frações metanólicas dos extratos aquosos dos frutos imaturos, intermediários e maduros estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6: Teor de Fenóis e Flavonóides Totais em diferentes estágios de maturação.

| Teor de Fenóis e Flavonóides Totais das Frações Metanólicas | | |
|---|----------------------------|----------------------------------|
| Amostras | Fenóis (mg de AG/g fração) | Flavonóides (mg de RUT/g fração) |
| Goiaba Verde | 22,41a ± 0,50 | 2,83a ± 1,31 |
| Goiaba Intermediário | 34,61b ± 0,32 | 5,1b ± 1,0 |
| Goiaba Madura | 32,92b ± 1,26 | 5,65b ± 1,22 |

Dados mostram médias ± D.P. valores médios de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$.

Comparando os resultados dos teores de compostos fenólicos observamos que os estágios intermediário e maduro não apresentam diferença significativa. Igual observação é feita na comparação entre os mesmo estágios nos teores de flavonóides. Bashir *et. al.* (2003) discorda dos valores obtidos e apresentam uma diminuição dos teores de compostos fenólicos durante o amadurecimento dos frutos. Ainda segundo Bashir *et. al.* (2003), os valores de compostos fenólicos são maiores nas cascas quando comparados com as polpas isoladamente e a variação de concentração das polpas de cor rosa foi pequena e na mesma faixa dos valores obtidos neste trabalho.

O estágio verde apresentou os menores teores tanto fenóis como para flavonóides, o resultado é semelhante ao encontrado no extrato hidroalcoólico por Vieira *et. al.* (2011). Entre os testes realizados, a concentração de fenóis é bem

superior a de flavonóides. A literatura posiciona a classe dos flavonóides como participante do variado grupo de compostos fenólicos que compreende ainda fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, taninos, lignanas, ligninas entre outros (BRAVO, 1998; CROFT, 1998), sendo assim, a comparação das concentrações obtidas sugere há presença de outros compostos fenólicos que não flavonóides, e não puderam ser identificados nos testes realizados.

O conteúdo molecular dos metabólitos secundários sofre grande variação e é influenciado diretamente por estágio de maturação, cultivo, origem geográfica, condições de colheita, metodologia e solventes usados na extração (VIEIRA *et. al.*, 2011). Amostras de frutos frescos apresentam maior quantidade de compostos fenólicos após extração que frutos congelados para posterior liofilização. Durante o congelamento, as células dos frutos podem passar por um processo de junção dos compartimentos por quebra da estrutura interna culminando na aproximação de enzimas e ativadores dos compostos fenólicos causando a sua degradação (SHOFIAN *et. al.*, 2001).

5.2.5 Análise por CLAE

O perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduros para fenóis e flavonóides revelou a presença de ácido gálico (t_R = 12.65 min; pico 1), catequina (t_R = 16.79 min; pico 2), ácido clorogênico (t_R = 24.83 min; pico 3), ácido cafeico (t_R = 28.05 min; pico 4), epicatequina (t_R = 34.96 min; pico 5), rutina (t_R = 40.01 min, pico 6), quercitrina (t_R = 44.27 min; pico 7), isoquercitrina (t_R = 46.85 min; pico 8), quercetina (t_R = 50.13 min; pico 9), campferol (t_R = 55.23 min; pico 10) e campferol glicosilado (t_R = 63.47 min; pico 11), além de outros componentes em menor concentração (Figura 5).

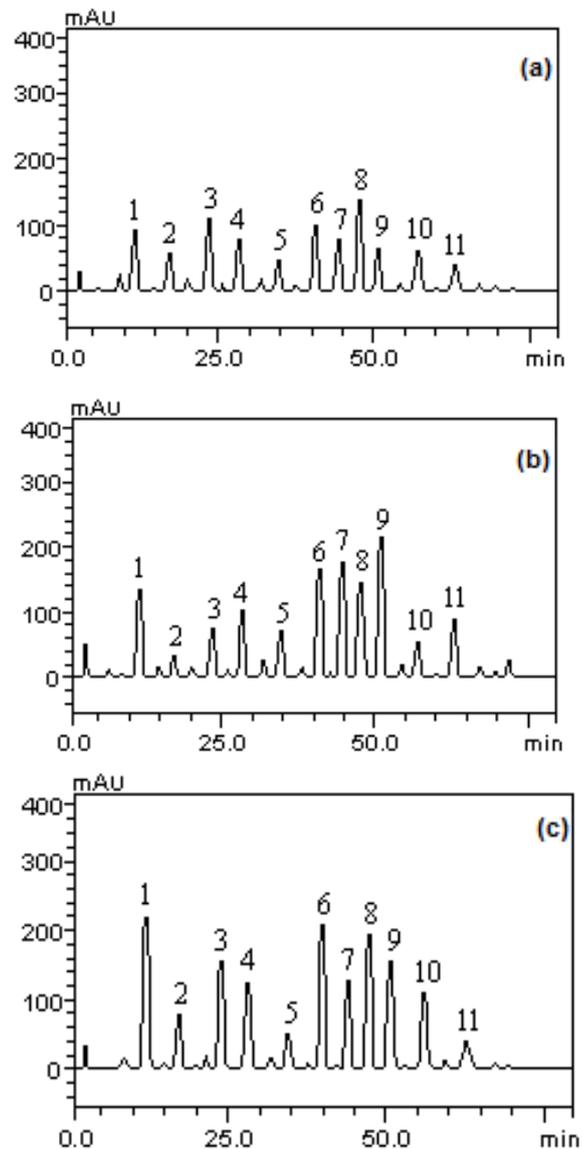


Figura 5: Perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde (a), Intermediário (b) e Maduro (c) para fenóis e flavonóides. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), epicatequina (pico 5), rutina (pico 6), quercitrina (pico 7), isoquercitrina (pico 8), quercetina (pico 9), campferol (pico 10) e campeferol glicosilado (pico 11).

