

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ANGÉLICA SIMÕES FERRARI**

**AVALIAÇÃO DE FITOQUÍMICOS E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE CELULAR  
E ANTIPROLIFERATIVA DO SUCO DE GRUMIXAMA (*Eugenia brasiliensis*) E  
DO SUCO DE CAMBUCI (*Campomanesia phaea*)**

Alfenas/MG

2014

**ANGÉLICA SIMÕES FERRARI**

**AVALIAÇÃO DE FITOQUÍMICOS E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE CELULAR  
E ANTIPROLIFERATIVA DO SUCO DE GRUMIXAMA (*Eugenia brasiliensis*) E  
DO SUCO DE CAMBUCI (*Campomanesia phaea*)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas – MG.

Área de Concentração: Fisiopatologia.

Subárea: Ciência de Alimentos.

Orientador: Luciano Bruno de Carvalho Silva.

Alfenas/MG

2014

Ferrari, Angélica Simões.

Avaliação de fitoquímicos e das atividades antioxidante celular e antiproliferativa do suco de Grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e do suco de Cambuci (*Campomanesia phaea*) / Angélica Simões Ferrari - Alfenas, MG, 2014.

95 f. -

Orientador: Luciano Bruno de Carvalho Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Suco de frutas. 2. Efeito Antioxidante. 3. Cancer relacionado a terapia. I. Silva, Luciano Bruno de Carvalho. II. Título.

CDD: 615.321


ANGÉLICA SIMÕES FERRARI

**AVALIAÇÃO DE FITOQUÍMICOS E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE CELULAR  
E ANTIPROLIFERATIVA DO SUCO DE GRUMIXAMA (*Eugenia brasiliensis*) E  
DO SUCO DE CAMBUCI (*Campomanesia phaea*)**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Aplicada à Saúde pela Universidade  
Federal de Alfenas – MG.  
Área de Concentração: Fisiopatologia.  
Subárea: Ciência dos Alimentos.

Aprovada em: 07 / 08 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. : Luciano Bruno de Carvalho Silva  
Instituição: Unifal-MG Assinatura: 

Prof. : Elisa de Almeida Fochiz  
Instituição: UNICAMP-SP Assinatura: Elisopótez

Prof. : Flávia Della Lucia  
Instituição: UNIFAL-MG Assinatura: Flávia Della Lucia

Dedico aos meus pais Landerson e Janice, pelo amor incondicional, carinho, apoio e confiança, que tanto me ajudaram na realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre guiar os meus passos conduzindo-me aos melhores caminhos, e a Nossa Senhora, pela proteção e bênção constante.

A minha mãe Janice e ao meu pai Landerson, pessoas de tamanha importância, que me educaram, me transmitiram princípios de fé, amor e amizade, e que sempre acreditaram na minha capacidade e me encorajaram a batalhar pelos meus objetivos. Obrigada pelo amor incondicional, incentivo, pela presença constante em minha vida, por serem meu porto seguro, por acreditarem em mim e por tantas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que os meus se tornassem realidade. Sem o amor, carinho, apoio e dedicação de vocês nada disso seria possível. A vocês, meu agradecimento infinito e meu eterno amor!

Ao meu namorado Matheus, por entender as várias vezes que me ausentei em virtude da pesquisa e pela paciência que sempre teve comigo nos meus momentos de inquietação e cansaço. Obrigada pelo olhar que acalma, abraço que aconchega e amor que alegra, pelas palavras de apoio, carinho e amor e por estar sempre ao meu lado torcendo e acreditando em mim. Amo você!

Ao meu irmão Netto, e minha cunhada Mariana, pelo amor, carinho, e amizade de vocês, que mesmo estando tão longe, não deixaram de torcer pelo meu sucesso, me apoiar e me incentivar, transmitindo-me sempre coisas boas e mostrando-me o lado bom da vida. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva, pessoa apaixonada pela nutrição, grande doutor em alimentos, exemplo de garra e força de vontade. Obrigada pelos ensinamentos, conhecimentos transmitidos e por confiar em mim, acreditando no meu potencial para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares pelos momentos divididos e por tornarem mais leve os meus estudos, com boas conversas, risadas e companheirismo.

Aos professores Rui Hai Liu, Gláucia Maria Pastore, Marisa Ionta, Marisi Gomes Soares, Valdemar Antônio Paffaro Júnior e aos professores, funcionários e alunos do Lant<sup>in</sup> (Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas *in vivo*), Departamento de Nutrição, LABAInt (Laboratório de Biologia Animal Integrativa), DBioCTD (Departamento de Biologia Celular, Tecidual e de Desenvolvimento),

Instituto de Química, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAMP) e Universidade de Cornell pelos ensinamentos transmitidos, disponibilidade e disposição em compartilharem experiências, que contribuíram, cada um ao seu modo, com a realização desse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde e a Universidade Federal de Alfenas – MG por proporcionarem a oportunidade de crescer no conhecimento sempre com ética e profissionalismo.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo incentivo financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse estudo e para que o meu sonho se tornasse realidade.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

## RESUMO

O Brasil está entre os países detentores das maiores biodiversidades do planeta, apresentando uma grande variedade de espécies de frutas nativas, selvagens e/ou exóticas, dentre elas a grumixama e o cambuci, e que são excelentes fontes de compostos bioativos que possuem diversas atividades biológicas. Vários estudos vêm mostrando que as frutas nativas brasileiras, inclusive muitas das espécies pertencentes à família *Myrtaceae*, apresentam alta concentração de fitoquímicos, exibindo atividades antioxidante e antiproliferativa. Dessa maneira teve-se como objetivo investigar o conteúdo total de fenólicos e o teor de flavonoides, identificar a presença de compostos bioativos e principais açúcares e investigar a atividade antioxidante celular e antiproliferativa dos extratos das frutas grumixama e cambuci. Para a quantificação dos compostos fenólicos, foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e para a quantificação do teor flavonoides, foi utilizado um método colorimétrico modificado. As identificações de compostos bioativos e principais açúcares foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear, respectivamente. A atividade antioxidante celular foi determinada de acordo com o Teste da Capacidade Sequestrante de Radicais Peroxil (PSC) e Ensaio da Atividade Antioxidante Celular (CAA). A atividade antiproliferativa contra linhagem de células cancerígenas HepG2, A549 e MCF7 foi avaliada por meio de ensaio colorimétrico (MTS) e a viabilidade celular por meio da exclusão com o azul de tripano. O total de fenólicos e flavonoides para a grumixama foi  $938,21 \pm 11,05$  mg GAE/100 g de amostra e  $133,11 \pm 31,21$  mg CE/100 g de peso seco da amostra, respectivamente, e para o cambuci foi  $367,84 \pm 10,79$  mg GAE/100 g de amostra e  $79,73 \pm 15,27$  mg CE/100 g de peso seco da amostra, respectivamente. Através dos métodos do PSC e CAA, a grumixama apresentou maior atividade antioxidante ( $434,50 \pm 3,63$   $\mu$ mol de Vitamina C equivalente/100 g de amostra e  $93,47 \pm 15,25$   $\mu$ mol QE/100 g de amostra, respectivamente) quando comparada ao cambuci ( $249,54 \pm 2,56$   $\mu$ mol de Vitamina C equivalente/100 g de amostra e  $19,30 \pm 4,07$   $\mu$ mol QE/100 g de amostra, respectivamente). Os cromatogramas da CLAE sugeriram a presença dos flavonoides rutina e quercetina no extrato de grumixama e os espectros de RMN sugeriram a presença de frutose, glicose, sacarose, manitol e manose em ambos os extratos. A viabilidade das

culturas HepG2 e A549 não foi afetada pelo tratamento com os extratos. Entretanto, foi observada redução da viabilidade celular nas culturas MCF7 na concentração de 50 µg/mL. O ensaio de viabilidade, determinado por exclusão com azul de tripano, mostrou que o extrato de grumixama na concentração de 50 µg/mL apresenta atividade antiproliferativa sobre a linhagem MCF7 através da indução de morte celular e que a atividade antiproliferativa do extrato de cambuci, na mesma concentração, pode estar relacionada à inibição da proliferação celular. Portanto, atribui-se grande importância às frutas grumixama e cambuci, sugerindo-se que as mesmas podem ajudar a prevenir a incidência de doenças causadas por estresse oxidativo, sendo uma boa estratégia nutricional.

**Palavras-chave:** Grumixama. Cambuci. Atividade Antioxidante Celular. Atividade Antiproliferativa.

## ABSTRACT

Brazil is among the holders of the greatest biodiversity on the planet countries, presenting a wide variety of native fruits, wild and/or exotic among them grumixama and cambuci, and are excellent sources of bioactive compounds that have diverse biological activities. Several studies have shown that Brazilian native fruits, including many species belonging to the family Myrtaceae has shown high concentrations of phytochemicals, exhibiting antioxidant and antiproliferative activities. Thus, care has to investigate the total phenolic content and the content of flavonoids, identify the presence of bioactive compounds and sugars and investigate the antioxidant and antiproliferative activity of grumixama and cambuci. For quantification of the phenolic compounds was utilized colorimetric Folin-Ciocalteu reagent and to quantify the content of flavonoids a modified colorimetric method was used. The identification of bioactive compounds and sugars was made by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR), respectively. The antioxidant activity was determined according to the test of Peroxyl Radical Scavenging Capacity (PSC) and Cellular Antioxidant Activity (CAA). The antiproliferative activity against lineage of cancer cells HepG2, A549 and MCF7 was assessed by colorimetric assay (MTS) and the cell viability by exclusion of trypan blue. The total phenolics, and flavonoids for grumixama was  $938.21 \pm 11.05$  mg GAE/100 g of sample and  $133.11 \pm 31.21$  mg EC/100 g of dry weight of the sample, respectively, and for the cambuci was  $367.84 \pm 10.79$  mg GAE/100 g of sample and  $79.73 \pm 15.27$  mg EC/100 g of dry weight of the sample, respectively. By the methods of PSC and CAA, the grumixama showed higher antioxidant activity ( $434.50 \pm 3.63$   $\mu$ mol of Vitamin C equivalent/100 g and  $93.47 \pm 15.25$   $\mu$ mol EQ/100 g of sample, respectively) when compared to cambuci ( $249.54 \pm 2.56$   $\mu$ mol of Vitamin C equivalent/100 g and  $19.30 \pm 4.07$  EQ/100 g of sample, respectively). The HPLC chromatograms suggested the presence of flavonoids quercetin and rutin in the extract of grumixama and the NMR spectra suggested the presence of fructose, glucose, sucrose, mannitol and mannose in both extracts. The viability of HepG2 and A549 cultures was not affected by treatment with the extracts. However, reduction of cell viability was observed on MCF7 cultures at a concentration of 50 mg/mL. The test of viability, determined by trypan blue exclusion, at a concentration of 50 mg/mL,

showed that the extract of grumixama has antiproliferative activity on MCF7 lineage by inducing cell death and that the antiproliferative activity of the extract of cambuci, at the same concentration, may be related to inhibition of cell proliferation. Therefore attaches great importance to fruits grumixama and cambuci, suggesting that they can help prevent the incidence of diseases caused by oxidative stress and is a good nutritional strategy.

**Keywords:** Grumixama. Cambuci. Cellular Antioxidant Activity. Antiproliferative activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1 -</b>	Biomás Brasileiros .....	21
<b>FIGURA 2 -</b>	Classificação dos Fitoquímicos .....	24
<b>FIGURA 3 -</b>	Exemplo de cardápio com baixo conteúdo de fenólicos .....	32
<b>FIGURA 4 -</b>	Exemplo de cardápio com alto conteúdo de fenólicos .....	33
<b>FIGURA 5 -</b>	Árvore e frutos <i>Eugenia brasiliensis</i> .....	40
<b>FIGURA 6 -</b>	Árvore e frutos <i>Campomanesia phaea</i> .....	42
<b>FIGURA 7 -</b>	Cromatograma com os devidos tempos de retenção do Mix dos cinco padrões utilizados na CLAE .....	56
<b>FIGURA 8 -</b>	Cromatogramas dos extratos de frutas nativas brasileiras .....	57
<b>FIGURA 9 -</b>	Espectros de $^1\text{H}$ .....	60
<b>FIGURA 10 -</b>	Espectros de $^{13}\text{C}$ .....	61
<b>FIGURA 11 -</b>	A) Estrutura química do manitol. B) Valores dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	62
<b>FIGURA 12 -</b>	A) Estrutura química da frutose. B) Valores dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	63
<b>FIGURA 13 -</b>	A) Estrutura química da sacarose. B) Valores dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	64
<b>FIGURA 14 -</b>	A) Estrutura química da manose. B) Valores dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	65
<b>FIGURA 15 -</b>	A) Estrutura química da glicose. B) Valores dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	66
<b>FIGURA 16 -</b>	Estrutura química dos principais tipos de flavonoides .....	67
<b>FIGURA 17 -</b>	Estrutura de flavonoides ligados entre si ou a carboidratos.....	68
<b>FIGURA 18 -</b>	Rota para polifenóis dietéticos e seu metabolismo em seres humanos .....	69
<b>FIGURA 19 -</b>	Possíveis mecanismos propostos para a prevenção do câncer pelo consumo de polifenóis.....	70
<b>FIGURA 20 -</b>	Reação entre diclorofluoresceína e ABAP dentro da célula.....	72
<b>FIGURA 21 -</b>	Atividade Antioxidante Celular do extrato de grumixama.....	74
<b>FIGURA 22 -</b>	Atividade Antioxidante Celular do extrato de cambuci .....	74
<b>FIGURA 23 -</b>	Conversão do sal tetrazolio em formazano.....	76

<b>FIGURA 24 -</b>	Viabilidade celular de linhagens tratadas com extrato de grumixama .....	77
<b>FIGURA 25 -</b>	Viabilidade celular de linhagens tratadas com extrato de cambuci.....	78
<b>FIGURA 26 -</b>	Porcentagem de células viáveis e não viáveis, tratadas com extratos de grumixama e cambuci na concentração de 50 µg/mL e determinadas por exclusão com o azul de tripano .....	81
<b>QUADRO 1 -</b>	Espécies de frutas pertencentes à família <i>Myrtaceae</i> , presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	Conteúdo Total de Fenólicos dos extratos de grumixama e cambuci.....	52
<b>TABELA 2 -</b>	Teor de Flavonoides dos extratos de grumixama e cambuci .....	54
<b>TABELA 3 -</b>	Atividade Antioxidante Celular, por meio do PSC, dos extratos de grumixama e cambuci .....	71
<b>TABELA 4 -</b>	Atividade Antioxidante Celular, por meio do CAA, e EC <sub>50</sub> dos extratos de grumixama e cambuci .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABAP** - Amidinopropano
- ANOVA** - Análise de Variância
- A549** - Linhagem de células humana de câncer de pulmão
- CAA** - Activity Antioxidant Cellular
- CAM** - Cambuci
- CE** - Catequina Equivalente
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DCFH** - Diacetato de Diclorofluoresceína
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- DEMEM** - Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DP** - Desvio Padrão
- DPPH** - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl / Método da capacidade de sequestrar radicais livres
- EC<sub>50</sub>** - Concentração Eficaz Média
- EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ERO** - Espécies Reativas de Oxigênio
- GAE** - Ácido Gálico Equivalente
- GRU** - Grumixama
- HepG2** - Linhagem de células humana de câncer de fígado
- KOH** - Hidróxido de Potássio
- MCF7** - Linhagem de células humana de câncer de mama
- MTS** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio / Sal Tetrazolio
- ORAC** - Oxigen Radical Absorbance Capacity
- PBS** - Phosphate buffered saline / Tampão fosfato-salino
- PSC** - Peroxyl Radical Scavenging Capacity Assay
- QE** - Quercetina Equivalente
- RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1	BIODIVERSIDADE BRASILEIRA.....	20
2.2	FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS E COMPOSTOS BIOATIVOS .....	22
2.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
2.4	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA .....	36
2.5	GRUMIXAMA ( <i>Eugenia brasiliensis</i> ) E CAMBUCI ( <i>Campomanesia phaea</i> ).....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
3.1	OBJETIVO GERAL .....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1	MATERIAL .....	44
4.1.1	<b>Frutas</b> .....	44
4.1.2	<b>Células</b> .....	45
4.2	MÉTODOS.....	45
4.2.1	<b>Determinação do Conteúdo Total de Fenólicos</b> .....	45
4.2.2	<b>Determinação do Teor de Flavonoides</b> .....	45
4.2.3	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	46
4.2.4	<b>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	46
4.2.5	<b>Teste da Capacidade Sequestrante de Radicais Peroxil (PSC)</b> .....	47
4.2.6	<b>Atividade Antioxidante Celular (CAA)</b> .....	48
4.2.7	<b>Atividade Antiproliferativa</b> .....	49
4.2.7.1	Linhagens celulares, condições de cultivo e preparo dos extratos .....	49
4.2.7.2	Ensaio Colorimétrico – MTS.....	50
4.2.7.3	Viabilidade Celular determinada por Exclusão com Azul de Tripano ....	50
4.2.8	<b>Análise Estatística</b> .....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
5.1	CONTEÚDO TOTAL DE FENÓLICOS.....	52
5.2	TEOR DE FLAVONOIDES.....	54
5.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	55

5.4	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	58
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR POR MEIO DO TESTE PSC.....	70
5.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR POR MEIO DO TESTE CAA.....	71
5.7	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	75
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

Entende-se por biodiversidade ou diversidade biológica a existência de grandes variedades de espécies vegetais, animais e de microorganismos em um determinado habitat, bem como a variedade dentro de espécies e de ecossistemas, sendo importante para a sobrevivência de populações no mundo (PERES; VERCILLO; DIAS, 2011; LEWINSOHN; PRADO, 2000).

O Brasil em sua longa extensão abrange várias zonas climáticas, o que leva a grandes variações ecológicas, com formação de biomas, sendo eles: Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, sendo a Amazônia o maior bioma, seguida pelo Cerrado e Mata Atlântica. Essa grande variedade de biomas reflete a riqueza ecológica do país, estando o Brasil entre os países detentores das maiores biodiversidades do planeta (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013g; MALTA et al., 2013).

Devido à sua grande biodiversidade o Brasil apresenta uma grande variedade de espécies de frutas nativas, selvagens e/ou exóticas, não cultivadas comercialmente e que são excelentes fontes de fitoquímicos (NERI-NUMA et al., 2013).

Os fitoquímicos são definidos como compostos bioativos presentes em frutas, vegetais, legumes, cereais e plantas e que possuem a capacidade de proteger o corpo contra danos causados pela presença de radicais livres, que levam ao estresse oxidativo, além de apoptose e regulação da expressão gênica de células proliferativas, metabolismo hormonal e efeitos antibacterianos e antivirais (NERI-NUMA et al., 2013; FLORES et al., 2012; BARTOLOME et al., 2006; LIU, 2004; SUN et al., 2002).

Portanto, estudos sugerem cada vez mais, que dietas ricas em frutas e vegetais podem reduzir ou limitar o estresse oxidativo, além da redução do risco de doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e Alzheimer, devido à manutenção do balanço entre oxidantes e antioxidantes e manutenção dos efeitos de oxidantes reativos (JIRATANAN; LIU, 2004; ADOM; LIU, 2002; SUN et al., 2002). Além disso, um fornecimento constante de fitoquímicos presentes nessas dietas, com benefícios para saúde, proporciona mecanismos de defesa, limitando o

desenvolvimento de uma etapa crítica para o início da carcinogênese (MEYERS et al., 2003; CHU et al., 2002).

As ações da Atividade Antiproliferativa dos fitoquímicos incluem a inativação de eletrófilos reativos potencialmente carcinogênicos e a eliminação de espécies reativas de oxigênio que podem iniciar a produção de um tumor. Tais atividades são possivelmente oriundas à combinação inerente e complexa interação entre os fitoquímicos (MEYERS et al., 2003; LIU; SUN, 2003).

Devido às diversas atividades biológicas dos fitoquímicos eles tornam-se, cada vez mais, alvos de pesquisas para identificação dos seus efeitos na saúde humana. Pensando nisso, vários estudos vêm mostrando que as frutas nativas brasileiras, inclusive muitas das espécies pertencentes à família *Myrtaceae* vem apresentando alta concentração de fitoquímicos, exibindo atividades antioxidante e antiproliferativa (DENARDIN et al., 2013; NERI-NUMA et al., 2013; BIEGELMEYER et al., 2011; MOON et al., 2011; FATHILAH et al., 2010; GENOVESE et al., 2008).

A família *Myrtaceae*, compreende 142 gêneros e mais de 5500 espécies. Está distribuída predominantemente no Hemisfério Sul e é constituída por plantas de folhas simples, opostas, com margens inteira e de coloração sempre verde. Uma das características marcantes dessa família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (DONATO; MORRETES, 2007). Dentre as espécies da família *Myrtaceae*, encontram-se a *Eugenia brasiliensis* e a *Campomanesia phaea* (WILSON, 2011, citado por THORNHILL, et al., 2011).

