

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

BRUNO ALEXANDRE DA SILVA

**Caracterização físico-química e capacidade antioxidante dos frutos do cutite
Pouteria macrophylla [(Lam.) Eyma]**

Belém
2011

BRUNO ALEXANDRE DA SILVA

**Caracterização físico-química e capacidade antioxidante dos frutos do cutite
Pouteria macrophylla [(Lam.) Eyma]**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos como requisito avaliativo para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. José Guilherme S. Maia.

Belém
2011

BRUNO ALEXANDRE DA SILVA

**Caracterização físico-química e capacidade antioxidante dos frutos do cutite
Pouteria macrophylla [(Lam.) Eyma].**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos como requisito avaliativo para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data: 23/08/2011
Conceito: Aprovado

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jose Guilherme S. Maia
(ITEC/FEQ – Orientador)

Prof^a. Dr^a. Eloisa Helena A. Andrade
(ICEN/FQ – Membro)

Prof. Dr. Lênio José G. de Faria
(ITEC/FEQ – Membro)

Prof. Dr. Jesus Nazareno S. de Souza
(ITEC/FEA – Suplente)

A minha família por toda compreensão, carinho e paciência para comigo durante essa jornada longa, sinuosa e cheia de obstáculos, agora já superada. Sem vocês eu não seria ninguém.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. José Guilherme Maia, pela confiança, apoio, paciência e parceria, a qual eu espero que continue alcançando bons resultados.

Ao professor Dr. Friedhelm Marx, do Instituto de Nutrição e Ciência de Alimentos da Universidade de Bonn, Alemanha, pela hospitalidade com que me recebeu em sua equipe de pesquisa, tornando mais proveitoso e gratificante o período em que estive desenvolvendo meu trabalho no instituto.

Ao Dr. André Gordon, em nome de quem agradeço a todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Instituto de Nutrição e Ciência de Alimentos da Universidade de Bonn, Alemanha, por tudo o que me ensinaram e pelas valiosas contribuições técnicas e científicas no desenvolvimento deste trabalho. Danke schön!

Aos professores da banca examinadora: Dr^a. Eloisa Helena A. Andrade, Dr. Lênio José G. de Faria, por suas contribuições que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

A Dr^a. Joyce Kelly do Rosário da Silva, em nome de quem agradeço a todos os técnicos e alunos do LEPRON, pelo apoio técnico e pela agradável convivência no ambiente de trabalho.

Aos meus colegas de jornada por todos os momentos que compartilhamos desde o primeiro dia de aula no mestrado, pelas horas de estudo, horas de lazer, horas de almoço, risos e lágrimas. Cada um de vocês tem uma importância especial para mim. Obrigado!

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para realização deste trabalho.

A Deus, por conceder mais esta realização em minha vida.

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

Albert Einstein

RESUMO

Um grande número de espécies vegetais de uso alimentar e com potencial econômico na região amazônica, ainda é pouco investigado quanto à atividade biológica de seus constituintes químicos, particularmente no combate ao estresse oxidativo celular, que ultimamente vem despertando o interesse da comunidade científica. O fruto de *Pouteria macrophylla*, conhecido popularmente como cutite e utilizado neste estudo, apresentou em média 4,0 cm de diâmetro, 37,0 g de peso, polpa com rendimento de 76% e intensa cor amarela. A caracterização físico-química mostrou que o fruto possui 64% em massa de água e valores de nitrogênio total, extrato etéreo e resíduo mineral fixo abaixo de 2%. O teor de fenólicos totais foi de $866,97 \pm 8,4$ mg GAE/100 g em relação a matéria fresca e $2288,73 \pm 22,18$ mg GAE/100 g em relação à matéria seca, enquanto a capacidade de seqüestro do radical DPPH mostrou valores de $EC_{50} = 299,97 \pm 3,93$ g/g DPPH para a matéria fresca e $EC_{50} = 113,63 \pm 1,49$ g/g DPPH para a matéria seca. A capacidade antioxidante do cutite também foi avaliada pelo método Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC), partindo do extrato aquoso da polpa liofilizada, em reações com o radical peroxila e a espécie não radicalar peroxinitrito. Para o valor TOSC de 50% foram observadas as concentrações 0,56 mg/mL e 0,83 mg/mL do extrato, nas reações com peroxila e peroxinitrito respectivamente. O ácido gálico, identificado por CLAE-DAD-IES-EM, é o principal contribuinte à capacidade antioxidante do extrato aquoso do cutite, seguido do digaloilglicose, seu derivado glicosilado. A quantificação do ácido gálico por CLAE-DAD apresentou um valor de 4,7 mg/g de polpa fresca do fruto. Por CG-EM foi verificada a presença de 51 constituintes voláteis no aroma do cutite, com predominância de benzaldeído, butanoato de butila, linalol, hexanoato de butila, hexanol, caprilato de butila e acetato de butila.

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, ácido gálico, capacidade antioxidante, TOSC.

ABSTRACT

A large number of plant species used as food and showing economic potential in the Amazon Region is still poorly investigated about the bioactivity of its chemical constituents, particularly against cellular oxidative stress, that recently has aroused the interest of the scientific community. The fruits of *Pouteria macrophylla*, popularly known as cutite and used in this study presented an average diameter of 4.0 cm, weight of 37.0 g, yield pulp of 76.0% and a intense yellow color. The physicochemical characterization showed fruits with 64.0% of water mass and total nitrogen, ether extract and ash values below 2.0%. The total phenolic content was 866.97 ± 8.4 mg GAE/100 g in the fresh fruit and 2288.73 ± 22.18 mg GAE/100 g in the dry mater, while the ability of DPPH radical scavenging showed EC_{50} values of 299.97 ± 3.93 g/g DPPH for the fresh fruit and 113.63 ± 1.49 g/g DPPH of dry mater. The antioxidant capacity of cutite was also evaluated by Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) assay, based on the lyophilized aqueous extract of its pulp, in reactions with the peroxy radical and the reactive nitrogen species peroxytrite, To the TOSC values of 50% were obtained extract concentrations of 0.56 mg/mL and 0.83 mg/mL in reactions with peroxy and peroxytrite, respectively. The gallic acid, identified by HPLC-DAD-ESI-MS, is the major contributor for the antioxidant capacity of the aqueous extract of cutite, followed by digalloylglycose, its glycosilated derivative. The quantification of gallic acid by HPLC-DAD showed a value of 4.72 mg/g of fresh pulp of the fruit. By CG-MS analysis was verified the presence of 51 volatile constituents in the cutite aroma, with predominance of benzaldehyde, butyl butanoate, linalool, butyl hexanoate, hexanol, butyl caprylate and butyl acetate.

Key words: *Pouteria macrophylla*, cutite, gallic acid, antioxidant capacity, TOSC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Frutos de cutite.	25
Figura 02:	Análise cromatográfica no método TOSC.	26
Figura 03:	Tipos de respostas no método TOSC.	27
Figura 04:	Curva dose-resposta do extrato aquoso do fruto de cutite (C) frente ao peroxinitrito (Pn) e o radical peroxila (Px). Comparação com os resultados encontrados por Lichtenthaler, R. (2004) para o açáí (A).	52
Figura 05:	Cromatograma do extrato aquoso dos frutos de cutite. Delimitação das frações e dos sinais majoritários A e B.	53
Figura 06:	Comparação entre as cinéticas da reação de inibição da produção de etileno (AC) no método TOSC para o controle H ₂ O (C), extrato bruto de cutite (E) e frações FA e FB.	54
Figura 07:	Comparação entre os íon-cromatogramas do extrato do cutite e da solução padrão de ácido gálico 0,05 mg/mL. a) Constituinte m/z 169,71 [M-H] ⁻ e tempo de retenção de 10,13 min. b) Padrão do ácido gálico m/z 169,36 [M-H] ⁻ e tempo de retenção de 10,26 min.	55
Figura 08:	Comparação entre os cromatogramas e espectros do extrato dos frutos de cutite (1) e da solução padrão de ácido gálico (2).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Dados de entrada para análise de TOSC no Software TableCurve.	27
Tabela 02:	Avaliação de peso do fruto do cutite.	36
Tabela 03:	Avaliação das medidas do fruto do cutite.	37
Tabela 04:	Avaliação das medidas da semente do cutite.	37
Tabela 05:	Rendimento das partes do fruto do cutite.	37
Tabela 06:	Comparativo entre dados experimentais e dados relatados na literatura.	37
Tabela 07:	Avaliação de cor da polpa do fruto do cutite.	38
Tabela 08:	Caracterização físico-química dos frutos do cutite.	39
Tabela 09:	Resultados de fenólicos totais, DPPH, Vitamina C e umidade de frutos amazônicos.	52
Tabela 10:	Valores TOSC de 20%, 50% e 80% para o extrato do cutite e solução de Trolox.	53
Tabela 11:	Quantificação do ácido gálico no extrato aquoso dos frutos do cutite.	56
Tabela 12:	Constituintes do aroma dos frutos de cutite.	67
Tabela 13:	Constituintes mais abundantes no aroma de cutite.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Área sob a curva da reação da amostra.
AC	Área sob a curva da reação controle.
CG	Cromatografia em fase gasosa.
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência.
C _v	Coefficiente de variação.
DAD	Detector de arranjo de diodos.
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil.
EM	Espectrometria de massa.
ERN	Espécie reativa de nitrogênio.
ERO	Espécie reativa de oxigênio.
FID	Ionização por chama.
FRAP	Poder antioxidante de redução do íon férrico.
IES	Ionização por eletro spray.
IR	Índice de refração.
KMBA	Ácido α -ceto- γ -metiolbutírico.
MF	Matéria fresca.
Mim	Minutos.
MS	Matéria seca.
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio.
p/p	Concentração peso por peso.
p/v	Concentração peso por volume.
Rpm	Rotações por minuto.
SD	Desvio padrão.
Seg	Segundos.
SNC	Sistema Nervoso Central.
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox.
TOSC	Total oxidant scavenging capacity.
TR	Tempo de retenção
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter.
UV-VIS	Ultravioleta-Visível.
v/v	Concentração volume por volume.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
OBJETIVOS.....	17
CAPÍTULO 1: Síntese bibliográfica sobre <i>Pouteria macrophylla</i> , o método TOSC, e a relevância de compostos fenólicos e aromas para a saúde.	18
RESUMO	19
ABSTRACT.....	20
1.1. INTRODUÇÃO.....	21
1.2. Compostos fenólicos, aroma e saúde.	21
1.3. <i>Pouteria macrophylla</i> (Lam.) Eyma.	24
1.4. O método Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC).....	25
1.5. CONSIDERAÇÕES.....	28
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2: Biometria e composição centesimal do cutite.	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	34
2.2. Materiais e métodos.....	34
2.2.1. Amostra de cutite.....	34
2.2.2. Biometria dos frutos.....	35
2.2.3. Análise de cor.....	35
2.2.4. Composição centesimal.....	36
2.3. Resultados e discussão.	36
2.3.1. Biometria.	36
2.3.2. Análise de cor.....	38
2.3.3. Composição centesimal.....	38
2.4. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 3: Determinação da capacidade antioxidante do cutite (<i>Pouteria macrophylla</i>) e identificação e quantificação do seu constituinte principal.....	41
RESUMO	42
ABSTRACT.....	43
3.1. INTRODUÇÃO.....	44
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.	45
3.2.1. Reagentes.....	45

3.2.2. Material vegetal.....	45
3.2.3. Extratos.....	46
3.2.4. Determinação do conteúdo de fenólicos totais.	47
3.2.5. Capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.	47
3.2.6. Perfil cromatográfico e fracionamento do extrato por CLAE-DAD.....	47
3.2.7. Capacidade antioxidante pelo método TOSC.	48
3.2.8. Análises qualitativas por CLAE-DAD-IES-EM ⁿ	49
3.2.9. Análises quantitativas por CLAE-DAD.....	49
3.2.10. Análise estatística.....	50
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	50
3.3.1. Determinação do teor de fenólicos totais.....	50
3.3.2. Capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.	51
3.3.3. Capacidade antioxidante do extrato de cutite e suas frações pelo método TOSC. .	52
3.3.4. Análises qualitativas por CLAE-DAD-IES-EM.....	54
3.3.5. Análises quantitativas por CLAE-DAD.....	55
3.4. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 4: Caracterização do aroma do cutite.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
4.1. INTRODUÇÃO.....	64
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.2.1. Material vegetal.....	65
4.2.2. Extração do aroma de cutite.....	65
4.2.3. Análise do aroma de cutite por CG-EM	65
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.3.1. Constituintes do aroma dos frutos de <i>P. macrophylla</i>	66
4.4. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	70
CONCLUSÕES GERAIS	72
APÊNDICES.....	74
Apêndice A: Dados do experimento de biometria e caracterização físico-química dos frutos de cutite.....	75
Apêndice B: Dados do experimento para determinação do conteúdo de fenólicos totais.	79
Apêndice C: Dados do experimento de determinação da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.....	81

Apêndice D: Dados da determinação da capacidade antioxidante pelo método TOSC.	85
Apêndice E: Dados do experimento de identificação do ácido gálico no extrato dos frutos de cutite.	93
Apêndice F: Dados do experimento de quantificação do ácido gálico no extrato dos frutos de cutite.	96
Apêndice G: Dados do experimento de caracterização do aroma do fruto de cutite.	101

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse da comunidade científica sobre as propriedades nutricionais, tecnológicas e a bioatividade de frutos amazônicos vem crescendo nos últimos anos, no entanto, grande parte das publicações científicas nessa área aborda apenas frutos com elevado potencial comercial, negligenciando um grande número de frutos considerados exóticos ou subutilizados, mas que são popularmente conhecidos e apreciados na Amazônia. Neste sentido, esta dissertação traz um estudo sobre o fruto de *Pouteria macrophylla*, popularmente conhecido como cutite, no intuito de fornecer informações que auxiliem em futuros estudos nutricionais, tecnológicos e de atividade biológica do fruto.

O primeiro capítulo traz uma abordagem geral sobre compostos fenólicos e compostos voláteis presentes em frutos e sua relação com a saúde humana, em seguida, apresenta informações sobre o fruto de *Pouteria macrophylla* e por fim, trata acerca dos fundamentos teóricos e metodológicos do método Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC).

O segundo capítulo trata sobre a análise biométrica dos frutos do cutite, a determinação instrumental da cor da polpa fresca utilizando o sistema CIELab e a caracterização físico-química do fruto.

O terceiro capítulo discorre sobre a determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do cutite pelo método de Folin-Ciocalteu, a avaliação da atividade antioxidante total pelo método do seqüestro do radical DPPH, a avaliação da capacidade antioxidante específica frente às espécies reativas peroxila e peroxinitrito pelo método TOSC, a identificação por CLAE-DAD-IES-EMⁿ do constituinte químico responsável pela maior contribuição na capacidade antioxidante e sua quantificação por CLAE-DAD.

O quarto e último capítulo, apresenta a caracterização do aroma do fruto fresco do cutite no estágio imaturo e do fruto maduro nos estados fresco e liofilizado, utilizando o método de extração-destilação de aroma de Likens e Nickerson e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Espera-se que os resultados dos estudos apresentados nesta dissertação possam contribuir cientificamente e incentivar novos estudos acerca do cutite, de frutos do gênero *Pouteria* e de outros frutos amazônicos considerados exóticos ou subutilizados. Em busca de novas fontes de alimentação saudável, de compostos de

interesse tecnológico e de compostos bioativos, com a finalidade de proporcionar melhor aproveitamento dos frutos amazônicos e contribuir para o desenvolvimento sustentável da região.

OBJETIVOS.

O objetivo principal deste estudo foi promover a caracterização físico-química dos frutos de *Pouteria macrophylla*, determinar a capacidade antioxidante e quantificar o seu constituinte principal.

E como objetivos específicos:

- 1) Determinar a caracterização física e físico-química dos frutos de *P. macrophylla*.
- 2) Determinar a capacidade antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada do fruto de *P. macrophylla* frente ao radical peroxila e a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito, usando o método TOSC.
- 3) Identificar por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, os principais constituintes químicos responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada do fruto de *P. macrophylla*.
- 4) Quantificar por CLAE-DAD o principal constituinte químico responsável pela capacidade antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada do fruto de *P. macrophylla*.
- 5) Determinar o teor de fenólicos totais do extrato aquoso da polpa liofilizada do fruto de *P. macrophylla* pela reação de Folin & Ciocalteu.
- 6) Determinar a atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada do fruto de *P. macrophylla* frente ao radical DPPH.
- 7) Caracterizar a composição química do aroma dos frutos de *P. macrophylla*.

CAPÍTULO 1: Síntese bibliográfica sobre *Pouteria macrophylla*, o método TOSC, e a relevância de compostos fenólicos e aromas para a saúde.

RESUMO

Durante o desenvolvimento e maturação das frutas, são produzidos metabólitos secundários relacionados com o seu valor nutricional e atividade biológica, entre eles, estão os compostos voláteis e os compostos fenólicos. O aroma típico de frutas pode ser resultado da combinação de inúmeros compostos voláteis ou devido à presença de poucos deles chamados de "compostos de impacto", que geram a "impressão digital do sabor" e auxiliam o homem no reconhecimento de alimentos apropriados, evitando escolhas alimentares pobres ou perigosas. Compostos fenólicos são os mais importantes antioxidantes encontrados em frutas e vegetais, compõem uma grande classe de compostos aos quais têm sido atribuídos vários efeitos biológicos benéficos ao ser humano. Algumas espécies do gênero *Pouteria* produzem frutos bastante apreciados, dentre elas estão a *P. caimito* (abiu), *P. sapota* (sapoti), *P. macrocarpa* (cutite grande) e *P. macrophylla* (cutite). O fruto de *P. macrophylla* é uma baga arredondada com sementes ovóides de cor marrom escura, envoltas em uma polpa amarela de consistência farinácea, sabor agradável e aroma característico. A literatura reporta a presença de polifenóis na constituição química de frutos de algumas espécies do gênero *Pouteria* e a atividade antioxidante de seus sucos. O método Total Oxidant Scavenging Capacity foi proposto por Regoli & Winston (1998) como sendo uma nova metodologia para avaliar a resistência biológica de organismos marinhos ao estresse oxidativo e é baseado no rendimento do etileno proveniente da reação entre uma espécie reativa oxidante e o substrato oxidável KMBA. A amostra que não contém antioxidantes recebe valor de TOSC igual a 0%, a amostra que contém antioxidantes que suprimem completamente a formação de etileno apresenta valor de TOSC igual a 100% e a amostra que apresenta valores de TOSC negativos é caracterizada como pró-oxidante. O grupo de trabalho do Dr. Friedhelm Marx, do Instituto de Nutrição e Ciência de Alimentos da Universidade de Bonn, Alemanha, aperfeiçoou o método TOSC e o aplicou na análise da capacidade antioxidante de alimentos.

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, polifenóis, aroma, TOSC.

ABSTRACT

During fruit development and maturation are produced secondary metabolites related to nutritional value and biological activity, including volatile and phenolic compounds. The typical fruit aroma may be result of a combination of several volatile compounds or due to presence of a few of them called "impact compounds" that generate the "fingerprint of taste" and help the human in recognition of appropriate foods, avoid poor or dangerous food choices. Phenolic compounds are the most important antioxidants found in fruits and vegetables, compose a large class of compounds which have been attributed various beneficial biologic effects to humans. Some species of *Pouteria* genus produce fruits highly valued, including *P. caimito* (abiu), *P. sapota* (sapoti), *P. macrocarpa* (cutite grande) and *P. macrophylla* (cutite). *P. macrophylla* fruit is a round berry with dark brown ovoid seeds, wrapped in a yellow flesh with farinaceous consistency, good flavor and peculiar aroma. The literature reports the presence of polyphenols in chemical composition of fruits from some *Pouteria* species and antioxidant activity of its juices. The Total Oxidant Scavenging Capacity method was proposed by Regoli and Winston (1998) as a new methodology to evaluate the biologic resistance of marine organisms to oxidative stress and is based on yield of ethylene from reaction between a reactive oxidant species and the oxidizable substrate KMBA. The sample that doesn't contains antioxidants receives TOSC value 0%, the sample containing antioxidants that completely suppresses the ethylene formation present TOSC value 100% and the sample that show negative TOSC values is characterized as pro-oxidant. The working group of Dr Friedhelm Marx, Institute of Nutrition and Food Science at the University of Bonn, Germany, made the optimization this method and applied it to determinate the antioxidant capacity in foods.