A análise confirmou a presença de compostos fenólicos e flavonóides como indicado nos testes anteriores. A concentração crescente para compostos fenólicos e flavonóides à medida que os frutos amadureceram também foi confirmada como observado anteriormente. As estruturas dos compostos identificados estão esquematizadas nas Figuras 6 e Figura 7 e Figura 8. A concentração em mg/g das substâncias encontradas estão demonstradas na Tabela 7.

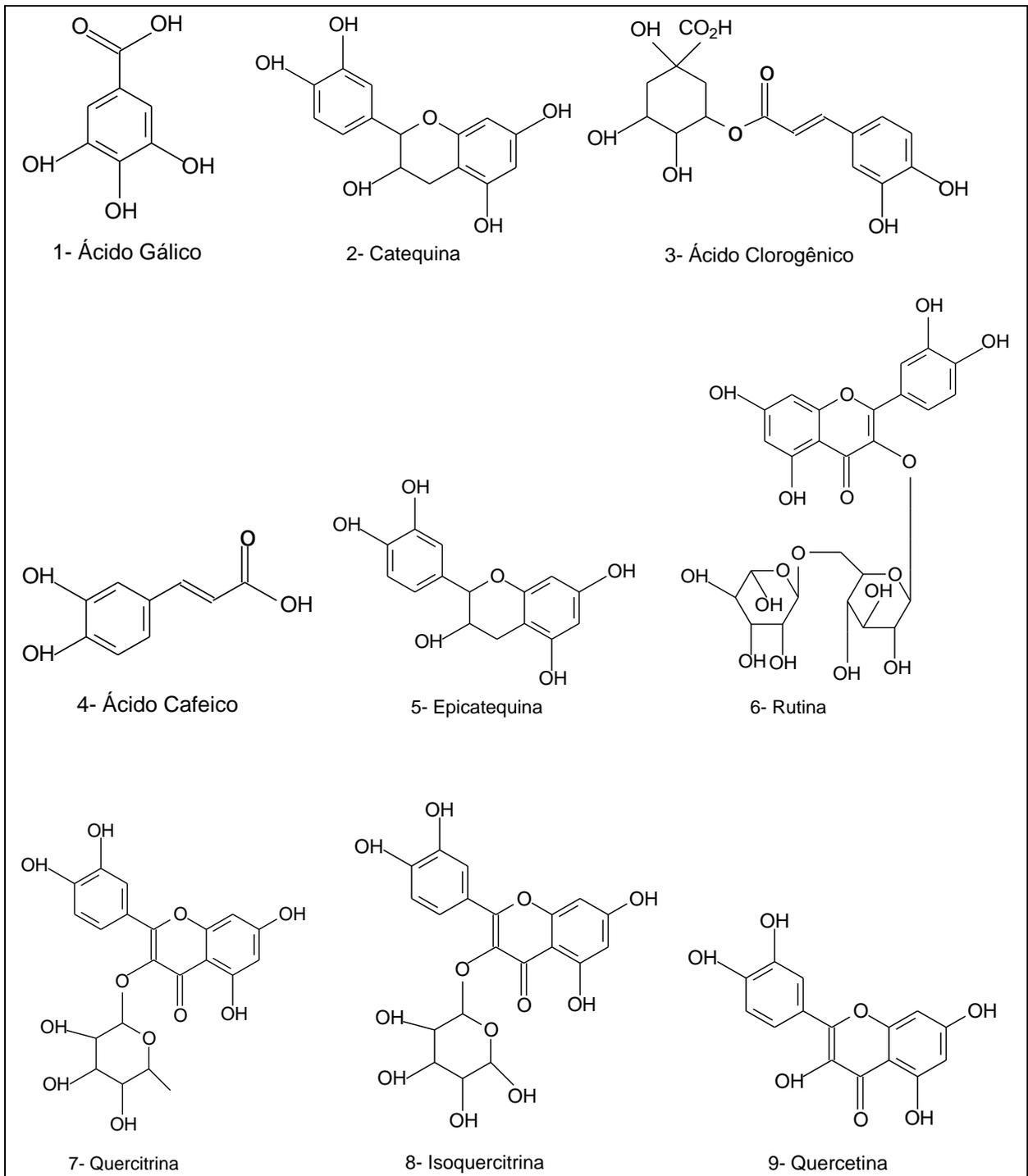


Figura 6: Estruturas químicas dos compostos identificados nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde, Intermediário e Maduro.

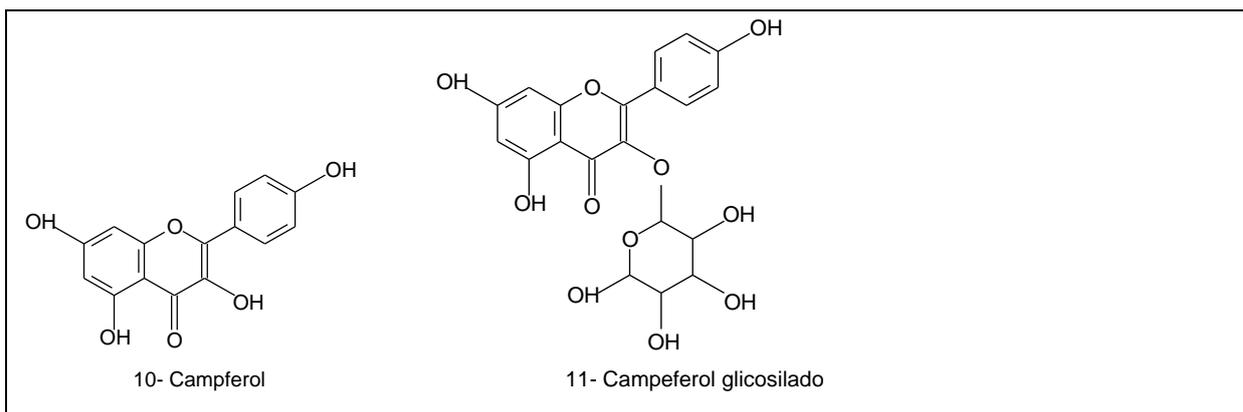


Figura 6 : Estruturas químicas dos compostos identificados nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde, Intermediário e Maduro.