A *Eugenia brasiliensis*, popularmente conhecida como grumixama, grumixaba, grumichameira, grumixameira ou cerejeira brasileira, é encontrada nas florestas costeiras brasileiras, desde o sul da Bahia até Santa Catarina e é utilizada na medicina popular como um adstringente, anti-inflamatório, energizante, revitalizante, diurético e para o tratamento do reumatismo, das desordens gastrointestinais e da depressão (FLORES, et al., 2012; MAGINA et al., 2012; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ, 2012; COLLA et al., 2012; PIETROVSKI et al., 2008). Os frutos possuem polpa espessa, de cor clara e adocicada, com maturação ocorrendo de novembro a dezembro e utilizados tradicionalmente para a produção de geleias, tortas e licores (UFRJ, 2012; FLORES et al., 2012).

A espécie *Campomanesia phaea*, conhecida popularmente como Cambuci, da árvore Cambucizeiro é uma fruta de origem brasileira, nativa da Serra do Mar,

entre os estados de São Paulo e Minas Gerais (SILVA, et al., 2012). Os frutos são carnosos, suculentos e comestíveis, com casca fina e coloração verde, apresenta cheiro doce, mas é extremamente ácido como o limão (KAWASAKI; LANDRUM, 1997, citado por SILVA et al., 2012; VALLILO et al., 2005). É utilizado na medicina popular para o tratamento da disenteria, problemas de estômago, diarreia, cistites, distúrbios hepáticos, bem como para redução do colesterol no sangue (DICKEL et al., 2007, citado por MADALOSSO et al., 2011). Além disso, o cambuci é bastante utilizado no preparo de sucos, geleias e doces em calda, sendo considerado um fruto exótico com propriedades aromáticas que favorecem o seu uso como agente flavorizante em alimentos e bebidas (SILVA et al., 2012; VALLILO et al., 2005).

Devido a grande diversidade de frutas nativas brasileiras e a presença de efeitos benéficos para à saúde, em virtude da presença dos fitoquímicos nas mesmas, considera-se necessário a realização de mais estudos com frutas, a fim de identificar novos alimentos antioxidantes e antiproliferativos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as frutas brasileiras grumixama e cambuci quanto à sua quantidade de fenóis totais e flavonoides, bem como as suas atividades antioxidante e antiproliferativa em culturas de células específicas para cânceres hepático, pulmonar e mamário para possíveis aplicações nos setores farmacêutico, cosmético, alimentício e/ou formulação de novos produtos processados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Segue abaixo revisão de literatura sobre os assuntos abordados ao longo do presente estudo.

### 2.1 BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Entende-se por biodiversidade ou diversidade biológica a existência de grandes variedades de espécies vegetais, animais e de microorganismos em um determinado habitat, bem como a variedade dentro de espécies e de ecossistemas, sendo importante para a sobrevivência de populações no mundo (PERES; VERCILLO; DIAS, 2011; LEWINSOHN; PRADO, 2000).

O Brasil em sua longa extensão abrange várias zonas climáticas, como o trópico úmido do Norte, o semiárido do Nordeste e as áreas temperadas do Sul, o que leva a grandes variações ecológicas, com formação de biomas, sendo eles: Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, como ilustrado na Figura 1, sendo a Amazônia o maior bioma, seguida pelo Cerrado e Mata Atlântica. Essa grande variedade de biomas reflete a riqueza ecológica do país, estando o Brasil entre os países detentores das maiores biodiversidades do planeta (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013f; BRASIL, 2013g; MALTA et al., 2013).

Figura 1 - Biomas Brasileiros.



Fonte: BRASIL, 2013c.

A Caatinga ocupa 11% do território brasileiro e apresenta uma biodiversidade rica, que ampara diversas atividades econômicas. O Cerrado é conhecido como a Savana mais rica do mundo, abrigando mais de 10 mil espécies vegetais, apresenta elevado potencial aquífero e ocupa 22% do território nacional. O Pantanal é uma planície aluvial, considerado uma das maiores extensões úmidas contínuas do planeta, contendo quase 2 mil espécies de plantas e ocupando 1,76% da área total do território brasileiro. O Pampa ocupa 2,07% do território nacional e é composto por paisagens naturais variadas, abrangendo de serras a planícies e de morros rupestres a coxilhas, abrigando cerca de 3 mil espécies de plantas, com diversidade notável de gramíneas (BRASIL, 2013g).

A Floresta Amazônica é a região de maior biodiversidade, estando entre as maiores Regiões Naturais em área florestal do Brasil, contendo mais de 2500 espécies de árvores, 30 mil espécies de plantas e a maior bacia hidrográfica do mundo, abrigando cerca de 50% da biodiversidade do planeta (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013e; BRASIL, 2013g). Já a Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical do Continente Americano, abrangendo a costa Brasileira, o leste do Paraguai e o nordeste da Argentina (TABARELLI et al., 2005).

A Mata Atlântica é considerada como um dos três *hotspots*<sup>1</sup> mais importantes para a conservação da natureza no planeta, sendo constituída por cinco formações florestais, sendo elas: Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual e Ombrófila Aberta, apresentando-se como uma das regiões mais ricas do mundo em biodiversidade (BRASIL, 2013h; ZECHINI et al., 2012). É uma das florestas tropicais mais importantes, abrangendo florestas de pinheiros de araucárias, mangues, restingas, pastagens de alta elevação e brejos, sendo responsável pela proteção de bacias hidrográficas, ciclos hidrológicos, regulação do clima regional, controle da erosão dos solos e redução dos gases gerados pelo efeito estufa (SILVA et al., 2009; TABARELLI et al., 2005; SILVA et al., 2005). Ainda que tenha sido largamente destruída pela alta exploração dos seus recursos, como madeira, frutas e caças ilegais, além da apropriação das terras para pastagem, agricultura e silvicultura, ela ainda é detentora de mais de oito mil espécies de plantas, anfíbios, aves e mamíferos, ocupando 15 estados brasileiros das regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste (BRASIL, 2013c; TABARELLI et al., 2005).

São nas regiões da Floresta Amazônica e Mata Atlântica onde se encontram a maior concentração de frutas nativas/exóticas, as quais possuem grande quantidade de compostos bioativos, sendo utilizadas na medicina popular como medicamentos tradicionais para o tratamento de algumas patologias (LEITE-LEGATTI, et al., 2012; MALTA, et al., 2012).

## 2.2 FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS E COMPOSTOS BIOATIVOS

Devido à sua grande biodiversidade o Brasil apresenta uma grande variedade de espécies de frutas nativas, selvagens e/ou exóticas, não cultivadas comercialmente e que são excelentes fontes de fitoquímicos (NERI-NUMA et al., 2013).

Os fitoquímicos são definidos como compostos bioativos presentes em frutas, vegetais, legumes, cereais e plantas e que possuem a capacidade de proteger o corpo contra danos causados pela presença de radicais livres, que levam ao

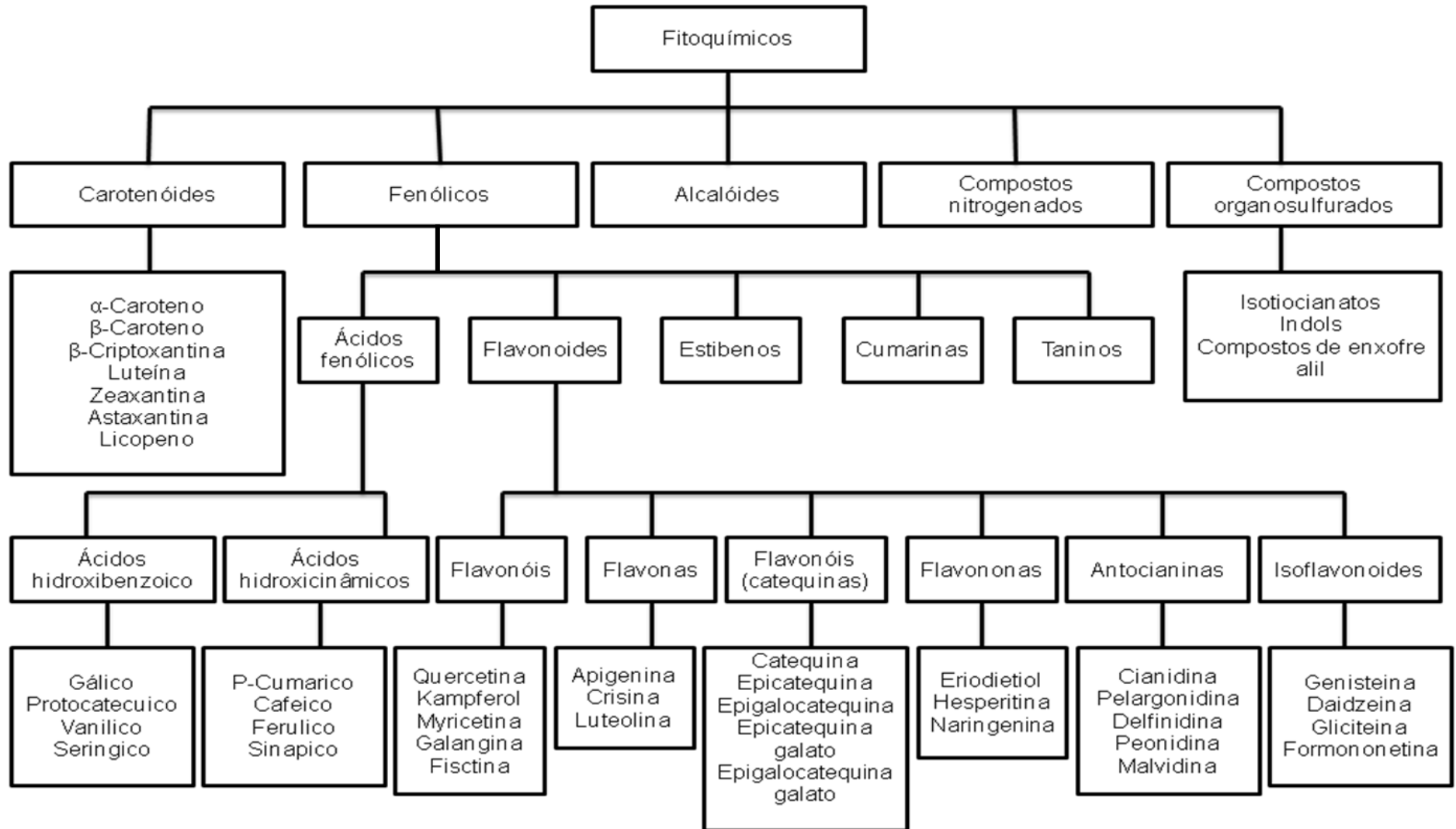
---

<sup>1</sup> *Hotspots*: toda área prioritária para conservação, com alta biodiversidade e ameaçada de extinção no mais alto grau (BRASIL, 2013b).

estresse oxidativo, além de apoptose e regulação da expressão gênica de células proliferativas, metabolismo hormonal e efeitos antibacterianos e antivirais (NERI-NUMA et al., 2013; FLORES et al., 2012; BARTOLOME et al., 2006; LIU, 2004; SUN et al., 2002).

De acordo com Liu (2004), os fitoquímicos podem ser classificados como carotenóides, fenólicos, alcalóides, compostos organosulfurados e compostos contendo nitrogênio, recebendo maior importância os fenólicos e carotenóides (FIGURA 2).

Figura 2 - Classificação dos Fitoquímicos.



Fonte: Adaptado de LIU, 2004.

Nos últimos anos foi intensificado o interesse em estudos desses compostos devido aos possíveis benefícios para a saúde humana, dando-se uma grande importância aos produtos naturais, por apresentarem capacidade de prevenir o risco de algumas doenças crônicas não degenerativas, por possuírem em sua composição tais compostos com diferentes atividades (NERI-NUMA et al., 2013; FLORES et al., 2012; BARTOLOME et al., 2006).

Devido às diversas atividades biológicas, o uso da fitoterapia para o tratamento de muitas doenças é tradição desde a antiguidade, sendo bem disseminado em todo o mundo, porém, nas últimas décadas, os estudos fitoterápicos veem ganhando importância e contribuindo com informações que subsidiam o controle de qualidade dos fármacos de origem vegetal, garantindo certa segurança na comercialização e/ou consumo *in natura* (MALTA et al., 2013; DONATO; MORRETES, 2007).

Portanto, pesquisas indicam que uma dieta rica em frutas e vegetais diminuem a incidência de doenças cardíacas, câncer e algumas doenças neurodegenerativas, pois são importantes fontes de compostos antioxidantes, desempenhando um papel considerável na prevenção do estresse oxidativo e doenças inflamatórias. Os pigmentos dessas frutas são responsáveis por grande parte do conteúdo de compostos bioativos, demonstrando atividades antialérgica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória e anti-hemorrágica (REYNERTSON et al., 2008).

O Brasil possui um grande número de frutas nativas exploradas pela agroindústria devido aos seus potenciais de aplicação, alta quantidade em fitoquímicos, vitamina C e consequentes capacidades funcionais, despertando o interesse dos pesquisadores (MALTA et al., 2013; NERI-NUMA et al., 2013; GOLÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010).

Vários estudos vêm mostrando que as frutas nativas brasileiras, inclusive muitas das espécies pertencentes à família *Myrtaceae* vem apresentando alta concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antiproliferativa (DENARDIN et al., 2013; NERI-NUMA et al., 2013; BIEGELMEYER et al., 2011; MOON et al., 2011; FATHILAH et al., 2010; GENOVESE et al., 2008). O Quadro 1 mostra as espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae* já estudadas, bem como a presença de compostos bioativos, suas atividades biológicas e potenciais de aplicação.

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Araçá/Araçazeiro ( <i>Psidium guineensis</i> / <i>Psidium rufum</i> / <i>Psidium cattleianum</i> )	Ácidos Gálico, Cumárico e Felúrico, Epicatequina, Miricetina e Quercetina	Antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa	Sucos	Oliveira et al., 2012/ Medina et al., 2011
Cagaiteira/Cagaita/ Murta-cagaiteira ( <i>Eugenia dysenterica</i> )	Ácido Gálico, Quercetina e Kampferol	Antioxidante, laxativa, tratamento da diarreia e disenteria	Doces, picolés, vinho, sorvete e consumo <i>in natura</i>	Siqueira et al., 2013/ Oliveira et al., 2012/ Vieira et al., 2012/ Gonçalves; Lajolo; Genovese, 2010
Cambuci ( <i>Campomanesia phaea</i> )	Ácido Elágico, Quercetina e Kampferol	Antiglicemiante, tratamento da disenteria, problemas de estômago, diarreia, cistite e distúrbios hepáticos	Licores, sucos, geleias e doces em calda	Silva et al., 2012/ Madalosso et al., 2011/ Gonçalves; Lajolo; Genovese, 2010

(continua)

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Camu Camu/ Camucamu/Camocamo ( <i>Myrciaria dubia</i> )	Ácido Elágico, Cianidina, Catequina, kempferol, Naringenina Quercetina, Quercitrina e Rutina	Antioxidante e anti- inflamatória	Sucos, sorvetes e purês	Akter et al., 2011/ Reynertson et al., 2008/ Inoue et al., 2008
Feijoa/Goiaba de Abacaxi ( <i>Feijoa sellowiana</i> )	Terpenos, taninos, quinonas e flavonoides	Antibacteriana, antioxidante e anti- inflamatória	Suco, vinho, iogurte, doces, sorvete e consumo <i>in natura</i> ou cozida	Weston, 2010/ Vuotto et al., 2000

(continuação)

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Goiaba ( <i>Psidium guajava</i> )	Ácidos Gálico, Elágico e Cafeico, Quercetina, Kampferol, $\beta$ -caroteno, Luteína e Licopeno	Hipoglicemiante, antibacteriana, antiespasmódica, anti-hipertensiva, antioxidante, hepatoprotetora, tratamento da disenteria e insuficiência gástrica	Geleias, doces, sucos, recheios de doces, gelatinas e consumo <i>in natura</i>	Nantitanon; Yotsawimonwat; Okonogi, 2010/ Gutiérrez; Mitchell; Solis, 2008
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	Ácido Elágico, Miricetina, Quercetina, Quercitrina, Rutina, Cianidina e Delfinidina	Anti-inflamatória, antiglicemiante, diurética, tratamento de doenças digestivas, da febre, do reumatismo e da depressão	Geleias, tortas, licores e consumo <i>in natura</i>	Flores et al., 2012/ Colla et al., 2012/ Reynertson et al., 2008/ Cole; Haber; Setzer, 2007

(continuação)

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Guavira/Gabiroba/ Guabiroba/Guariroba/ Guabiroba-do-campo ( <i>Campomanesia adamantium</i> )	Miricetina, Quercetina, Myricitrin	Tratamento da diarreia, doenças da bexiga, inflamação e reumatismo	Licores, sucos e doces	Breda; Sanjinez- Argandoña; Correia, 2012/ Ferreira et al., 2012
Jabuticaba/ Jabuticabeira ( <i>Myrciaria cauliflora</i> )	Ácido Elágico, Cianidina, Delfinidina, Miricetina, Quercetina, Quercitrina e Rutina	Antioxidante, anti- inflamatória, tratamento da hemoptise, asma, diarreia e inflamação crônica das amígdalas	Geleia, suco, licor e consumo <i>in natura</i>	Oliveira et al., 2012/ Leite-Legatti et al., 2012/ Reynertson et al., 2008
Jambo ( <i>Syzygium jambos</i> )	Ácido Elágico, Quercetina e Quercitrina	Tônico para o cérebro, adstringente, digestiva e tratamento de doenças hepáticas	Geleia, doce, vinho e licor	Reynertson et al., 2008

(continuação)

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
<p>Jambolão (<i>Syzygium cumini</i>/ <i>Eugenia jambolana</i>)</p>	<p>Ácidos Gálico e Elágico, Cianidina, Delfinidina, Quercetina e Rutina</p>	<p>Antidiabética, hipolipemiante hepatoprotetora e nefroprotetora</p>	<p>Sucos, vinhos e consumo <i>in natura</i></p>	<p>Devkar; Pandya; Shah, 2012/ Reynertson et al., 2008/ Nuengchamnog; Ingkaninan, 2008</p>
<p>Myrtle Verdadeiro (<i>Myrtus communis</i>)</p>	<p>Miricetina</p>	<p>Anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, hipoglicemiante, analgésica, tratamento das doenças orais, candidíase, feridas, e desordens urinárias</p>	<p>Erva Medicinal</p>	<p>Choudhary et al., 2013</p>

(continuação)

Quadro 1 - Espécies de frutas pertencentes à Família *Myrtaceae*, presença de compostos bioativos, atividades biológicas e potenciais de aplicação.

FRUTAS / ESPÉCIES	COMPOSTOS BIOATIVOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	POTENCIAIS DE APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Pitanga/Pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> )	Cianidina, Miricetina e Quercetina	Antioxidante, anti-hipertensiva, diurética, anti-inflamatória e tratamento de distúrbios digestivos	Doces e chás	Oliveira et al., 2012/ Correia et al., 2011/ Consolini; Baldini; Amat, 1999
Pitomba-do-cerrado ( <i>Eugenia luschnathiana</i> )	Ácido Elágico, Quercetina, Quercitrina e Rutina Luteína, Zeaxantina,	Antioxidante	Licor e consumo <i>in natura</i>	Reynertson et al., 2008
Uvaia ( <i>Eugenia pyriformis</i> )	$\beta$ -caroteno, Criptoxantina	Antioxidante	Sucos, sorvete, geleia, doces e consumo <i>in natura</i>	Pereira et al., 2012

(conclusão)

Em virtude das várias atividades biológicas que as frutas e os vegetais exercem no corpo humano, devido à presença de fitoquímicos em sua composição, estudos veem enfatizando a importância do consumo de alimentos ricos em tais compostos, dentre eles os compostos fenólicos. Pensando em tal propósito, tem-se na Figura 3 um exemplo de cardápio com baixo conteúdo de compostos fenólicos e na Figura 4 um exemplo de cardápio com alto conteúdo de compostos fenólicos, ressaltando-se que para uma dieta ser considerada alta em fenólicos, o valor total de tais compostos na dieta deve ser maior que 2000 miligramas por dia (FALLER; FIALHO, 2009).

FIGURA 3 - Exemplo de cardápio com baixo conteúdo de fenólicos.

REFEIÇÃO	ALIMENTO	QUANTIDADE DE FENÓLICOS
DESJEJUM	Leite Integral (150 mL)	
	Café (50 mL)	
	Açúcar (20 g)	
	Pão Francês (50 g)	
	Manteiga (20 g)	
COLAÇÃO	Barra de Cereais	
ALMOÇO	Arroz branco (3 colheres de servir – 150 g)	135 mg
	Feijão preto (50 g)	48 mg
	Bife grelhado (1 unidade – 100 g)	
	Alface (30 g)	39,3 mg
	Tomate (30 g)	24 mg
	Gelatina de morango (80 g)	
LANCHE DA TARDE	Pão integral (2 fatias)	95,76 mg
	Requeijão (30 g)	
	Suco de manga (com 70 g de manga)	186,2 mg
JANTAR	Arroz branco (2 colheres de servir – 120 g)	108 mg
	Feijão preto (50 g)	48 mg
	Bife grelhado (1 unidade – 100 g)	
	Cenoura (30 g)	46,8 mg
	Laranja (1 unidade – 100 g)	337 mg
CEIA	Biscoito cream-cracker (4 unidades – 20g)	
<b>TOTAL</b>		<b>1068,06 mg</b>

Fonte-conteúdo de fenólicos: WU et al., 2004.