Key words: *Pouteria macrophylla*, cutite, poliphenols, aroma, TOSC.

1.1. INTRODUÇÃO

Este capítulo traz uma síntese bibliográfica de publicações científicas relevantes para a compreensão do leitor acerca do estudo desenvolvido nos capítulos subsequentes, seu conteúdo faz uma abordagem geral dos compostos fenólicos e compostos voláteis presentes em frutos e sua relação com a saúde humana. Em seguida, apresenta informações taxonômicas, morfológicas e fitoquímicas do fruto de *Pouteria macrophylla*, conhecido como cutite, selecionado como objeto deste estudo e, por fim, trata de modo breve acerca dos fundamentos teóricos e metodológicos do método Total Oxidant Scavenging Capacity conhecido com TOSC, uma técnica de determinação da capacidade antioxidante, robusta, precisa e versátil, que ainda não vem sendo utilizada nas pesquisas científicas da área de alimentos do Brasil. Vale ressaltar que o objetivo deste trabalho não foi esgotar as informações contidas neste capítulo, mas somente proporcionar ao leitor dados complementares para condução de seus estudos.

1.2. Compostos fenólicos, aroma e saúde.

Durante o desenvolvimento e maturação dos frutos, inúmeros metabólitos secundários são produzidos e alguns deles, além de desempenhar papel fisiológico no vegetal, têm também importante correlação com o valor nutricional na saúde humana, entre os quais se destacam os compostos voláteis e fenólicos.

O aroma de um alimento é constituído de compostos orgânicos de baixa peso molecular e que pertencem a diversas classes químicas diferentes, como hidrocarbonetos, álcoois, éteres-óxidos, aldeídos, cetonas, aminas, ésteres e amidas heterocíclicas, geralmente estando presentes nos alimentos em baixas concentrações (DRUAUX et al. 1998).

O aroma típico de frutos pode ser resultado da combinação de inúmeros compostos voláteis de diferentes classes químicas e em concentrações abaixo de 30 partes por milhão, ou devido à presença de alguns poucos compostos chamados de “compostos de impacto”, os quais, mesmo em concentrações da ordem de partes por bilhão, são responsáveis pela característica completa do aroma. Diversos estudos sobre a composição de voláteis de frutos tropicais estão sendo conduzidos para a identificação, quantificação e elucidação das possíveis contribuições destes voláteis para o aroma, no entanto, isto ainda representa um grande desafio aos pesquisadores devido à complexidade destas misturas, o custo e ao grande número

de frutos ainda não caracterizados (YOUNG; PATTERSON, 1990; WINTERHALTER, 1991).

Muitos compostos voláteis são produzidos em tecidos vegetais em fases específicas de desenvolvimento, por exemplo, durante a floração, amadurecimento ou maturação. Embora um único fruto ou vegetal sintetize várias centenas de compostos voláteis, apenas um pequeno conjunto gera a "impressão digital do sabor" que ajuda os animais e os seres humanos a reconhecerem alimentos apropriados e evitar escolhas alimentares pobres ou nocivas à saúde. Além disso, estudos de preferências ou aversões de sabor sugerem que a percepção de sabor pode estar ligada ao valor nutricional ou a atividade biológica, ambos associados aos alimentos (GOFF; KLEE, 2006).

O aumento do consumo de frutos pode estar associado à correlação entre a baixa incidência de doenças degenerativas e o alto nível de ingestão diário de frutos de algumas populações. Vários efeitos biológicos benéficos ao ser humano têm sido atribuídos à presença de compostos bioativos como carotenóides, vitamina C e compostos fenólicos, entre estes efeitos ressalta-se a atividade antioxidante (FESKANICH et al. 2000; MICHELS et al. 2000).

Compostos fenólicos são os mais importantes antioxidantes encontrados em frutos e vegetais, compõe uma grande classe de compostos que podem ter características lipofílicas ou hidrofílicas. Sua fórmula molecular contém pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas e sua atividade depende de características estruturais das moléculas como número de anéis aromáticos, tipo e posição de grupos substituintes. Os monofenóis são menos eficientes que os polifenóis, mas no caso do ácido gálico o efeito indutivo dos três grupos hidroxila é um importante fator que aumenta a atividade. Outro fator que aumenta sensivelmente o poder antioxidante dos monofenóis é a substituição de hidrogênios por grupos metoxila (SANCHEZ-MORENO, et al. 1998).

O grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxilas na molécula dos compostos fenólicos estão entre os mais importantes fatores que determinam sua atividade antioxidante. A solubilidade e os efeitos estéricos de cada molécula podem ser afetados pelo tipo de estrutura do substituinte, como no caso dos derivados glicosilados, que podem aumentar ou diminuir a atividade antioxidante (RICE-EVANS et al. 1996).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Dependendo do grau de hidrogenação e da substituição no heterociclo, os flavonóides diferenciam-se em flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Encontram-se geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos. Os não flavonóides são compostos benzóicos e cinâmicos, conhecidos como ácidos fenólicos, que contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e outros diferentes grupos funcionais como aldeídos, alcoóis ou ácidos, que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares. Estilbenos, lignanas e, de forma polimerizada, os taninos e ligninas são outros compostos de natureza fenólica. Algumas propriedades sensoriais dos vegetais como a cor, a adstringência e o aroma são influenciadas por compostos fenólicos (KARAKAYA, 2004; MANACH et al. 2004).

De modo geral os compostos fenólicos são antioxidantes versáteis, apresentando variados mecanismos de ação como combate aos radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, quelação com metais de transição como o Fe^{2+} e o Cu^{+} , interrupção da reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificação do potencial redox do meio, entre outros. Atuam como reparadores da lesão nas moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI; EBELER, 2008).

Como os compostos fenólicos atuam por mecanismos variados, dependendo da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento, pode ocorrer sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos (PEDRIELLI; SKIBSTED, 2002; HASSIMOTTO et al. 2005).

Pesquisas reportam a ação de compostos fenólicos contra alergias, inflamações, hepatotoxinas, vírus, tumores, no aumento da resistência dos vasos sanguíneos, no bloqueio de enzimas que produzem estrógeno e na modificação das rotas metabólicas das prostaglandinas (MILES et al. 2005; PUKASKAS et al. 2005; VALKO et al. 2006).

1.3. *Pouteria macrophylla* (Lam.) Eyma.

Esta espécie enquadra-se taxonomicamente no Reino Plantae, divisão Magnoliopsida, classe Magnoliopsida, subclasse Dillenidae, ordem Ebenales e Família Sapotaceae e é conhecida também pelos nomes botânicos *Richardella macrophylla* (Lam.) Pierre, *Lacuna rivicoa* Gaertn., *Vitellaria rivicoa* (Gaertn.) Pierre e pelos nomes populares cutite e cutito (FELIPPI, 2006; CAVALCANTE, 1988).

A família Sapotaceae tem distribuição mundial com maior incidência em regiões tropicais e subtropicais principalmente na Ásia e América do Sul. Esta família apresenta mais de 50 gêneros e mais de 1000 espécies. Muitos gêneros da família Sapotaceae produzem frutos comestíveis entre eles estão *Chrysophyllum*, *Manilkara*, *Mimusops* e *Pouteria*. (SILVEIRA et al. 2008; MA et al. 2004).

Estudos de caracterização fitoquímica de algumas espécies de Sapotaceae demonstram a presença de alcalóides, flavonóides, terpenóides, benzenóides e fenilpropanóides na constituição química destas espécies e outros estudos atribuem a espécies do gênero *Pouteria* diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral, analgésica, antipirética, anticonvulsivante, depressora do SNC, antiespasmódica e anti-hiperglicêmica (SILVEIRA et al. 2008; CONSERVA et al. 2006).

No gênero *Pouteria*, algumas espécies produzem frutos popularmente conhecidos e bastante apreciados, dentre estes estão *P. caimito* (abiu), *P. sapota* (sapoti), *P. macrocarpa* (cutite grande) e *P. macrophylla* (cutite) (SILVA, 2007).

Pouteria macrophylla é uma árvore mediana apresentando em média 20 m de altura, tronco reto com até 50 cm de diâmetro, sua casca quando cortada libera látex, apresenta uma copa densa com ramos mais novos ascendentes, tem folhas alternas cartáceas ovaladas ou oblanceoladas com 10-18 cm de comprimento, 5-9 cm de largura (30 por 10 cm em indivíduos jovens); inflorescências em fascículos de 3-10 flores nascidas entre as folhas ou nos ramos onde as folhas já caíram; cálice de 4-5 sépalas oblongo-ovais, pilosas externamente; corola esverdeada com 4-6 pétalas, estames opostos as mesmas; ovário globoso com 5 lóculos uniovulados.

Algumas formas selvagens do cutite têm sido encontradas na bacia amazônica sendo, portanto, muito provável que daí tenham se originado as formas cultivadas desde o nordeste brasileiro até a Guatemala (CAVALCANTE, 1988).

O fruto de *P. macrophylla* é uma baga arredondada apresentando em média 6 cm de diâmetro, sementes ovóides de cor marrom escura, envoltas em uma

polpa amarela de consistência farinácea com aspecto semelhante ao da gema de ovo cozido, tem sabor agradável e cheiro bem característico. Em geral o cutitizeiro frutifica em abundância e é comum que os galhos mais fracos não resistam ao peso dos frutos e caiam. O período de safra compreende os meses de outubro até fevereiro (CAVALCANTE, 1988).



Figura 01: Frutos de cutite.

A literatura relata a presença de polifenóis na constituição química de frutos de algumas espécies do gênero *Pouteria* e a atividade antioxidante de seus sucos (SILVEIRA et al. 2008; MA et al. 2004).

1.4. O método Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC).

O método Total Oxidant Scavenging Capacity foi originalmente proposto por Regoli & Winston na década de 90 como sendo uma nova metodologia para avaliar a resistência biológica de organismos marinhos como *Mytilus sp* ao estresse oxidativo causado por poluição ambiental. Extratos de frações celulares de *Mytilus sp* submetidos a ambientes poluídos eram testados contra as espécies reativas peroxila, hidroxila e peroxinitrito e a capacidade antioxidante destas frações, quantificada por cromatografia em fase gasosa. Esta técnica fornecia importantes informações sobre os mecanismos bioquímicos de resistência ao estresse oxidativo desses organismos que são utilizados como bioindicadores no monitoramento da qualidade ambiental (REGOLI et al. 1998).

O método TOSC é baseado no rendimento do etileno proveniente da reação entre uma espécie reativa oxidante e o substrato oxidável KMBA. A cinética de formação do etileno durante o ensaio é monitorado por repetidas análise por cromatografia em fase gasosa de alíquotas de headspace do meio raecional, como

ilustra a figura 02. São coletadas alíquotas nos tempos de reação 0, 12, 24, 36, 48 e 60 minutos para cada diluição da amostra em análise (LICHTENTHÄLER, 2004).

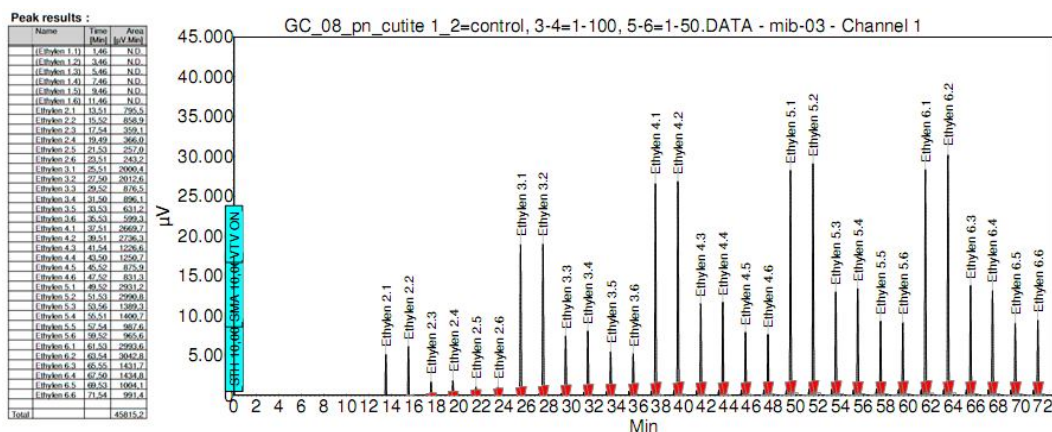


Figura 02: Análise cromatográfica no método TSOC.

No método TOSC um antioxidante é caracterizado por sua capacidade de inibir a formação de etileno por uma espécie reativa oxidante, tomando por referência uma reação controle onde não ocorre a inibição da formação de etileno devido à ausência de antioxidantes no meio reacional. Os valores de TOSC são quantificados por comparação entre a área sob a curva da reação controle (AC) e a área sob a curva da reação que contém a amostra (AA) de acordo com a equação 01 (LICHTENTHÄLER, 2004).

$$\text{TOSC \%} = 100\% - \left[\frac{\int \text{AA}}{\int \text{AC}} \times 100\% \right] \quad (01)$$

A amostra que não contém constituintes químicos antioxidantes recebe valor de TOSC igual a zero%, pois apresenta a área sob a curva igual a da reação controle. A amostra que suprime completamente a formação de etileno apresenta área sob a curva igual a zero e valor de TOSC igual a 100%. A amostra que apresenta área sob a curva maior que a da reação controle é caracterizada como pró-oxidante e apresenta valores de TOSC negativos (LICHTENTHÄLER et al. 2003).

No método TOSC são necessárias pelo menos cinco diluições de uma amostra para a conclusão de um experimento, sendo que uma das diluições deve apresentar valor de TOSC inferior a 20% e outra valor superior a 80% como no exemplo ilustrado na tabela 01, pois, na expressão dos resultados no método TOSC, dados com valores de TOSC entre 20% e 80% apresentam a melhor correlação concentração-resposta (LICHTENTHÄLER et al. 2003).

Tabala 01: Dados de entrada para análise de TOSC no Software TableCurve.

Ponto	Fator de diluição		TOSC %
	X	Y	
6	0,04	98	
5	0,01	72	
4	0,004	36	
3	0,002	21	
2	0,001	14	
1	0	0	

O método TOSC apresenta algumas características bastante interessantes como: (1) possibilidade de se avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra contra radicais com importante potencial lesivo para tecidos biológicos; (2) sensibilidade para pequenas concentrações na faixa de μM ; (3) amostras contendo substâncias puras ou matrizes complexas podem ser analisadas; (4) aplica-se tanto para antioxidantes hidrossolúveis como para lipossolúveis; (5) permite a distinção entre os antioxidantes de ação rápida, os de ação lenta e os de ação rápida e efeito retardante; (6) substâncias pró-oxidantes também são detectadas pelo método (LICHTENTHÄLER et al. 2003).

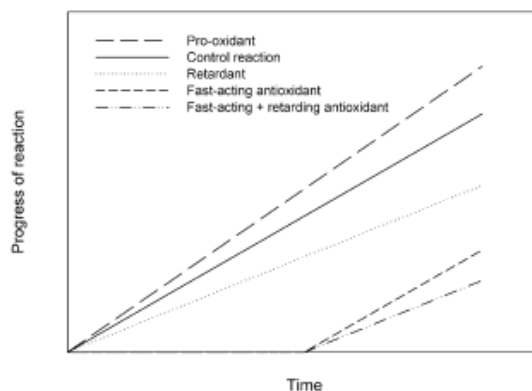


Figura 03: Tipos de resposta no método TOSC.

A partir da década de 2000 o grupo de trabalho do Dr. Friedhelm Marx, do Instituto de Nutrição e Ciência de Alimentos da Universidade de Bonn, Alemanha, aperfeiçoou o método com o uso de sistema de injeção automatizado e dos softwares de análise de dados Root v3.02/07 e TableCurve 2D v5.1, aplicando o método TOSC na análise da capacidade antioxidante de alimentos (LICHTENTHÄLER et al. 2003).

1.5. CONSIDERAÇÕES

A literatura científica sobre a caracterização morfométrica, nutricional e fitoquímica de frutos amazônicos ainda é escassa e se restringe a frutos com grande potencial comercial, por isso, se faz necessário maior empenho científico, não somente na caracterização completa de frutos amazônicos exóticos ou subutilizados, como também na investigação de bioatividade relacionada aos constituintes químicos neles presentes. Neste sentido, o uso de métodos mais sensíveis, robustos e específicos é de suma importância para que se possam fazer aproximações teóricas relevantes entre os resultados obtidos nos testes *in vitro* com o comportamento e ação dos compostos bioativos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- CAVALCANTE P.B.: **Frutas Comestíveis da Amazônia**, 4^a ed. Coleção Adolpho Drucke, 279 p, Belém, 1988.
- CONSERVA L. M. et. al.: **Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 16 (Sulp.), p. 611 – 617, 2006.
- DRUAUX, C.; LE THANH, M.; SEUVRE, A. M.; VOILLEY, A.: **Application of Headspace Analysis to the Study of Aroma Compounds–Lipids Interactions**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 75, no. 2, p. 127-130, 1998.
- FELIPPI M.: **Morfologia da flor, do fruto e da plântula; Ontôgenese e germinação da semente de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- FESKANICH, D.; ZIEGLER, R. G.; MICHAUD, D. S.; GIOVANNUCCI, E. L.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A.: **Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women**. Journal of the National Cancer Institute, v. 92, p. 1812 – 1823, 2000.
- GOFF, S. A.; KLEE, H. J.: **Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value?** SCIENCE, v. 311, p. 815-819, 2006.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M.: **Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

KARAKAYA, S.: **Bioavailability of phenolic compounds.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.44, n.6, p.453-464, 2004.

KYNGMI, M, S.; EBELER, E.: **Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 96-104, 2008.

LICHTENTHÄLER R.: **Optimisation of the Total Oxidant Scavenging Capacity Assay and Application on Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Pulps and Seeds.** Tese de Doutorado, UniBonn, Bonn, Alemanha, 2004.

LICHTENTHÄLER R.; MARX F.; KIND O. M.: **Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay.** European Food Research and Technology., 216 (2): 166-173, 2003.

MA, J. et. al.: **Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three *Pouteria* Species by Selected Ion Monitoring Liquid Chromatography – Mass Spectrometry.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, p. 5873 – 5878, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.: **Polyphenols: food sources and bioavailability.** American Journal of Clinical Nutrition, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MICHELS, K. B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K. J.; ROSNER, B. A.; STAMPFER, M. J.; FUCHS, C. S.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.: **Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers.** Journal of the National Cancer Institute, v. 92, p.1740 - 1752, 2000.

MILES, E. A.; ZOOUBOULI, P.; CALDER, P. C.; PHIL, D.: **Diferential antiinflammatory affects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures.** Nutrition, v. 21, p. 389-394, 2005.

PEDRIELLI, P.; SKIBSTED, L. H.: **Antioxidant synergy and regeneration affect of quercetin, (-) epicatequin of α -tocoferol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 7138-7144, 2002.

PODSEDEK, A.: **Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 40, p.1-11, 2007.

PUKASKAS, A.; VAN BEEK, T. A.; DE WAARD, P.: **Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE_NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts.** Journal of Chromatography, v. 1074, p. 81-88, 2005.

REGOLI F. et. al.: **Total oxyradical scavenging capacity in mussel *Mytilus* sp. As a new index of biological resistance to oxidative stress.** Chemosphere, Vol. 37, p. 2773-2783, 1998.

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

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

SILVA C. A. de M.: **Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVEIRA D.; SIMEONI L. A.; SILVA C. A. M.: **Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 19 (2A), p. 501 – 509, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M. T. D.; MILAN, M.; TELSER, J.: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.32, n.3, p.3-41, 2006.

WINTERHALTER, P.: Fruits IV. In: MAARSE, H. (Ed). **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 389-409, 1991.

YOUNG, H.; PATERSON, V.: The flavor of exotic fruit. In: MORTON I.D.; MACLEOD, A.J. (Eds.): **The food flavors. Part C: The flavor of fruits**. Amsterdam: Elsevier, p. 281-326, 1990.