Tabela 7: Composição de fenóis e flavonoides de das frações metanólicas de frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro.

| Compostos | Maduro | | Intermediário | | Verde | | LOQ | LOD |
|------------------------|---------------|----------|----------------------|----------|---------------|----------|--------------|--------------|
| | mg/g | % | mg/g | % | mg/g | % | µg/mL | µg/mL |
| Ácido gálico | 12,56 ± 0,03a | 1,25 | 7,65 ± 0,01a | 0,76 | 4,73 ± 0,01a | 0,47 | 0,025 | 0,083 |
| Catequina | 4,91 ± 0,01b | 0,49 | 1,74 ± 0,01b | 0,17 | 3,92 ± 0,03b | 0,39 | 0,019 | 0,062 |
| Ácido clorogênico | 9,70 ± 0,03c | 0,97 | 4,32 ± 0,02c | 0,43 | 5,11 ± 0,03a | 0,51 | 0,038 | 0,125 |
| Ácido cafeico | 7,32 ± 0,02d | 0,73 | 5,76 ± 0,01d | 0,57 | 4,57 ± 0,02ab | 0,45 | 0,007 | 0,023 |
| Epicatequina | 3,04 ± 0,01e | 0,30 | 4,17 ± 0,01c | 0,41 | 3,62 ± 0,01b | 0,36 | 0,039 | 0,128 |
| Rutina | 12,85 ± 0,04a | 1,28 | 8,28 ± 0,03e | 0,82 | 5,38 ± 0,01a | 0,53 | 0,011 | 0,034 |
| Quercitrina | 7,03 ± 0,01d | 0,70 | 8,95 ± 0,01e | 0,89 | 4,69 ± 0,03a | 0,46 | 0,015 | 0,049 |
| Isoquercitrina | 12,34 ± 0,01a | 1,23 | 7,91 ± 0,01a | 0,79 | 8,19 ± 0,02c | 0,81 | 0,009 | 0,031 |
| Quercetina | 9,45 ± 0,02c | 0,94 | 12,37 ± 0,03f | 1,23 | 4,05 ± 0,01b | 0,40 | 0,008 | 0,029 |
| Campferol | 6,58 ± 0,02d | 0,65 | 2,31 ± 0,02e | 0,23 | 4,23 ± 0,02b | 0,42 | 0,023 | 0,075 |
| Campferol glicosilado* | 2,98 ± 0,03e | 0,29 | 5,40 ± 0,02d | 0,54 | 3,50 ± 0,01b | 0,35 | - | - |

*Quantificado como Campferol. Os resultados são expressos com média ± D.P. de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey $p < 0.01$.

O perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduros para carotenóides revelou a presença de tocoferol (tR = 13.65 min; pico 1), licopeno (tR = 17.34 min; pico 2) e β -caroteno (tR = 24.01 min) (Figura 9). As estruturas dos compostos identificadas estão representadas na Figura 10.

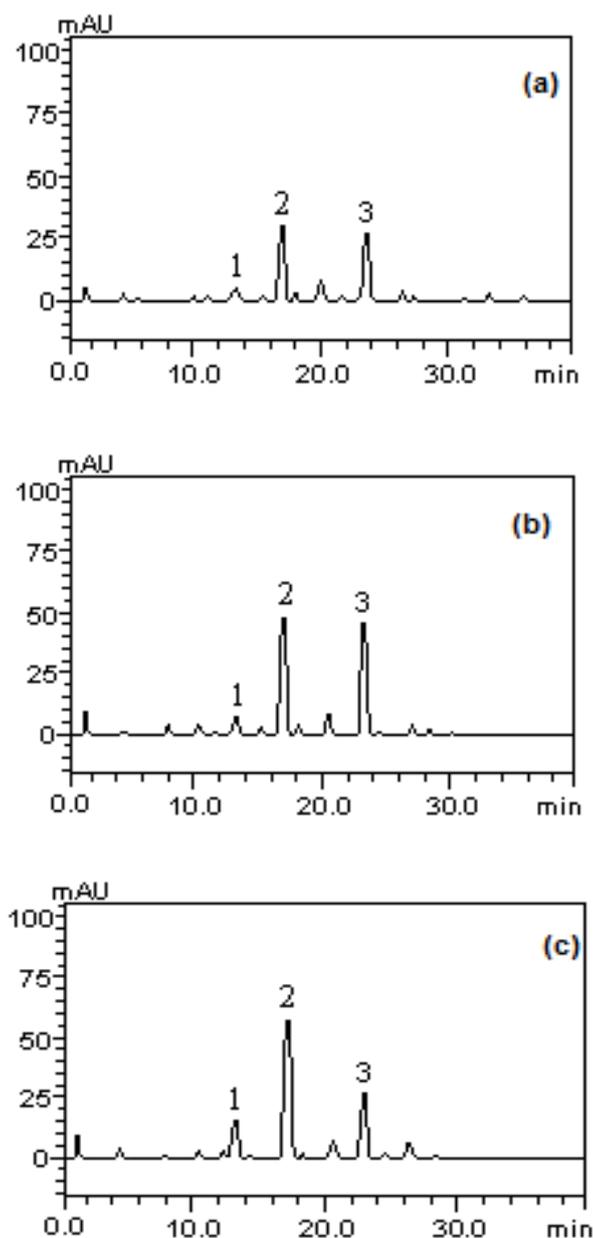


Figura 7: Perfil de análise das frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde (a), Intermediário (b) e Maduro (c) para carotenóides. Tocoferol (pico 1), licopeno (pico 2), β -caroteno (pico 3).