FIGURA 4 - Exemplo de cardápio com alto conteúdo de fenólicos.

REFEIÇÃO	ALIMENTO	QUANTIDADE DE FENÓLICOS
DESJEJUM	Suco de 2 kiwis	422,56 mg
	Banana (1 unidade)	231 mg
	Farelo de aveia (15 g)	24,45 mg
	Pão integral (1 fatia)	47,88 mg
	Manteiga (10 g)	
COLAÇÃO	Maçã Fuji (1 unidade)	291,18 mg
	Semente de abóbora (1 porção – 15 g)	45,45 mg
ALMOÇO	Arroz branco (1 colher de servir – 50 g)	45 mg
	Feijão preto (1 colher de sopa – 25 g)	24 mg
	Bife grelhado (1 unidade – 100 g)	
	Brócolis (30 g)	101,1 mg
	Cenoura (30 g)	46,8 mg
	Alface (40 g)	52,4 mg
	Laranja (1 unidade)	337 mg
LANCHE DA TARDE	Pão integral (2 fatias)	95,76 mg
	Queijo cottage (2 fatias médias)	
	Pera (1 unidade)	220 mg
	Suco de 2 nectarinas	291,04 mg
JANTAR	Arroz branco (1 colher de servir – 50 g)	45 mg
	Feijão preto (25 g)	24 mg
	Bife grelhado (1 unidade – 100 g)	
	Beterraba (30 g)	73,2 mg
	Espinafre (40 g)	85,6 mg
	Tomate (30 g)	24 mg
	Ameixa (1 unidade)	315,48 mg
CEIA	Biscoito de farinha de aveia com passas (1 unidade)	197,78 mg
	Geleia de mirtilo 100% natural (10 g)	53,1 mg
	Chá de gengibre (com 10 g)	31,7 mg
<b>TOTAL</b>		<b>3126,08 mg</b>

Os exemplos desses cardápios mostram a simplicidade em se alcançar o valor preconizado para o consumo de uma dieta alta em compostos fenólicos, alcançando-se facilmente 2000 miligramas por dia através do aumento do consumo de frutas e vegetais.

Os compostos fenólicos são moléculas heterogêneas que apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e grupamentos de hidroxila e/ou metoxila. Eles compreendem os flavonoides, os ácidos fenólicos, os estilbenos, as cumarinas e uma ampla variedade de taninos. São importantes por apresentarem propriedades antioxidantes para os alimentos e o corpo humano, através do sequestro de radicais livres, prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos. Portanto, são indicados para a prevenção e/ou tratamento de algumas doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e o câncer (BERNARDES et al., 2011; HAMM et al., 2009; SOARES, 2002).

À vista disso, a capacidade antioxidante de algumas frutas nativas/exóticas foi determinada, dentre elas frutas do cerrado, da mata atlântica e da floresta amazônica. A amora apresenta alta capacidade antioxidante, devido ao elevado nível de antocianinas monoméricas, compostos fenólicos e presença de antocianinas poliméricas, com predominância da cianidina 3-glicosídeo (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010). O araçá apresenta um complexo de sesquiterpenos, predominando o germacreno além de ser uma boa fonte de vitamina C total, cerca de 400 mg/100g da polpa fresca (SACRAMENTO; BARRETO; FARIA; 2008; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; ANDRADE; ARAGÃO; FERREIRA, 1993).

Porém, há ainda muitas espécies que não foram estudadas quanto à sua capacidade antioxidante e funcional, despertando grande interesse dos pesquisadores (MALTA et al., 2013; GOLÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010). Pensando nisso, considera-se necessário a realização de mais estudos com frutas dessa família, a fim de identificar novos alimentos antioxidantes e antiproliferativos.

### 2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As pessoas estão constantemente expostas a fatores que geram a produção de radicais livres, como por exemplo, irradiação, poluentes atmosféricos, hábitos alimentares inadequados e também subprodutos dos processos metabólicos (VAYALIL, 2012). Espécies reativas de oxigênio e radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH), são constantemente formados no corpo humano pela ação normal do metabolismo, ressaltando que no estado normal do metabolismo, os níveis de oxidantes e antioxidantes são mantidos em balanço, o que é importante para conservar as condições fisiológicas do organismo. Porém, uma alta produção de oxidantes pode causar um estresse oxidativo induzido pelo aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (excesso de radicais livres), gerando danos no DNA, oxidação de proteínas e lipídeos de membrana e outras biomoléculas, inativação de enzimas e mutações de genes, podendo desencadear doenças degenerativas como o câncer (CHEN; YEN, 2006; JIRATANAN; LIU, 2004; SUN et al., 2002; CHU et al., 2002; LIU et al., 2002).

Estudos sugerem cada vez mais que o estresse oxidativo pode ser reduzido ou limitado por uma dieta antioxidante, através do consumo de frutas e vegetais, além da redução do risco de doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e Alzheimer, devido à manutenção do balanço entre oxidantes e antioxidantes e manutenção dos efeitos de oxidantes reativos (JIRATANAN; LIU, 2004; ADOM; LIU, 2002; SUN et al., 2002). A mistura complexa dos fitoquímicos nos alimentos mostra-se mais eficiente em prover benefícios protetores à saúde quando comparada ao consumo individual de um antioxidante, devido à combinação dos efeitos sinérgicos e aditivos desses compostos, pois diferentes plantas têm diferentes composições de fitoquímicos, com diferentes estruturas e funções protetoras, ressaltando-se a forte atividade antioxidante e antiproliferativa (LIU; SUN, 2003; ADOM; LIU, 2002).

Os antioxidantes são substâncias que, ao estarem presentes em pequenas concentrações, neutralizam os radicais livres e previnem os danos causados por eles. Estas substâncias podem reduzir os danos adversos, inativando os oxidantes antes que estes reajam com os alvos biológicos, impedindo assim as reações em

cadeia ou a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (AZZI; DAVIES, 2004). Portanto eles agem “varrendo” os radicais livres ou inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio, durante o metabolismo celular (MEYERS et al., 2003).

Além do sistema de proteção endógeno, o consumo de compostos bioativos pela dieta é um fator protetor adicional para manter-se o equilíbrio do estado redox da célula, pois frutas e vegetais ricos em pigmentos como antocianinas, betalaínas e carotenoides são fontes potentes de antioxidantes (JIRATANAN; LIU, 2004). Este complexo sistema de proteção antioxidante, endógeno e exógeno, interage entre si e atua sinergicamente para neutralizar os radicais livres (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT; 2006).

Devido ao fato de possuírem potencial profilático e terapêutico em muitas doenças, os antioxidantes têm ganhado muita importância nos últimos anos (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007). A descoberta da relação entre os radicais livres com o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, envelhecimento, entre outras, conduziu a uma mudança médica sobre os cuidados com a saúde. Com isso, a literatura sobre antioxidantes expandiu-se tremendamente por causa da evidência que estes podem contribuir trazendo benefícios nutricionais (WU et al., 2004).

## 2.4 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Câncer é um conjunto de mais de cem doenças, tendo como característica principal o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por várias regiões do corpo. As células cancerosas são muito agressivas, incontroláveis e dividem-se rapidamente formando tumores ou neoplasias malignas, sendo que as características que diferenciam os diversos tipos de cânceres são os tipos de células que acometem, a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (INCA, 2013).

O câncer pode ser oriundo de causas variadas, que podem ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas estão associadas ao meio ambiente, incluindo irradiação, poluentes atmosféricos, agrotóxicos e xenobióticos, aos hábitos alimentares inadequados e aos estilos de

vida não saudáveis, e as causas internas compreendem predisposição genética, desequilíbrio hormonal e deficiências do sistema imunológico (INCA, 2013; PASCOAL, 2012).

A proteção contra os diferentes agentes externos e internos, que entram em contato com as diferentes estruturas do organismo, é realizada através de mecanismos de defesa naturais (próprios do organismo), geneticamente pré-determinados e que varia de um indivíduo para o outro. Esses mecanismos de defesa possibilitam a interrupção da produção de células alteradas e sua subsequente eliminação e abrangem a integridade do sistema imunológico e seus órgãos linfóides, a capacidade de reparo do DNA danificado por agentes cancerígenos e a ação de enzimas que transformam e eliminam as substâncias cancerígenas (INCA, 2013).

Além disso, dietas ricas em frutas e vegetais reduzem o risco de danos oxidativos no DNA, impedindo assim o desenvolvimento de uma etapa crítica para o início da carcinogênese, sendo a prevenção uma estratégia mais efetiva do que o tratamento de doenças crônicas degenerativas. Um fornecimento constante de fitoquímicos com benefícios para saúde proporciona mecanismos de defesa, diminuindo o risco de tais doenças. Isso é mostrado por diversos estudos que sugerem que o conteúdo de fitoquímicos presentes nessas dietas contribuem com um efeito protetor contra doenças crônicas degenerativas devido às suas atividades antioxidante, antimutagênica e antiproliferativa. Sendo que, dentre tais fitoquímicos, destacam-se os compostos fenólicos, como os flavonoides, os compostos nitrogenados, tocoferóis, carotenoides e o ácido ascórbico (MEYERS et al., 2003; CHU et al., 2002).

As ações da Atividade Antiproliferativa dos fitoquímicos incluem a inativação de eletrófilos reativos potencialmente carcinogênicos e a eliminação de espécies reativas de oxigênio que podem iniciar a produção de um tumor. Tais atividades são possivelmente oriundas à combinação inerente e complexa interação entre os fitoquímicos (MEYERS et al., 2003; LIU; SUN, 2003).

Nos testes de citotoxicidade são investigadas moléculas com potencial de destruir células neoplásicas em cultura, numa correlação entre a concentração e a resposta e seletividade para alguma linhagem tumoral (modelos de seleção) (SACOMAN, et al., 2008). São utilizadas várias linhagens celulares tumorais com o intuito de se obter uma visão ampliada dos efeitos das drogas ou compostos

bioativos. Estas linhagens devem ser de cânceres originados de diferentes tecidos com diferentes origens embrionárias e com características morfológicas e fisiológicas distintas. Esse tipo de ensaio é particularmente útil na determinação dos mecanismos de reação e dose-resposta de um composto (SACOMAN et al., 2008; ROESLER et al., 2007).

Métodos de investigação da atividade citotóxica, antiproliferativa e antioxidante celular foram desenvolvidos e padronizados pelo grupo de estudos do Prof. Dr. Rui Hai Liu do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Cornell. Para este fim são utilizadas culturas de células específicas de linhagem humana hepatócida (HepG2). Nestes ensaios são levados em conta aspectos de captação celular e distribuição de compostos (WOLFE; LIU, 2008; WOLFE; LIU, 2007; LIU et al., 2002)

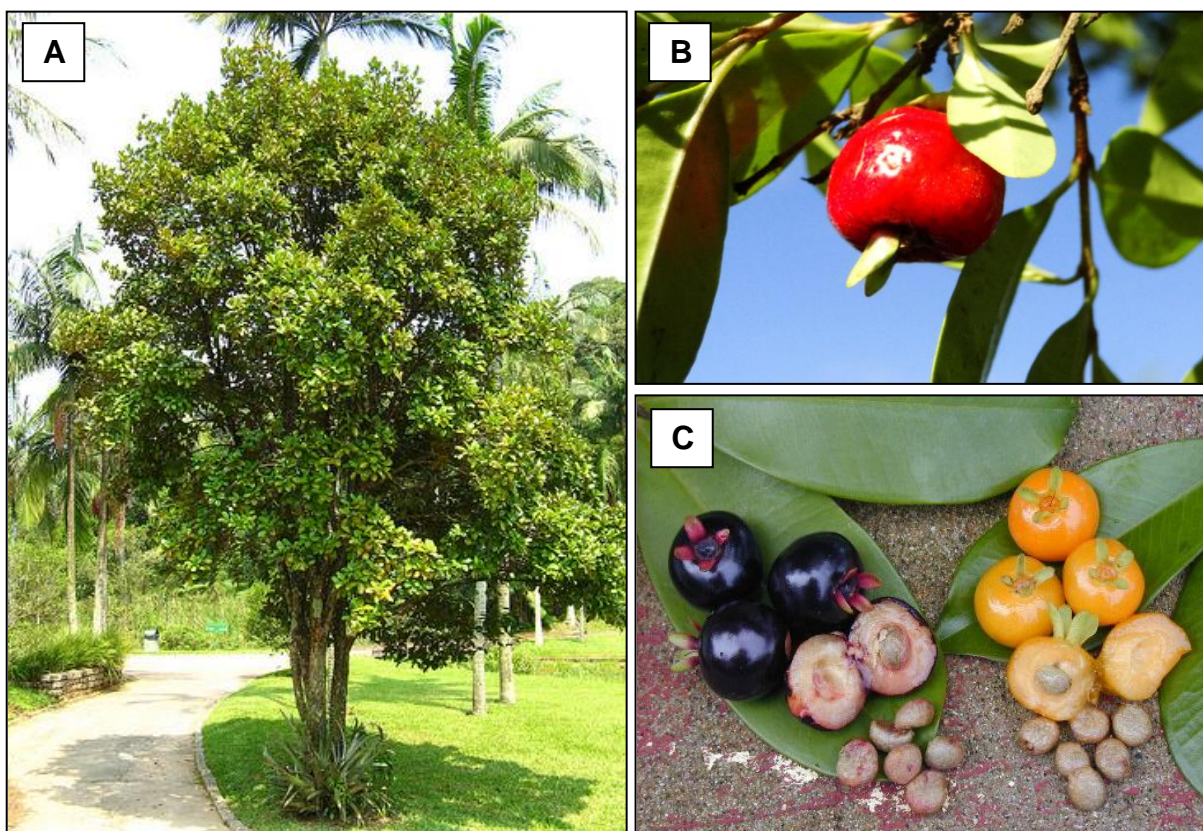
## 2.5 GRUMIXAMA (*Eugenia brasiliensis*) E CAMBUCI (*Campomanesia phaea*)

*Myrtaceae*, é uma família que compreende 142 gêneros e mais de 5500 espécies. Está distribuída predominantemente no Hemisfério Sul, com alta diversidade ocorrendo na Austrália, áreas tropicais e temperadas da América do Sul e Sudeste da Ásia, enquanto que apenas três gêneros ocorrem na África e um na região mediterrânea da Europa (WILSON, 2011, citado por THORNHILL, et al., 2011). É constituída por plantas de folhas simples, opostas, com margens inteira e de coloração sempre verde. Uma das características marcantes dessa família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (DONATO; MORRETES, 2007). Dentre as espécies da família *Myrtaceae*, encontram-se a *Eugenia brasiliensis* e a *Campomanesia phaea*.

O gênero *Eugenia* é um dos maiores gêneros da família *Myrtaceae*, possuindo cerca de 350 espécies, ocorrendo desde o México até a Argentina. Várias espécies cultivadas possuem frutos comestíveis usados na medicina popular, para o tratamento de doenças digestivas, doenças inflamatórias, da febre, para baixar os níveis de glicose no sangue e também como antimicrobianos, além de apresentarem óleos essenciais (FLORES et al., 2012; MAGINA et al., 2012; ZOGHBI, 2011; COLE; HABER; SETZER, 2007). Suas folhas, frutos e madeira são adstringentes,

aromáticos e diuréticos, tradicionalmente utilizados como tratamento alternativo para o reumatismo (REVILLA, 2002 citado por FLORES, et al., 2012). A floração ocorre em setembro/outubro, durando uma ou duas semanas, seguindo-se à formação dos frutos, comestíveis e agradáveis (DONATO; MORRETES, 2007). A *Eugenia brasiliensis*, popularmente conhecida como grumixama, grumixaba, grumichameira, grumixameira ou cerejeira brasileira, é encontrada nas florestas costeiras brasileiras, desde o sul da Bahia até Santa Catarina e é utilizada na medicina popular como um adstringente, anti-inflamatório, energizante, revitalizante, diurético e para o tratamento do reumatismo, das desordens gastrointestinais e da depressão (FLORES et al., 2012; MAGINA et al., 2012; UFRJ, 2012; COLLA et al., 2012; PIETROVSKI et al., 2008). A grumixameira possui de 5 a 10 metros de altura, apresenta floração branca e folhas simples de 6 a 9 centímetros, com coloração verde quando adultas (FIGURA 5). Os frutos são arredondados medindo cerca de 2,5 cm, com coloração variando entre amarelo, negro e vermelho, sendo o negro e o vermelho cores características de frutas ricas em antocianinas (FIGURA 5). Possuem polpa espessa, de cor clara e adocicada, com maturação ocorrendo de novembro a dezembro e utilizados tradicionalmente para a produção de geleias, tortas e licores (UFRJ, 2012; FLORES et al., 2012).

Figura 5 – Árvore e frutos *Eugenia brasiliensis*.



- A) Grumixameira em idade frutífera.  
 B) Grumixama vermelha.  
 C) Grumixamas negra e amarela.

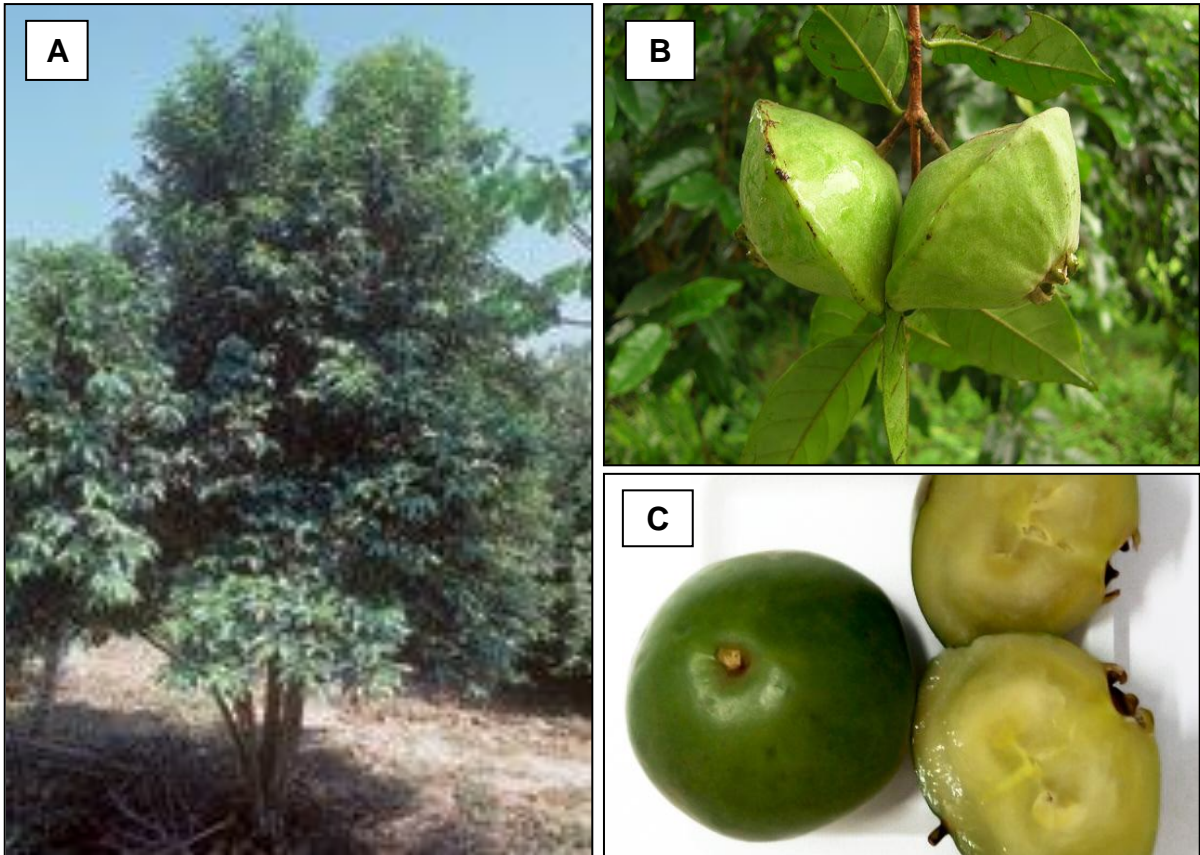
Fontes: A) CASAPRO, 2013; B) COLECIONANDO FRUTAS, 2013; C) MONTOSO GARDENS, 2013.