CAPÍTULO 2: Biometria e composição centesimal do cutite.

RESUMO

A caracterização biométrica de frutos é indispensável, pois, características físicas têm relação com sua qualidade e compõem, junto com atributos sensoriais e nutricionais, um conjunto de caracteres fundamentais na avaliação do potencial comercial do fruto, além de servir como ferramenta para estudos da variabilidade fenotípica para o manejo e melhoramento genético. Neste estudo foram realizadas as análises biométrica, físico-química e determinação instrumental da cor da polpa dos frutos de *P. macrophylla*, para se obter informações que auxiliem em futuros estudos nutricionais e tecnológicos sobre este fruto. Verificou-se que os frutos apresentaram em média 4 cm de diâmetro e 37 g de peso, com rendimento de 76% de polpa, a qual apresentou moderada luminosidade ($L^* = 66,32$), com o predomínio do componente amarelo ($b^* = 67,45$) sobre o componente vermelho ($a^* = 9,72$), sugerindo uma cor amarela forte. Os frutos apresentaram 64% em massa de água e nitrogênio total, extrato etéreo e resíduo mineral fixo abaixo de 2%. Mais estudos sobre o valor nutricional dos frutos de cutite devem ser conduzidos para se obter mais informações sobre sua relevância como alimento.

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, análise biométrica, composição centesimal, CIELab.

ABSTRACT

Fruit biometric characterization is essential therefore, physical characteristics are related to quality and compose, with nutritional and sensory attributes, a set of key characters in evaluation of fruit market potential, serving also as tool for studies of phenotypic variability for management and genetic improvement. In this study were performed biometrics, physical and chemical analysis and instrumental color determination for flesh of the *P. Macrophylla* fruits, to obtain information for assist in future technological and nutritional studies on this fruit. It was found that fruits show on average 4 cm in diameter and 37 g weight, with a pulp yield of 76%, which exhibited moderate light ($L^* = 66,32$), with predominance of yellow component ($b^* = 67,45$) over red component ($a^* = 9,72$), suggesting a strong yellow color. fruits showed 64% by mass of water, total nitrogen, ether extract and ash below 2%. Further studies about nutritional value of cutite fruits should be conducted to learn more about its food importance.

Key words: *Pouteria macrophylla*, cutite, biometric analysis, nutritional composition, CIELab.

2.1. INTRODUÇÃO

Nos estudos com espécies de frutos que apresentam potencial para a comercialização, a caracterização biométrica de frutos e sementes assume um papel indispensável, pois, características físicas como tamanho, forma e cor guardam grande relação com sua qualidade e compõem, junto com outros atributos como aparência, sabor, odor, textura e valor nutritivo, um conjunto de caracteres fundamentais na avaliação do potencial comercial do fruto, além do que, a análise biométrica é uma importante ferramenta para compreensão da variabilidade fenotípica nas populações, fornecendo informações úteis para o manejo e melhoramento genético. (BORGES et al. 2010; CHITARRA, M; CHITARRA, A. 1990; CRUZ; CARVALHO, 2002; CRUZ et al., 2001).

Neste estudo foi realizada a análise biométrica dos frutos de *P. macrophylla*, considerando os parâmetros peso do fruto, da semente e da casca, o perímetro, o diâmetro longitudinal do fruto e da semente, o diâmetro transversal do fruto e da semente e o rendimento da polpa. Foram feitas também a determinação instrumental da cor da polpa fresca do fruto utilizando o sistema CIELab e a caracterização físico-química do fruto para determinação de seu resíduo mineral fixo, nitrogênio total, extrato etéreo e perda por dessecação, no intuito de caracterizar física e quimicamente o cutite, levantando informações gerais que auxiliem em futuros estudos nutricionais e tecnológicos do fruto.

2.2. Materiais e métodos.

2.2.1. Amostra de cutite.

As amostras dos frutos do cutite (*P. macrophylla*) utilizadas neste estudo foram colhidas durante o seu período de safra no mês de novembro de 2010, na sede campestre da Assembléia Paraense, localizada na Avenida Almirante Barroso km 01, Belém, Pará, Brasil. Foram coletados 176 frutos de cutite, dos quais, 2 foram excluídas da amostragem e os 174 restantes foram aleatoriamente divididas em 6 grupos de 29 frutos. Em cada grupo, os frutos foram numeradas de 1 à 29 e 5 frutos de cada grupo foram sorteados para compor o grupo de 30 frutos utilizados no estudo biométrico. As partes comestíveis dos 144 frutos restantes foram manualmente separadas das sementes e misturadas, sendo 25% do material fresco levado imediatamente para análise e 75% liofilizado sob pressão de $3,6 \times 10^{-1}$ mbar a -51°C por 72 horas e armazenado á -30°C até a execução das demais análises.

No procedimento de amostragem, foram considerados os frutos maduros, inteiros, visualmente sadios e sem evidências de predação ou outro tipo de dano.

Amostras do exemplar de *P. macrophylla* foram comparadas com exsicatas autênticas existentes no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, na cidade de Belém, PA, Brasil.

2.2.2. Biometria dos frutos.

Para a análise biométrica dos frutos de *P. macrophylla*, os parâmetros determinados foram o peso do fruto, da semente e da casca, o perímetro do fruto, o diâmetro longitudinal do fruto e da semente, o diâmetro transversal do fruto e da semente e o rendimento da polpa.

Os frutos foram primeiramente pesados inteiros e foram feitas as medições de perímetro e diâmetros, em seguida, foi feita separação cuidadosa da semente, sua pesagem e medição de diâmetros, posteriormente, foi feita a separação da casca e sua pesagem. Este procedimento foi repetido para cada fruto do grupo amostral.

As análises biométricas foram conduzidas de acordo com Carvalho, J. E. U. & Müller, C. H. 2005, com auxílio de Balança analítica e Paquímetro Tramontina certificado pela ISO 9001.

2.2.3. Análise de cor.

A determinação instrumental da cor foi realizada utilizando a polpa fresca do fruto imediatamente após sua obtenção com o auxílio de um colorímetro Konica Minolta, modelo Chroma mater CR-400, utilizando o sistema CIELab (CIE, 1986). No espaço colorimétrico CIELab, definido por L^* , a^* , b^* , a coordenada L^* corresponde à luminosidade e se refere à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de zero (0) a cem (100). Quanto maior o valor de L^* , mais claro é o objeto. O parâmetro a^* refere-se à contribuição das cores do verde (a^-) ao vermelho (a^+) e o parâmetro b^* refere-se às cores do azul (b^-) ao amarelo (b^+). As medições foram realizadas em triplicata com o aparelho previamente calibrado segundo instruções do fabricante.

2.2.4. Composição centesimal.

A caracterização físico-química da polpa dos frutos de *P. macrophylla* foi realizada de acordo com os métodos oficiais de análises de frutos (AOAC, 1997; AOCS, 2002). As análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Federal do Pará (UFPA), conforme os seguintes ensaios:

- **Resíduo mineral fixo:** Determinação das cinzas em mufla a 550°C, segundo o método AOAC 940.26 (AOAC, 1997).
- **Extrato etéreo:** A fração lipídica extraída e quantificada de acordo com o método AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2002), utilizando o sistema de Soxhlet.
- **Nitrogênio total:** O teor de nitrogênio total determinado pelo método AOAC 920.152, método de Kjeldahl (AOAC, 1997).
- **Perda por dessecação:** Determinação da umidade, pelo método AOAC 931.04 (AOAC, 1997), de diferença de massa entre matéria seca e úmida.

2.3. Resultados e discussão.

2.3.1. Biometria.

O aspecto geral dos frutos de *P. macrophylla* utilizados neste estudo condiz com a descrição feita por Cavalcante, P. B. 1988. Verificou-se que as bagas arredondadas apresentaram em média 4 cm de diâmetro e 37g de peso, com rendimento de 76% de polpa. Nas tabelas 02 a 05 estão os resultados detalhados do estudo biométrico dos frutos do cutite.

Tabela 02: Avaliação de peso do fruto de cutite.

	Peso em g			
	Máximo	Mínimo	Média	SD
Fruto Inteiro	49,31	27,29	37,26	5,87
Casca	5,67	1,93	3,66	0,99
Polpa	36,41	22,58	28,36	3,8
Semente	8,55	2,52	5,23	1,67

Tabela 03: Avaliação das medidas do fruto de cutite.

Medidas do fruto em cm				
	Máximo	Mínimo	Média	<i>SD</i>
Diâmetro Longitudinal	4,7	3,6	4,09	0,26
Diâmetro Transversal	4,5	3,6	4,08	0,26
Circunferência	14,3	11,7	13,12	0,82

Tabela 04: Avaliação das medidas da semente do cutite.

Medidas da semente em cm				
	Máximo	Mínimo	Média	<i>SD</i>
Diâmetro Longitudinal	2,9	2	2,45	0,22
Diâmetro Transversal	2,2	1,2	1,65	0,24

Tabela 05: Rendimento das partes do fruto do cutite.

Rendimento %		
	Média	<i>SD</i>
Casca	9,66	1,7
Polpa	76,49	3,9
Semente	13,85	3,24

Tabela 06: Comparativo entre dados experimentais e dados relatados na literatura.

	Experimental	<i>SD</i>	Literatura	<i>SD</i>
Média Peso	37,26	5,87	31,3	11,3
Média DL	4,09	0,26	3,8	0,6
Média DT	4,08	0,26	5,2	6,1
% Casca	9,66	1,7	7,9	2,2
% Polpa	76,49	3,9	79,4	3,9
% Semente	13,85	3,24	12,7	3,7

Não foi observada diferença significativa para os parâmetros biométricos dos frutos de *P. macrophylla* entre os resultados encontrados neste estudo e os resultados reportados no estudo realizado por Carvalho e Müller em 2005.

2.3.2. Análise de cor

A cor é um importante parâmetro indicador de qualidade de um alimento e, em relação a frutos, assume também grande importância na diferenciação do grau de maturação dos frutos de diversas espécies além de ser um parâmetro valioso na identificação de frutos já caracterizados na literatura científica. As medidas instrumentais da cor eliminam a subjetividade envolvida na percepção humana desta característica. (RAPHAELIDES et al. 1998; OLIVO et al. 2001). O resultado do ensaio para a determinação de cor da polpa do cutite mostrado na tabela 06 indicou moderada luminosidade (L^*), com o predomínio do componente amarelo (b^*) sobre o componente vermelho (a^*), cuja contribuição na cor foi pequena com valores baixos, sugerindo uma cor amarela forte.

Tabela 07: Avaliação de cor da polpa do fruto do cutite.

	Cor CIELab		
	Média	SD	c_v %
L	66,32	1,13	2
a^*	9,72	0,28	3
b^*	67,45	0,86	1

2.3.3. Composição centesimal.

A caracterização físico-química do fruto de *P. macrophylla* foi realizada no laboratório de análise de alimentos da faculdade de engenharia de alimentos da Universidade Federal do Pará. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados na tabela 08.

Tabela 08: Caracterização físico-química dos frutos de *P. macrophylla*.

<i>Pouteria macrophylla</i>			
	Média	SD	c_v %
Resíduo mineral fixo	1,13	0,03	2
Extrato etéreo	0,94	0,02	2
Nitrogênio total	1,6	0,02	1
Perda por dessecação	62,12	0,95	2
Carboidratos*	34,21	-	-

*Estimativa por subtração (Carboidratos=100% - (umidade+cinzas+lípídios+proteínas))

2.4. CONCLUSÕES

A biometria dos frutos de *P. macrophylla* utilizados neste estudo mostrou alta similaridade com os dados descritos em literatura, os frutos apresentaram em média 4 cm de diâmetro, 37,26g de peso, rendimento de 76% de polpa e cor amarela forte.

A análise da composição centesimal mostrou frutos com 64% em massa de água, além de nitrogênio total, extrato etéreo e resíduo mineral fixo de 2% cada, indicando baixa concentração de proteínas e lipídios. Outros estudos sobre a composição centesimal, o valor nutricional e teor de vitaminas dos frutos do cutite serão conduzidos posteriormente para obtenção de informações mais relevantes do fruto e seu uso como alimento.

REFERÊNCIAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemists): **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**. 16^a ed., 3 rev., Washington, 1997.

AOCS (American Oil Chemists Society): **Official Methods and Recommended Practices of the American Chemists Society**. 5^a ed., Champaign, 2002.

BORGES, K. C. de F. et al.: **Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 471-478, 2010.

CARVALHO J.E. U.; MÜLLER C. H.: **Biometria e rendimento percentual de polpa de frutas nativas da Amazônia**. Embrapa, Comunicado Técnico n° 139, ISSN 1517-2244, 2005.

CAVALCANTE P.B.: **Frutas Comestíveis da Amazônia**, 4^a ed. Coleção Adolpho Drucke, 279 p, Belém, 1988.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/Faepe, 1990. 320 p.

Cruz, E. D.; Carvalho, J. E. U. **Biometria de frutos e germinação de sementes de *Couratari stellata* A.C. Smith (Lecythidaceae)**. Acta Amazonica, Manaus, v. 33, p. 381-388, 2003.

Cruz, E. D.; Martins, F. de O.; Carvalho, J. E. U.: **Biometria de frutos e germinação de sementes de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae - Caesalpinioideae)**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 24, p. 161-165, 2001.

OLIVO, R.; GUARNIERI, P. D.; SHIMOKOMAKI, M. **Fatores que influenciam na cor de filés de peito de frango**. Revista Nacional da Carne, n. 289, p. 44-49, 2001.

RAPHAELIDES, S. N.; GRIGOROPOULOU, S.; PETRIDIS, D. **Quality attributes of pariza salami as influenced by the addition of mechanically deboned chicken meat**. Food Quality and Preference, v. 9, n. 4, p. 237-242, 1998.

**CAPÍTULO 3: Determinação da capacidade antioxidante do cutite
(*Pouteria macrophylla*) e identificação e quantificação do seu
constituente principal**

RESUMO

A potencial atividade antioxidante de frutos da Amazônia tem sido bastante evidenciada nos últimos anos. Neste capítulo, a capacidade antioxidante do extrato aquoso dos frutos do cutite (*Pouteria macrophylla*) e suas frações, foi determinada pelo método TOSC frente ao peroxinitrito e ao radical peroxila, o teor de fenólicos totais foi avaliado pelo método Folin-Ciocalteu, foi verificada a capacidade de seqüestro do radical livre DPPH e o principal composto antioxidante presente no extrato foi identificado por CLAE-DAD-IES-EMⁿ e quantificado por CLAE-DAD. O extrato dos frutos do cutite apresentou valores de 50% de TOSC em concentrações de 530 mg/L frente ao radical peroxila e 830 mg/L frente ao peroxinitrito, valor de DPPH EC₅₀ = 299,97 g MF/g DPPH e o ácido gálico foi identificado como principal composto antioxidante presente no extrato seguido do digaloilglicose, seu derivado glicosilado. Os frutos do cutite são uma boa fonte alimentar de polifenóis (8,67 ± 0,08 mg GAE/g fruto) e ricos em ácido gálico (4,72 ± 0,15 mg/g fruto).

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, ácido gálico, polifenóis, capacidade antioxidante, CLAE.

ABSTRACT

The potential antioxidant activity of Amazon fruits has been quite evidenced in recent years. In this study, the antioxidant capacity to aqueous extract of cutite fruit (*P. macrophylla*) and fractions, was determinate by TOSC method against peroxy nitrite and peroxy radical, the total phenolic content was evaluated by Folin-Ciocalteu method, was verified the capacity of DPPH free radical scavenging and the principal antioxidant compound on extract was identified by HPLC-DAD-ESI-MSn and quantified by HPLC-DAD. The cutite extract showed 50% TOSC values in concentrations of 550 mg/L against peroxy radical and 830 mg/L against peroxy nitrite, value to DPPH EC50 = 299,97 g FM/g DPPH and the gallic acid was identified as principal antioxidant compound on extract, followed by digalloylglycose, its glycosilated derivative. Cutite fruits are a good food source of polyphenols ($8,67 \pm 0,08$ mg GAE/g fruit) and rich in gallic acid ($4,72 \pm 0,15$ mg/g fruit).

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, gallic acid, polifenols, antioxidant capacity, HPLC.

3.1. INTRODUÇÃO

A região amazônica possui uma grande variedade de espécies de alimentos de origem vegetal com grande potencial econômico, conhecidas por seus usos populares, mas pouco estudadas em relação as suas características nutricionais, tecnológicas e principalmente no que diz respeito à bioatividade de seus constituintes químicos no combate ao estresse oxidativo celular, o qual está relacionado a muitas doenças crônicas degenerativas, inflamatórias, auto-imunes e cardiovasculares, além de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (ARUOMA, 2003; RAMASSAMY et al. 2008). Neste sentido, a importância dos frutos da Amazônia tem sido cada vez mais evidenciada e dentre suas propriedades, a atividade antioxidante potencial de constituintes químicos presentes nestes alimentos, tem assumido importante papel (SILVA et al. 2007; SOUZA et al. 2008).

Fisiologicamente, o metabolismo humano produz inúmeras espécies reativas, em especial as de oxigênio (ERO) e as de nitrogênio (ERN), que estão envolvidas em importantes funções celulares como a fagocitose, mas que, em condições fisiopatológicas, podem ser produzidas em excesso e escapar do sistema antioxidante do organismo iniciando um processo de estresse oxidativo celular (VASCONCELOS et al. 2007; MANACH et al. 2004).

O fruto do cutite é uma baga arredondada apresentando em média 6 cm de diâmetro, sementes ovóides de cor marrom escura, envoltas em uma polpa amarela de consistência farinácea com aspecto semelhante ao da gema de ovo cozido, tem sabor agradável e cheiro bem característico (CAVALCANTE, 1988). No gênero *Pouteria*, algumas espécies produzem frutos popularmente conhecidos e bastante apreciados na região amazônica, dentre elas estão o abiu (*P. caimito*), sapoti (*P. sapota*), cutite grande (*P. macrocarpa*) e cutite (*P. macrophylla*) (SILVA, 2007). A literatura reporta a presença de diversos polifenóis na constituição química de frutos de algumas espécies do gênero *Pouteria* e a atividade antioxidante de seus sucos (SILVEIRA et al. 2008).

Numerosos métodos têm sido usados para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais em alimentos ou outros sistemas biológicos, dentre os métodos mais usados atualmente estão o total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP), capacidade de seqüestro do radical

1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (ARUOMA, 2003; VASCONCELOS et al. 2007) e total oxidant scavenging capacity (TOSC) (REGOLI; WINSTON, 1999; LICHTENTHÄLER; MARX, 2005; GORDON et al. 2011).

Não há um método simples e universal pelo qual a capacidade antioxidante pode ser avaliada de forma quantitativamente precisa. Atualmente, o método ORAC é um dos mais usados (NIKI, 2010), entretanto, o método TOSC tem mostrado vantagens com maior robustez, determinação das cinéticas de reação, identificação de atividade pró-oxidante e capacidade de análise envolvendo um maior número de radicais livres e de espécies reativas não radicalares presentes no metabolismo humano (TOMER, 2007; LICHTENTHÄLER et al. 2003).

Neste estudo, o conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso de cutite foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante total foi avaliada pelo método do seqüestro do radical DPPH. A capacidade antioxidante específica frente ao radical peroxila e à espécie reativa não radicalar de nitrogênio, peroxinitrito, foram avaliadas pelo método TOSC e o constituinte químico responsável pela maior contribuição na capacidade antioxidante frente o peroxinitrito foi identificado por CLAE-DAD-IES-EMⁿ e quantificado por CLAE-DAD.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.2.1. Reagentes.

Os solventes usados nos ensaios por CLAE, CLAE-EM e para a preparação dos extratos foram obtidos de J.T. Baker (Griesheim, Alemanha). ácido dietilenotriaminopentaacético ($\geq 99\%$), ácido α -ceto- γ -metiolbutirico (KMBA) ($\geq 97\%$), 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) diclorídrico ($\geq 97\%$) e 3-morfolinossidnonimino N-etilcarbamida foram obtidos de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). Reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, ácido gálico e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil foram obtidos de Sigma-Aldrich Chemie (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes usados tinham de grau analítico.