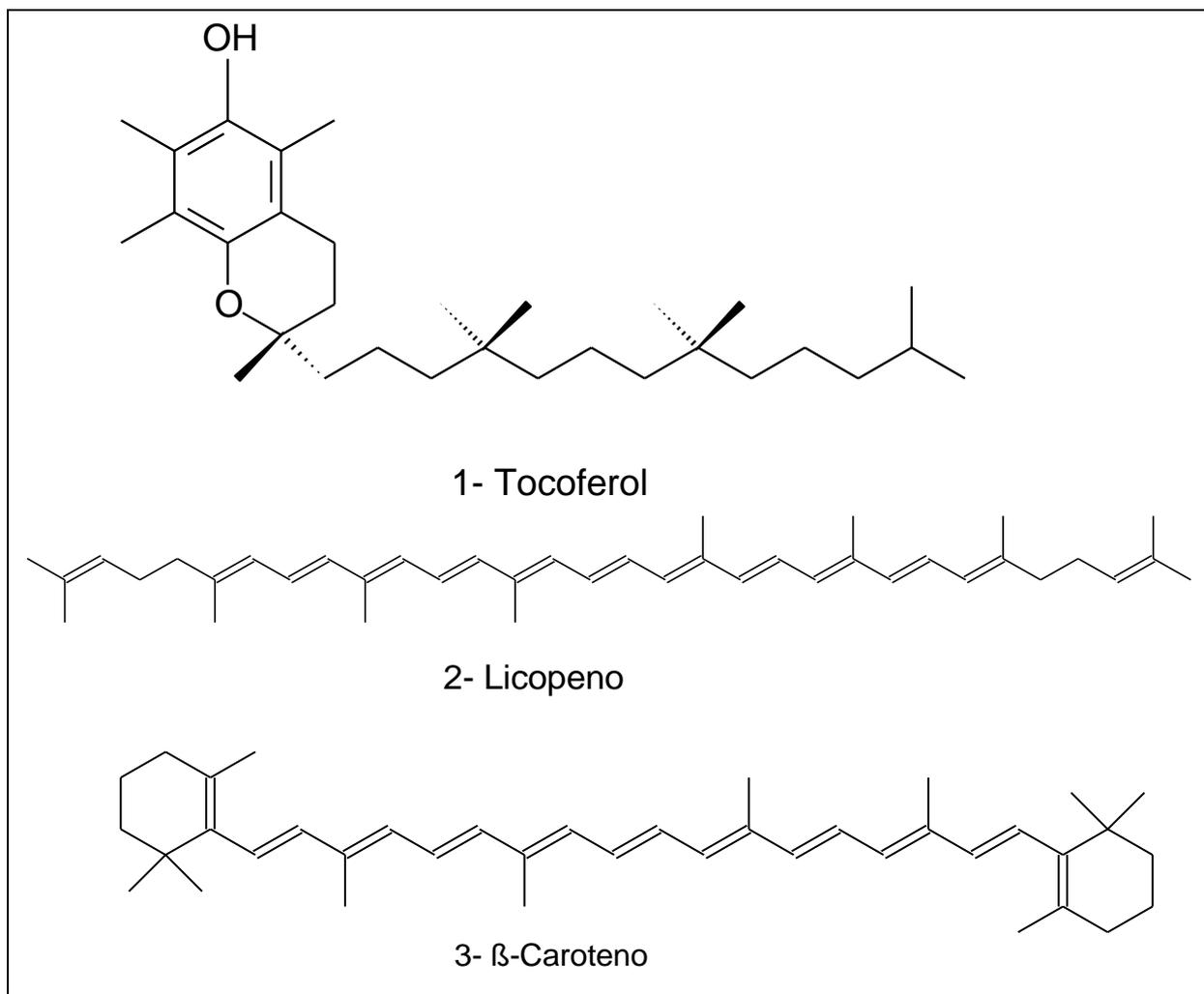


Figura 8: Estruturas químicas dos carotenóides identificados nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação Verde, Intermediário e Maduro.

Assim como observado para os compostos fenólicos e flavonóides, a concentração de carotenóides aumenta com o amadurecimento dos frutos (Tabela 8). Resultado confirmado com observação de aumento da intensidade da cor vermelha das polpas dos frutos verde até o maduro devido aumento da concentração de licopeno.

Tabela 8: Composição de carotenóides das frações metanólicas de frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro.

| Compostos | Maduro | | Intermediário | | Verde | | LOQ | LOD |
|------------|---------------|------|---------------|------|--------------|------|-------|-------|
| | mg/g | % | mg/g | % | mg/g | % | µg/mL | µg/mL |
| Tocoferol | 4,15 ± 0,01a | 0,41 | 1,70 ± 0,02a | 0,17 | 1,43 ± 0,01a | 0,14 | 0,023 | 0,075 |
| Licopeno | 12,37 ± 0,01b | 1,23 | 10,63 ± 0,01b | 1,06 | 6,27 ± 0,03b | 0,62 | 0,017 | 0,056 |
| β-Caroteno | 6,82 ± 0,03c | 0,68 | 10,25 ± 0,01b | 1,02 | 5,98 ± 0,02b | 0,59 | 0,009 | 0,028 |

Os resultados são expressos com media ± D.P. de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey p< 0.001

5.2.6 Composição química do óleo essencial

O óleo essencial de *Psidium guajava* obtido por hidrodestilação e identificado em CG/EM teve rendimento (m/m) de 0,017%. O mesmo apresenta cor amarelo claro e odor característico desagradável. Foram identificados quatorze constituintes químicos correspondendo a 99,76 % do óleo essencial. Resultados da análise química qualitativa e quantitativa estão mostrados na Tabela 5. Podemos observar que α -terpineol (35,86 %), 1,8-cineol (18,83 %), β -cariofileno (10,08 %) são os componentes majoritários. Esses dados estão de acordo com vários trabalhos relatados na literatura, que identificaram no óleo das folhas de *P. guajava* muitas substâncias em comum com o óleo em estudo. Pino *et. al.* (2001) encontraram o β -cariofileno (21,6 %), o nerolidol (19,2 %) e o selin-11-en-4- α -ol (13,4 %) como componentes predominantes. Silva *et. al.* (2003), identificaram o 1,8-cineol (21,4 %) como componente majoritário em um óleo das folhas de *P. guajava* da Amazônia, enquanto o limoneno (41,2 %) e o β -cariofileno (21,3 %) constituíram os componentes principais no óleo obtido na Nigéria (OGUNWANDE *et al.*, 2003).