Já os frutos do gênero *Campomanesia* são amplamente utilizados para fazer licores, aguardente, sucos, sorvetes e doces (LORENZI, et al., 2006, citado por MADALOSSO, et al., 2011; VALLILO et al., 2005). As folhas são tradicionalmente utilizadas como medicamentos para a disenteria, problemas de estômago, diarreia, e cistites, bem como distúrbios hepáticos. Eles também têm sido utilizados para reduzir o colesterol no sangue (DICKEL et al., 2007, citado por MADALOSSO et al., 2011).

A espécie *Campomanesia phaea*, conhecida popularmente como Cambuci, da árvore Cambucizeiro é uma fruta de origem brasileira, nativa da Serra do Mar e Mata Atlântica, entre os estados de São Paulo e Minas Gerais. É também encontrada em outras regiões do Brasil, mas em menor proporção (SILVA et al., 2012). Seu nome é derivado do tupi-guarani que significa pote de barro, devido ao formato do fruto, que se assemelha aos vasos de barro feitos pelos índios (KAWASAKI; LANDRUM, 1997). O Cambucizeiro apresenta altura de 3 a 5 metros e

tronco com diâmetro de 20 a 30 centímetros, com aspecto de escamas, além de floração branca e vistosa nos meses de agosto a novembro, e frutificação abundante, com frutos arredondados, durante os meses de janeiro e fevereiro (VALLILO et al., 2005), estando ameaçado de extinção devido à exploração predatória da sua madeira e também pelo desmatamento da Mata Atlântica (FIGURA 6) (KAWASAKI; LANDRUM, 1997, citado por SILVA et al., 2012). A espécie *Campomanesia phaea* foi inicialmente descrita como *Abbevillea phaea* por Berg, em 1857. O fruto, conhecido desde os primórdios coloniais, foi usado durante muitos anos exclusivamente como aromatizante para cachaças (MATHIAS; ANDRADE, 2011, citado por SILVA et al., 2012). Os frutos medem, geralmente, de 5 a 6 cm de diâmetro na região mediana, por 3 a 4,5 cm de espessura, são carnosos, suculentos e comestíveis (VALLILO et al., 2005), com casca fina e coloração verde, inclusive com a maturidade (tornando-se às vezes um pouco mais amarelada ou alaranjada). Desse modo, o fruto amadurece quando fica mais macio e cai dos galhos. Apresenta cheiro doce, mas é extremamente ácido como o limão (FIGURA 6) (KAWASAKI; LANDRUM, 1997, citado por SILVA et al., 2012). Apesar de rico sob os pontos de vista nutricional e sensorial, o consumo da fruta *in natura* é limitado devido à forte acidez e ao baixo teor de carboidratos. Como as qualidades de sabor e aroma não se perdem com o processamento, o cambuci é bastante utilizado no preparo de sucos, geleias e doces em calda, sendo considerado um fruto exótico com propriedades aromáticas que favorecem o seu uso como agente flavorizante em alimentos e bebidas (SILVA et al., 2012; VALLILO et al., 2005).

Figura 6 – Árvore e frutos *Campomanesia phaea*.



A) Cambucizeiro em idade frutífera.

B e C) Cambuci.

Fontes: A) REVISTA GLOBO RURAL, 2013; B e C) COLECIONANDO FRUTAS, 2013.

### 3 OBJETIVOS

Segue abaixo a especificação dos objetivos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os extratos da grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e cambuci (*Campomanesia phaea*) quanto à sua quantidade de fenólicos totais e flavonoides e identificação de principais açúcares, bem como as suas atividades antioxidante e antiproliferativa em cultura de células específicas para câncer hepático, pulmonar e mamário.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a quantidade de fenóis totais e flavonoides;
- b) Avaliar a Atividade Antioxidante Celular contra linhagem de células humana de câncer hepático (HepG2);
- c) Estudar a capacidade Antiproliferativa contra linhagens de células humana de câncer hepático (HepG2), pulmonar (A549) e mamário (MCF7), bem como a viabilidade celular por exclusão, através da contagem de células viáveis e células não viáveis;
- d) Identificar a presença de fitoquímicos, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- e) Identificar os principais açúcares, por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos utilizados no presente estudo estão discriminados a seguir.

### 4.1 MATERIAL

Foram utilizados extratos de frutas e cultura de células de carcinoma humano.

#### 4.1.1 Frutas

Na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas-SP, foram avaliadas várias frutas exóticas dos diferentes biomas, Cerrado, Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Foram realizados estudos da capacidade antioxidante, do perfil de fenólicos totais e antocianinas pelos seguintes métodos: capacidade de sequestrar radicais livres (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) – DPPH, capacidade da absorção de radicais oxigênio – ORAC, cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE e fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Foram selecionadas para o presente estudo a grumixama vermelha e o cambuci, ambos em fase madura, provenientes do Sítio do Belo em Paraibuna-SP. As frutas foram identificadas de acordo com o sistema de classificação proposto pelo *The Angiosperm Phylogeny Group II* (2003). As frutas não danificadas foram selecionadas e lavadas. A porção comestível foi retirada, subdividida e homogeneizada com água e etanol (95:5 v/v) por 20 minutos de acordo com Roesler et al., 2006. As amostras foram concentradas em rotaevaporador a 40 °C, liofilizadas, pulverizadas e armazenadas a -20 °C em recipiente de vidro opaco. O rendimento do extrato foi de 25%, ou seja, para cada 100 g de fruta obteve-se 25 g de extrato. Optou-se por estudar as frutas na forma de extrato aquoso levando em consideração a ingestão dos sucos de grumixama e cambuci pela população.

#### **4.1.2 Células**

Para ensaio de atividade antioxidante e antiproliferativa utilizou-se linhagem de células de carcinoma hepático, denominadas HepG2, carcinoma pulmonar, denominadas A549 e carcinoma mamário, denominadas MCF7. As células foram mantidas em meio de cultura completo, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, e em temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2 MÉTODOS**

Para o alcance dos objetivos foram utilizados os métodos descritos a seguir.

##### **4.2.1 Determinação do Conteúdo Total de Fenólicos**

O conteúdo total de fenólicos dos extratos de grumixama e cambuci foi determinado usando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), que foi modificado no laboratório da Universidade de Cornell (YANG et al., 2004). Os extratos das frutas foram diluídos 1:10 com água destilada e foram obtidas leituras da curva padrão no intervalo de 0.0-600.0 µg de ácido gálico/mL. Os extratos foram oxidados pelo reagente Folin-Ciocalteu e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio. A absorvância foi mensurada em 760 nm depois de 90 minutos, à temperatura ambiente, em um leitor de placa II Dynex MRX (Dynex Technologies Inc., Chanilly, VA). Os valores da absorvância foram então comparados com os de padrão de ácido gálico, com concentrações conhecidas. Todos os valores foram expressos como a média (miligramas de ácido gálico equivalente - GAE - por 100 g de peso seco da amostra) ± Desvio Padrão (DP) para três repetições (triplicata).

##### **4.2.2 Determinação do Teor de Flavonoides**

O teor total de flavonoides dos extratos de grumixama e cambuci foi determinado usando um método colorimétrico modificado (JIA et al., 1999; YANG et al., 2004). Para tal, 0,25 mL dos extratos diluídos 1:10 foram misturados com 1,25 mL de água destilada e subsequentemente com 0,075 mL de solução de nitrito de

sódio a 5% e deixados reagir por 5 minutos. Então, 0,15 mL de cloreto de alumínio a 10% foram adicionados e deixados reagir por 6 minutos, salientando que, antes foram adicionados 0,5 mL de hidróxido de sódio 1 M. Água destilada foi adicionada para levar ao volume final da mistura de 3 mL. A absorvância da mistura foi imediatamente mensurada em comprimento de onda de 510 nm contra um branco preparado, usando um espectrofotômetro II DYNEX MRX. O teor de flavonoides foi determinado através de uma curva padrão de catequina e expressos como a média (miligramas de catequina equivalente - CE - por 100 g de peso seco da amostra)  $\pm$  Desvio Padrão (DP) para três repetições (triplicata).

#### **4.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Foi realizado cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) – dos extratos das frutas nativas brasileiras grumixama e cambuci para identificação de flavonoides. Para tanto utilizou-se cinco padrões, a saber: catequina, rutina, quercetina, apigenina e kampferol.

A análise foi realizada em cromatógrafo Shimadzu UFLC 20 A, coluna Shim-Pack (Shimadzu) CLC-ODS - 4257830 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 0,25% v/v (eluente A) e Acetonitrila (eluente B). O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, e fluxo de 0,7 mL/minuto. Durante os 2 minutos iniciais a análise foi realizada com 10% do eluente B, em seguida a concentração de B aumentou linearmente até 20% em 6 minutos, até 30% em 10 minutos, até 35% em 15 minutos e em seguida até 60% em 20 minutos. Depois a concentração de B foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise. Os resultados foram obtidos através de leitura realizada numa absorvância de 333nm,8nm.

#### **4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os extratos das frutas grumixama e cambuci foram solubilizados em DMSO-D6 e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AC-300, operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (ppm).

#### 4.2.5 Teste da Capacidade Sequestrante de Radicais Peroxil (PSC)

O teste PSC foi realizado de acordo com o protocolo de Wolfe e Liu (2008), o qual avalia a atividade antioxidante celular através da capacidade de eliminação do radical peroxil. Para tal, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de células de carcinoma hepático humano (HepG2) foi incubada a uma densidade de  $6 \times 10^4$  células/poço em microplaca estéril. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio contendo o extrato de frutas mais 25  $\mu\text{M}$  de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Depois adicionou-se 600  $\mu\text{M}$  de 2,2-azobis (amidinopropano) diidoclorido às células. A leitura foi realizada a 37 °C, com filtros de emissão a 538 nm e excitação a 485 nm, sendo realizada a cada cinco minutos, durante uma hora. Antes da utilização na reação, 107  $\mu\text{L}$  de diacetato de diclorofluoresceína a 2,48 mM foi adicionado a 893  $\mu\text{L}$  de KOH a 1,0 mM, durante 5 minutos, para ser hidrolisada, removendo, dessa forma, a porção diacetato, a fim de formar diclorofluoresceína. A diclorofluoresceína obtida foi diluída em 7 mL de tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). Amidinopropano (2,2-Azobis) foi preparado fresco em tampão e mantido a 4°C. Além disso, para realização do ensaio, 100  $\mu\text{L}$  do extrato da grumixama e 100  $\mu\text{L}$  do extrato do cambuci foram diluídos em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) e depois transferidos para os poços contendo as células. Adicionou-se ainda, 100  $\mu\text{L}$  de diclorofluoresceína por poço. A placa foi levada ao espectrofotômetro de fluorescência Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Franklin, MA), e a solução em cada célula foi misturada por agitação a 1200 rpm durante 20 segundos. A reação foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de amidinopropano (2,2-azobis). Cada conjunto de diluições e controle foi analisada por três vezes em colunas adjacentes. A reação foi realizada a 37 °C, e a fluorescência foi avaliada a 485 nm de excitação e 538 nm de emissão, com o espectrofotômetro de fluorescência. O tampão foi utilizado para reações de controle. Os dados foram adquiridos com software Ascent, versão 2.6 (Thermo Labsystems). As áreas sobre a curva média de fluorescência em função do tempo de reação cinética (AUC) para o controle e para as amostras (até 36 minutos) foram integradas e usadas como a base para calcular a atividade antioxidante de acordo com a equação:

$$\text{PSC unidade} = 1 - (\text{SA} / \text{CA})$$

Onde SA é AUC para a amostra ou diluição padrão e CA é AUC para a reação controle. Os compostos que inibirem a oxidação da diclorofluoresceína produzem SA menores e conseqüentemente, unidades PSC maiores. A concentração eficaz média ( $EC_{50}$ ) foi definida como a dose necessária para causar uma inibição de 50% (PSC unidade = 0,5) para cada extrato. Os resultados foram expressos como micromol de equivalentes de vitamina C por grama de extrato da amostra  $\pm$  desvio padrão (DP) para as análises em triplicata.

#### **4.2.6 Atividade Antioxidante Celular (CAA)**

Para determinação da atividade antioxidante celular utilizou-se ainda o ensaio de CAA. Nesse teste as células de carcinoma hepático humano (HepG2) foram plaqueadas a uma densidade de  $6 \times 10^4$  células/poço, em uma placa de 96 poços, contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura por poço. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS. Imediatamente antes da utilização na reação, 107  $\mu\text{L}$  de diacetato diclorofluoresceína a 2,48 mM foi hidrolisada para diclorofluoresceína com 893  $\mu\text{L}$  de KOH a 1,0 mM durante 5 minutos num frasco, a fim de remover a porção diacetato e, em seguida, foi diluído com 7 mL de tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). Amidinopropano (ABAP) a 200 mM, preparado fresco, foi mantido a 4 °C. Para o teste, 100  $\mu\text{L}$  de extrato da grumixama e 100  $\mu\text{L}$  de extrato do cambuci foram diluídos em tampão de fosfato 75 mM (pH 7,4) e, em seguida, transferidos para as células de reação sobre uma placa de 96 poços. Sendo que, após esse processo adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de diclorofluoresceína. A placa de 96 poços foi carregada no espectrofotômetro de fluorescência (ThermoLabsystems, Franklin, MA), sendo a solução em cada célula misturada por agitação a 1200 rpm durante 20 segundos. A reação foi então iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ABAP.

Cada conjunto de diluições de uma repetição e controle foram analisados por três vezes em colunas adjacentes. Sendo que, a reação foi realizada a 37 °C, e a fluorescência monitorada a 485 nm de excitação e 538 nm de emissão com o espectrofotômetro de fluorescência e a fluorescência foi medida a cada 5 minutos,

durante 1 hora (WOLFE; LIU, 2007; SONG et al., 2010; WOLFE et al., 2008). Utilizou-se tampão para as reações do controle.

Após obtenção dos valores de fluorescência, a área sobre a curva média de fluorescência em função do tempo foi integrada, a fim de calcular o valor de CAA para cada concentração, tanto no extrato de grumixama, quanto para o de cambuci. A seguir têm-se a fórmula utilizada para fazer essa integração entre áreas sobre a curva.

$$\text{CAA unidade} = 100 - \left( \int SA / \int CA \right) \times 100$$

Onde  $\int SA$  é a área sob a fluorescência da amostra em função da curva do tempo e  $\int CA$  é a área obtida a partir da curva do controle. A dose eficaz média ( $EC_{50}$ ) para cada extrato foi determinada pela medida de  $\log(fa/fu)$  em função de  $\log(\text{dose})$ , onde  $fa$  é a fração afetada (unidade de ácido cítrico anidro), e  $fu$  é a fração não afetada (1 unidade CAA) pelo tratamento. Os valores de  $EC_{50}$  foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) para os conjuntos de dados obtidos em triplicata. Os valores de  $EC_{50}$  foram convertidos em valores de CAA, os quais são expressos em micromoles de quercetina equivalentes (QE) por 100 g de extrato (peso seco da amostra), utilizando o valor médio de  $EC_{50}$  para a quercetina, pelo menos, a partir de experiências separadas.

#### **4.2.7 Atividade Antiproliferativa**

Foi investigada a atividade antiproliferativa dos extratos de grumixama e cambuci.

##### **4.2.7.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e preparo dos extratos**

O ensaio para avaliação da atividade antiproliferativa foi realizado utilizando linhagens celulares derivadas de cânceres humanos (HepG2 – carcinoma hepático, A549 – carcinoma pulmonar e MCF7 – carcinoma mamário). As células foram cultivadas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e

5% de CO<sub>2</sub>). O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias e as células subcultivadas regularmente. As subculturas foram obtidas por tripsinização com uma solução de tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%. Estoques de cada uma das linhagens foram congelados na presença de 10% de crioprotetor (Dimetilsulfóxido - DMSO) e mantidos em biofreezer (-80 °C).

Os extratos de frutas (grumixama e cambuci) foram solubilizados em água destilada (5mg/mL) e as soluções-estoque foram mantidas sob refrigeração (4 °C). Imediatamente antes do tratamento, as diluições foram feitas (1 - 50 µg/mL) em meio de cultura a partir das soluções estoque.

#### 4.2.7.2 Ensaio Colorimétrico – MTS

As células foram semeadas em placas de 96 poços com inoculo inicial de  $5 \times 10^3$  ou  $1 \times 10^4$  células/poço dependendo da linhagem celular. Após a aderência das células (24 horas), o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com os extratos da grumixama e do cambuci nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL por 72 horas. As células do grupo controle receberam apenas meio de cultura sem o extrato de frutas.

Ao término do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o Kit “Cell Titer 96TM” da Promega. Esse ensaio é baseado na conversão enzimática (desidrogenase) do sal tetrazolio em formazano, o qual absorve luz em 490nm.

As análises foram realizadas em leitor de ELISA (Zenyth), sendo a taxa de absorbância diretamente proporcional ao número de células vivas. Os valores de absorbância das amostras tratadas foram comparados aos das amostras não tratadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP).

#### 4.2.7.3 Viabilidade Celular determinada por Exclusão com Azul de Tripiano

As células de carcinoma mamário humano (MCF7) foram semeadas em placas de 35 mm com densidade de  $7 \times 10^4$  células/placa. Após a adesão (24 horas), as células foram tratadas com os extratos das frutas grumixama e cambuci na concentração de 50 µg/mL durante 72 horas. Ao término do tratamento as células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA) e diluídas na concentração

de 1:1, sendo 100  $\mu$ L de suspensão de células para 100  $\mu$ L do corante azul de tripano (0,4%). A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer, sendo determinada a população de células viáveis (não coradas) e inviáveis (células coradas em azul). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  Desvio Padrão (DP).

#### **4.2.8 Análise Estatística**

Análises estatísticas foram conduzidas usando o SigmaPlot Versão 2000 (Aspire Software International, Ashburn, VA), SPSS para Windows versão 15.0 (Norussis, 2006) e GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e diferenças entre as médias foram localizadas por meio do teste de comparação one-way de Tukey. A significância foi determinada em  $p < 0,05$ . Todos os dados foram registrados como a média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) de três repetições (triplicata).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo estão descritos abaixo.

### 5.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓLICOS

O método colorimétrico Folin-Ciocalteu, utilizado na determinação do conteúdo total de fenólicos, leva em consideração a coloração azul originada da oxidação dos fenolatos pelo reagente Folin-Ciocalteu, reduzindo os ácidos a um complexo azul, gerando uma coloração proporcional à quantidade de compostos fenólicos (AVELLA; GARCIA; CISNEROS, 2008; TOMEI; SILVA; SALVADOR, 2007).

Dessa maneira, determinou-se o conteúdo total de fenólicos dos extratos de grumixama e cambuci e os resultados são expressos como miligramas de ácido gálico equivalente por 100 gramas de peso seco da parte comestível das frutas.

Dentre as duas frutas analisadas, a grumixama apresentou o maior conteúdo de fenólicos, com um valor de  $938,21 \pm 11,05$  mg GAE/100 g, seguida pelo cambuci, com um valor de  $367,84 \pm 10,79$  mg GAE/100 g (TABELA 1).

Tabela 1 - Conteúdo Total de Fenólicos dos extratos de grumixama e cambuci.

Frutas	Conteúdo Total de Fenólicos mg GAE <sup>b</sup> /100 g amostra
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	$938,21 \pm 11,05^a$
Cambuci ( <i>Campomanesia phaea</i> )	$367,84 \pm 10,79$

a Média  $\pm$  desvio padrão de três determinações

b Valores expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por 100 gramas de amostra

Fonte: A autora.

De acordo com o conteúdo total de fenólicos, as frutas podem ser classificadas em três categorias, a saber:

- a) Baixo conteúdo de fenólicos, quando os valores são menores que 100 mg GAE/100 g;
- b) Médio conteúdo de fenólicos, quando os valores estiverem na faixa de 100-500 mg GAE/100 g;
- c) Alto conteúdo de fenólicos, quando os valores são maiores que 500 mg GAE/100 g, para amostras baseadas na fruta fresca (VASCO, RUALES, KAMAL-ELDIN, 2008; RUFINO et al., 2010).

Sendo assim, conforme essa classificação, a grumixama é classificada como uma fruta contendo alto conteúdo de fenólicos e o cambuci como uma fruta contendo médio conteúdo de fenólicos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Biegelmeyer et al. (2011), onde foram estudadas frutas do gênero *Psidium*, dentre elas a goiaba vermelha e a goiaba amarela, com conteúdo total de fenólicos de  $501,33 \pm 0,02$  mg/100 g de fruta fresca e  $292,03 \pm 0,03$  mg/100 g de fruta fresca, respectivamente.

Outras frutas pertencentes à família *Myrtaceae*, dentre elas jabuticaba, jambolão e araçá-vermelho, foram analisadas, encontrando-se, respectivamente, os valores 170,60, 159,16 e 427,11 mg GAE/100 g<sup>-1</sup> para o conteúdo total de fenólicos (HAMM et al., 2009). Neri-Numa et al. (2013) estudaram o araçá-boi, uma fruta também pertencente à família *Myrtaceae*, e encontraram um valor de  $184,08 \pm 8,25$  mg GAE/g.