3.2.2. Material vegetal.

As amostras dos frutos de cutite utilizadas neste estudo foram colhidas, em duas etapas, durante o seu período de safra nos meses de novembro de 2009 e novembro de 2010, na sede campestre da Assembléia Paraense, localizada na Avenida Almirante Barroso km 01, Belém, Pará, Brasil. No procedimento de

amostragem, foram considerados os frutos maduros, inteiros, visualmente sadios e sem evidências de predação ou outro tipo de dano. As partes comestíveis do fruto (casca e polpa) foram homogeneizadas, congeladas, liofilizadas sob pressão de $3,6 \times 10^{-1}$ mbar a -51°C por 72 horas, finamente trituradas com auxílio de graal e pistilo e armazenadas a -30°C até a execução dos ensaios.

Amostras do exemplar de *P. macrophylla* foram comparadas com exsiccatas autênticas existentes no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, na cidade de Belém, PA, Brasil.

3.2.3. Extratos.

Para o ensaio de TOSC, determinação do conteúdo de fenólicos totais, determinação da capacidade de seqüestro do radical DPPH e para os ensaios qualitativos e quantitativos por CLAE-DAD, foi preparado o extrato aquoso dos frutos de cutite solubilizando 1 g de matéria seca finamente triturada em água ultra pura em quantidade suficiente para 10 g de solução. Após solubilização, a solução foi levada a banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida centrifugada por 10 minutos em rotação de 10000 rpm a 20°C . O sobrenadante correspondente ao extrato aquoso de cutite a 10% (p/p) foi armazenado em frasco âmbar a -30°C até a execução dos ensaios. Optamos pela utilização de um simples método de extração a base de água por entender que, em se tratando de frutos comestíveis, a extração aquosa é o método que mais se aproxima da preparação de um suco de fruta e a interpretação dos resultados obtidos a partir deste tipo de extrato torna-se mais apropriada à compreensão da importância do cutite como alimento.

Para a identificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD-IES-EMⁿ foi utilizado um método de extração com líquido pressurizado (PAPAGIANNPOULOS et al. 2004). 500 mg de matéria seca finamente triturada foi extraída com acetona-água-ácido fórmico (70+29+1; v/v/v) em um sistema de extração por solvente acelerada (ASE 200, Dionex) em temperatura ambiente por 20 minutos em dois ciclos, em seguida, foi feita a extração em fase sólida (SPE) em um sistema ASPEC XL Gilson. O cartucho para SPE de poliamida (500 mg x 3 mL) foi condicionado com 3 mL de dimetilsulfóxido-ácido fórmico-ácido trifluoracético (DMSO-FAc-TFA) (98,7+1+0,3; v/v/v) e lavado com 5 mL de água ultra pura. O extrato foi diluído até que contivesse menos de 15% (v/v) de solvente orgânico e o cartucho foi carregado com o extrato em frações volumétricas de 20 mL até a exaustão, sendo lavado com

10 mL de água ultra pura após cada carregamento. Durante a eluição com DMSO-FAc-TFA, os primeiros 0,5 mL do extrato foram descartados e os próximos 1,25 mL foram coletados e armazenados a -80°C até a realização dos ensaios.

3.2.4. Determinação do conteúdo de fenólicos totais.

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria UV-VIS de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al. 1999). 500 µL de extrato dos frutos de cutite na concentração 20mg/mL foi transferido para um tubo de vidro, foram adicionados 2,5 mL de solução de reagente de Folin-Ciocalteu:água (10:90 v/v) e a mistura permaneceu em repouso por 5 minutos, em seguida, foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v), os tubos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz. A amostra em branco usando água ultra pura foi preparada nas mesmas condições. O cálculo dos resultados foi baseado na curva de calibração de sete pontos construída com soluções de padrão de referência de ácido gálico em concentrações de 5 µg/mL a 80 µg/mL ($R^2 = 0,9996$) e o resultado expresso em miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de fruta. As análises foram feitas em triplicata e as absorbâncias foram medidas à 740 nm.

3.2.5. Capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.

Para a determinação de atividade antioxidante frente ao radical DPPH, 100 µL do extrato dos frutos de cutite foram adicionados a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM e o decréscimo da absorbância à 515 nm foi medido a cada minuto até a estabilização. O cálculo dos resultados foi baseado na curva de calibração de sete pontos construída com soluções de DPPH em concentrações de 0 µM a 62,5 µM ($R^2 = 0,9983$) e a atividade antioxidante foi expressa como a concentração do extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}) com valores expressos em g de fruta/g de DPPH (RUFINO et al. 2007).

3.2.6. Perfil cromatográfico e fracionamento do extrato por CLAE-DAD.

Para a caracterização do perfil cromatográfico e para o fracionamento do extrato, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto de um cromatógrafo Varian Pro Star controlado pelo software Galaxie Varian,

equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), bomba binária, pré-coluna Securit Guard C18 4 mm x 2 mm Phenomenex, coluna Aqua 3 µm C18 150 mm x 2 mm Phenomenex, com temperatura do forno de 25 °C, volume de injeção de 20 µL, usando como fase móvel A 1% de ácido fórmico em água ultra pura, e fase móvel B 1% de ácido fórmico em acetonitrila, com fluxo de 0,2 mL/mim, em modo de eluição gradiente de início em 0,5% B, levado a 40% B aos 32 mim, 100% B de 34 mim a 43 mim, levado a 0,5% B de 45 mim até 60 mim. Os comprimentos de onda monitorados foram 265 nm, 280 nm e 520 nm.

Após a determinação do perfil cromatográfico, o extrato aquoso dos frutos de cutite foi fracionado por CLAE-DAD em cinco partes denominadas de F1 a F5 e, posteriormente, foi conduzida uma segunda etapa de fracionamento separando apenas os períodos de eluição referentes aos dois sinais cromatográficos majoritários encontrados nas frações de maior contribuição na capacidade antioxidante, denominados FA e FB. As frações do extrato foram coletadas em tubos de polipropileno de 20 mL, congeladas, liofilizadas e resuspendidas em 220 µL de água ultra pura para atingir concentrações de 45,4 µL/mL no momento em que foram submetidas aos ensaios de TOSC.

3.2.7. Capacidade antioxidante pelo método TOSC.

A determinação da capacidade antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada dos frutos de *P. macrophylla* pelo método TOSC, feita conforme descrito em Lichtenthäler, R. et. al. 2003.

A partir do extrato aquoso a 10% (p/p) da polpa liofilizada do cutite, foram preparadas as diluições de 1/25, 1/50, 1/100, 1/250, 1/ 500 e 1/1000. Estas diluições foram testadas frente às espécies reativas peroxila e peroxinitrito, em duas determinações para cada diluição frente a cada uma das espécies reativas.

As análises de cromatografia em fase gasosa para a quantificação do etileno foram desenvolvidas em um equipamento GC-17A Shimadzu controlado pelo software Galaxie Varian e equipado com detector de ionização por chama (FID), coluna Varian Chrompack PoraPLOT Q de 27,5 m x 0,53 mm x 20 µm, nitrogênio como gás de arraste a um fluxo de 15 mL/mim, temperatura de 80 °C para o forno, 100 °C para o injetor e 220 °C para o detector. O equipamento operou com o sistema de amostragem automatizado CombiPal Auto Sampler controlado pelo software Pal Cycle Composer v 1.5, CTC Analitics, equipado com seringa de 3 mL

para headspace, programada para fazer uma injeção de 100 µL nos tempos de reação 0, 12, 24, 36, 48 e 60 min e incubadora de amostras para 06 posições com temporizador e agitador térmico, programada para uma incubação de 60 min a 37°C com agitação de 5 seg a cada 55 seg.

3.2.8. Análises qualitativas por CLAE-DAD-IES-EMⁿ.

Na determinação da identidade do constituinte químico responsável pela maior contribuição na capacidade antioxidante, o extrato do cutite foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, em um sistema composto de um cromatógrafo Dionex Summit controlado pelo software Chromeleon, equipado com detector de arranjo de diodos UVD-340S, bomba P-580 A HPG, Amostrador automático ASI-100 T, pré-coluna Securit Guard C18 4 mm x 2 mm Phenomenex, coluna Aqua 3µm C18 150 mm x 2 mm Phenomenex, com temperatura do forno de 25 °C, volume de injeção de 20 µL, fase móvel A 1% de ácido acético em água ultra pura, fase móvel B 1% de ácido acético em acetonitrila, fluxo de 0,2 mL/min, gradiente de início em 0,5% B, levado a 40% B aos 32 min, 100% B de 34 min a 43 min, levado a 0,5% B de 45min até 60min, Acoplado a um espectrômetro de massas Thermo MS-iontrap LCQ Classic com sistema de ionização por eletro spray controlado pelo software Xcalibur, com os seguintes parâmetros de operação: ionização negativa, fonte de tensão -4,0 kV, tensão do capilar -10V, temperatura do capilar 300 °C. Como ferramentas para a análise dos resultados contou-se com literatura indexada e padrões de referência.

3.2.9. Análises quantitativas por CLAE-DAD.

Para a quantificação do constituinte químico responsável pela maior contribuição na capacidade antioxidante do extrato de cutite, foi utilizado sistema composto de um cromatógrafo Dionex ultimate 3000 controlado pelo software Chromeleon, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), bomba quaternária, pré-coluna Securit Guard C18 4 mm x 2 mm Phenomenex, coluna Varian 5 µm C18 250 mm x 4,6 mm, com temperatura do forno 25 °C, volume de injeção de 20 µL, fase móvel A 1% de ácido fórmico em água ultra pura, fase móvel B 1% de ácido fórmico em acetonitrila, fluxo de 0,2 mL/min, gradiente de início em 5% B, levado a 45% B aos 20 min, 55% B aos 32 min, 100% B de 34 a 43 min,

levado a 5% B de 45 mim até 60 mim, monitorando os comprimentos de onda de 265 nm, 271 nm, 280 nm, 310 nm e 360 nm.

Uma curva analítica de cinco pontos foi construída com soluções de ácido gálico padrão em concentrações de 5 mg/L a 50 mg/L. Para a quantificação, foram utilizados 03 extratos com concentrações de matéria seca próximas a 2 g/L preparados a partir de diluições de 03 diferentes extratos aquosos de frutos de cutite a 10% (p/p).

3.2.10. Análise estatística

Os ensaios de determinação do conteúdo de fenólicos totais, capacidade de seqüestro do radical DPPH e quantificação do ácido gálico, foram realizados em triplicata com três determinações para cada replicata (3x3) considerando coeficiente de variação <5% para as amostras de 2009 e 2010 e os resultados foram expressos como valores de média \pm desvio padrão e os cálculos foram feitos com auxílio do software Exel 2007. Os dados obtidos para o método TOSC a partir das replicatas das análises cromatográficas foram tratados no software Root v3.02/07, para a determinação dos valores de TOSC para cada uma das diluições analisadas, no software TableCurve 2D v5.1 para a construção da representação gráfico da cinética da reação de inibição da formação de etileno durante 60 min e no software Exel 2007 para construção de representações gráficas simples a partir dos resultados obtidos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.3.1. Determinação do teor de fenólicos totais.

Os resultados mostraram teor de fenólicos totais de $8,67 \pm 0,08$ mg GAE/g de fruto de cutite ($866,97 \pm 8,4$ mg GAE/100 g F), considerando o estudo conduzido por Rufino e colaboradores (2010) para outras espécies de frutos da Amazônia, o nosso estudo mostra que o cutite apresenta uma quantidade de polifenóis em matéria fresca próxima a quantidade relatada para o puçá-preto (868 ± 51 mg GAE/100 g F), superior à quantidade encontrada para o açaí ($454 \pm 45,6$ mg GAE/100 g F) e pouco inferior a quantidade relatada para a acerola ($1063 \pm 53,1$ mg/100 g F) e para o camu-camu ($1176 \pm 14,8$ mg GAE/100 g F). Em relação à matéria seca, o cutite apresentou uma quantidade de polifenóis de $2288,73 \pm 22,18$ mg GAE/100 g MS enquanto que puçá-preto, açaí, acerola e camu-camu

apresentaram $2638 \pm 48,9$ mg GAE/100 g MS, 3268 ± 527 mg GAE/100 g MS, $10280 \pm 77,7$ mg GAE/100 g MS e 11615 ± 384 mg GAE/100g MS, respectivamente. De acordo com a classificação proposta por Vasco e colegas (2008), o cutite apresenta uma alta proporção de polifenóis em relação à matéria seca e uma média proporção de polifenóis em relação à matéria fresca, evidenciando que os frutos de cutite podem ser considerados como uma rica fonte de polifenóis para a dieta humana.

3.3.2. Capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.

Os resultados para capacidade de seqüestro do radical livre DPPH mostraram valor de $EC_{50} = 299,97 \pm 3,93$ g MF/g DPPH para o cutite. Considerando o estudo conduzido por Rufino e colaboradores (2010) para outras espécies de frutos da Amazônia, o nosso estudo mostra que o cutite apresentou atividade antioxidante maior que puçá-preto ($414 \pm 14,4$ g MF/g DPPH), camu-camu ($478 \pm 1,2$ g MF/g DPPH), acerola ($670 \pm 64,5$ g MF/g DPPH) e açaí (4264 ± 1381 g MF/g DPPH). Em relação à matéria seca, o cutite apresentou $EC_{50} = 113,63 \pm 1,49$ g MS/g DPPH, enquanto que açaí, puçá-preto, acerola e camu-camu apresentaram 598 ± 164 g MS/g DPPH, $65,6 \pm 2,4$ g MS/g DPPH, $49,2 \pm 2,5$ g MS/g DPPH e $42,6 \pm 1,4$ g MS/g DPPH respectivamente. Classificando em ordem decrescente da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH temos, para a matéria fresca: cutite > puçá-preto > camu-camu > acerola > açaí e; para a matéria seca: camu-camu > acerola > puçá-preto > cutite > açaí. Provavelmente, a diferença entre a capacidade de seqüestro do radical DPPH entre matéria seca e matéria fresca para o cutite e para os frutos relatados no trabalho de Rufino e colaboradores (2010) está relacionada com o teor de umidade de cada fruto, no entanto, levando em consideração o fruto *in natura* os resultados encontrados para o cutite são bastante interessantes já que o cutite apresenta quantidade de vitamina C muito inferior aos frutos camu-camu e acerola (GORDON, A. et. al. 2001; RUFINO, M. S. M. et. al. 2010), assim como, também não foi detectada a presença de antocianinas na constituição química deste fruto.

Para melhor visualização alguns dados sobre os frutos amazônicos citados neste estudo foram condensados na tabela 09.

Tabela 09: Resultados de fenólicos totais, DPPH, Vitamina C e umidade de frutos amazônicos

Fruit	Fenólicos totais (mg GAE/100g)	DPPH (EC ₅₀) g/g DPPH	Vitamina C mg/100g	Umidade (%)
Cutite (<i>Pouteria macrophylla</i>)	2289 ± 22	300 ± 3.9	94 ± 24 ^a	62 ± 1.0
Puçá-preto ^b (<i>Mouriri pusa</i>)	868 ± 51	414 ± 14.4	29 ± 1.4	64 ± 0.8
Açaí ^b (<i>Euterpe oleracea</i>)	454 ± 45	4264 ± 1381	84 ± 10.0	84 ± 2.8
Acerola ^b (<i>Malpighia emarginata</i>)	1063 ± 53	670 ± 64.5	1357 ± 9.5	91 ± 0.2
Camu-Camu ^b (<i>Myrciaria dubia</i>)	1176 ± 15	478 ± 1.2	1882 ± 43.2	90 ± 0.5

a) GORDON et al. 2011. b) RUFINO et al. 2010

3.3.3. Capacidade antioxidante do extrato de cutite e suas frações pelo método TOSC.

O perfil cromatográfico do extrato dos frutos de cutite foi determinado em busca de informações sobre grupos de constituintes químicos aos quais se poderia atribuir capacidade antioxidante, como antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos (LEOPOLDINI, M. et. al. 2011). Na análise do perfil cromatográfico não foram observados sinais em 520 nm o que sugere a ausência de antocianinas no extrato (Wu, X. ET. al. 2004). Os perfis cromatográficos em 265 nm e 280 nm foram semelhantes e mostraram dois sinais majoritários próximos dos tempos de retenção 10 e 20 minutos nomeados de picos A e B respectivamente. A figura 04, mostra a comparação entre as curvas dose-resposta no método TOSC para o extrato aquoso de cutite, investigado neste estudo, e para o açaí investigado por Lichtenthäler, R. (2004) frente às espécies reativas peroxila e peroxinitrito e a tabela 10, apresenta a concentração, expressa em mg/L, para o extrato de cutite e para o Trolox, necessárias para se obter valores de TOSC de 20%, 50% e 80%.

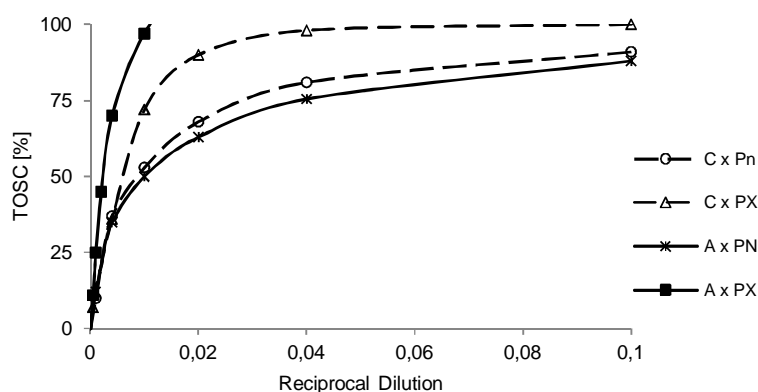


Figura 04: Curva dose-resposta do extrato aquoso do fruto de cutite (C) frente ao peroxinitrito (Pn) e o radical peroxil (Px). Comparação com os resultados encontrados por Lichtenteller, R. (2004) para o açaí (A).

Tabela 10: Valores de TOSC de 20%, 50% e 80% para extrato de cutite e solução de Trolox.

TOSC %	peroxila		Peroxinitrito	
	Cutite mg/L	Trolox* mg/L	Cutite mg/L	Trolox* mg/L
20	180	3,8	200	9,5
50	560	17,8	830	24,3
80	1330	41,8	3700	69,3

*Resultado reportado por Lichtenthäler, R. 2004.

A partir da avaliação do perfil cromatográfico, foi feito o fracionamento do extrato em cinco partes referentes aos intervalos de eluição de 05 mim a 15 min, 15 mim a 25 min, 25 mim a 35 min, 35 mim a 45 min e 45 mim a 55 min que foram nomeadas respectivamente de frações F1 a F5. Posteriormente, foi feito um fracionamento separando os intervalos de eluição de 10 mim a 11,5 mim e 19,5 mim a 21,5 mim referente aos sinais A e B e estas frações foram nomeadas de FA e FB, respectivamente (figura 05). A capacidade antioxidante de todas as frações foi analisada pelo método TOSC frente ao peroxinitrito e além da reação controle com água ultra pura, uma reação controle positivo foi preparada com o extrato bruto de cutite na concentração 45,4 $\mu\text{L/mL}$ para uma análise comparativa.

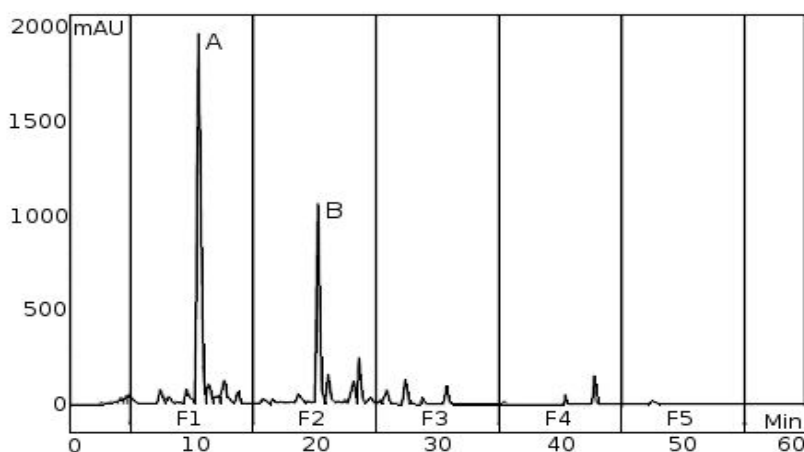


Figura 05: Cromatograma do extrato aquoso dos frutos de cutite. Delimitação das frações e dos sinais majoritários A e B.