As diferenças observadas nas composições químicas qualitativas e quantitativas dos óleos relacionados podem está relacionadas a variações de cultivos, climáticas, geográficas, horários de coletas e métodos de extrações. Todos esses fatores oferecem grande impacto no perfil da composição química dos voláteis.

Tabela 9: Composição química (%) do óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*.

| Constituintes | (%) | Índice de retenção (Literatura)* |
|-----------------------------|--------------|----------------------------------|
| 1,8-cineol | 18,83 | 1033 |
| cis-ocimeno | 1,78 | 1040 |
| sabineno | 1,69 | 1097 |
| borneol | 1,16 | 1165 |
| 4-terpineol | 3,91 | 1177 |
| α -terpineol | 35,86 | 1189 |
| β -cariofileno | 10,08 | 1418 |
| α -humuleno | 3,07 | 1454 |
| guaieeno | 4,42 | 1490 |
| α -selineno | 6,79 | 1494 |
| nerolidol | 2,84 | 1564 |
| óxido cariofileno | 6,89 | 1581 |
| cadinol | 1,16 | 1640 |
| selin-11-en-4- α -ol | 1,28 | 1652 |
| TOTAL | 99,76 | |

5.3 Atividade Antioxidante

5.3.1 DPPH

As frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro foram capazes de neutralizar o radical livre DPPH (Gráfico 1). As concentrações para Cl_{50} indicaram valores próximos, sem diferença estatística significativa entre eles, com melhor resultado para o estágio maduro com concentração de 848,78 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 10).

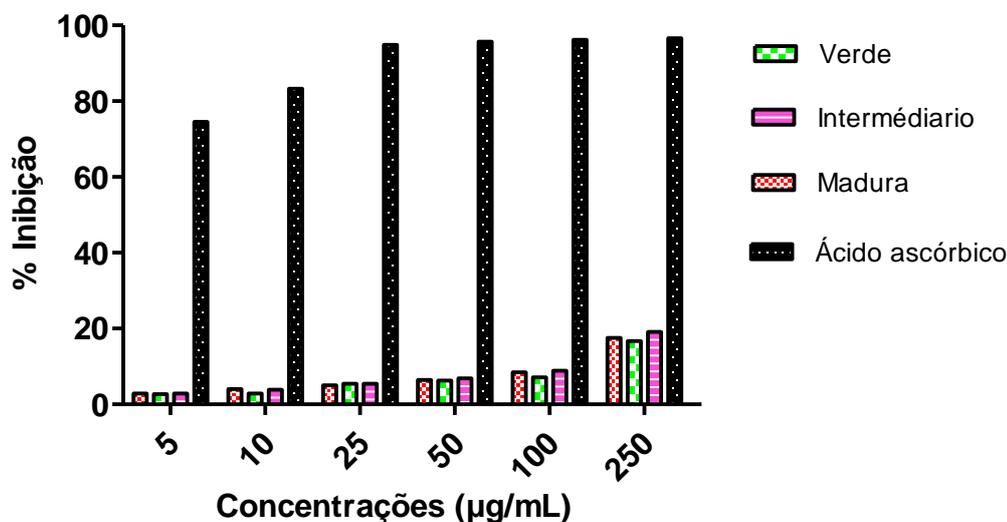


Gráfico 1: Efeitos de diferentes concentrações das frações metanólicas dos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro frente ao radical DPPH.

Tabela 10: Valores da concentração inibitória a 50% (CI_{50} µg/mL) para as frações metanólicas dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro de *Psidium guajava* obtidos por meio de reação com o radical livre DPPH.

| Amostras | CI_{50} (µg/mL) |
|-----------------|-------------------|
| Verde | 859,33 |
| Intermediário | 854,63 |
| Maduro | 848,78 |
| Ácido ascórbico | 2,25 |

A reação de neutralização do radical livre DPPH guarda um grau de proporcionalidade com a quantidade de compostos doadores de elétrons ou de prótons, quanto maior a capacidade de doação, maior será a neutralização. Compostos fenólicos em geral apresentam estrutura química com grupos hidroxílicos, carboxílicos e carbonílicos ligados ao anel aromático que são facilmente atacados por espécies reativas, a presença destes grupos está diretamente ligada ao poder de neutralização das espécies reativas (VAN ACKER *et. al.*, 1995).

Cao *et al.* (1997) correlaciona a quantidade de hidroxilas ligadas à estrutura básica dos flavonóides com a sua capacidade antioxidante e observa que os flavonóides de maior número de hidroxilas tem maior potencial antioxidante. Gutierrez *et al.* (2008) lista a presença de flavonóides com multiligantes hidroxílicos (quercetina, leucocianidina, campferol e guajaverina), confirmados pela análise em CLAE, em frutos de goiaba. Estes flavonóides aumentam a concentração durante o amadurecimento o que pode ser relacionado a maior atividade neutralizante do radical DPPH ter sido observada no estágio maduro.

5.2.2 Quelação de íons Fe²⁺

Os resultados obtidos para a capacidade de quelação dos íons Fe²⁺ pelas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro estão apresentados na Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente.