Frutas como amora preta, mirtilo e morango apresentam uma grande variedade no conteúdo total de fenólicos, com valores de 100 a 820 mg GAE/100 g (ZHENG et al., 2007; JACQUES et al., 2009; BIEGELMEYER et al., 2011).

Médio conteúdo de fenólicos também foi encontrado no araçá-boi com um valor de  $184,08 \pm 8,25$  mg GAE/100 g (NERI-NUMA et al., 2013) e em frutas pertencentes ao gênero *Eugenia*, dentre elas, pitanga roxa ( $463 \pm 16$  mg GAE/100 g<sup>-1</sup>), pitanga vermelha ( $210 \pm 3$  mg AGE/100 g<sup>-1</sup>) e pitanga laranja ( $179 \pm 5$  mg GAE/100 g<sup>-1</sup>) (BAGETTI, 2009).

Sun et al. (2002) encontraram alto conteúdo de fenólicos no cranberry ( $527,2 \pm 21,5$  mg GAE/100 g), e médio conteúdo de fenólicos na maçã ( $296,3 \pm 6,4$  mg GAE /100 g), na uva vermelha ( $201,0 \pm 2,9$  mg AGE /100 g) e no morango ( $160,0 \pm 1,2$  mg AGE /100 g).

Comparando-se o conteúdo total de fenólicos dos extratos das frutas grumixama e cambuci, com outras frutas da literatura, evidencia-se que as frutas do

presente estudo, principalmente a grumixama, apresentam quantidade de fenólicos superior à frutas comumente consumidas pela população brasileira como, por exemplo, goiaba, maçã e morango. Sendo assim, atribui-se grande importância às frutas grumixama e cambuci, uma vez que a presença de compostos fenólicos em sua composição atribuem propriedades benéficas a tais frutos, pois de acordo com Reynerston et al. (2008), os polifenóis das frutas possuem a capacidade de sequestrar radicais livres, sendo importantes constituintes antioxidantes da dieta, e o incentivo ao consumo de tais alimentos pode ajudar a prevenir a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (BERNARDES et al., 2011; HAMM et al., 2009; SOARES, 2002).

## 5.2 TEOR DE FLAVONOIDES

O conteúdo de flavonoides foi alto na grumixama, apresentando um valor de  $133,11 \pm 31,21$  mg CE/100 g de peso seco da amostra, seguido pelo cambuci, com um valor de  $79,73 \pm 15,27$  mg CE/100 g de peso seco da amostra (TABELA 2).

Tabela 2 - Teor de Flavonoides dos extratos de grumixama e cambuci.

Frutas	Teor de Flavonoides mg CE <sup>b</sup> /100 g amostra
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	$133,11 \pm 31,21^a$
Cambuci ( <i>Campomanesia phaea</i> )	$79,73 \pm 15,27$

a Média  $\pm$  desvio padrão de três determinações

b Valores expressos em miligramas de catequina equivalente por 100 gramas de peso seco da amostra

Fonte: A autora.

Valor menor foi encontrado no jambolão ( $6,6 \pm 0,2$  mg/100g), fruta pertencente ao gênero *Eugenia* (DEVKAR; PANDYA; SHAH, 2012).

Outras frutas foram estudadas, quanto ao conteúdo total de flavonoides, por Gonçalves, Lajolo e Genovese (2010), que encontraram os valores  $79,0 \pm 5$  mg de

CE/100 g de fruta,  $22,0 \pm 2$  mg de CE/100 g de fruta e  $15,9 \pm 0,3$  mg de CE/100 g de fruta para o tucumã, carambola e graviola, respectivamente.

Outros estudos também determinaram o conteúdo total de flavonoides em algumas frutas pertencentes à família *Myrtaceae*, a saber: goiaba vermelha ( $0,0335 \pm 0,002$  g/kg<sup>-1</sup>), goiaba branca ( $0,0165 \pm 0,0012$  g/kg<sup>-1</sup>), jaboticaba ( $0,33 \pm 0,02$  g/kg<sup>-1</sup>), camu-camu ( $0,31 \pm 0,01$  g/kg<sup>-1</sup>), pitanga ( $0,17 \pm 0,01$  g/kg<sup>-1</sup>), além do cambuci ( $0,0035 \pm 0,0002$  g/kg<sup>-1</sup>) e da grumixama ( $1,91 \pm 0,06$  g/kg<sup>-1</sup>) (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012).

A presença de flavonoides nos extratos de grumixama e cambuci podem produzir propriedades benéficas aos frutos, devido à capacidade de sequestrar radicais livres advinda desses compostos, atuando como antioxidantes que doam átomos de hidrogênio, inibindo a reação em cadeia provocada pelos radicais livres, inativando-os (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Dessa maneira os flavonoides contribuem de maneira importante com o potencial antioxidante de dietas ricas em frutas que contenham tais compostos (BERNARDES et al., 2011).

O teor de flavonoides dos extratos das frutas grumixama e cambuci foi expresso em miligramas de catequina por 100 gramas de peso seco da amostra. Deve-se atentar para as unidades de medida utilizadas em cada estudo, antes de realizar algumas comparações. Outro fator importante a se levar em consideração são as partes utilizadas das frutas para a extração da amostra, pois podem ser utilizadas a polpa ou a casca, e também a fruta fresca ou seca. Ressaltando que o mesmo é válido para o conteúdo total de fenólicos, onde os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por 100 gramas de peso seco da parte comestível das frutas.

### 5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação, identificação e quantificação de espécies químicas, realizada através da distribuição dos componentes de uma mistura em duas fases, uma móvel e outra estacionária, que estão em contato íntimo. A CLAE tem grande importância nas técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número

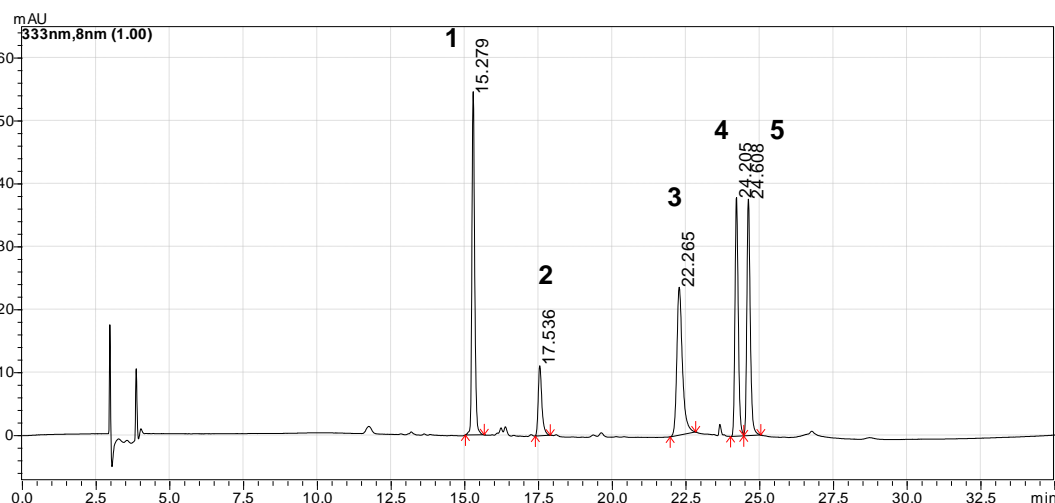
de compostos similares presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, BRAGA; BONATO, 2006).

Sendo assim, realizou-se cromatografia líquida de alta performance dos extratos das frutas nativas brasileiras Grumixama e Cambuci, utilizando-se cinco padrões (catequina, rutina, quercetina, apigenina e kampferol) para identificações de flavonoides nessas frutas.

A leitura da cromatografia foi realizada numa absorvância de 333nm,8nm e os resultados obtidos são mostrados em cromatogramas.

A Figura 7 indica o cromatograma do mix dos cinco padrões utilizados para análise de fitoquímicos.

Figura 7 - Cromatograma com os devidos tempos de retenção do Mix dos cinco padrões utilizados na CLAE.



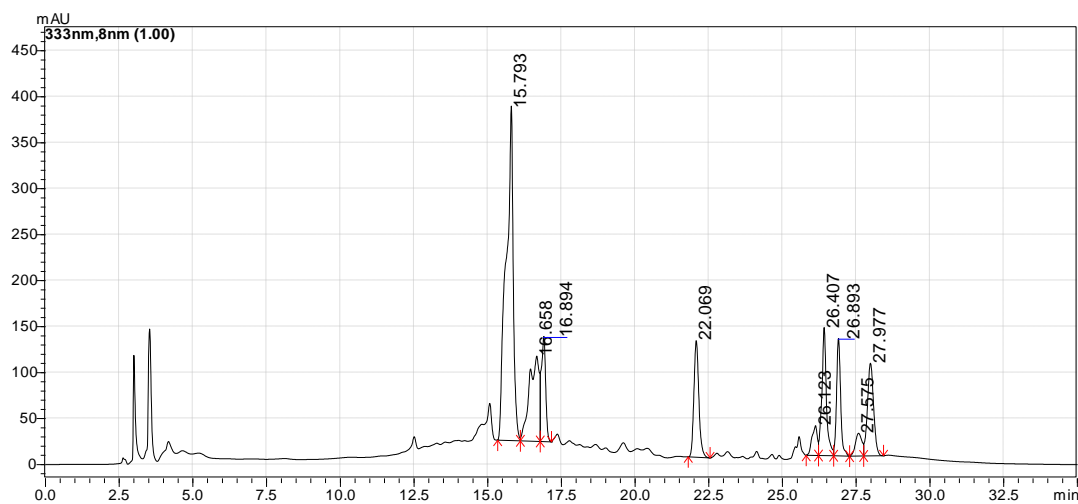
Pico	Tempo Ret.	Padrão	Área	Altura
1	15.279	Rutina	358891	50877
2	17.536	Catequina (degradação)	96078	10965
3	22.265	Quercetina	309297	23357
4	24.205	Apigenina	294281	35910
5	24.608	Kampferol	301237	36965

Fonte: A autora.

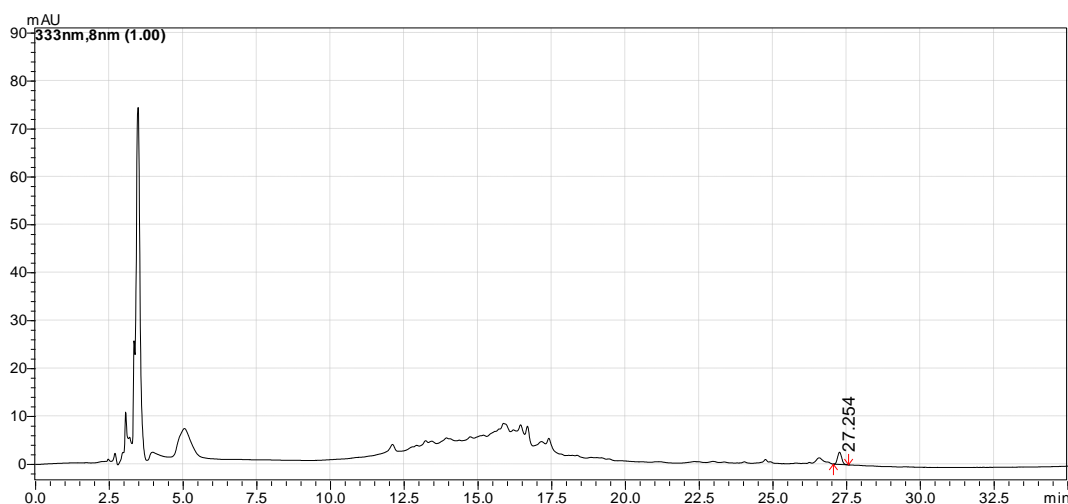
Os resultados da identificação de flavonoides nas amostras de extratos de Grumixama e Cambuci são mostrados na Figura 8.

Figura 8 - Cromatogramas dos extratos de frutas nativas brasileiras.  
A) Grumixama.  
B) Cambuci.

### A) Grumixama



### B) Cambuci



Fonte: A autora.

Ao analisar o cromatograma do extrato de Grumixama (FIGURA 8 A) sugere-se a presença dos flavonoides rutina, aparecendo no tempo de retenção de 15,793 minutos e quercetina, aparecendo no tempo de retenção de 22,069 minutos. Nos demais tempos de retenção não é possível identificar os outros padrões de flavonoides utilizados.

No cromatograma do extrato de Cambuci (FIGURA 8 B) observa-se que os padrões de flavonoides utilizados não apareceram nos tempos de retenção analisados.

É importante salientar que há outros tipos de flavonoides além dos padrões empregados, que não foram utilizados na análise de HPLC e que poderiam ser encontrados em tais frutas.

Gonçalves, Lajolo e Genovese (2010) identificaram os flavonoides quercetina e kampferol em amostras de frutas de Cambuci, além de quercetina em polpas comerciais dessa fruta. Quercetina e rutina foram encontradas em amostras de Grumixama por Reynertson et al. (2008). Isso pode ser devido ao local de origem da fruta e/ou ao tipo de extração e preparação das amostras, que pode ser aquoso, alcoólico ou lipídico, pois, de acordo com Martins-Ramos, Bortoluzzi e Mantovani (2010), a constituição química das espécies de frutas pode ser variável, dependendo do tipo de solo, temperatura, altitude e estações climáticas.

Algumas frutas da família Mirtácea foram estudadas por Gonçalves, Lajolo e Genovese (2010) quanto à existência de flavonoides em sua composição, e foi identificado quercetina e kampferol no Camu-Camu e Araçá e catequina e quercetina no Tucumã.

Outros estudos identificaram quercetina na Jabuticaba, Pitomba, Camu-Camu, Jambo, Jambolão, Pitanga e Gabiroba e Rutina na Jabuticaba, Pitomba, Camu-Camu e Jambolão, sendo todas essas frutas também pertencentes à família Mirtácea (FERREIRA et al., 2012; CORREIA et al., 2011; REYNERTSON et al., 2008).

Akter et al. (2011) encontraram os flavonoides catequina, quercetina, rutina e kampferol em amostras de Camu-Camu, uma fruta nativa brasileira pertencente à mesma família da Grumixama e do Cambuci.

#### 5.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

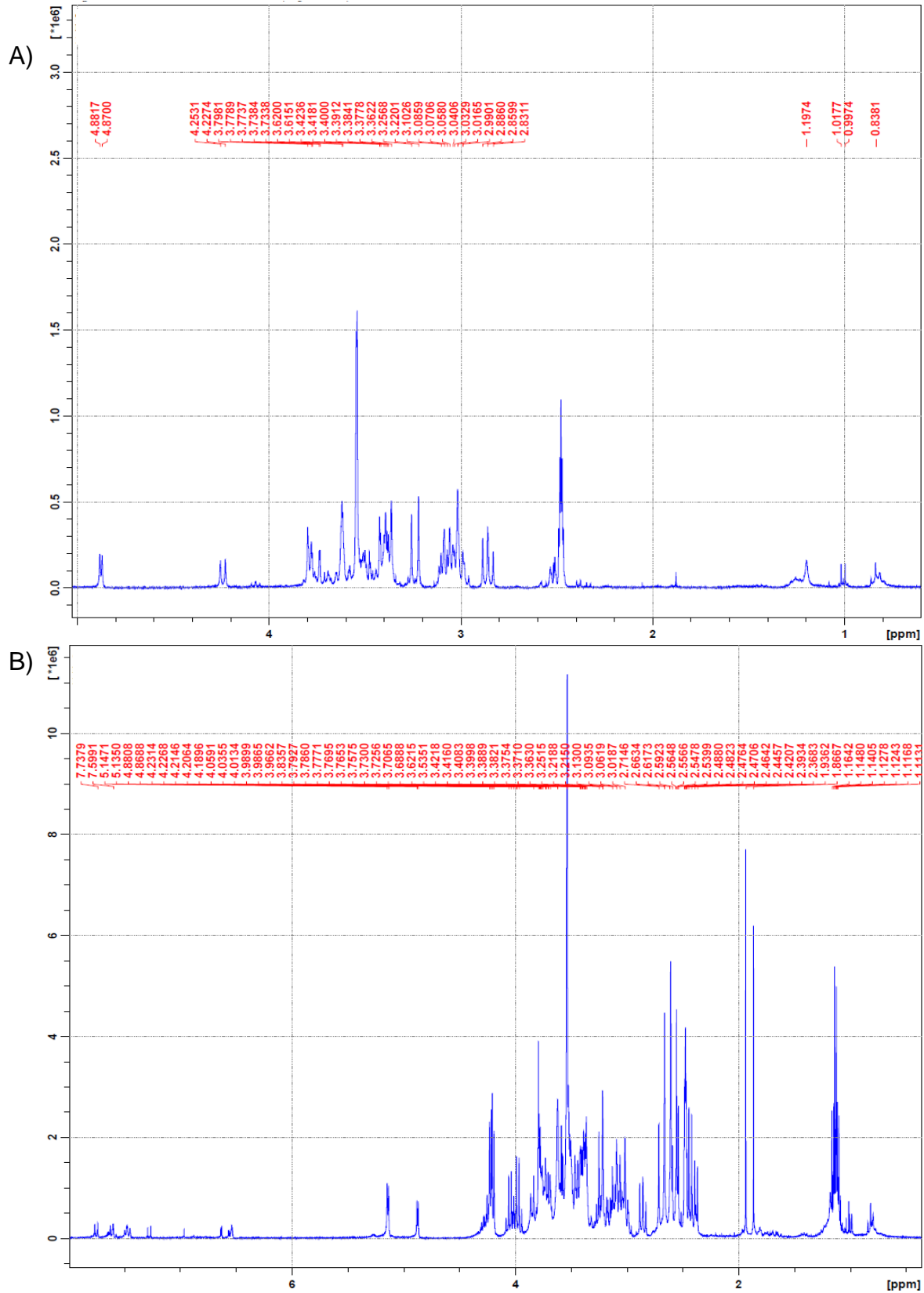
A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta que pode ser utilizada para a determinação de estruturas moleculares e identificação de compostos orgânicos, permitindo a análise de pequenas quantidades de compostos puros, com grande precisão, através da ação de um campo magnético. A amostra, que pode ser um gás, sólido, líquido, soluções, géis, emulsões ou amostras *in vivo*, pode absorver radiação na região de radiofrequência, sendo gerado um gráfico das

frequências dos picos de absorção versus intensidade, constituindo os espectros de RMN. O espectro de hidrogênio fornece o deslocamento químico dos átomos de hidrogênio presentes na amostra, e o espectro de carbono fornece o deslocamento químico dos átomos de carbono. Tal análise permite identificar a proximidade espacial de alguns átomos, auxiliando na identificação de diferentes partes de moléculas provenientes de um metabólito secundário (ROCHA, 2013; FONSECA, 2012; SOARES, 2006).

Devido à RMN ser uma importante ferramenta na identificação de compostos orgânicos, realizou-se tal análise com os extratos das frutas grumixama e cambuci.

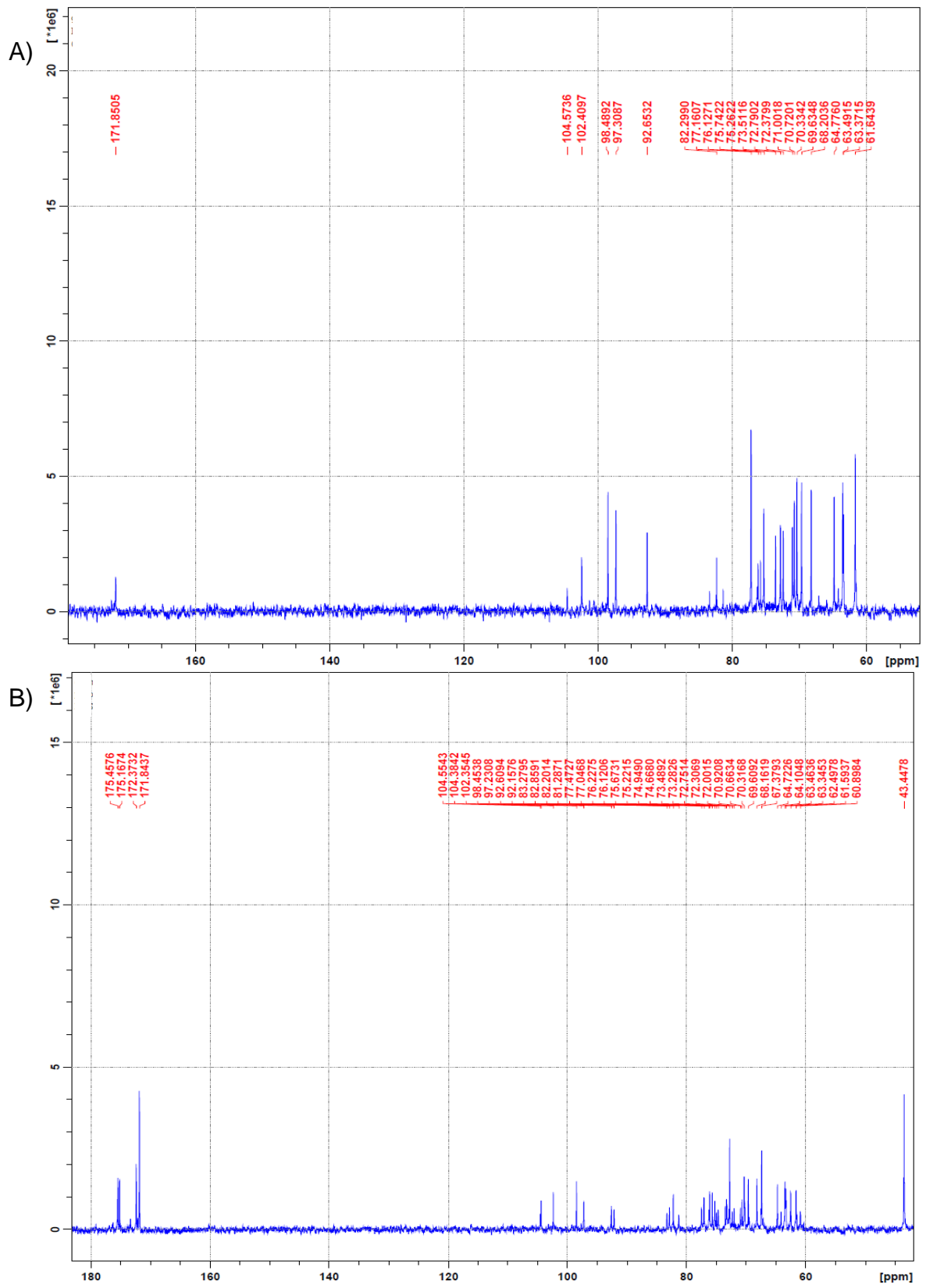
Os espectros de  $^1\text{H}$  exibiram sinais na região de  $\delta$  3,0 – 5,4 (FIGURA 9 A e B) que são compatíveis com deslocamentos químicos de hidrogênios característicos de açúcares e, através da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , verificam-se sinais na região de  $\delta$  60,0 - 100,0 (FIGURA 10 A e B), que também são característicos de açúcares, sugerindo a presença de tais compostos nos extratos.