A reação controle positivo com extrato bruto do cutite apresentou valor TOSC de 78,56%. A fração F1, que inclui o constituinte químico referente ao pico A, obteve valor TOSC de 67% e a fração FA obteve valor TOSC de 59,02%. A fração

F2, que inclui o constituinte químico referente ao pico B, obteve valor TOSC de 44,6% e a fração FB obteve valor TOSC de 25,39%. As frações F3 e F4 obtiveram valores TOSC de 8,1%, 1,13%, respectivamente, e a fração F5 obteve um valor TOSC negativo de - 0,66%, evidenciando a presença de compostos com atividade pró-oxidante no extrato. É importante observar que a capacidade antioxidante total do extrato bruto de cutite é resultado da possível interação entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes, por isso, quando fracionamos o extrato, a soma dos valores de TOSC das frações pode ser diferente do valor de TOSC do extrato bruto. A cinética das reações de inibição da formação do etileno para o extrato bruto de cutite e para as frações FA e FB é ilustrada na figura 06.

De acordo com os resultados obtidos, o constituinte químico referente ao sinal A, foi considerado como o responsável pela maior contribuição para a capacidade antioxidante do extrato dos frutos de cutite frente à espécie reativa não radicalar de nitrogênio peroxinitrito. Este resultado tem grande relevância para outros tipos de estudos de bioatividade envolvendo os frutos de cutite, pois a literatura relata a influência direta e indireta do peroxinitrito em danos por oxidação de membranas lipídicas (STAMBRO, 2000), proteínas (DONNE et al. 2003) e DNA (HALLIWELL, 1999).

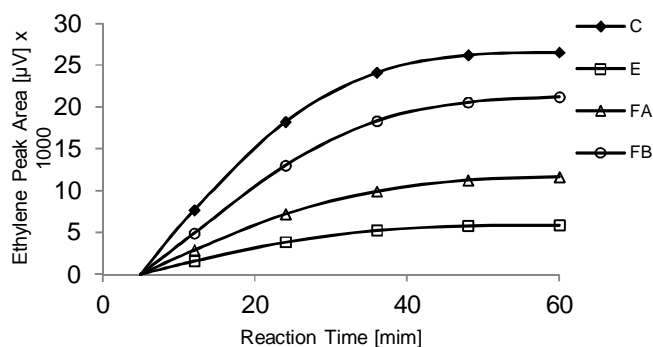


Figura 06: Comparação entre as cinéticas da reação de inibição da produção de etileno (AC) no método TOSC para o controle H₂O (C), extrato bruto de cutite (E) e para as frações (FA e FB).

3.3.4. Análises qualitativas por CLAE-DAD-IES-EM.

O íon-cromatograma obtido do extrato do cutite mostrou um sinal com tempo de retenção próximo de 10 mim de m/z 169.71 [M - H]⁻, massa associada ao ácido gálico (GOTTLIEB et al. 1991), fornecendo informações suficientes para a identificação do pico "A" como ácido gálico (figura 07). A comparação entre os perfis dos íon-cromatogramas obtidos do extrato de cutite e de uma solução padrão de ácido gálico a 0,5 mg/L, confirma que o constituinte químico responsável pela maior

contribuição para a capacidade antioxidante dos frutos de cutite é o ácido gálico. O sinal com tempo de retenção próximo a 20 min de m/z 483 $[M-H]^-$ e padrão de fragmentação m/z 331, 313, 271, 241 e 169 $[M-H]^-$ revela a identidade do pico “B” como digaloilglicose, um derivado do ácido gálico. Observações preliminares sugerem a presença de aproximadamente outros 20 compostos fenólicos no extrato dos frutos de cutite.

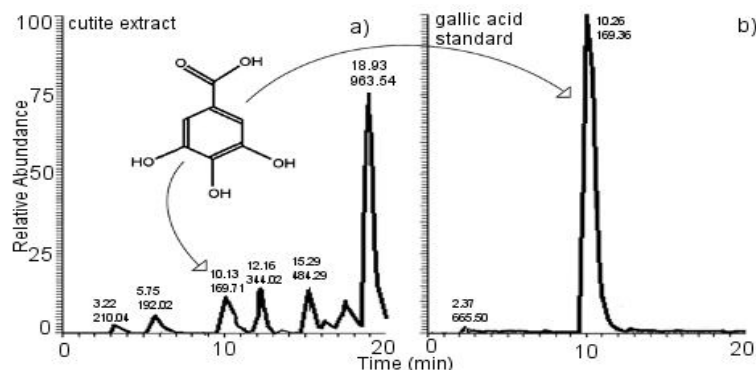


Figura 07: Comparação entre os cromatogramas dos íons obtidos do extrato de cutite e da solução padrão de ácido gálico 0,05mg/mL. a) Composto de m/z 169, 71 $[M-H]^-$ com tempo de retenção de 10, 13 minutos. b) Padrão de ácido gálico de m/z 169, 36 $[M-H]^-$ com tempo de retenção de 10, 26 minutos.

3.3.5. Análises quantitativas por CLAE-DAD.

Para a quantificação do ácido gálico no extrato aquoso dos frutos de cutite, foi feito um experimento piloto para determinar as condições analíticas mais adequadas à análise quantitativa, como faixa de concentração de trabalho, comprimento de onda de absorção máxima do ácido gálico e linearidade do método. O tratamento matemático dos dados obtidos na construção da curva de calibração mostrou $r^2 = 0.9995$ (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Para verificar a eficiência na separação cromatográfica dos compostos presentes no extrato do cutite e eliminar a hipótese de co-eluição entre compostos, foi feita a comparação entre o espectro do padrão de ácido gálico e o espectro do pico “A” referente ao ácido gálico no extrato (figura 08). Nas condições experimentais utilizadas, se obteve excelente separação do ácido gálico e não houve co-eluição entre compostos no intervalo de integração de trabalho.

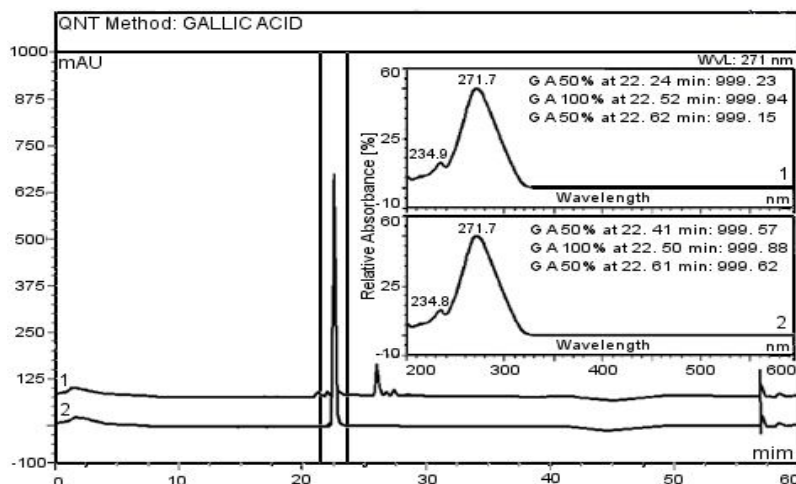


Figura 08: Comparação entre os cromatogramas e espectros do extrato dos frutos de cutite (1) e da solução padrão de ácido gálico (2).

Os resultados do experimento de quantificação do ácido gálico no extrato aquoso dos frutos do cutite mostraram a presença de 4,72 mg de ácido gálico para cada g de polpa fresca do fruto (tabela 11). O estudo desenvolvido por MA e colaboradores (2004) mostrou a presença de altas concentrações de ácido gálico em três espécies de frutos do gênero *Pouteria* com destaque para os frutos de sapoti (*P. sapota*).

Tabela 11: Quantificação do ácido gálico no extrato aquoso dos frutos de cutite.

	Extrato 1	Extrato 2	Extrato 3	Média	SD	c_v
Ácido gálico mg/g MS	12,4156	12,9093	12,0748	12,4666	0,4196	3%
Ácido gálico mg/g MF	4,703	4,89	4,5739	4,7223	0,1589	3%

Naturalmente, o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico), intermediário no metabolismo secundário, é encontrado como componente de taninos hidrolisáveis em vegetais (GRUNDHOFER, 2001). Estudos relatam a capacidade de taninos hidrolisáveis em diminuir o poder invasivo de células tumorais e também sobre a capacidade de galotaninos em seqüestrar espécies reativas como superóxidos e óxido nítrico (TANIMURA et al. 2005; NAKAGAWA et al. 2002).

Estudos desta natureza podem se constituir em ferramenta para a geração de informações aos estudos de metaboloma, envolvendo os compostos polifenólicos da dieta e seus complexos efeitos biológicos (MANACH et al. 2009), contribuindo também, para a caracterização nutricional de frutos da Amazônia e sua utilização como alimento na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo celular.

3.4. CONCLUSÕES

Os frutos do cutite apresentaram teor de fenólicos totais de $866,97 \pm 8,4$ mg GAE/100 g em relação a matéria fresca e $2288,73 \pm 22,18$ mg GAE/100 g em relação à matéria seca, podendo ser considerados como uma rica fonte de polifenóis para a dieta humana.

Os resultados para capacidade de seqüestro do radical livre DPPH mostraram valores de $EC_{50} = 299,97 \pm 3,93$ g/g DPPH para matéria fresca e $EC_{50} = 113,63 \pm 1,49$ g/g DPPH para matéria seca, resultado interessante levando em consideração o fruto *in natura* já que o cutite apresenta quantidade de vitamina C muito inferior aos frutos camu-camu e acerola e não foi detectada a presença de antocianinas em sua constituição química.

O extrato aquoso da polpa liofilizada do cutite testada no método TOSC frente à espécie reativa peroxila apresentou valores de TOSC de 50% na concentração de 0,56mg/mL e frente ao peroxinitrito, apresentou valores de TOSC de 50% na concentração de 0,83mg/mL.

O ácido gálico foi identificado como o constituinte químico responsável pela maior contribuição para a capacidade antioxidante dos frutos do cutite, seguido do digaloilglicose, seu derivado glicosilado e os resultados do experimento de quantificação do ácido gálico no extrato aquoso dos frutos de cutite mostraram a presença de 4,72 mg de ácido gálico para cada g de polpa fresca do fruto.

REFERÊNCIAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. D.O.U. 02/06/2003. Brasília, Brasil.

ARUOMA, O. I.: **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods.** Mutation Research, vol. 9, p. 523–524, 2003.

CAVALCANTE, P. B. In **Frutas Comestíveis da Amazônia**, 4^a ed. Coleção Adolpho Drucke, Belém/Pará, Brasil, 1988; 279 p.

DONNE, I. D.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. **Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.** Clinical Chemistry Acta, vol. 329, p. 23-28, 2003.

GORDON, A.; SCHADOW, B.; QUIJANO, C. E.; MARX, F. **Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae).** Food Research International (2011), doi:10.1016/j.foodres.2011.01.015.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, J. G. S.; MARX, F. **Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 59(14), p. 7688–7699, 2011.

GOTTLIEB, H. E.; KUMAR, S.; SAHAI, M.; RAY, A. B. **Ethyl brevifolin carboxylate from *Flueggea microcarpa*.** Phytochemistry, vol. 30, p. 2435-2438, 1991.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. **Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins.** Phytochemistry, vol. 57, p. 915-927, 2001.

HALLIWELL, B. **Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition.** Mutation Research, vol. 443, p. 37–52, 1999.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** INMETRO. Rio de Janeiro, Brasil, 2007; 25 p.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. **The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants.** Food Chemistry, vol. 125, p. 288–306, 2011.

LICHTENTHÄLER, R.: **Optimisation of the Total Oxidant Scavenging Capacity Assay and Application on *Euterpe Oleracea* Mart. (Açaí) Pulps and Seeds.** Tese de Doutorado, UniBonn, Bonn, Alemanha, 2004; 152 p.

LICHTENTHÄLER, R.; MARX, F. **Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, p. 103–110, 2005.

LICHTENTHÄLER, R.; MARX, F.; KIND, O. M.: **Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay.** Europe Food Research and Technology, vol. 216, p. 166–173, 2003.

MA, J.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J.: **Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three *Pouteria* Species by Selected Ion Monitoring Liquid Chromatography – Mass Spectrometry.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, p. 5873–5878, 2004.

MANACH, C.; HUBERT, J.; LLLORACH, R.; SCALBERT, A. **The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics.** Molecular Nutrition and Food Research, vol. 53, p. 1303–1315, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** American Journal of Clinical Nutrition, vol. 79, p. 727–747, 2004.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. **Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea.** Food Chemistry and Toxicology, vol. 40, p. 1745–1750, 2002.

NIKI, E. **Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*.** Free Radical Biology and Medicine, vol. 49, p. 503–515, 2010.

PAPAGIANNOPOULOS, M.; WOLLSEIFEN, H. R.; MELLENTHIN, A.; HABER, B.; GALENSA, R. **Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, p. 3784–3791, 2004.

RAMASSAMY C. et. al.: **Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer’s Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 56, p. 4855 – 4873, 2008.

REGOLI, F.; WINSTON, G. W. **Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals.** Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 156, p. 96–105, 1999.

RUFINO M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENÉZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH.** Embrapa: Comunicado Técnico on line, 2007; 127, 1679–6535.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; JIMENÉZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S.; FILHO, J. M. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil.** Food Chemistry, vol. 121, p. 996–1002, 2010.

SILVA, C. A. M.: **Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae).** Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2007; 164 p.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. **Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant**

species from the Amazonian region. Food Chemistry, vol. 101, p. 1012–1018, 2007.

SILVEIRA, D.; SIMEONI, L. A.; SILVA, C. A. M.: **Genus Pouteria: Chemistry and biological activity.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19 (2A), p. 501–509, 2008.

SINGH, M.; ARSENEAULT, M.; SANDERSON, T.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. **Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 56, p. 4855–4873, 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M.: **Analysis of total phenols and other oxidation substrats and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.** Methods in Enzymology, vol. 299, p. 152–178, 1999.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. **Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays.** Food Chemistry, vol. 106, p. 331–339, 2008.

STAMBRO, W. D. **Modeling the interaction of peroxynitrite with low-density lipoproteins I: plasma levels of peroxynitrite.** Journal of Theoretical Biology, vol. 205, p. 457–464, 2000.

TANIMURA, S.; KADOMOTO, R.; TANAKA, T.; ZHANG, Y.; KOUNO, I.; KOHNO, M. **Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity.** Biochemical and Biophysical Reserch Communiations, vol. 330, p. 1306–1313, 2005.

TOMER, D. P.; MCLEMAN, L. D.; OHMINE, S.; SCHERER, P. M.; MURRAY, B. K.; O'NEILL, K. L. **Comparison of the Total Oxyradical Scavenging Capacity and Oxygen Radical Absorbance Capacity Antioxidant Assays.** Journal of Medicinal Food, vol. 10, p. 337–344, 2007.

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

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, vol. 30, p. 1323–1338, 2007.

WU, X.; GU, L.; PRIOR, R. L.; MCKAY, S. **Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, p. 7846–7856, 2004.

CAPÍTULO 4: Caracterização do aroma do cutite.

RESUMO

Um grande número de compostos voláteis contribuem para o sabor característico dos frutos. Neste estudo, foi feita a caracterização do aroma do fruto do cutite (*Pouteria macrophylla*) utilizando o método de destilação-extração simultânea de Likens e Nickerson e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foi verificada a presença de 51 constituintes voláteis no aroma do cutite, pertencentes a várias classes químicas, com predominância de benzaldeído, butanoato de butila, linalol, hexanoato de butila, hexanol, caprilato de butila e acetato de butila.

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, aroma, Likens e Nickerson, CG-EM.

ABSTRACT

A large number of volatile compounds contribute to flavor of fruits. In this study was conducted the characterization of the aroma of Amazonian fruit known as cutite (*Pouteria macrophylla*) using the simultaneous distillation-extraction method of Likens and Nickerson and gas chromatography coupled to mass spectrometry. It was verified the presence of 55 volatile compounds in cutite aroma belonging to deferments chemical classes. Predominant compounds were benzaldehyde, butyl butanoate, linalool, butyl hexanoate, hexanol, butyl caprylate and butyl acetate.

Palavras-chave: *Pouteria macrophylla*, cutite, aroma, Likens e Nickerson, GC-MS.

4.1. INTRODUÇÃO

Os frutos de cutite (*P. macrophylla*) são popularmente conhecidos na Amazônia por seu sabor adocicado e por seu aroma forte e característico, contudo são subutilizados comercialmente (CAVALCANTE, 1988). A relação entre a qualidade percebida pelo consumidor e a presença de compostos responsáveis pelo sabor e aroma de um fruto são parâmetros essenciais da qualidade e assumem fundamental importância para a área de alimentos. Esta abordagem impacta diretamente a indústria através da definição de índices que se relacionam com a qualidade e, portanto, com o valor agregado ao produto (MACHADO et al. 2007).

As sensações do gosto e do aroma integram a resposta fisiológica do sabor. A sensação do gosto é atribuída à presença de diferentes tipos de compostos nos alimentos (açúcares, sais, ácidos, limonina) determinando as sensações básicas doce, salgado, azedo e amargo. A sensação do aroma é bem mais complexa, pois o olfato humano pode diferenciar milhares de compostos voláteis os quais são considerados como os principais responsáveis pelo sabor característico dos alimentos (FRANCO et al. 2004).

Metabólitos secundários de frutos incluem um grande número de compostos voláteis que contribuem para o sabor e, portanto, têm um forte impacto sobre a preferência do consumidor (HARKER, 2004). Existem vários métodos para determinar os metabólitos voláteis em material vegetal. Estes métodos geralmente consistem em técnicas de preparação de amostras para extração dos metabólitos voláteis a partir dos tecidos, como a destilação, a extração em headspace estático ou dinâmico, microextração em fase sólida, extração direta ou extração com fluido supercrítico e mais geralmente a separação por cromatografia gasosa, muitas vezes usando espectrometria de massa para permitir a identificação dos metabólitos (STASHENKO et al. 2004; MAIA et al. 2008; NUNES et al. 2008; BICCHI et al. 2008; KREUTZMANN et al. 2006; NARAIN et al. 2007; ROSILLO et al. 1999; OBANDO-ULLOA et al. 2010; ELSS et al. 2005).

Neste estudo, foi feita a caracterização do aroma do fruto imaturo fresco e do fruto fresco e liofilizado maduro do cutite utilizando o método de destilação-extração simultânea de Likens e Nickerson e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

As amostras dos frutos do cutite (*P. macrophylla*) utilizadas neste estudo foram colhidas durante o seu período de safra no mês de novembro de 2010, na sede campestre da Assembléia Paraense, localizada na Avenida Almirante Barroso km 01, Belém, Pará, Brasil. Foram utilizados 50 frutos imaturos e 144 frutos maduros. As partes comestíveis dos 144 frutos maduros foram manualmente separadas das sementes e misturadas, sendo 25% do material fresco levado imediatamente para análise e 75% liofilizado sob pressão de $3,6 \times 10^{-1}$ mbar a -51°C por 72 horas, finamente trituradas com auxílio de graal e pistilo e armazenado á -30°C até a execução das demais análises. As partes comestíveis dos 50 frutos imaturos foram manualmente separadas das sementes, misturadas e levadas imediatamente para análise. No procedimento de amostragem, foram consideradas as frutas, inteiras, visualmente sadias e sem evidências de predação ou outro tipo de dano.

Amostras do exemplar de *P. macrophylla* foram comparadas com exsiccatas autênticas existentes no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, na cidade de Belém, PA, Brasil.

4.2.2. Extração do aroma de cutite

A extração do aroma dos frutos de cutite foi feita utilizando o dispositivo de micro destilação-extração a vapor de Likens e Nickerson (SANDRA; BICCHI, 1987). 25 g dos frutos foram submetidos à destilação-extração simultânea, com 125ml de água ultra pura e 3,5 ml de n-pentano, durante 1,5 horas. O mesmo procedimento foi conduzido para o cutite imaturo, cutite maduro fresco e cutite maduro liofilizado. Foram obtidos os concentrados correspondentes, solúveis em n-pentano.