Tabela 11: Porcentagem de Fe²⁺ quelado pela fração metanólica dos frutos de *Psidium guajava* no estágio de maturação verde, intermediário e maduro.

| Porcentagem de Fe ²⁺ Quelado em Diferentes Estágios de Maturação | | | |
|---|--------|---------------|--------|
| Concentração (µg/mL) | Verde | Intermediário | Maduro |
| 250 | 21,93% | 9,2% | 6,57% |
| 100 | 17,09% | 3,73% | 0,89% |
| 50 | 14,57% | 0% | 0% |
| 25 | 10,50% | 0% | 0% |
| 10 | 6,36% | 0% | 0% |

A maior porcentagem de quelação foi encontrada no estágio de maturação verde na concentração de 250 µg/mL com 21,93%, à medida que a concentração foi

reduzida, a porcentagem de quelação também diminuiu proporcionalmente. Diferente do estágio de maturação verde, os estágios intermediário e maduro apresentaram menores porcentagens de quelação dos íons Fe^{2+} . Na sua maior concentração, o estágio intermediário apresentou 9,2% assim como o estágio maduro que apresentou 6,57%. Para ambos, nem todas as concentrações foram capaz de quelar os íons ferro.

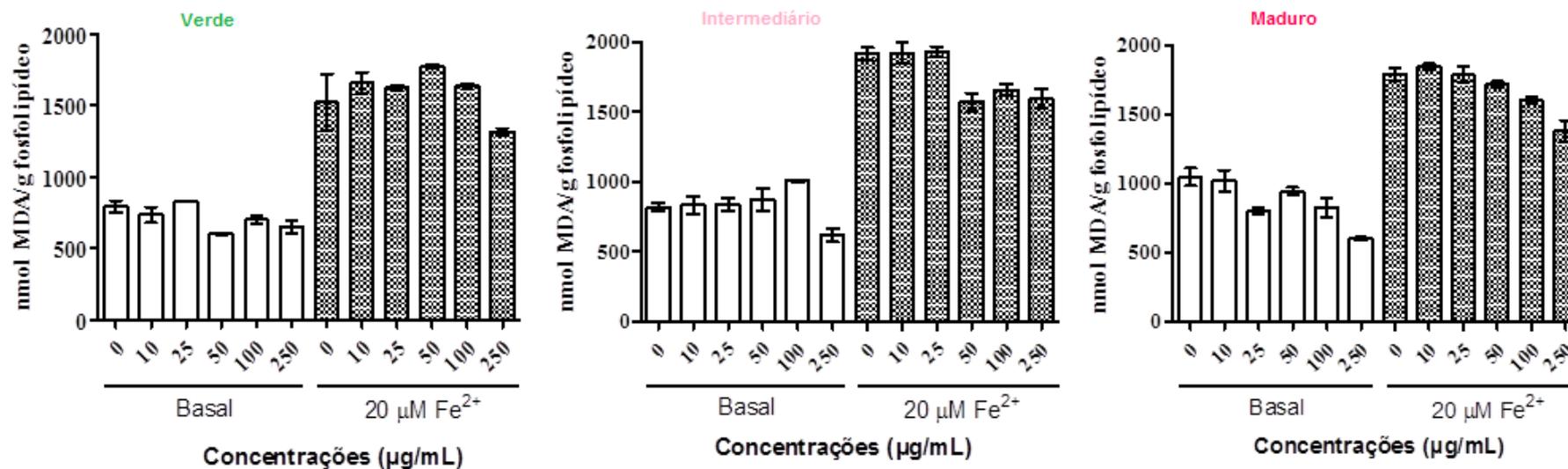
Os íons ferro participam da produção de EROS mostrada na Equação 4 e Equação 5. A quelação destes íons por compostos diversos presentes nas frações metanólicas dos frutos de *Psidium guajava*, está associada a um efeito protetor contra EROS prejudiciais aos sistemas biológicos. O estágio verde de maturação mostrou maior atividade por está via antioxidante em relação a neutralização direta das EROS observado no teste do sequestro do radical livre DPPH. Disler *et. al.* (1975) demonstraram que em ratos, taninos presente em chás são capazes de atuar como quelantes de ferro inibindo a absorção intestinal do metal. Jain *et. al.* (2003) apud Gutierrez *et. al.* (2008) cita os frutos verdes como ricos em taninos e por correlação com a sua atividade *in vivo* observada em ratos, podemos supor que a maior atividade quelante apresentada pelo fruto no estágio mais imaturo deve-se a presença de taninos.

5.2.3 Peroxidação lipídica

A inibição do processo de peroxidação lipídica apresentou indícios de redução quanto aos níveis basais para as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro que se destaca dos demais. O teste apresentou grande variação entre os resultados e a atividade antioxidante não foi considerada significativa para nenhuma das amostras e concentrações testadas. Os dados obtidos estão apresentados no Gráfico 2.

Gull *et. al.* (2012) determinaram a atividade antioxidante dos frutos de *Psidium guajava* em diferentes estágios de maturação, colhidos em 3 regiões diferentes, pela inibição oxidação do ácido linoleico induzida por tiocianato. Os valores obtidos apresentaram significante atividade sendo o estágio mais imaturo o de melhor resultado. Embora seus estudos envolveram um metodologia diferente, a comparação com os resultados obtidos neste trabalho é válida, visto que, a via antioxidante em estudo (inibição da peroxidação lipídica) é comum aos trabalhos.

Figura 9: Gráficos resultantes da análise da peroxidação lipídica induzida e as propriedades antioxidantes das frações metanólicas dos estágios de maturação verde, intermediário e maduro dos frutos de *Psidium guajava*.