FIGURA 9 - Espectros de  $^1\text{H}$ .  
 A) Extrato de Grumixama.  
 B) Extrato de Cambuci.



Fonte: A autora.

FIGURA 10 - Espectros de  $^{13}\text{C}$ .  
 A) Extrato de Grumixama.  
 B) Extrato de Cambuci.

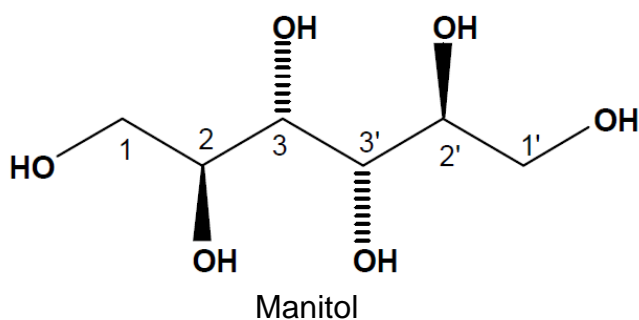


Fonte: A autora.

Com base no princípio da metodologia de RMN e após levantamento da estrutura molecular de açúcares presentes na literatura, realizou-se análise dos espectros de RMN dos extratos de grumixama e cambuci e comparação com os espectros dos açúcares presentes na literatura. De tal modo, após essa análise, pôde sugerir-se a presença dos açúcares frutose, sacarose, manitol, manose e glicose nos extratos das frutas grumixama e cambuci. As figuras 11, 12, 13, 14 e 15 apresentam as moléculas e os espectros desses açúcares que podem estar presentes nos extratos.

Figura 11 - A) Estrutura química do manitol.  
B) Valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A)



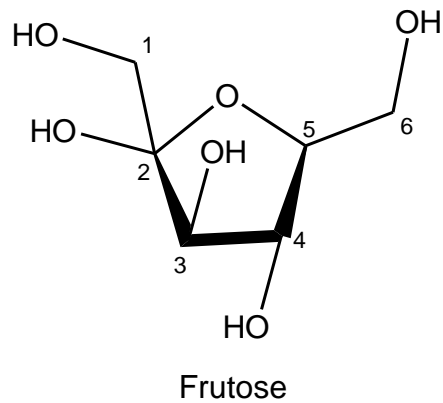
B)

	MANITOL (ELIAS, 2003)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	3,38 e 3,61	72,2	3,38 e 3,61	72,37	3,38 e 3,62	72,3
2	3,45	70,7	3,42	70,72	3,42	70,66
3	3,54	64,6	3,61	64,77	3,53	64,72

Fonte: A autora.

Figura 12 - A) Estrutura química da frutose.  
 B) Valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A)



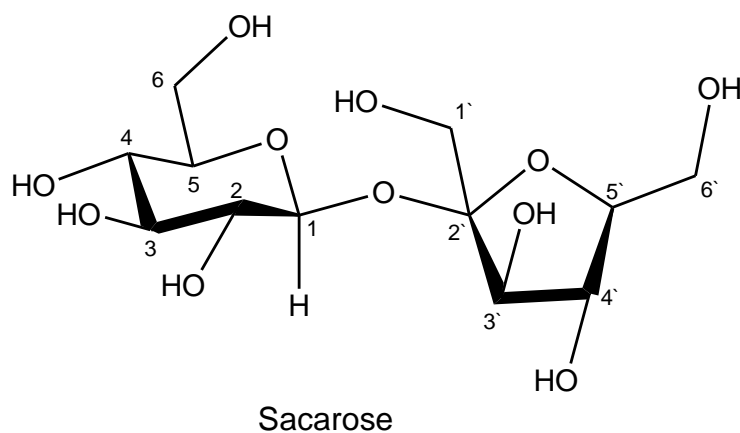
B)

Nº	FRUTOSE (MOCCELINI et al., 2009)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	3,93 - 3,78	64,8	4,22 - 3,77	64,77	3,96 - 3,78	64,72
2	-	99,0	-	98,48	-	98,45
3	3,73	68,5	3,73	68,2	3,73	68,16
4	3,65	70,6	3,62	70,72	3,68 - 3,62	70,66
5	3,91	70,1	3,79	70,33	3,96	70,31
6	3,54 - 3,79	64,2	3,42 - 3,79	64,77	3,53 - 3,79	64,1

Fonte: A autora.

Figura 13 - A) Estrutura química da sacarose.  
B) Valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A)



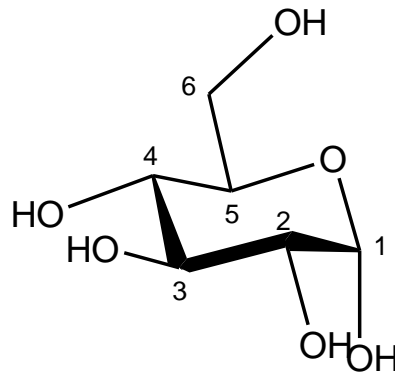
B)

Nº	SACAROSE (OLIVEIRA et al., 2007)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	5,16	91,7	4,88	92,6	5,14	92,1
2	3,18 e 5,03	71,6	3,10 e 4,88	71	3,21 e 5,13	72
3	3,46 e 4,74 - 4,80	72,8	3,42 e 4,25 - 4,87	72,79	3,42 e 4,23 - 4,86	72,75
4	3,12 e 4,74 - 4,80	69,8	3,10 e 4,25 - 4,87	69,63	3,13 e 4,23 - 4,86	69,6
5	3,62	72,8	3,62	72,79	3,62	72,75
6	3,4 - 3,56 e 4,40	60,5	3,4 - 3,61 e 4,25	61,64	3,4 - 3,53 e 4,23	60,89
7	-	104,3	-	104,57	-	104,38
8	3,88 e 4,49	77,1	3,79 e 4,25	77,16	3,83 e 4,23	77,04
9	3,78 e 5,18	74,3	3,77 e 4,88	73,51	3,78 e 5,14	74,66
10	3,56	82,5	3,61	82,29	3,53	82,20
11	3,53 - 3,60 e 4,37	62,5	3,42 - 3,61 e 4,25	63,37	3,53 - 3,62 e 4,23	62,49
12	3,40 e 4,74 - 4,80	62,1	3,40 e 4,87	61,64	3,40 e 4,23 - 4,86	62,49

Fonte: A autora.

Figura 14 - A) Estrutura química da manose.  
B) Valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A)



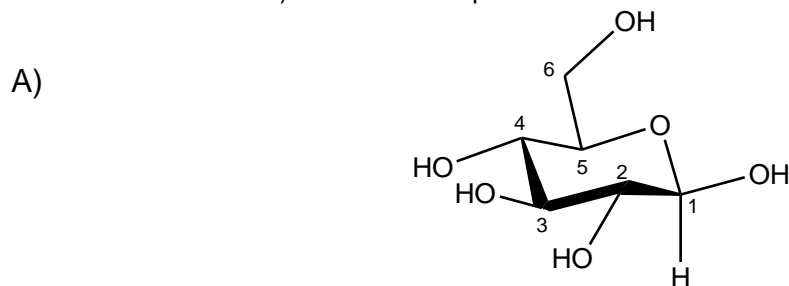
Manose

B)

	MANOSE (SMOUM, RUBINSTEIN, SREBNIK, 2003)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4,88	94,6	4,88	-	4,88	-
2	3,47	72,0	3,42	72,37	3,42	72,0
3	3,35	68,0	3,36	68,20	3,36	68,16
4	3,39	71,2	3,39	71,0	3,39	70,9
5	3,73	73,7	3,73	73,51	3,73	73,48
6	3,45 - 3,66	62,1	3,42 - 3,62	61,64	3,42 - 3,68	62,49

Fonte: A autora.

Figura 15 - A) Estrutura química da glicose.  
B) Valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



Glicose

B)

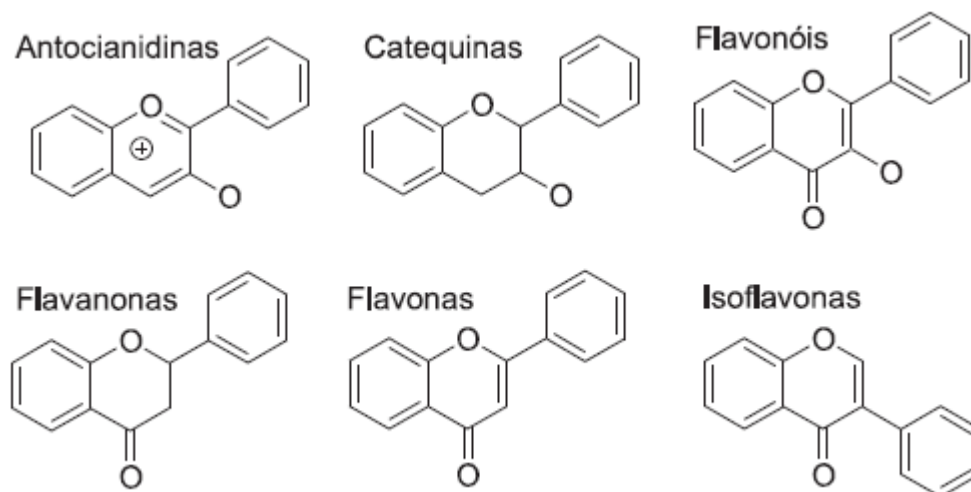
	$\alpha$ -D-GLICOSE (POMIN, 2012)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	5,32	91,4	-	92,65	5,14	92,15
2	3,63	71,8	3,62	71,0	3,62	72,0
3	3,83	72,4	3,79	72,37	3,83	72,3
4	3,92	71,2	3,79	71,0	3,96	70,92
5	3,5	69,8	3,42	69,63	3,53	69,6
6	3,91 - 3,82	60,3	4,22 - 3,79	61,64	3,96 - 3,83	60,89
	$\beta$ -D-GLICOSE (POMIN, 2012)		GRUMIXAMA		CAMBUCI	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4,74	95,9	4,87	97,3	4,86	97,23
2	3,37	74,1	3,37	73,51	3,37	74,66
3	3,60	75,8	3,61	75,74	3,62	75,67
4	3,92	71,2	3,79	71,0	3,96	70,92
5	3,5	69,8	3,42	69,63	3,53	69,6
6	3,91 - 3,82	60,3	4,22 - 3,79	61,64	3,96 - 3,83	60,89

Fonte: A autora.

Ainda que a análise do teor de flavonoides tenha constatado a presença de flavonoides nos extratos de grumixama e cambuci e, que o cromatograma da análise de CLAE tenha sugerido a presença dos flavonoides rutina e quercetina, não foi possível detectar a estrutura molecular de tais compostos pela análise de RMN, pois os valores dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de tais extratos não são sugestivos de compostos que contenham anéis aromáticos em sua estrutura. Isso pode ser devido ao fato dos flavonoides serem comumente encontrados na forma de glicoconjugados, estando ligados a carboidratos através dos grupos hidroxílicos (FIGURA 17), originando os O-glicosídeos ou ligados diretamente aos carbonos, formando os C-glicosídeos (SOUZA, 2008), sugerindo-se que a análise por RMN não tenha apresentado sensibilidade para detectar tais compostos conjugados, mas apenas a porção açúcar presente nos extratos, ressaltando que isso não ocorre na análise de CLAE, visto que de acordo com Março, Poppi e Scarminio (2008), os flavonoides podem ser separados por procedimentos cromatográficos e os compostos individuais podem ser identificados por comparação com padrões.

Os flavonoides são considerados produtos do metabolismo secundário e possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis, na configuração  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ , sendo divididos em classes de acordo com o estado de oxidação do anel central de pirano, compreendendo flavonas, flavonóis, flavonona, antocianinas, entre outros (FIGURA 16) (SOUZA, 2008; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

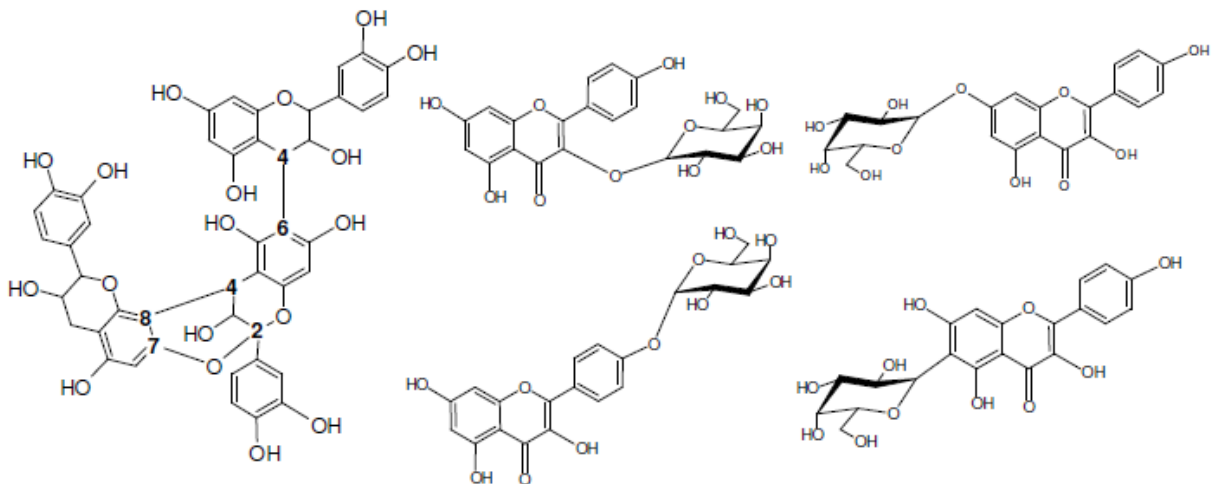
Figura 16 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.



Fonte: MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008.

Além disso, os flavonoides podem ser encontrados na forma livre, mas são frequentemente encontrados formando oligômeros entre si ou na forma conjugada. Glicosil-flavonoides podem ser encontrados como mono-, di-, tri- e tetra-glicosídeos. A figura 17 mostra a estrutura de flavonoides ligados entre si ou à carboidratos.

Figura 17 - Estrutura de flavonoides ligados entre si ou a carboidratos.



Fonte: Adaptado de SOUZA, 2008.

Dentre os diversos estudos que relatam as importantes atividades biológicas dos flavonoides, como por exemplo, anti-câncer e anti-inflamatórios, há algumas pesquisas que demonstram que a posição em que a porção glicosídica encontra-se ligada aos flavonoides pode estar diretamente relacionada a tais atividades, podendo atuar de formas diferentes, salientando que muitas vezes os glicosídeos apresentam melhor atividade quando comparados à forma livre. A posição da ligação glicosídica também está relacionada à biodisponibilidade dos flavonoides, alterando a sua absorção intestinal, visto que sua desglicosilação pelas células do intestino delgado e fígado pode alterar o tipo de atividade biológica esperada (SOUZA, 2008).

Segundo Cardona et al. (2013), os polifenóis de baixo peso molecular podem ser rapidamente absorvidos no intestino delgado, enquanto que os que possuem alto peso molecular atingem o cólon de maneira inalterada, estimando-se que apenas 5-10% do total de fenóis são absorvidos no intestino delgado, sendo o restante (90-95%) acumulado no lúmen intestinal, estando sujeito à atividade enzimática da

microbiota intestinal (FIGURA 18). Portanto, sugere-se que os flavonoides conjugados aos carboidratos dependem em grande parte da comunidade microbiana do intestino para serem degradados, originando moléculas de baixo peso molecular para serem mais facilmente absorvidas e, assim, desempenharem suas atividades biológicas.

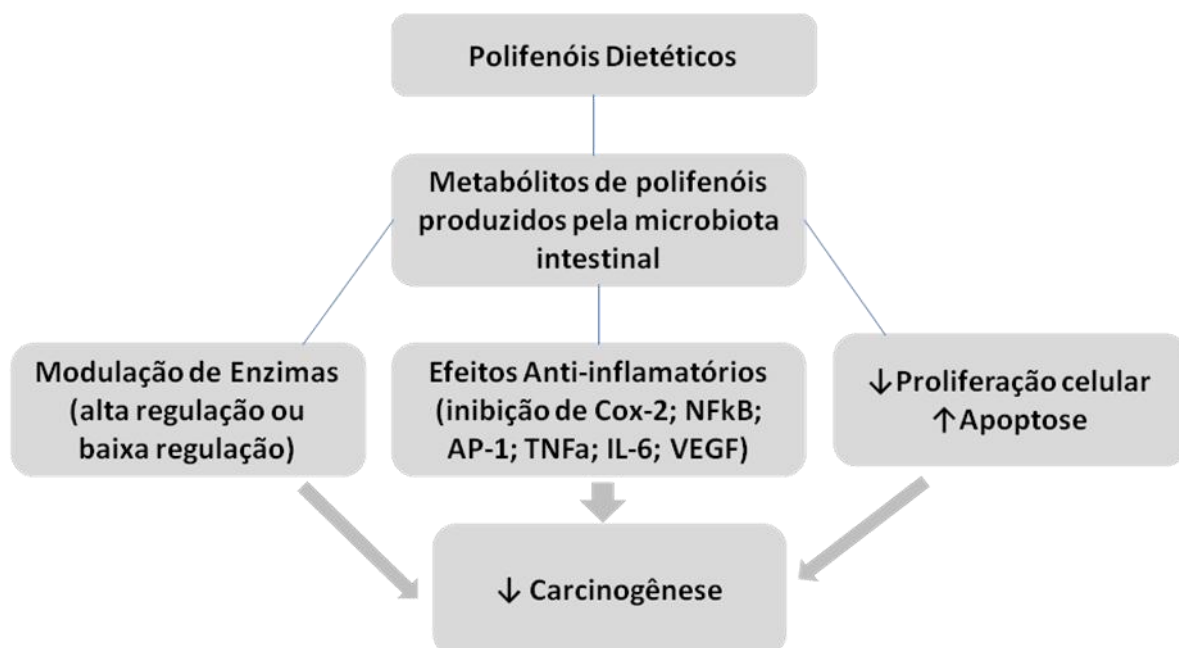
Figura 18 - Rota para polifenóis dietéticos e seu metabolismo em seres humanos.



Fonte: Adaptado de CARDONA et al., 2013.

Cardona et al. (2013) sugere ainda que diversos estudos relacionam o metabolismo microbiano dos polifenóis dietéticos à prevenção do câncer (FIGURA 19), o que confere propriedade benéficas aos alimentos que contenham tais compostos em sua composição.

Figura 19 - Possíveis mecanismos propostos para a prevenção do câncer pelo consumo de polifenóis.



Fonte: Adaptado de CARDONA et al., 2013.

Sendo assim, acredita-se que as frutas grumixama e cambuci possuam propriedades benéficas à saúde humana, por apresentarem compostos como fenóis, flavonoides e flavonoides conjugados à açúcares em sua composição, visto que, tais compostos são importantes na prevenção do risco de doenças causadas por estresse oxidativo, conferindo importância às frutas grumixama e cambuci como uma boa estratégia nutricional.