4.2.3. Análise do aroma de cutite por CG-EM

As análises de cromatografia em fase gasosa para a identificação dos constituintes do aroma do cutite foram realizadas em um equipamento CG FOCUS Thermo Electron, equipado com sistema de injeção automatizado AI-3000 em modo de injeção tipo splitless (Split flow 20:1), usando-se coluna capilar de sílica DB5-ms (30m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste, ajustado para fornecer uma

velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100 °C), temperatura do injetor 240 °C, temperatura da fonte e outras partes 200 °C, injeção sem divisão de fluxo de 0,1µL do extrato, temperatura da coluna programada para 40-60 °C com gradiente de 2 °C/mim, 60-260 °C (4 °C/mim). O equipamento operou acoplado a um espectrômetro de massas EM DSQ II Thermo electron controlado pelo software Xcalibur, o filtro do quadrupolo varreu a faixa de 39 a 450 daltons a cada segundo. A ionização foi obtida por impacto eletrônico com energia de ionização de 70 ev. O software do equipamento conta com a biblioteca de dados NIST 2005.

Cada composto existente nos íonscromatogramas foi identificado através da comparação de seu espectro de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com os espectros existentes na biblioteca do sistema (Willey, NIST) e na literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) foram determinados através da equação 02 que relaciona o tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Foi plotada uma curva de calibração com uma série de *n*-alcanos (C8-C24) injetados nas mesmas condições cromatográficas das análises das amostras.

$$AI_{(x)} = 100 \frac{P_z + 100 \cdot \frac{[(RT_{(x)} - RT_{(P_z)})]}{[(RT_{(P_{z+1})} - RT_{(P_z)})]} \quad (02)$$

Onde:

AI: Índice de retenção aritmético

P_z: Índice de retenção aritmético do hidrocarboneto anterior a X

RT_(x): Tempo de retenção do composto desconhecido

RT_(P_z): Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior a X

RT_(P_{z+1}): Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior a X

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Constituintes do aroma dos frutos de *P. macrophylla*.

A tabela 12 apresenta os constituintes identificados para o aroma dos frutos de cutite fresco imaturo e cutite fresco maduro e liofilizado. Foi verificada a presença de 51 constituintes voláteis de diferentes classes.

Tabela 12. Constituintes do aroma dos frutos de cutite.

TR	IR	Constituintes	Fruto Fresco		Maduro liofilizado
			Imaturo	Maduro	
5,48	802	butanoato de etila			0,2
5,90	807	acetato de butila		2,0	1,8
7,40	846	2- <i>E</i> -hexanal	1,9	0,6	0,5
7,90	863	hexanol	5,2	4,4	3,5
8,80	889	2-heptanona		0,4	0,5
9,40	894	2- heptanol		0,2	0,1
10,10	908	isobutanoato de isobutila		3,5	1,3
12,13	921	butanoato de butila			3,8
12,30	928	benzaldeido	80,7	48,3	40,2
13,70	980	mirceno		0,1	
14,08	994	butanoato de butila	0,1	12,0	10,0
14,80	1013	acetato de hexila			0,5
15,00	1017	isobutirato de isoamila		0,2	
15,30	1024	isobutirato de pentila		0,2	
15,68	1033	benzilalcool	2,5	1,3	0,6
16,10	1042	2-metil-butanoato de butila	0,1	0,4	0,4
16,31	1047	<i>E</i> - β -Ocimeno			0,3
16,51	1052	isovalerato de isopentila			0,2
16,90	1060	butanoato de isopentila		0,3	0,3
17,30	1070	óxido de <i>cis</i> linalol (furanoide)	0,1	0,1	0,2
18,00	1085	óxido de <i>trans</i> linalol (furanoide)	2,1	0,5	0,7
18,40	1095	butanoato de pentila		0,1	
18,60	1099	linalol	0,8	8,5	10,5
19,71	1127	hexanoato de 3-hidroxi-etila			0,1
19,84	1130	butanoato de 3-hidroxi-butila		0,4	0,8
20,55	1148	isobutanoato de hexila			0,2
20,67	1151	hexanoato de isobutila		1,6	1,4
21,34	1168	óxido de <i>cis</i> linalol (piranoide)	0,1	0,1	0,2
21,54	1173	óxido de <i>trans</i> linalol (piranoide)	0,7	0,4	0,6
21,75	1179	4-terpineol		0,1	0,1
22,14	1189	salicilato de metila	1,1	0,2	0,4

22,22	1191	hexanoato de butila		7,2	9,7
22,30	1193	α -terpineol	0,4	0,4	0,8
22,44	1196	octanoato de etila			0,6
23,40	1223	nerol		0,1	0,1
24,28	1247	(2E)-octenoato de etila			0,1
24,35	1249	geraniol	0,1	0,3	0,4
24,47	1252	γ -octalactona (Tentativa)		0,2	0,3
25,77	1289	heptanoato de butila	0,1	0,1	0,2
25,98	1294	isobutanoato de benzila			0,1
27,08	1327	benzoato de isobutila			0,1
27,17	1329	tridecanoato de 3-hidroxi-etila			0,1
27,68	1345	butanoato de benzila			0,1
27,77	1347	caprilato de isobutila		0,4	0,2
28,62	1372	benzoato de butila		0,1	0,5
28,95	1382	(E)-cinamato de metila			0,2
29,11	1387	caprilato de butila		2,0	2,7
29,36	1394	decanoato de etila			0,1
31,61	1465	2-propenoato de 3-fenil etila			0,5
32,51	1484	2-tridecanona			0,2
35,24	1485	caprato de butila		0,1	0,2
Total			96	96,87	96,6

Foram identificadas 06 classes de compostos voláteis no aroma do cutite, em ordem decrescente de número de compostos presentes temos 32 ésteres > 11 terpenos > 03 álcoois > 02 aldeídos = 02 cetonas > 1 lactona. Em ordem decrescente de abundância dos compostos temos: aldeídos > ésteres > terpenos > alcoóis > cetonas > lactonas.

A tabela 13 mostra os compostos mais abundantes presentes no aroma dos frutos de cutite.

Tabela 13: Constituintes mais abundantes no aroma de cutite.

N°	Classe	Composto	IR	Área %		
				imaturo	maduro	maduro liof.
1	éster	acetato de butila	807	-	2	1,8
2	álcool	hexanol	863	5,2	4,4	3,5
3	aldeído	benzaldeído	928	80,7	48,3	40,2
4	éster	butanoato de butila	994	0,1	12,0	10,0
5	terpeno	linalol	1099	0,8	8,5	10,5
6	éster	hexanoato de butila	1191	-	7,2	9,7
7	éster	caprilato de butila	1387	-	2,0	2,7
Total				86,8	84,42	78,4

Foram observadas pequenas variações na abundancia dos constituintes do aroma do cutite em relação ao fruto maduro nos estados fresco e liofilizado, contudo, a liofilização é reconhecida como um bom método de conservação de substâncias voláteis entre os demais métodos de controle de umidade ou secagem.

No processo de liofilização ocorre retenção de moléculas de baixo peso molecular, mesmo as com pressão de vapor maior que a da água, devido à difusão seletiva da água através da matriz liofilizada, pois, nas condições da liofilização, o coeficiente de difusão das moléculas voláteis é muito menor que o coeficiente da água. Em escala macromolecular a retenção de voláteis se dá pelo aprisionamento de moléculas em microrregiões da matriz liofilizada, no processo que se inicia no congelamento da amostra, os voláteis são retidos na matriz alimentar antes da sublimação do gelo e com a continuação do resfriamento ocorre a formação de mais gelo puro, concentrando as demais moléculas na região intersticial. Devido à alta concentração de soluto e a baixa temperatura as forças intermoleculares dentro da matriz alimentar favorecem o fenômeno de transição vítrea levando a matriz alimentar ao estado sólido amorfo que tem grande capacidade de retenção de moléculas devido à existência de volume livre em sua estrutura. (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

O estudo conduzido Krokida e Philippopoulos (2006), demonstrou maior retenção de voláteis em amostras de maçã tratada pelo processo de liofilização que por secagem convencional por ar, demonstrou também que na secagem convencional por ar, quanto maior a temperatura utilizada na secagem, maior foi a perda de voláteis.

4.4. CONCLUSÃO

Foi verificada a presença de 51 compostos voláteis no aroma de cutite e estes compostos pertencem às classes éster, aldeído, álcool, cetona, lactona e terpeno.

Os compostos mais abundantes foram benzaldeído, butanoato de butila, linalol, hexanoato de butila, hexanol, caprilato de butila e acetato de butila.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 802p, 2007.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 317p, 1998.

BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGORBINI, B.; RUBIOLO, P.: **Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices**. Journal of Chromatography A, vol, 1184, p. 220 – 233, 2008.

CAVALCANTE P.B.: **Frutas Comestíveis da Amazônia**, 4^a ed. Coleção Adolpho Drucke, 279 p, Belém, 1988.

ELSS, S.; PRESTON, C.; HERTZIG, C.; HECKEL, F.; RICHLING, E.; SCHREIER, P.: **Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr.) and pineapple products**. LWT-Food Science and Technology. vol. 38, p. 263-274, 2005.

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; LANÇAS, F.M.: **Compostos voláteis de três cultivares de manga (*Mangifera indica* L.)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 24, p. 165-169, 2004.

HARKER, F. R.: **Consumer evaluation of teste and flavor: Zespri gold and zespri green**. New Zealand Kiwifruit Journal, vol. 166, p. 5-9, 2004.

KREUTZMANN, S.; EDELENBOS, M.; CHRISTENSEN, L. P.; THYBO, A.; PETERSEN, M. A.: **Analysis of aroma compounds from carrots by dynamic headspace technique using different purging and cutting methods**. Developments in Food Science, vol. 43, p. 505 – 508, 2006.

KROKIDA, M. K.; PHILIPPOPOULOS, C. **Volatility of apples during air and freeze drying**. Journal of Food Engineering, vol. 73, No. 2, p. 135-141, 2006.

MACHADO, C. C. B.; BASTOS, D. H. M.; JANZANTTI, N. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FRANCO, M. R. B.: **Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Química Nova, Vol. 30, No. 3, p. 513-518, 2007.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.: **Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Journal of Food Composition and Analysis, vol. 21, p. 572-576, 2008.

NARAIN, N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.: **Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation**. Food Chemistry, vol. 102 (3), p. 726 – 731, 2007.

NUNES, C.; COIMBRA, M. A.; SARAIVA, J.; ROCHA, S. M.: **Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma**. Food Chemistry, vol. 111, p. 897–905, 2008.

OBANDO-ULLOA, J. M.; RUIZ, J.; MONFORTE, A. J.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P.: **Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.)**. Food Chemistry, vol. 118 (3), p. 815 – 822, 2010.

ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L.: **Study of the volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties**. Journal of Chromatography A, vol. 847, p. 155 – 159, 1999.

SANDRA, P.; BICCHI, C.: **Capillary gas chromatography in essential oil analysis**. Huething, New York, 1987.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, J. R.: **Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiá aromática* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography**. Journal of Chromatography A, vol. 1025, p. 105, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

A biometria dos frutos de *P. macrophylla* revelou frutos de 4 cm de diâmetro, 37,26g de peso, rendimento de 76% de polpa e cor amarela forte. A composição centesimal mostrou frutos com 64% em massa de água e nitrogênio total, extrato etéreo e resíduo mineral fixo abaixo de 2%.

O fruto de cutite pode ser considerado como uma rica fonte de polifenóis para a dieta humana, pois a partir de um método simples de extração aquosa, apresentou teor de fenólicos totais equivalente ao de outros frutos amazônicos consideradas de alto valor nutricional.

O ensaio de capacidade de seqüestro do radical livre DPPH realizado neste estudo apresentou resultado interessante em relação ao fruto do cutite *in natura*, apresentando maior atividade antioxidante que outros frutos amazônicos consideradas de alto valor nutricional, levando em consideração que o cutite apresenta teor de vitamina C muito inferior a frutos como acerola e camu-camu e não foi detectada a presença de antocianinas em sua constituição química.

O extrato aquoso da polpa liofilizada do cutite testada no método TOSC mostrou valores de 50% de TOSC para as concentrações 0,56 mg/mL e 0,83 mg/mL do extrato, nas reações com peroxila e peroxinitrito respectivamente e capacidade antioxidante maior que a do açaí frente ao peroxinitrito, espécie reativa relacionada a diversos distúrbios biológicos iniciados pelo estresse oxidativo celular.

O método TOSC pode ser considerado como uma ferramenta importante para avaliar a influência que tem os antioxidantes naturais de alimentos sobre a saúde, pois monitora espécies reativas formadas continuamente no metabolismo humano como os radicais peroxila e hidroxila e a espécie reativa não radicalar peroxinitrito. O método ainda é pouco utilizado na área de alimentos e existe pouca literatura científica sobre o assunto nesta área.

O ácido gálico foi identificado como o constituinte químico responsável pela maior contribuição para a capacidade antioxidante dos frutos de cutite, seguido de seu derivado glicosilado o digaloilglicose e os resultados do experimento de quantificação do ácido gálico no extrato aquoso deste fruto mostraram a presença de 4,72 mg de ácido gálico para cada g de polpa fresca.

Foi verificada a presença de 51 compostos voláteis no aroma de cutite e estes compostos pertencem às classes éster, aldeído, álcool, cetona, lactona e

terpeno. Os compostos mais abundantes foram benzaldeído, butanoato de butila, linalol, hexanoato de butila, hexanol, caprilato de butila e acetato de butila.

APÊNDICES

Apêndice A: Dados do experimento de biometria e caracterização físico-química dos frutos de cutite.

n°	Peso em g				
	fruto	semente	polpa+casca	casca	polpa
1	32,44	3,37	29,07	2,95	26,12
2	47,31	5,56	41,75	5,34	36,41
3	34,85	4,98	29,87	3,24	26,63
4	42,26	8,27	33,99	4,47	29,52
5	31,75	4,11	27,64	2,66	24,98
6	43,1	6,2	36,9	4,65	32,25
7	36,28	5,86	30,42	3,41	27,01
8	42,29	5,53	36,76	4,52	32,24
9	36,27	3,92	32,35	3,48	28,87
10	28,14	2,52	25,62	2,11	23,51
11	43,18	5,11	38,07	4,66	33,41
12	35,23	3,89	31,34	3,34	28
13	27,29	2,78	24,51	1,93	22,58
14	31,53	3,51	28,02	2,64	25,38
15	46,44	5,97	40,47	5,15	35,32
16	33,25	4,83	28,42	3,12	25,3
17	33,92	3,37	30,55	3,29	27,26
18	29,75	2,53	27,22	2,32	24,9
19	32,68	4,1	28,58	2,9	25,68
20	36,71	6,37	30,34	3,52	26,82
21	38,16	5,34	32,82	3,93	28,89
22	44,52	8,25	36,27	4,85	31,42
23	49,31	7,83	41,48	5,67	35,81
24	37,39	6,18	31,21	3,77	27,44
25	31,97	6,21	25,76	2,9	22,86
26	41,55	5,28	36,27	4,4	31,87
27	41,23	8,55	32,68	4,32	28,36
28	30,95	4,29	26,66	2,44	24,22
29	40,11	5,93	34,18	4,17	30,01
30	37,91	6,37	31,54	3,75	27,79
MÉDIA	37,26	5,23	32,03	3,66	28,36
SD	5,87	1,67	4,75	0,99	3,80

n°	Medidas do fruto em cm			Medidas da semente em cm	
	Diâm. Vert.	Diâm. Hor.	Circunferência	Diâm. Vert.	Diâm. Hor.
1	4,1	3,7	12,2	2,2	1,9
2	4,5	4,5	14,3	2,6	1,7
3	4	4,1	13	2	1,6
4	4,3	4,2	13,4	2,9	2,1
5	3,9	3,7	12,2	2,2	1,4
6	4,1	4,3	13,7	2,6	1,8
7	4,1	3,9	13,1	2,6	1,7
8	4,2	4,5	14,3	2,5	1,7
9	3,9	4	13,3	2,4	1,4
10	3,6	3,8	11,7	2,3	1,2
11	4,4	4,5	13,7	2,4	1,7
12	4,6	4,2	13,6	2,5	1,8
13	3,9	3,6	12,3	2,2	1,3
14	4	3,9	13	2,4	1,6
15	4,3	4,2	14,1	2,6	1,5
16	4,2	4	13,3	2,5	1,7
17	3,9	3,8	11,9	2,4	1,4
18	4	3,6	12	2,3	1,3
19	3,9	4	12,9	2,1	1,4
20	4,1	3,7	12,7	2,5	1,8
21	4	4,3	13,1	2,2	1,8
22	4,1	4,1	14	2,8	2
23	4,7	4,4	14,3	2,8	1,9
24	3,8	4,4	13	2,3	1,6
25	3,8	4	11,9	2,4	1,5
26	4,1	4,2	14	2,7	1,7
27	4,5	4,5	13,9	2,8	2,2
28	3,8	3,8	11,7	2,3	1,4
29	4,1	4,3	13,7	2,6	1,8
30	3,9	4,1	13,3	2,4	1,7
MÉDIA	4,09	4,08	13,12	2,45	1,65
SD	0,26	0,28	0,82	0,22	0,24

n°	Rendimento em %		
	Casca	Polpa	Semente
1	9,09	80,52	10,39
2	11,29	76,96	11,75
3	9,30	76,41	14,29
4	10,58	69,85	19,57
5	8,38	78,68	12,94
6	10,79	74,83	14,39
7	9,40	74,45	16,15
8	10,69	76,24	13,08
9	9,59	79,60	10,81
10	7,50	83,55	8,96
11	10,79	77,37	11,83
12	9,48	79,48	11,04
13	7,07	82,74	10,19
14	8,37	80,49	11,13
15	11,09	76,06	12,86
16	9,38	76,09	14,53
17	9,70	80,37	9,94
18	7,80	83,70	8,50
19	8,87	78,58	12,55
20	9,59	73,06	17,35
21	10,30	75,71	13,99
22	10,89	70,58	18,53
23	11,50	72,62	15,88
24	10,08	73,39	16,53
25	9,07	71,50	19,42
26	10,59	76,70	12,71
27	10,48	68,78	20,74
28	7,88	78,26	13,86
29	10,40	74,82	14,78
30	9,89	73,31	16,80
MÉDIA	9,66	76,49	13,85
SD	1,17	3,90	3,24

Cinzas									
	Peso cad. g		cinzas	am. úmida	%				
	inicial	final							
A	25,9272	25,9841	0,0569	5,0493	1,126888876				
B	30,0688	30,1242	0,0554	5,0291	1,101588753	1,13	0,03	2%	
C	25,5298	25,5881	0,0583	5,0474	1,155050125				

lipídios									
	Peso bal. g		lipídios	am.úmida	%				
	inicial	final							
A	116,4661	116,5143	0,0482	5,0235	0,959490395				
B	146,9004	146,9473	0,0469	5,0475	0,929172858	0,94	0,02	2%	
C	106,9264	106,9743	0,0479	5,0687	0,945015487				

Proteínas				(V.Hclam - V.HClbr) . Fc HCl . 6,25 . 0,14					
	Peso am. g	Vol. de HCL em mL	Proteínas %	Pam					
A	1,0556	2	1,580520557						
B	1,0858	2,1	1,621925078	1,60	0,02	1%			
C	1,0991	2,1	1,602298471						
branco	0	0,2							

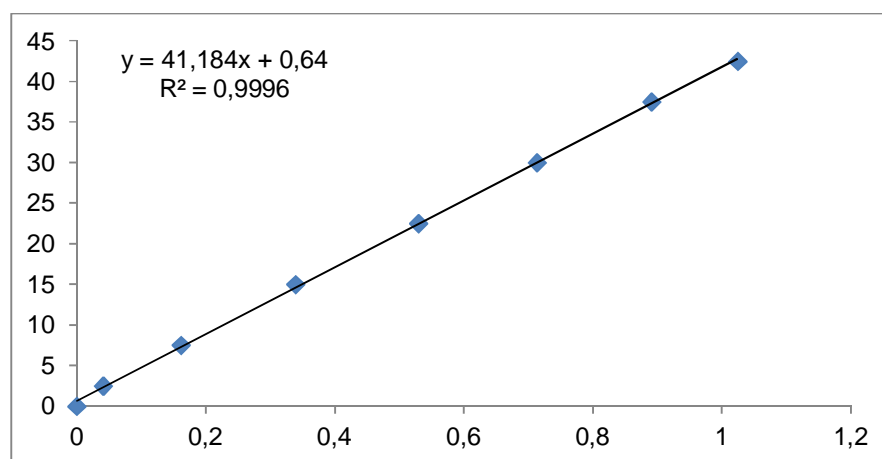
Umidade AOAC									
	Peso Beck. g		amostra						
	inicial	final	seca	úmida					
A	31,67	33,5235	1,8535	5,0247	3,1712	63,11223			
B	42,0637	44,019	1,9553	5,042	3,0867	61,21975	62,12	0,95	2%
C	40,9831	42,907	1,9239	5,0679	3,144	62,03753			

Umidade Infra-vermelho Gehaka									
	amostra								
	in natura	seca							
A	5,0812	1,9717	61,19617413						
B	5,0194	1,8903	62,34012033	62,49	1,37	2%			
C	5,0306	1,8151	63,91881684						

Cor CEILab									
ensaio	1	2	3						
L	67,62	65,65	65,68	66,32	1,13	2%			
a	9,58	9,53	10,04	9,72	0,28	3%			
b	67,81	66,47	68,07	67,45	0,86	1%			

Apêndice B: Dados do experimento para determinação do conteúdo de fenólicos totais.