6 CONCLUSÕES

- Foram obtidas as polpas dos frutos de *Psidium guajava* nos estágios de maturação verde, intermediário e maduro. A diferenciação foi feita baseada na cor das cascas, rigidez dos frutos e cor das polpas.
- O pH e acidez das polpas foram determinados e demonstraram o estágio de maturação maduro como o mais alcalino.
- Foram obtidos óleos essenciais das folhas de *Psidium guajava* com rendimento de 0,017%, coloração amarelo claro e odor desagradável.
- A elucidação da composição química demonstrou que o óleo apresenta composição diversa com a presença de 14 compostos. Os compostos majoritários são α -terpineol (35,86 %), 1,8-cineol (18,83 %), β -cariofileno (10,08 %).
- Foram obtidos extratos aquosos das polpas nos três estágios de maturação
- Foram obtidas frações metanólicas dos extratos aquosos nos três estágios de maturação.
- A prospecção fitoquímica apresentou para as três frações a existência de flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas e flavononas.
- A análise por CLAE das frações metanólicas revelou a presença de ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico epicatequina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, campferol e campeferol glicosilado, Tocoferol, licopeno e β -Caroteno.
- As frações metanólicas dos três estágios de maturação demonstraram a presença de compostos fenólicos, flavonóides e ácido ascórbico, assim como a capacidade de neutralizar o radical livre DPPH, sendo o estágio de maturação maduro o que apresentou melhor resultado e a capacidade de quelar os íons Fe^{2+} , sendo o estágio de maturação verde o que apresentou melhor resultado.
- O teste antioxidante da peroxidação lipídica não mostrou resultados significantes.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001
- AGARWAL, A.; GUPTA, S. SHARMA, R.K Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod. Boil. Endocrinol.**, v. 3: 28, 2005.
- AL GHOULEH, I.; KHOO, N. K. H.; KNAUS, U. G.; GRIENDLING, K. K.; TOUYZ, R. M.; THANNICKAL, V. J.; BARCHOWSKY, A.; NAUSEEF, W. M.; KELLEY, E. E.; BAUER, P. M.; DARLEY-USMAR, V.; SHIVA, S.; CIFUENTES-PAGANO, E.; FREEMAN, B. A.; GLADWIN, M. T.; PAGANO, P. J. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1271-1288, 2011.
- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats índices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of natural products**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.
- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats índices simulation in essential oils analysis. **Quim. Nov.**, v. 13, n.4, p. 282-284, 1990.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.
- ATKINS, P. **Físico-Química, 7ª ed., vol. 2**, LTC Editora: Rio de Janeiro, 2004.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; SPOTO, M. H. F. Estádios de maturação e qualidade pós-colheita de goiabas' Pedro Sato'. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 26, n. 1, p. 29-31, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 113-123, 2006.

BASHIR, H. A.; ABU-GOUKH, A. A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 557-563, 2003.

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.

BENOV, L.; BEEMA, A. F. Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 429-433, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas 12(2): 123 - 130, maio/ago. 1999.

BOLINGON, A. A.; SAGRILLO, M. R.; MACHADO, L. F.; FILHO, O. S.; MACHADO, M. M.; 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.

BRADY, C. J. Fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, n. 1, p. 155-178, 1987.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACDO, J. F. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 528, 2002.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondria. **Front Biosci**, v. 12, n. 1024-1033, p. 452, 2007.

CAMMERER, M. A. **Efeitos de uma dieta rica em flavonóides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia**

coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado. Tese p. 21, Porto Alegre, 2012.

CAMPOS, L Z. O. **Etnobotânica do gênero Psidium L. (Myrtaceae) no Cerrado brasileiro.** Tese p.13, Brasília, 2010.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L.; Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships **Free radicals. Biol. Med.** 22, p.749, 1997.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHANG, W. S. **Studies on active principles of hypoglycemic effect from Psidium guajava (I).** 1982. Tese de Doutorado. Master Thesis, The Graduate Institute of Pharmacy, Taipei Medical College.

CHENG, J.T.; YANG, R. S. Hypoglycemic effect of guava juice in mice and human subjects. **The American journal of Chinese medicine**, v. 11, n. 01n04, p. 74-76, 1983.

CONWAY, P. **Tree medicine: a comprehensive guide to the healing power of over 170 trees.** Judy Piatkus (Publishers) Limited p. 2173-2177, 2001.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COUTIÑO, R. R.; HERNÁNDEZ, C. P.; GILES, R. H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of Escherichia coli 0157: H7. **Archives of Medical Research**, v. 32, n. 4, p. 251-257, 2001.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 435-442, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, p.33-44, jan./jun., 2004.

DISLER, P. B., LYNCH, S.R.; TORRANCE, J. D.; SAYERS, M. H.; BOTHWELL, T. H.; CHARLTON R. W. The mechanism of the inhibition of iron absorption by tea. **The South African journal of medical sciences**, v. 40, n. 4, p. 109, 1975.

DIZDAROGLU, M.; PAWEL, J.; MUSTAFA B.; HENRY R. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102-1115, 2002.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 79-106, 2000.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FANHANI, A. P. G.; FERREIRA, M. P. AGENTES ANTIOXIDANTE: SEU PAPEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE DOS ATLETAS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 1,

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, Ano IV, No. 2, jul./dez. 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. FRANZON, R. et al. **Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Embrapa Cerrados, p.14, 2009.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO. R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M.. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Revista brasileira de reumatologia= Brazilian journal of rheumatology. Campinas. Vol. 48, n. 1 (jan. 2008), p. 17-24, 2008.**

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, n. 1, p. 13-18, 1999.

GAO, J.; CHEN, J.; TANG, X.; PAN, L.; XU, L.; ZHAO, L.; XU, Q. Cechanism underluing mitochondrial protections of Asiatic acid against hepapotoxixity in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 227-233, 2006.

GOTTLIEB, O. R. **Modified distillation trap.** *Chemist. Analyst.*, V. 49, n.1, p.114-116, 1960.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R. MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C; SOARES-SILVA, L. H. WILSON, P. G.; LUCAS, E. *World Checklist of Myrtaceae. Kew, royal botanis gardens*, p. 455, 2008.

GULL, J.; SULTANA, B.; ANWAR, F.; NASEER, R.; ASHRAF, M.; ASHAFUZZAMAN, M.. Variation in antioxidant attributes at three ripening stages of guava (*Psidium guajava* L.) fruit from different geographical regions of Pakistan. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3165-3180, 2012.

GUTIERREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals an catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods enzymol**, 186, 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4rd edition, Oxford University Press, 2007.

HELRICH, K. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., Arlington, A.O.A.C., 1990.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the

treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97, p. 1027-1031, 2002.