## 5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR POR MEIO DO TESTE PSC

Em virtude da metodologia do PSC ser uma melhoria dos ensaios químicos de atividade antioxidantes tradicionais, por mimetizar alguns dos processos celulares que ocorrem *in vivo*, a atividade antioxidante dos extratos das frutas grumixama e cambuci foi avaliada usando o método do PSC, levando em consideração a eficiência da proteção contra radicais peroxil. De acordo com esse método os resultados obtidos foram  $434,50 \pm 3,63$   $\mu\text{mol}$  de vitamina C equivalente/100 g para a

grumixama e  $249,54 \pm 2,56$   $\mu\text{mol}$  de vitamina C equivalente/100 g para o Cambuci (TABELA 3).

Tabela 3 - Atividade Antioxidante Celular, por meio do PSC, dos extratos de grumixama e cambuci.

Frutas	Valores de Hidro-PSC $\mu\text{mol}$ de vit C equivalente/100 g*
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	$434,50 \pm 3,63$
Cambuci ( <i>Campomanesia phaea</i> )	$249,54 \pm 2,56$

\* Médias das concentrações: 1 - 6,3  $\mu\text{g/mL}$

Fonte: A autora.

Adom e Liu (2005), encontraram altos valores de PSC em outras frutas, sendo elas, uva, com  $2108,9 \pm 148,8$   $\mu\text{mol}$  de vit C equivalente/100 g, cranberry, com  $1019,9 \pm 104,4$   $\mu\text{mol}$  de vit C equivalente/100 g e maçã, com  $309,2 \pm 3,63$   $\mu\text{mol}$  de vit C equivalente/100 g.

Outros estudos determinaram valores de PCS no murici e na guapeva, sendo eles  $490,63 \pm 86,36$  e  $579,14 \pm 109,36$   $\mu\text{mol}$  de vit C equivalente/100 g, respectivamente (MALTA; LIU; PASTORE, 2012).

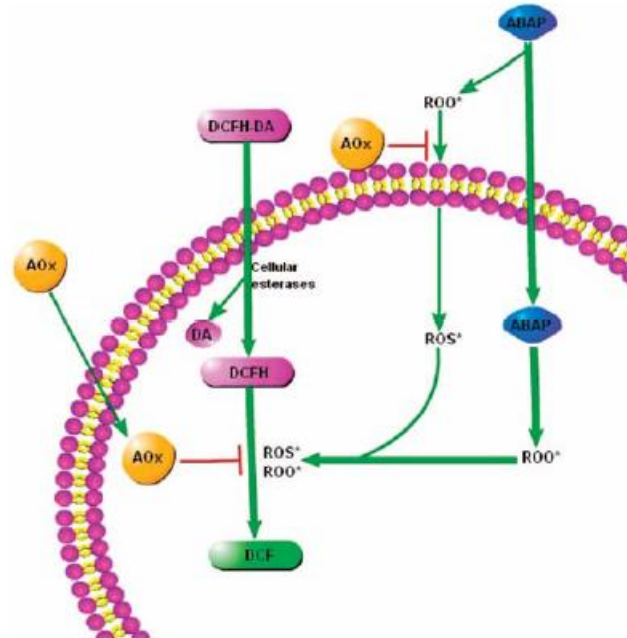
Shin et al. (2008) analisaram a atividade antioxidante do morango estocado em altas concentrações de  $\text{CO}_2$ , encontrando valores variando entre 585,8 e 799,1  $\mu\text{mol}$  de vit C equivalente/100 g.

## 5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR POR MEIO DO CAA

A metodologia do CAA emprega a capacidade dos produtos reativos da oxidação lipídica, os radicais peroxil, em induzir a formação de um indicador de estresse oxidativo fluorescente em cultura celular e mensura a prevenção da oxidação por agentes oxidantes. Em tal ensaio, a degradação do ABAP (2-amidinopropano) produz radicais peroxil, oxidando a diclorofluoresceína não fluorescente (DCFH) em diclorofluoresceína fluorescente (DCF), gerando uma

reação de fluorescência (WOLFE; LIU, 2007). A figura 20, de Wolf e Liu (2007) mostra o princípio da reação entre a diclorofluoresceína e ABAP dentro da célula.

Figura 20 - Reação entre diclorofluoresceína e ABAP dentro da célula.



Fonte: Adaptado de WOLFE e LIU, 2007.

Portanto o método de CAA considera a captação celular, distribuição e eficiência da proteção contra radicais peróxil sob condições fisiológicas, ressaltando-se a importância da utilização de uma metodologia mais relevante biologicamente na determinação da atividade antioxidante (WOLFE; LIU, 2007).

Desse modo, a atividade antioxidante celular da grumixama e do cambuci foi determinada utilizando-se o método do CAA. O  $EC_{50}$  e os valores de CAA estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade Antioxidante Celular, por meio do CAA, e EC<sub>50</sub> dos extratos de grumixama e cambuci.

Frutas	EC <sub>50</sub> µmol/mL <sup>a</sup>		CAA µmol QE/100g	
	sem lavagem com PBS	lavagem com PBS	sem lavagem com PBS	lavagem com PBS
Quercetina	7.01 ± 0.55	7.21 ± 0.89	-	-
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	1.85 ± 0.41	2.60 ± 0.52	100.79 ± 15.42 <sup>a</sup>	93.47 ± 15.25 <sup>a</sup>
Cambuci ( <i>Campomanesia phaea</i> )	1.45 ± 0.48	1.57 ± 0.35	26.76 ± 4.47 <sup>a</sup>	19.30 ± 4.07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>EC<sub>50</sub>: valores obtidos com os protocolos de lavagem com PBS e não lavagem com PBS não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p > 0,05).  
Fonte: A autora.

Foram utilizados protocolos de lavagem com o tampão PBS e não lavagem com o tampão PBS, pois, as diferenças entre ambos os protocolos fornecem alguns conhecimentos de como os antioxidantes interagem com as células, provendo informações no grau de captação e associação dos fitoquímicos pelas células, pois, de acordo com Wolfe e Liu (2007), quando se emprega a lavagem com PBS, os compostos presentes nos extratos das frutas devem ser absorvidos pela célula ou estarem intimamente ligados à membrana celular, visto que, com a lavagem com PBS, ocorre a remoção de compostos que estão vagamente associados com a membrana. Dessa maneira é possível verificar se houve incorporação da atividade antioxidante pela célula.

Sendo assim, após realização de ambos os protocolos, observou-se que os valores obtidos para EC<sub>50</sub> com ou sem lavagem com PBS não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p > 0,05).

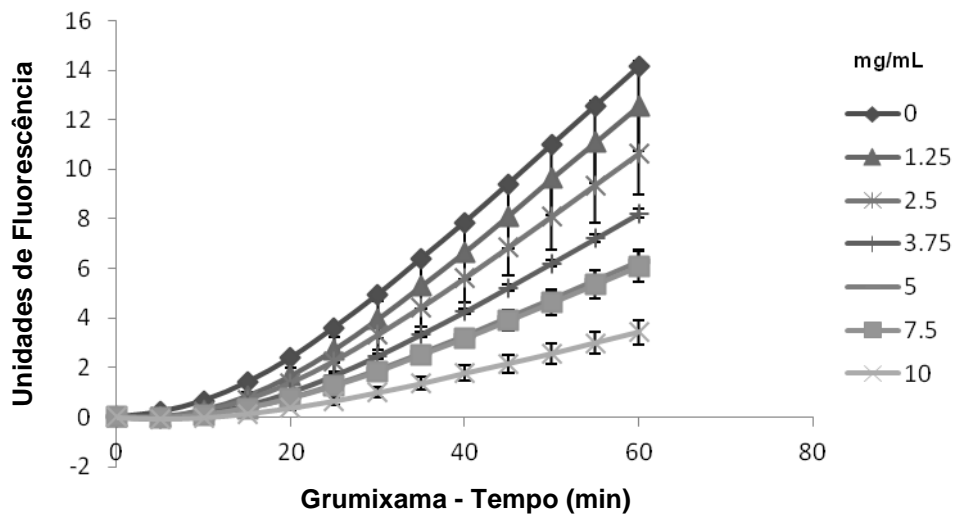
Nas Figuras 21 e 22 têm-se a atividade antioxidante celular dos extratos das frutas grumixama e cambuci.

As frutas mirtilo, cranberry, maçã, uva vermelha e uva verde foram estudadas por Wolfe e Liu (2007), apresentando os seguintes valores de EC<sub>50</sub>: 3,440 ± 0,239; 11,31 ± 0,29; 21,31 ± 3,34; 24,49 ± 1,73 e 62,89 ± 3,19 mg/mL para não lavagem

com PBS, e os valores  $10,81 \pm 0,44$ ;  $36,17 \pm 1,20$ ;  $38,60 \pm 3,26$ ;  $42,33 \pm 2,22$  e  $53,01 \pm 3,12$  mg/mL para lavagem com PBS, respectivamente.

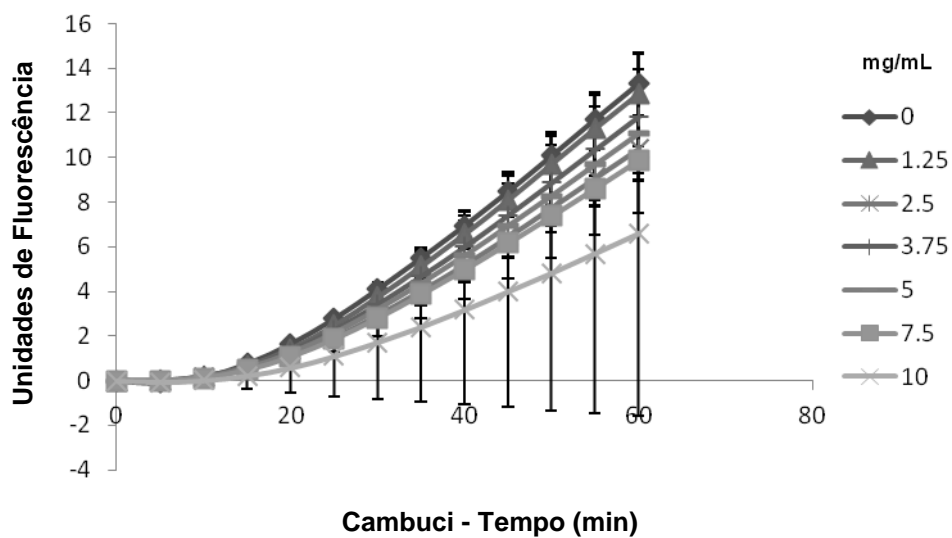
Outros estudos determinaram os valores de CAA, com o protocolo de lavagem com PBS, para as frutas murici e guapeva, sendo encontrados os valores de  $41,36 \pm 17,89$  e  $23,38 \pm 4,26$   $\mu\text{mol}$  de quercetina equivalente/100 g de frutas, respectivamente (MALTA; LIU; PASTORE, 2012).

Figura 21 - Atividade Antioxidante Celular do extrato de grumixama.



Fonte: A autora.

Figura 22 - Atividade Antioxidante Celular do extrato de cambuci.



Fonte: A autora.

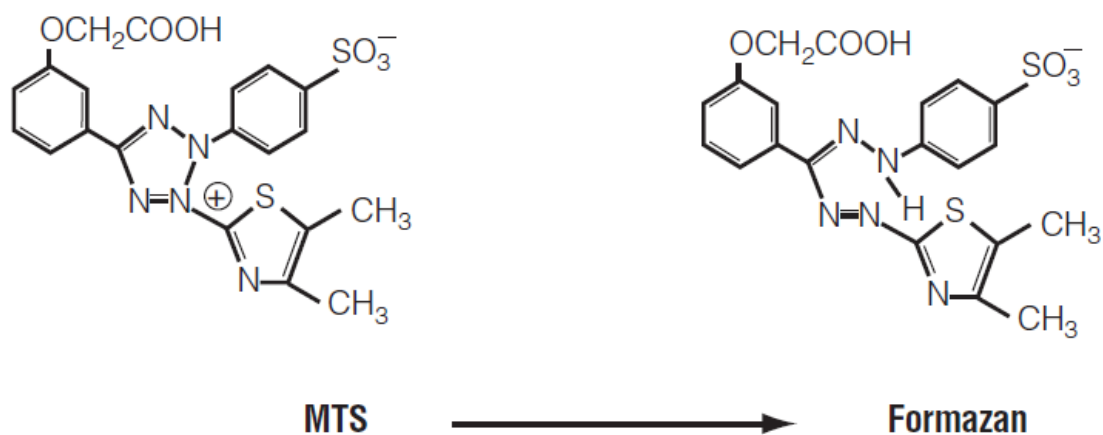
De acordo com Chu et al. (2002), espécies reativas de oxigênio tem sido associadas a doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e o câncer, além do envelhecimento precoce, visto que tais espécies apresentam a capacidade de causar danos oxidativos em biomoléculas como lipídeos, DNA e proteínas. Portanto, medir a atividade antioxidante dos alimentos é de grande valia, sendo que a metodologia utilizada no presente estudo mostra-se mais biologicamente representativa.

Pensando-se nos benefícios da ingestão de compostos antioxidantes cada vez mais se intensificam as pesquisas que determinam a atividade antioxidante dos alimentos e, como resultado, estudos demonstram que a ingestão de uma dieta rica em frutas e vegetais fornece uma ampla variedade de compostos antioxidantes capazes de diminuir os danos oxidativos em biomoléculas. Dentre tais compostos destacam-se os fitoquímicos, principalmente os compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, por serem capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio, prevenindo e/ou reduzindo o estresse oxidativo no corpo humano (WOLFE et al., 2008; CHU et al., 2002; LIU et al., 2002).

## 5.7 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Os extratos das frutas grumixama e cambuci foram avaliados quanto à sua atividade antiproliferativa contra células de carcinoma hepático humano (HepG2), carcinoma pulmonar humano (A549) e carcinoma mamário humano (MCF7). Inicialmente a viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico (MTS), um método baseado na conversão enzimática (desidrogenases) do sal tetrazolio em formazano (FIGURA 23), que é utilizado para avaliar atividade antiproliferativa (CORY et al., 1991).

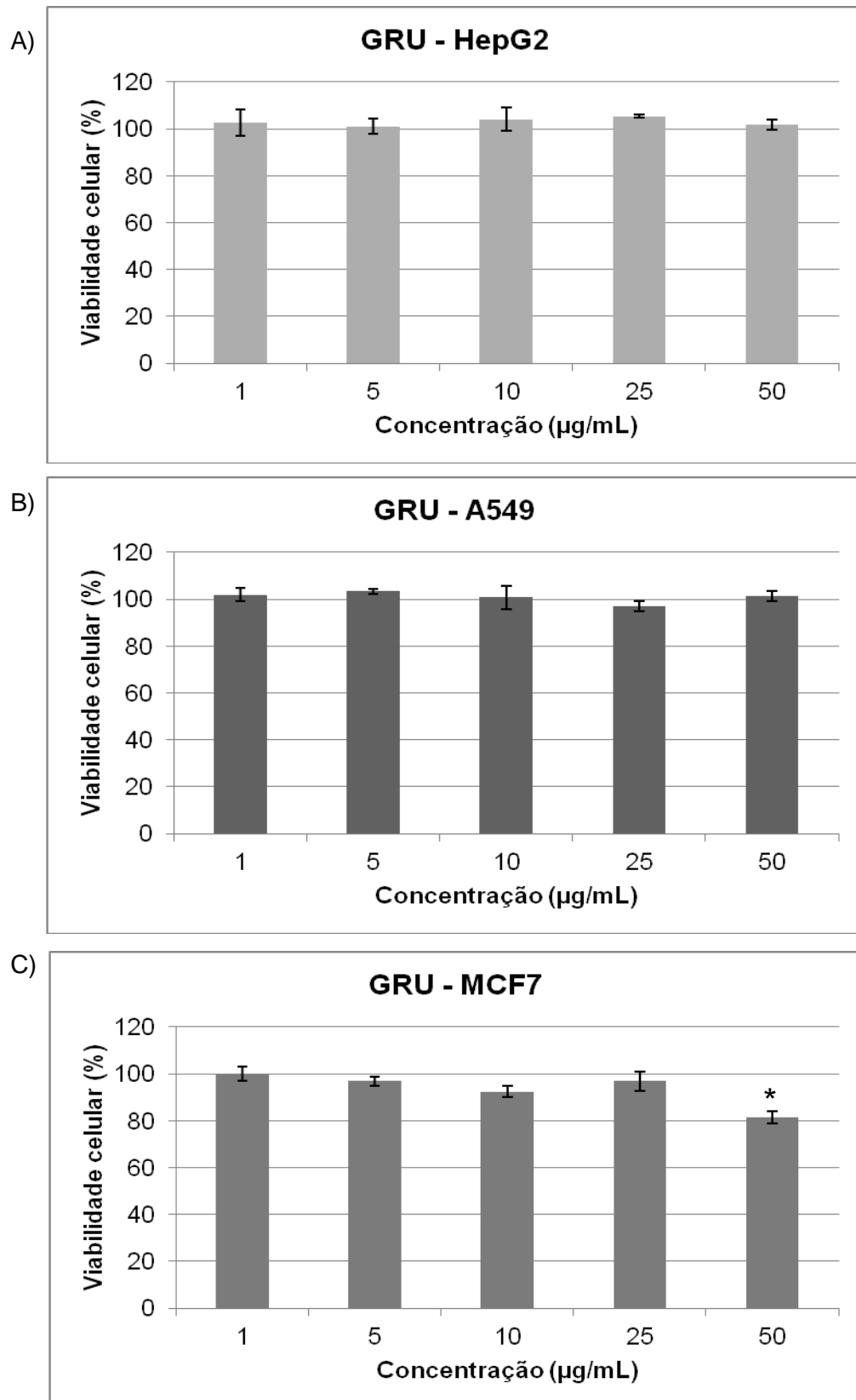
Figura 23 - Conversão do sal tetrazolio em formazano.



Fonte: PROMEGA, 2012.

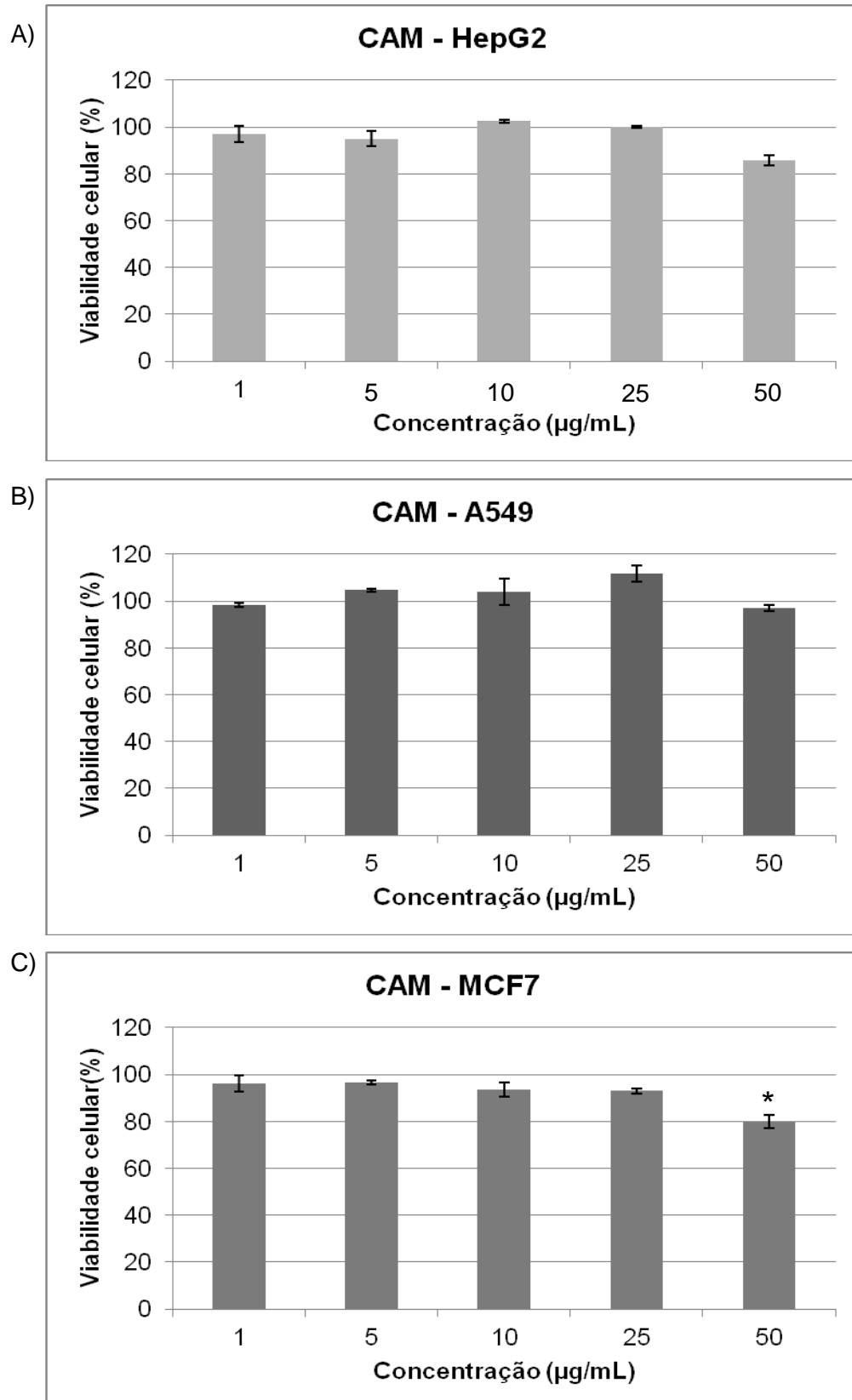
Os resultados mostraram que o tratamento com os extratos de ambas as frutas não afetou a viabilidade das linhagens HepG2 e A549 (Figuras 24 e 25) indicando que a grumixama e o cambuci não apresentam atividade antiproliferativa sobre essas linhagens, pelo menos, dentro da faixa das concentrações utilizadas no presente estudo. O mesmo não aconteceu em relação a linhagem MCF7, pois foi observado redução da viabilidade celular em cerca de 20% nas culturas de MCF7 tratadas com ambos os extratos na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Viabilidade celular de linhagens tratadas com extrato de grumixama.  
A) Carcinoma humano hepático (HepG2).  
B) Carcinoma humano pulmonar (A549).  
C) Carcinoma humano mamário (MCF7). \*  $p < 0,05$ .