Curva de Calibração com padrão ácido gálico						
Absorbância				DP	CV	[] AG ($\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$)
Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	Média			
0	0	0	0			0
0,041	0,040	0,042	0,041	0,0010	2%	2,5
0,165	0,159	0,161	0,162	0,0031	2%	7,5
0,340	0,339	0,338	0,339	0,0010	0%	15
0,526	0,534	0,529	0,530	0,0040	1%	22,5
0,715	0,711	0,714	0,713	0,0021	0%	30
0,903	0,878	0,892	0,891	0,0125	1%	37,5
1,035	1,014	1,024	1,024	0,0105	1%	42,5

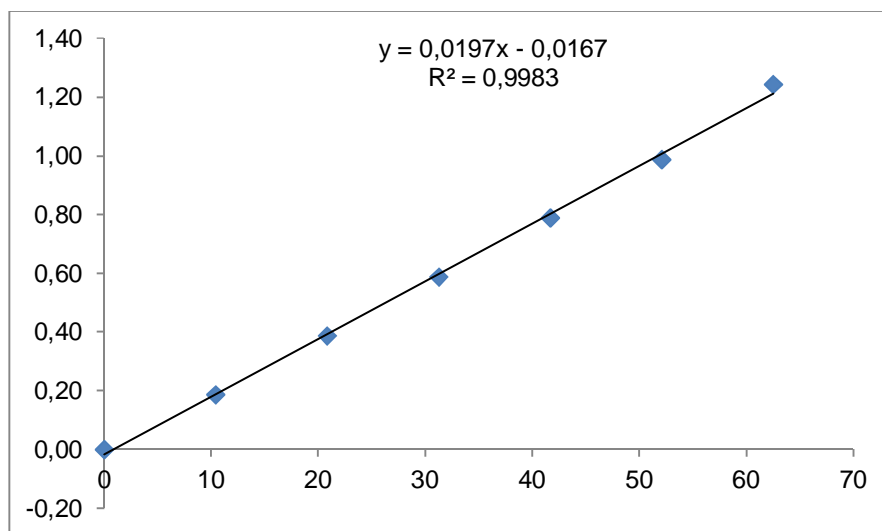


Extratos						
	2009			Média	DP	CV
	abs1	abs2	abs3			
r1	0,239	0,237	0,240	0,239	0,002	1%
r2	0,233	0,234	0,230	0,232	0,002	1%
r3	0,247	0,245	0,249	0,247	0,002	1%
				0,239	0,007356	3%
	2010			Média	DP	CV
	abs1	abs2	abs3			
r1	0,239	0,243	0,242	0,241	0,002	1%
r2	0,240	0,241	0,245	0,242	0,003	1%
r3	0,238	0,242	0,24	0,240	0,002	1%
				0,241	0,001018	0%

Determinação do teor de fenólicos totais		
Variáveis	Extrato 2009	Extrato 2010
Teor de MS da amostra (%)	37,8800	37,8800
Peso MS para extração (mg)	1099,5000	1092,1000
Volume de solvente (mL)	20,0000	20,0000
[] inicial do extrato (mg/mL)	54,9750	54,6050
Alíquota para diluição (mL)	1,6800	0,8400
Volume de diluição (mL)	100,0000	50,0000
[] de trabalho do extrato (mg/ml)	0,9236	0,9174
Alíquota para ensaio (ml)	0,5000	0,5000
Peso MS usada no ensaio (mg)	0,4618	0,4587
Absorb. branco	0,0000	0,0000
Absorb. Amostra (Média)	0,2393	0,2411
[] ext. µg EAG/0,5mL	10,4967	10,5699
FT mg EAG/g MS	22,7305	23,0441
FT mg EAG/g MF	8,6103	8,7291

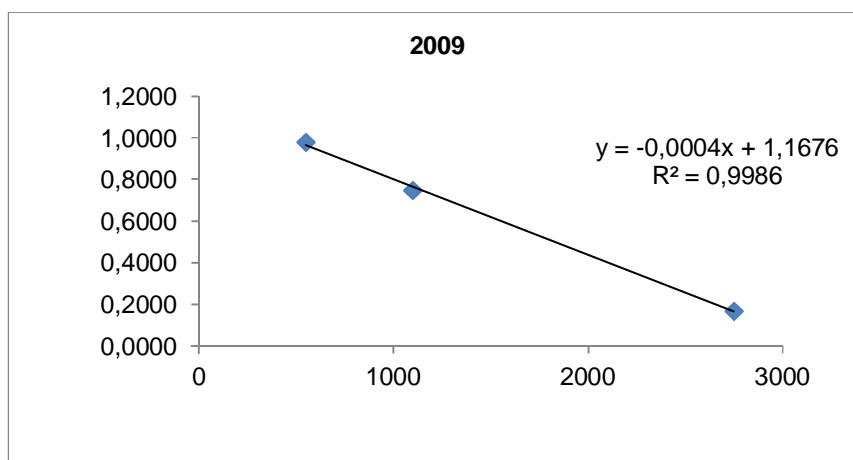
Apêndice C: Dados do experimento de determinação da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.

Curva de Calibração para DPPH									
Pontos	Aliq. S.T. (mL)	Vol. Final (mL)	[] DPPH (μM)	Absorbância					
				Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	DP	CV
P 1	0	10	0	0	0	0	0		
P 2	1,7	10	10,41	0,1894	0,1871	0,1851	0,1872	0,0022	1%
P 3	3,3	10	20,83	0,3843	0,3909	0,3882	0,3878	0,0033	1%
P 4	5	10	31,25	0,5901	0,5857	0,5893	0,5884	0,0023	0%
P 5	6,7	10	41,67	0,7931	0,7893	0,7854	0,7893	0,0039	0%
P 6	8,3	10	52,08	0,9897	0,9873	0,9881	0,9884	0,0012	0%
P 7	10	10	62,5	1,2392	1,2482	1,2453	1,2442	0,0046	0%

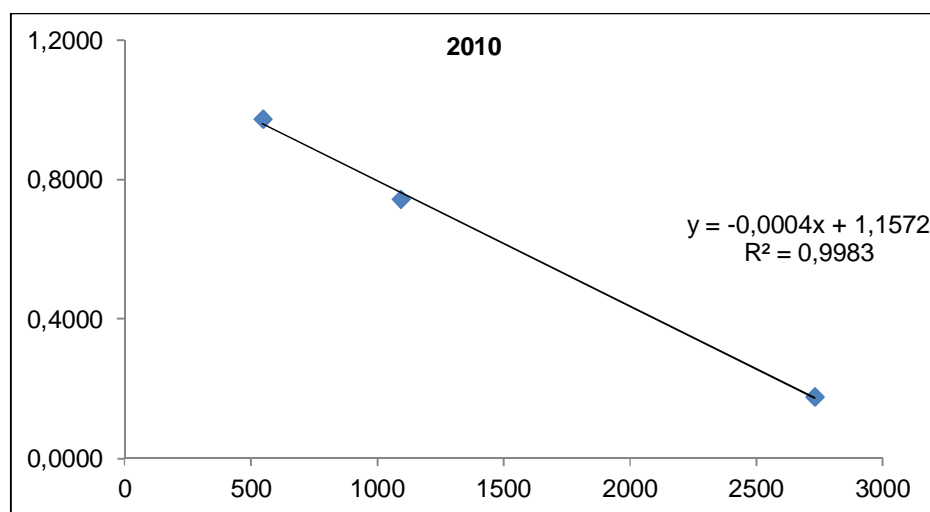


2009		2010	
[] Ext	Abs	[] Ext	Abs
2748,75	0,1689	2730,25	0,1776
1099,5	0,7492	1092,1	0,7445
549,75	0,9799	546,05	0,9745

Extrato 2009							
1° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,1596	0,1648	0,1595	0,1613	0,0030	2%
Ensaio 2	1,1897	0,1691	0,1738	0,1782	0,1737	0,0046	3%
Ensaio 3	1,1985	0,1653	0,1737	0,1765	0,1718	0,0058	3%
	1,2014				0,1689	0,0067	4%
	0,0134						
	1%						
2° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,7397	0,7405	0,7496	0,7433	0,0055	1%
Ensaio 2	1,1897	0,7591	0,7381	0,7505	0,7492	0,0106	1%
Ensaio 3	1,1985	0,7489	0,7573	0,7589	0,7550	0,0054	1%
	1,2014				0,7492	0,0059	1%
	0,0134						
	1%						
3° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,9803	0,9791	0,9703	0,9766	0,0055	1%
Ensaio 2	1,1897	0,9742	0,9834	0,9887	0,9821	0,0073	1%
Ensaio 3	1,1985	0,9795	0,9825	0,9814	0,9811	0,0015	0%
	1,2014				0,9799	0,0030	0%
	0,0134						
	1%						



Extrato 2010							
1° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,1782	0,1824	0,1712	0,1773	0,0057	3%
Ensaio 2	1,1897	0,1781	0,1774	0,1882	0,1812	0,0060	3%
Ensaio 3	1,1985	0,1803	0,1717	0,1705	0,1742	0,0053	3%
	1,2014				0,1776	0,0035	2%
	0,0134						
	1%						
2° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,7307	0,7226	0,7486	0,7340	0,0133	2%
Ensaio 2	1,1897	0,754	0,7601	0,7203	0,7448	0,0214	3%
Ensaio 3	1,1985	0,7314	0,7514	0,7815	0,7548	0,0252	3%
	1,2014				0,7445	0,0104	1%
	0,0134						
	1%						
3° [] de Trabalho							
	controle	R 1	R 2	R3	Média	DP	CV
Ensaio 1	1,2161	0,9762	0,9621	0,9843	0,9742	0,0112	1%
Ensaio 2	1,1897	0,9562	0,9775	0,9956	0,9764	0,0197	2%
Ensaio 3	1,1985	0,9805	0,96703	0,9711	0,9729	0,0069	1%
	1,2014				0,9745	0,0018	0%
	0,0134						
	1%						



Capacidade de sequestro do radical DPPH		
Variáveis	Extrato 2009	Extrato 2010
Teor de MS da amostra (%)	37,8800	37,8800
Peso MS para extração (mg)	1099,5000	1092,1000
Volume de solvente (mL)	20,0000	20,0000
[] inicial do extrato (mg/mL)	54,9750	54,6050
[] inicial do extrato (mg/L)	54975	54605
Aliquota para diluição (mL)	1,0000	1,0000
Volume da diluição 1	20,0000	20,0000
1° [] de trabalho (mg/mL)	2,74875	2,73025
1° [] de trabalho (mg/L)	2748,75	2730,25
Aliquota para ensaio (L)	0,0001	0,0001
Peso MS usada no ensaio (mg)	0,274875	0,273025
Absorbância 1° []	0,1689	0,1776
Volume da diluição 2	50,0000	50,0000
2° [] de trabalho (mg/mL)	1,0995	1,0921
2° [] de trabalho (mg/L)	1099,5	1092,1
Aliquota para ensaio (L)	0,0001	0,0001
Peso MS usada no ensaio (mg)	0,10995	0,10921
Absorbância 2° []	0,7492	0,7445
Volume da diluição 3	100,0000	100,0000
3° [] de trabalho (mg/mL)	0,54975	0,54605
3° [] de trabalho (mg/L)	549,75	546,05
Aliquota para ensaio (L)	0,0001	0,0001
Peso MS usada no ensaio (mg)	0,054975	0,054605
Absorbância 3° []	0,9799	0,9745
Absorbância do DPPH Controle 100%		1,2014
Absorbância do DPPH Controle 50%		0,6007
[] DPPH Eq. 50% da Abs. (mg/L)		31,3409
g DPPH		0,0124
	g MS/g DPPH	g MF/g DPPH
Extrato 2009	114,6819	302,7505
Extrato 2010	112,5779	297,1962
	113,63	299,97
	1,49	3,93
	1%	1%

Apêndice D: Dados da determinação da capacidade antioxidante pelo método TOSC.

pn_cutite_2010.08.23_Aqueous extract

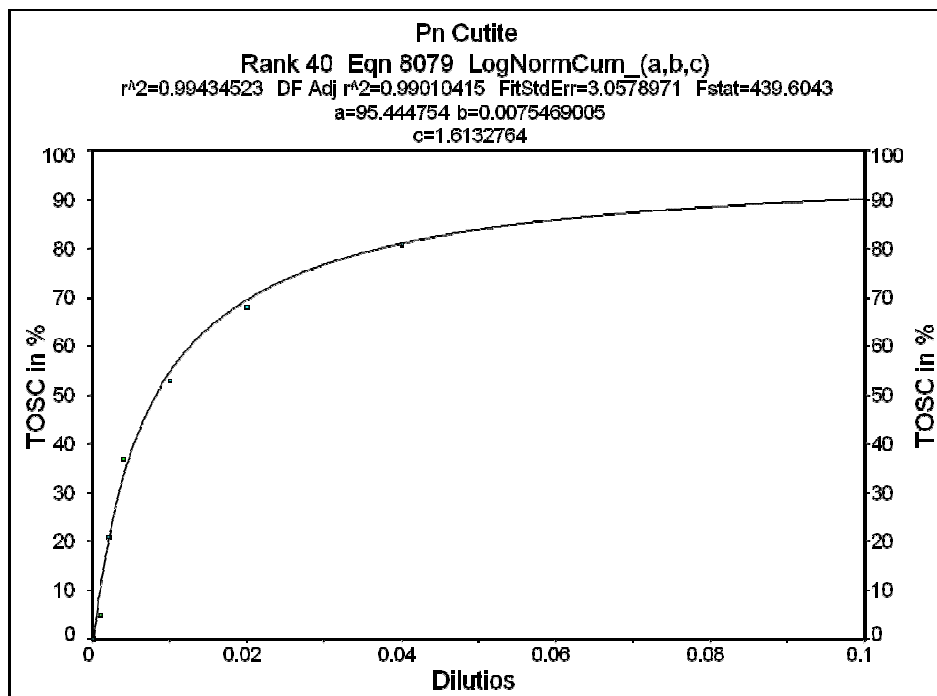
Dilution	T0	T1	T2	T3	T4	T5	mean	SD	C_v
control	0	12	24	36	48	60			
	0	7955	20004	26697	29312	29936	30182	347,896536	1%
	0	8589	20126	27363	29908	30428			
1_10	0	12	24	36	48	60			
	0	728	1871	2524	2778	2836	2808	39,5979797	1%
	0	633	1671	2279	2673	2780			
1_25	0	12	24	36	48	60			
	0	1349	3603	5090	5690	5771	5853	115,965512	2%
	0	1429	3669	5127	5845	5935			
1_50	0	12	24	36	48	60			
	0	2570	6312	8759	9876	10041	9977,5	89,8025612	1%
	0	2432	5993	8313	9656	9914			
1_100	0	12	24	36	48	60			
	0	3591	8765	12266	13893	14317	14332,5	21,9203102	0%
	0	3660	8961	12507	14007	14348			
1_250	0	12	24	36	48	60			
	0	4593	12241	16974	19180	19724	19826,5	144,95689	1%
	0	4522	11828	19835	19334	19929			
1_500	0	12	24	36	48	60			
	0	5112	15404	21756	24542	25459	24926	753,775829	3%
	0	5805	15557	21405	23762	24393			
1_1000	0	12	24	36	48	60			
	0	5985	17310	24901	29062	30123	30398,5	389,615836	1%
	0	6844	18101	25572	29873	30674			

pn_ctite_2010.08.31_Aqueous extract

Dilution	T0	T1	T2	T3	T4	T5	mean	SD	C_v
control	0	12	24	36	48	60			
	0	5793	12939	20145	26459	32606	33541	1322,28968	4%
	0	6887	14738	21876	28138	34476			
1_25	0	12	24	36	48	60			
	0	0	233	423	493	597	588	12,7279221	2%
	0	0	208	363	473	579			
1_50	0	12	24	36	48	60			
	0	235	565	884	1247	2740	2773,5	47,3761543	2%
	0	224	540	875	1292	2807			
1_100	0	12	24	36	48	60			
	0	474	1410	5084	9898	14668	14392	390,322943	3%
	0	477	1356	4815	9378	14116			
1_250	0	12	24	36	48	60			
	0	1599	7722	14354	20771	27202	26223,5	1383,80797	5%
	0	1440	6722	13242	19637	25245			
1_500	0	12	24	36	48	60			
	0	3080	9472	16367	23410	29322	30577,5	1775,54513	6%
	0	4222	11665	18498	25463	31833			
repeat	0	3481	10441	17740	24033	29817	29389	605,283405	2%
	0	3299	9966	16835	23083	28961			
1_1000	0	12	24	36	48	60			
	0	4405	11354	17972	24176	30149	30509	509,116882	2%
	0	4303	11110	18442	25215	30869			

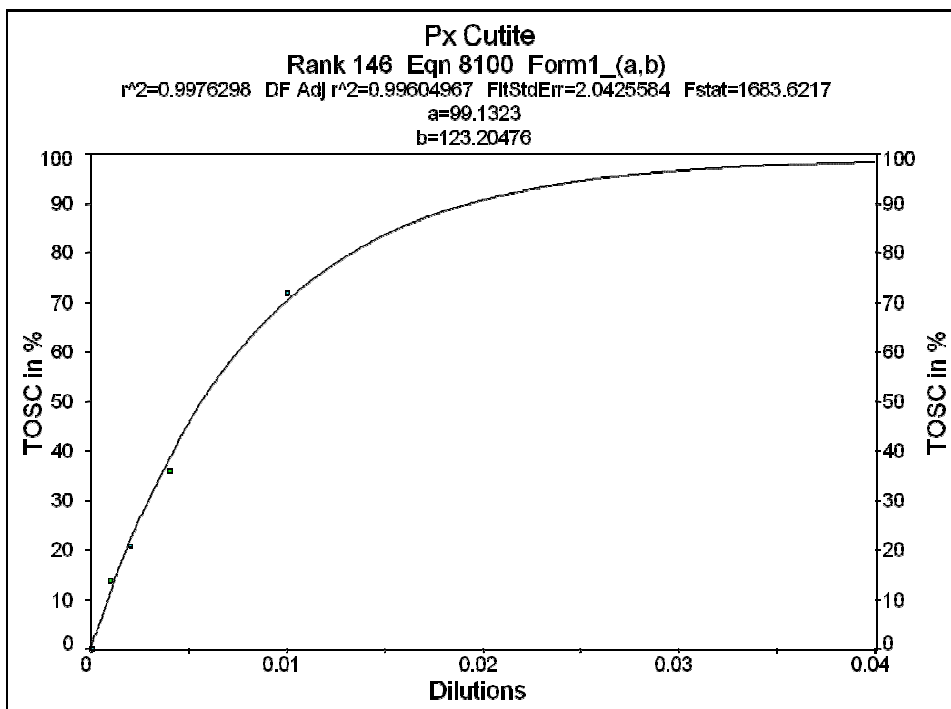
PREPARATION OF FRACTIONATED SAMPLES BY HPLC FOR TOSC									
HPLC samples = 1000µL Aqueous Ext. + 1000 UHQ H2O.									
HPLC Injection Volume = 20µL (10µL of the Aqueous Ext.)									
Fractions was freeze dried and dissolved in 220µL of UHQ H2O (concentration = 45,4µL/mL)									
A sample control was made to comparison using 454µL of the Aqueous Ext. Dissolved in 5mL of UHQ H2O. (concentration = 45,4µL/mL)									
Samples was tested against peroxyntirite.									
Obs. A quantidade de matéria seca é de 454µg contidas nos 100µL usados no meio reacional do TOSC.									