HSIEH, C.L., LIN, Y. C., KO, W. S., PENG, C. H., HUANG, C. N. PENG, R. Y., Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LSL glycations induced by glucose and glycoxal. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 357-363, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^aed., v. 1. São Paulo, 1985.

JAIN, N., DHAWAN, K.; MALHOTRA, S.; SINGH, R. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 309-315, 2003.

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.

JIMÉNEZ, E. A.; RINCON, M.; PULIDO, R.; SAURA, C. F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

JUNIOR, A. A. J.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES M. M. S.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 32, p. 434-449, 1998.

KONDO, S.; KITTIKORN, M.; KANLAYANARAT, S. Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, n. 3, p. 309-318, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERSESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LANDRUM, L. R.; CLARK, W. D.; SHARP, W. P. BRENDENCKE, J. Hybridization between *Psidium guajava* and *P. guineense* (Myrtaceae). **Economic Botany**, 49 (2), 153-161, 1995.

LEE, S. CHOI, H. K.; CHO, S. K.; KIM, Y. S.. Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data-processing approaches. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 29, p. 2983-2988, 2010.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 18, n. 2, p. 60-5, 2003.

LEME JUNIOR, J.; MALAVOLTA, E. Determinação fotométrica de ácido ascórbico. **Anais da ESALQ**, v.7, p.115-129, 1950.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1003-1008, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 137-147, 2009.

LOBO, V.; PATIL, A. PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn rev**, v. 4, n. 8, p. 118-125, 2010.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, P.; Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and experimental systems. **J. Cell Mol. Med.**, 14 (4), 840-860, 2010.

MATOS, F. J. A **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas- sistema de utilização das plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**, 4º ed., Edições UFC, p. 267, Fortaleza, 2002.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS 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.***Phytother. Res.*,15: 127-130,2001.

MEDINA, M. L.; PAGANO, F. Characterization of guava pulp (*Psidium guajava* L.) "Criolla Roja". **Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia**, v. 20, n. 1, p. 72-86, 2003.

MIQUEL, J.; RAMÍREZ-BOSCÁ, A.; RAMÍREZ-BOSCÁ, J. V.; ALPERI, J. D.; Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 42, n. 3, p. 289, 2006.

MONDAL, K. MALHOTRA, S. P.; JAIN V.; SINGH, R. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 4, p. 327-334, 2009.

NEIRA, G. A. M.; RAMÍREZ, G. M. Q. B. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DOS ESPECIES DE GUA-YABA CONTRA STREPTOCOCCUS MUTANS Y ESCHERICHIA COLI. **Actual Biol**, v. 27, n. Supl 1, p. 27-30, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; ADELEKE, K. A.; EKUNDAYO, O.; KOENIG, W. A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. **Flavour and Fragrance Journal**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 136-138, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, n. 95, 351-358, 1979.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 2, p. 132-145, 2007.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 34, n. 3, 2009.

PEREIRA, T.; CARLOS, L. A.; OLIVEIRA, J. G.; MONTEIRO, A. R. Influência das condições de armazenamento nas características físicas e químicas de goiaba (*Psidium guajava*), cv. Cortibel de polpa branca. **Ceres**, v. 53, n. 306, p. 276-284, 2006.

PINO, J. A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, [S.l.], v. 31, p. 61-62, 2001.

PUNTEL, R. L.; ROODS, D. H.; GROTTTO, D.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. **Life Science**, 81, 51-62, 2007.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Interv Aging**, 2 (2), 219-236, 2007.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZO, M. C. G; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico; The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Biosci. j**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radicals. Biol. Med.** 20, p.936, 1996.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR N. F.; VELLASCO, A. P.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SABIR S.M.; AHMAD S.D.; HAMIF, 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.

SALA, O. Uma introdução à espectroscopia atômica - O átomo de hidrogênio. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1773, 2007.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SEIFRIZ, I. **Propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal: Proteção da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio sobre membranas lipídicas e ação como sequestradores de radicais livres**. Tese, Florianópolis, 2012.

SENTURK, M.; KUFREVIOGLU, O. I.; CIFTCI, M. Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 420-424, 2009.

SHOFIAN, N. M.; HAMID, A. A.; OSMAN, A.; SAARI, N.; ANWAR, F.; DEK, M. S. P.; HAIRUDDIN, M. R. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 7, p. 4678-4692, 2011.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. In: **Eur. J. Biochem. Reviews** 215, 213-219, 1993.

SILVA, A. M. O. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos**. Tese, p. 15 São Paulo, 2012.

SILVA, J. D.; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* ssp. **Flavour and Fragrance Journal**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 240-243, 2003.

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

SOARES, F. D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M. O. M. MONTEIRO, A.R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food chemistry**, v. 100, n. 1, p. 15-21, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes; Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V. 158, p. 51-54, 2008.

SOUSA, C. M de M.; SILVA, H. R.; JÚNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. **Registry of Mass Spectra Date Base**. Washington DC. Government Printing Office, 1974.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, 36, 254-257, 2005.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D. MANCOL, J. CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKON, W. P.; VAN DER VIJGH, BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, M. A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função Low molecular weight pro-antioxidants and antioxidants from diet: structure and function. **Nutrire ver. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, SP, v. 31 n. 3 p. 95-118 dez. 2006.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

VENKATACHALAM, R. N.; SINGH, K.; MARAR, T. **Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Psidium guajava***. Free Rad. Antiox. Vol 2, ja-mar, 2012.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

WILSON, C. W.; SHAW, P. E.; CAMPBELL, C. W. Determination of organic acids and sugars in guava (*Psidium guajava* L.) cultivars by high-performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 8, p. 777-780, 2006.

WILSON, G. W.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. *Myrtaceae* revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n.11, p. 2013-2025, 2001.

YUSOF, S.; MOHAMED, S.; BAKAR, A. A. Effect of fruit maturity on the quality and acceptability of guava puree. **Food chemistry**, v. 30, n. 1, p. 45-58, 1988.

ZIMMERMANN, A. N.; KRISTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disc. Scientia**, v.9, n.1, p. 51-68, 2008.