Fonte: A autora.

Figura 25 - Viabilidade celular de linhagens tratadas com extrato de cambuci.  
A) Carcinoma humano hepático (HepG2).  
B) Carcinoma humano pulmonar (A549)  
C) Carcinoma humano mamário (MCF7). \*  $p < 0,05$ .



Fonte: A autora.

Medina et al. (2011) observou que a polpa fresca do araçá-morango, uma fruta pertencente à mesma família da grumixama e do cambuci, possui atividade antiproliferativa contra linhagens de carcinoma humano. As linhagens tratadas foram de carcinoma mamário (MCF7) e adenocarcinoma de cólon (Caco-2), nas concentrações de  $40 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e  $80 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , cuja atividade antiproliferativa foi concentração-dependente.

O extrato de pitanga roxa, outra fruta pertencente à mesma família (*Myrtaceae*) da grumixama e do Cambuci, apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de carcinoma hepático de camundongos (HSC), após 72 horas de tratamento (DENARDIN et al., 2013). O efeito foi concentração-dependente, tendo sido observado bloqueio do ciclo celular e apoptose em amostras tratadas com o extrato a  $50 \mu\text{g/mL}$  e  $100 \mu\text{g/mL}$ . Acredita-se que tal efeito possa estar relacionado com a presença de compostos fenólicos (DENARDIN et al., 2013).

Células humanas de adenocarcionama cervical (HeLa), hepatocarcinoma (HepG2), carcinoma gástrico (SNU-16), leucemia (U937) e fibroblastos de pulmão (CCD-25Lu) foram tratadas com extrato de folhas de goiaba na concentrações de  $25 \mu\text{g/mL}$ ,  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$  e  $200 \mu\text{g/mL}$ . As linhagens SNU-16 e HepG2 foram as mais sensíveis ao tratamento, tendo sido observada redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente (MOON et al., 2011). Porém, quando a goiaba foi estudada por Ampasavate, Okonogi e Anuchapreeda (2010) verificou-se que a mesma não apresentava atividade antiproliferativa contra linhagens humanas derivadas de leucemia. Os dados indicam que os efeitos das frutas sobre a proliferação podem ser dependentes não apenas da concentração e também do tipo celular.

A atividade antiproliferativa observada em frutos e folhas é, muitas vezes, decorrente da atividade sinérgica de substâncias bioativas. Muitos fitoquímicos como, por exemplo, os polifenóis, apresentam atividade antioxidante e pró-oxidante e podem ser utilizados como quimiopreventivos e quimioterápicos, respectivamente. A ação pró-oxidante pode ser um importante mecanismo na indução de apoptose de células cancerígenas, contribuindo com a destruição das mesmas de maneira seletiva. Além disso, de acordo com Khan et al. (2011), as células cancerosas apresentam elevados níveis de cobre e à mobilização endógena dos níveis de cobre pode ser determinante para atividade pró-oxidante.

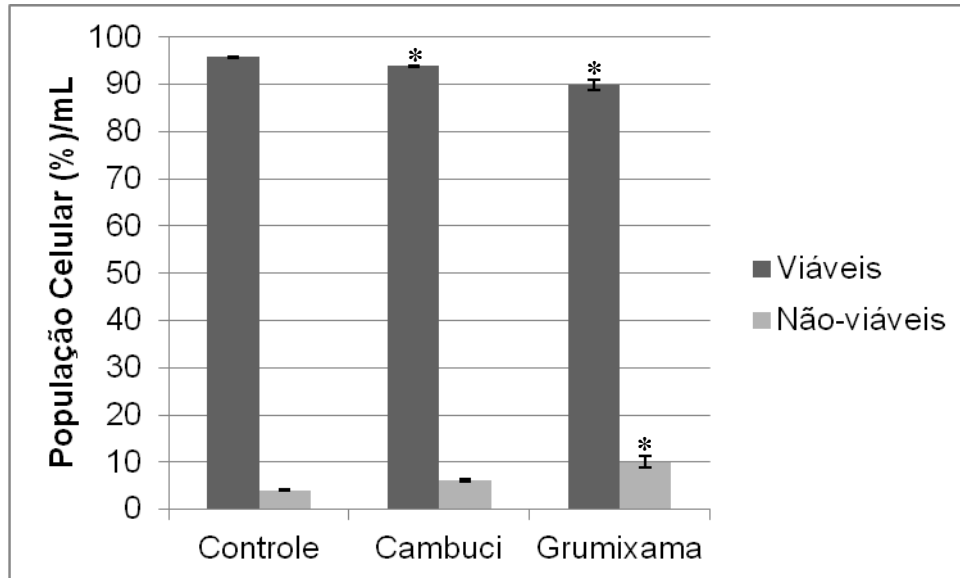
Considerando os resultados obtidos no nosso estudo, tanto a grumixama quanto o cambuci não apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens HepG2 e A549. Entretanto, ambas as frutas foram efetivas em reduzir a viabilidade de células MCF7, quando utilizadas na concentração de 50 µg/mL. Os dados mostram, portanto, que a atividade antiproliferativa das frutas estudadas sobre a linhagem MCF7 são concentração-dependente.

Com o objetivo de verificar se a atividade antiproliferativa da grumixama e do Cambuci está associada com indução de morte celular, novos testes de viabilidade foram realizados usando o ensaio de exclusão com Azul de Tripano. Essa abordagem metodológica permite determinar a população de células viáveis e não-viáveis, considerando que o Azul de Tripano é um corante vital que penetra apenas em células cuja integridade da membrana foi perdida (células mortas).

Os resultados mostraram que somente a grumixama foi efetiva em induzir morte celular, apresentando possível atividade citotóxica à linhagem MCF7 na concentração de 50 µg/mL. As culturas tratadas com grumixama apresentaram significativo aumento na população de células mortas em relação às culturas-controle (FIGURA 26). Embora o número de células mortas tenha aumentado nas culturas tratadas com Cambuci, a diferença observada não foi significativa (FIGURA 26). Os dados obtidos mostram, portanto, que a atividade antiproliferativa da grumixama está associada à indução de morte celular, enquanto que a atividade antiproliferativa do cambuci pode estar relacionada a inibição da proliferação celular, por não apresentar atividade citotóxica na concentração estudada.

Figura 26 - Porcentagem de células viáveis e não viáveis, tratadas com extratos de grumixama e cambuci na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e determinadas por exclusão com o azul de tripano.

\*  $p < 0,05$ .



Fonte: A autora.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados e após a análise dos mesmos, pode-se concluir que a grumixama apresentou alto conteúdo de fenólicos e o cambuci médio conteúdo de fenólicos, além de apresentarem flavonoides e açúcares em sua composição. Verificou-se também, que as frutas estudadas apresentam atividade antioxidante celular contra células humanas de câncer hepático (HepG2) e atividade antiproliferativa contra células humanas de câncer mamário (MCF7).

Dessa maneira, atribui-se grande importância às frutas grumixama e cambuci, uma vez que a presença de compostos fenólicos, flavonoides, açúcares além da atividade antioxidante celular e antiproliferativa, confere propriedades benéficas aos frutos, pois os mesmos podem possuir compostos com a capacidade de sequestrar radicais livres, diminuindo e/ou inibindo o dano oxidativo em biomoléculas, o que faz acreditar que o consumo do suco das frutas estudadas pode ajudar a prevenir a incidência de doenças causadas por estresse oxidativo, sendo uma boa estratégia nutricional.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and others antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 2, 2012.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Aug. 2002.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 2005.
- AKTER, M. S. et al. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Journal Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1728-1732, Aug. 2011.
- AMPASAVATE, C.; OKONOGI, S.; ANUCHAPREEDA, S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 013-021, Jan. 2010.
- ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; FERREIRA, S. A. N. Caracterização física e química dos frutos do araçá-pera (*Psidium acutangulum*). **Acta Amazonica**, v.23, p. 213-217, 1993.
- AVELLA, D. M. G.; GARCIA, C. A. O.; CISNEROS, A. M. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In: **Simposio de Metrología**. 2008. Centro Nacional de Metrologia, Santiago de Querétaro, México. Oct. 2008.
- AZZI, A.; DAVIES, K. F. Free radical biology – terminology and critical thinking. **FEBES Letters**, v. 558, p. 3-6. 2004.
- BAGETTI, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2009.

BARTLOME, A. et al. SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. **Biosensors & Bioelectronics**, 2006.

BERNARDES, N. R. et al. Atividade antioxidante e fenóis totais de frutas de Campos dos Goytacazes RJ, **Perspectivas Online**, v. 1, n. 1, 2011.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, Sep. 2011.

BRASIL. Conservação Internacional do Brasil. **Amazônia**. Brasília, DF, 2013a. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/onde/amazonia/>>. Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Conservação Internacional do Brasil. **Hotspots**. Brasília, DF, 2013b. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/como/index.php?id=8>>. Acesso em: 25 out. 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – **IBAMA**. Brasília, DF, 2013c. Disponível em: <[siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas](http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas)>. Acesso em: 25 out. 2013.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer – **INCA**. Brasília, DF, 2013d. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 26 nov. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Amazônia**. Brasília, DF, 2013e. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/amazonia>>. Acesso em: 24 out. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília, DF, 2013f. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 25 out. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biomas**. Brasília, DF, 2013g. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/biomas>>. Acesso em: 25 out. 2013 às 15h30min.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mata Atlântica**. Brasília, DF, 2013h. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 25 out. 2013.

BREDA, C. A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CORREIA, C. A. C. Shelf life of powdered *Campomanesia adamantium* pulp in controlled environments. **Journal Food Chemistry**, v. 135, p. 2960-2964, 2012.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415-1422, May. 2013.

CASAPRO. **Brasil**. 2013. Disponível em: <[pro.casa.abril.com.br/group/produtorescoleccionadoresdebromliaseorquideas/forum/topics/grumixama-eugenia-brasiliensis?xg\\_source=activity](http://pro.casa.abril.com.br/group/produtorescoleccionadoresdebromliaseorquideas/forum/topics/grumixama-eugenia-brasiliensis?xg_source=activity)>. Acesso em: 26 out. 2013.

CHEN, H. Y.; YEN, G. C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemistry**, Feb. 2006.

CHOUDHARY, M. I. et al. New inhibitors of ROS generation and T - cell proliferation from *Myrtus communis*. **Organic Letters**, v. 15, n. 8, 2013.

CHU, YI-FANG et al. antioxidant and antiproliferative of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oct. 2002.

COLLA, A. R. S. et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (*Myrtaceae*) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Aug. 2012.

COLE, R. A.; HARBER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Science Direct**, 2007.

COLECIONANDO FRUTAS. **Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.coleccionandofrutas.org/eugeniabrasili.htm>>. Acesso em: 26 out. 2013.

COLECIONANDO FRUTAS. **Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.coleccionandofrutas.org/campomanesiaphaea.htm>>. Acesso em: 26 out. 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

CORREIA, R. T. P. et al. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruits residues. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 539-547, Nov. 2011.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, v. 3, n. 7, p. 207-212, July, 1991.

DENARDIN, C. C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell Biochemistry and Function**, Jan. 2013.

DEVKAR, R. V.; PANDYA, A. V.; SHAH, N. H. Protective role of *Brassica oleracea* and *Eugenia jambolana* extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in H9C2 cells. **Journal of Food & Function**, v. 3, Apr. 2012.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, 1999.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007.

ELIAS, B. C. **Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck**. 2003. 190f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2003.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, 2009.

FATHILAH, A. R. et al. Antiproliferative activity of aqueous extract of *Piper betle* L. and *Psidium guajava* L. on KB and HeLa cell lines. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, June, 2010.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 100-108, Oct. 2012.

FERREIRA D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n. 3, 2010.

FLORES, G. et al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, Feb. 2012.

FONSECA, T. A. O. **Análise conformacional e estudo de interações intramoleculares em derivados do flavonol**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012.

FRANCO, M. R.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some brazilian fruits: umbu-cajá (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1263-1265, 2000.

GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, 2008.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial Frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666-4674, Mar. 2010.

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

HAMM, J. H. G. et al. Estudo fitoquímico em frutos da família *Myrtaceae*. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica, XI Encontro de Pós-Graduação, I Mostra Científica**. 2009. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ. Museu Nacional. **Horto Botânico**. 2012. Disponível em: <<http://www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico/eugeniabrasiliensis.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

INOUE, T. et al. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**, v. 52, p. 127-132, July, 2008.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-599, 1999.

JIRATANAN, T.; LIU, R. H. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Mar. 2004.

KHAN, H. Y. et al. Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: implications for a cancer preventive mechanism. **Biometals**, v. 24, p. 1169-1178, June, 2011.

KALIORA, A.; DEDOUSSIS, G.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 1-17, 2006.

KAWASAKI, M. L.; LANDRUM, L. R. Nots on economic plants. A rare and potentially economic fruit of Brazil: Cambuci, *Campomanesia phaea* (*Myrtaceae*). **Economic Botany**, Instituto de Botânica de São Paulo, 1997.

KUSKOSKI, E. M. et al. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, July, 2003.

LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Feb. 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: bioactive compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 593-603, July, 2012.

LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Journal of Food Research International**, July, 2012.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. **Projeto PNUD BRA/97/G31**, Unicamp, Campinas, nov. 2000.

LIU, M. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926-2930, Apr. 2002.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **JN the Journal of Nutrition**, American Society for Nutritional Sciences, 2004.

LIU, R. H.; SUN, J. Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Feb. 2003.

MADALOSSO, R. C. et al. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 6, maio, 2012.

MALTA, L. G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Journal Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 417-425, Aug. 2013.

MALTA, L. G. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604-61, 2012.

MALTA, L. G.; LIU, R. H.; PASTORE, G. M. Antiproliferative and antioxidant (in vitro and Cellular) activities of exotic Brazilian fruits. In: **16th IUFoST World Congress of Food Science and Technology**. 2012.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, abr. 2008.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Journal Food Chemistry**, v. 128, p. 916-922, Apr. 2011.

MEYERS, K. J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, Oct. 2003.

MIMICA-DUKIÉ, N. et al. Essential oil of *Myrtus Communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. **Journal of Molecules**, Apr. 2010.

MOCCELINI, S. K. et al. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. Ex Willd (Rutaceae). **Revista Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 131-133, jan. 2009.

MONTOSO GARDENS. **Brasil**. 2013. Disponível em: <[http://www.montosogardens.com/eugenia\\_brasiliensis.htm](http://www.montosogardens.com/eugenia_brasiliensis.htm)>. Acesso em: 26 out. 2013.

MOON, J. Y. et al. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Journal Food Chemistry**, v. 125, p. 369-375, 2011.

NANTITANON, W.; YOTSAWIMONWAT, S.; OKONOGLI, S. Factors influencing antioxidant activity and total phenolic content of guava leaf extract. **Journal LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1095-1103, Feb. 2010.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Journal of Food Research International**, v. 50, p. 70-76, Oct. 2013.

NUENGCHAMNOG, N.; INGKANINAN, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family *Myrtaceae* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. **Journal LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 297-302, Apr. 2008.

OLIVEIRA, D. F. et al. Atividade de carboidratos purificados a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Gold. **Revista Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 202-209, ago. 2007.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Journal Food Research International**, v. 48, p. 170-179, Mar. 2012.

PANTELIDS, G. E. et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, 2007.

PASCOAL, A. C. R. F. Prospecção de antioxidantes e de substâncias com atividade antiproliferativa em *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the *Myrtaceae* Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, Mar. 2012.

PERES, M. B.; VERCILLO, U. E.; DIAS, B. F. S. Avaliação do estado de conservação da fauna Brasileira e a lista de espécies ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Revista Científica de Biodiversidade Brasileira**, n. 1, 2011.

PIETROVSKI, E. F. et al. Tropical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (*Myrtaceae*) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Jan. 2008.

POMIN, V. H. Unravelling glycobiology by NMR spectroscopy. **Intech**, p.63-98, 2012.

PROMEGA. Technical buletin. CellTiter 96® AQueous non-radioactive cell proliferation assay INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G5421, G5430, G5440, G1111 AND G1112. USA, 2012.

REVISTA GLOBO RURAL. **Brasil**. 2013. Disponível em: <[revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1649492-4529,00.html](http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1649492-4529,00.html)>. Acesso em: 26 out. 2013.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible *Myrtaceae* fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, Jan. 2008.

ROCHA, G. **Determinação do teor de biodiesel no petrodiesel através da RMN em baixo campo, aliada a calibração multivariada**. 2013. 114f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2013.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SACOMAN, J. L. et al. Cytotoxicity and antitumoral active of dichloromethane extract and its fractions from pothomorphe umbellate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 411-415, 2008.

SACRAMENTO, C.K.; BARRETO, W.S.; FARIA, J.C. Araçá-boi: uma alternativa para agroindústria. **Bahia Agrícola**, v. 8, n. 2, 2008.

SHIN, Y. et al. Fruit quality, antioxidant contents and activity, and antiproliferative activity of strawberry fruit stored in elevated CO<sub>2</sub> atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 73, 2008.

SILVA, H. P. et al. Biodiversity conservation and human well-being: challenges for the populations and protected areas of the Brazilian Atlantic Forest. **Journal EcoHealth**, v. 2, n. 4, p. 333-342, Oct. 2005.

SILVA, I. G. et al. Estudo de caracterização do fruto cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] e sua aplicação no processamento de geleia. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 83-90, jan./jun. 2012.

SILVA, T. C. et al. Northeastern Brazilian student's representations of Atlantic Forest fragments. **Environ Development and Sustainability**, v. 12, n. 2, p. 195-211, Mar. 2009.

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

SIQUEIRA, E. M. A. et al. Brazilian Savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PloS ONE**, v. 8, n. 8, Aug. 2013.

SMOUM, R.; RUBINSTEIN, A.; SREBNIK, M. Combined <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>11</sup>B NMR and mass spectral assignments of boronate complexes of D-(+)-glucose, D-(+)-mannose, mannopyranoside. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 1015-1020, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002.

SOARES, T. S. **Estudos fitoquímicos e biológicos de *Melaleuca alternifolia***. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2006.

SONG, W. et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6621-6629, 2010.

SOUZA, L. M. **Aplicação da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 182f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica e Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR, Curitiba, 2008.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, M. D. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200-208, 2007.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, Nov. 2002.

TABARELLI, M. et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, June, 2005.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

THORNHILL, A. H. et al. Are pollen fossils useful for calibrating relaxed molecular clock dating of phylogenies? A comparative study using Myrtaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2011.

TOMEI, R. R.; SILVA, N. S.; SALVADOR, M. J. Estresse oxidativo: metodologias atuais para avaliação da atividade antioxidante. **Revista UniVap**, v. 14, n. 25, p. 26-31, jul. 2007.

VALLILO, M. I. et al. Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 241-244, ago. 2005.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

VAYALIL, P. K. Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. *Arecaceae*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Mar. 2012.

VIEIRA, P. M. et al. Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (*Myrtaceae*) in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 6, 2012.

VUOTTO, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 197-301, June, 2000.

ZECHINI, A. A. et al. Produção, Comercialização e identificação de variedade de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. **Revista Científica de Biodiversidade Brasileira**. ago. 2012.

ZOGHBI, M. G. B. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (*Myrtaceae*) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, 2011.

YANG, J. et al. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6787-6793, 2004.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*): A review. **Journal Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 923-926, Jan. 2010.

WOLFE, K. et al. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418-8426, 2008.

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

WOLFE, K.; LIU, R H. Structure-activity relationships of flavonoids em the cellular antioxidant activity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8804-8411, 2008.

WU, X. et al. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 407-422, 2004.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026-4030, May. 2004.