control UHQ water	0	12	24	36	48	60			
	0	7149	17641	23790	26055	26410	26504,5	133,643182	1%
	0	8107	18761	24391	26299	26599			
Cont. samp. [45,4 µL/mL]	0	12	24	36	48	60			
	0	1638	3921	5256	5772	5873	5847	36,7695526	1%
	0	1471	3737	5179	5766	5821			
05-15 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	2488	6143	8103	8964	9114	9050	90,509668	1%
	0	2338	5738	7735	8709	8986			
15-25 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	3594	9635	13234	14569	14883	15086,5	287,79246	2%
	0	4214	10132	13581	14867	15290			
25-35 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	7163	16998	22468	24511	25021	24759	370,523953	1%
	0	6869	16520	21614	23935	24497			
35-45 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	7626	18267	23816	26015	26461	26536,5	106,773124	0%
	0	7197	18028	23680	25896	26612			
45-55 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	7885	18683	24209	26821	26946	26816	183,847763	1%
	0	7170	17872	24336	26650	26686			
10-11,5 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	3012	7499	10168	11307	11491	11587,5	136,471609	1%
	0	2725	6821	9589	11113	11684			
19,5-21,5 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	4938	13050	18204	20500	21059	21156	137,178716	1%
	0	4790	12909	18376	20536	21253			
22,5-24 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	6722	16529	22794	25448	26038	26273	332,340187	1%
	0	7069	17211	23348	25764	26508			
26,5-27,5 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	6664	16827	23037	25225	25665	25768	145,663997	1%
	0	6514	16536	22702	24927	25871			
42,5-43,5 mim	0	12	24	36	48	60			
	0	7356	17872	24487	26650	27006	27142	192,333044	1%
	0	7449	18102	24475	27191	27278			

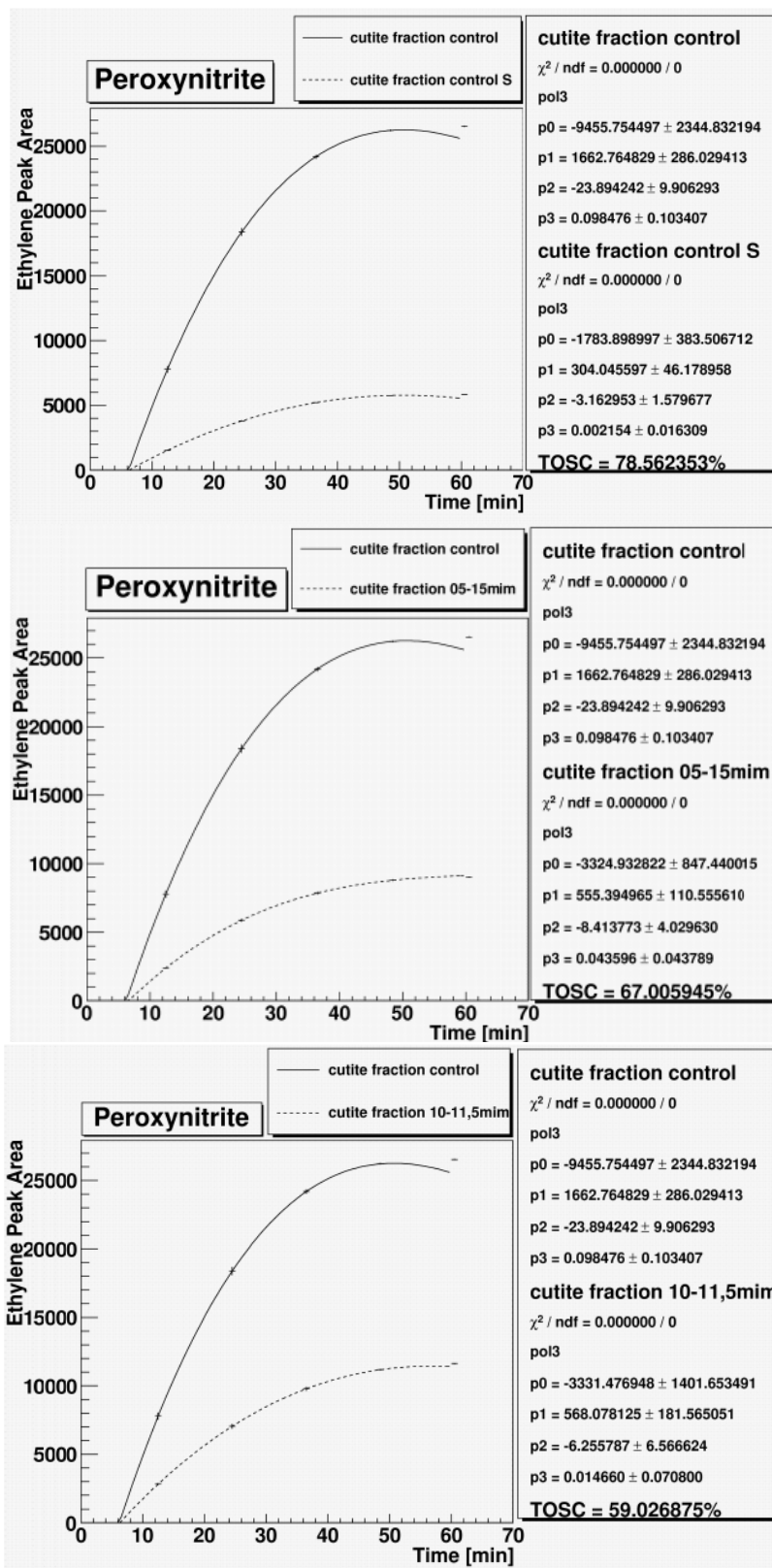


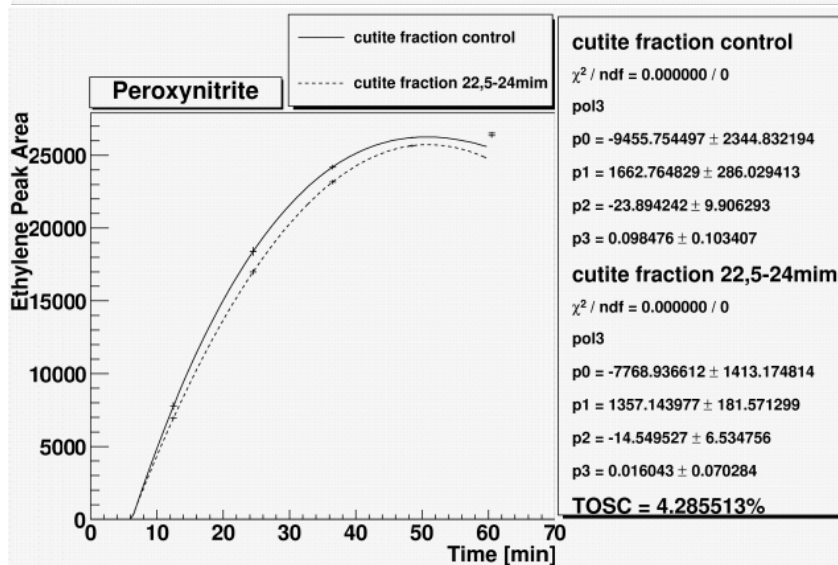
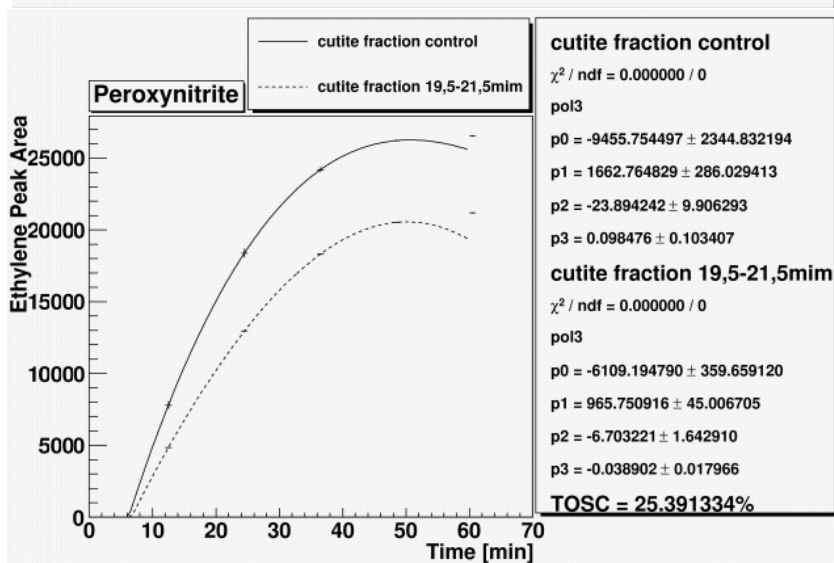
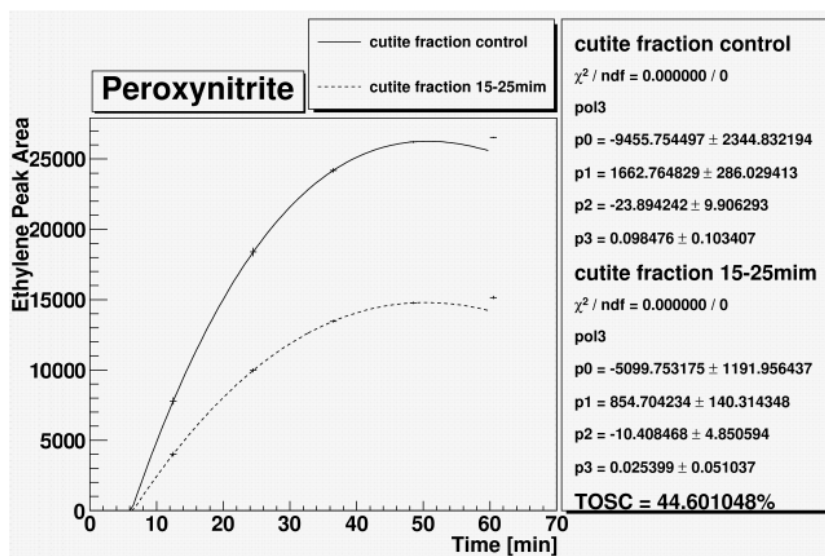
Indx	X-value	Y-value	95 Pred -	95 Pred +	Evaluation
1	0.0020495284	20	10.731234	29.268766	x=Root(y)
2	0.0083119549	50	40.824999	59.175001	x=Root(y)
3	0.03709408	80	70.948773	89.051227	x=Root(y)

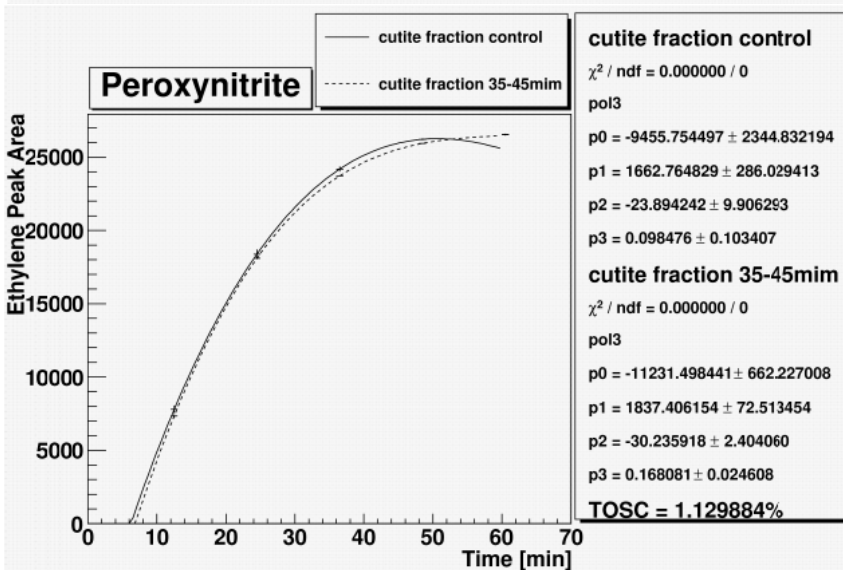
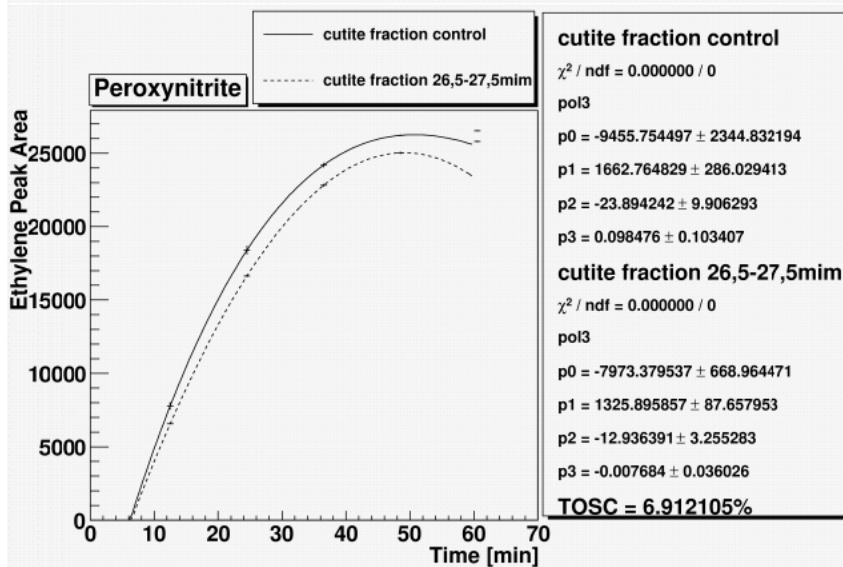
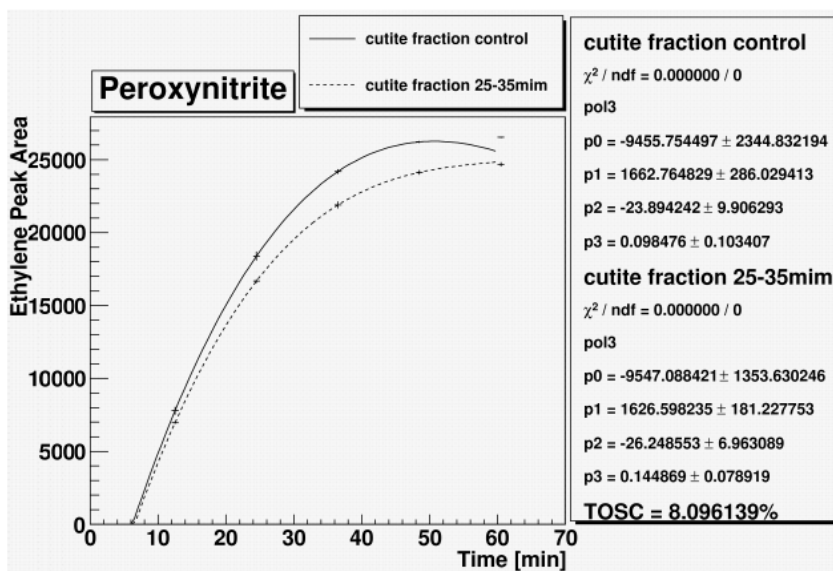
XXX

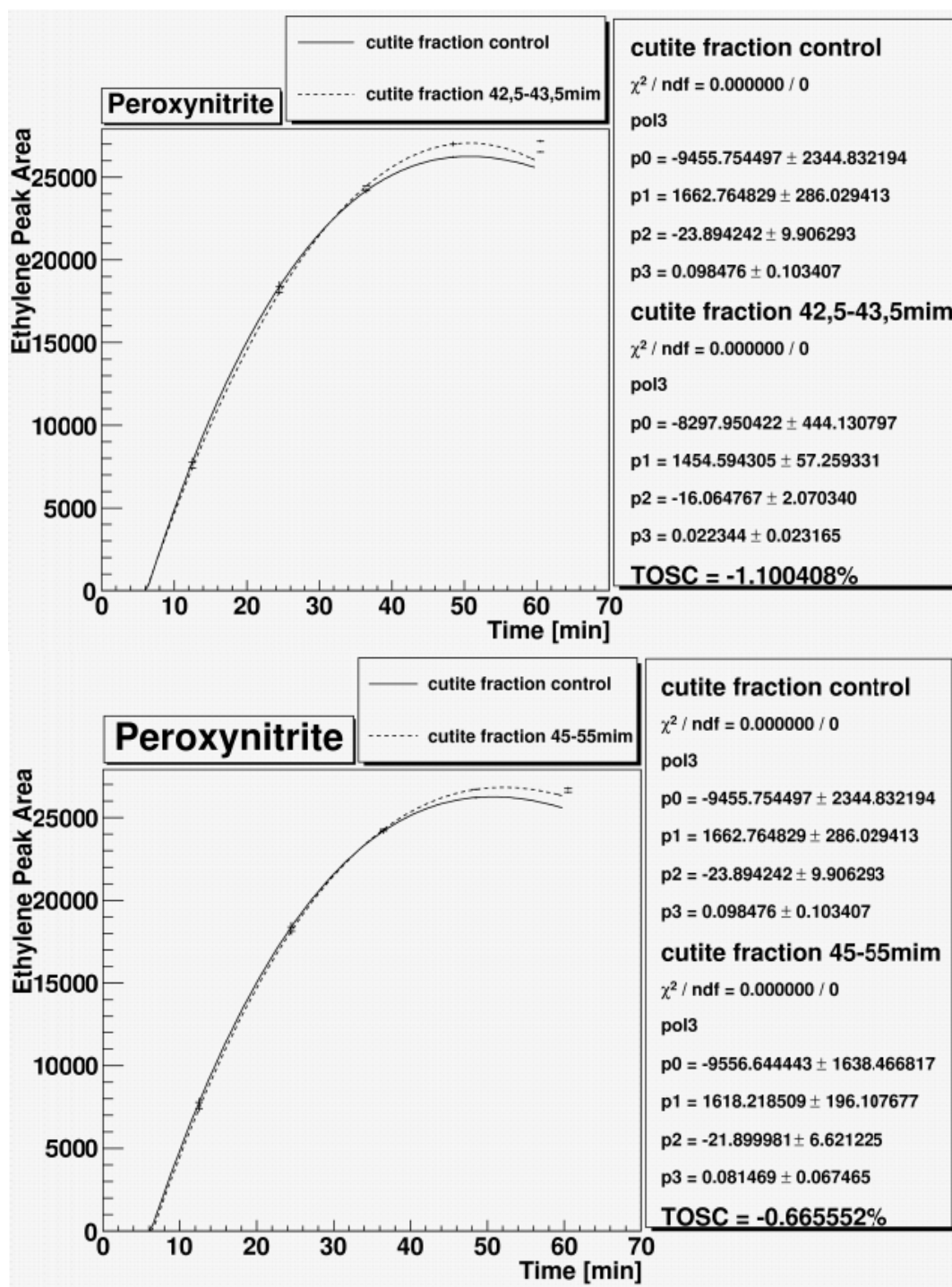


Indx	X-value	Y-value	95 Pred -	95 Pred +	Evaluation
1	0.0018289406	20	13.965892	26.034108	x=Root(y)
2	0.0056973339	50	43.1541	56.8459	x=Root(y)
3	0.013352384	80	73.171367	86.828633	x=Root(y)









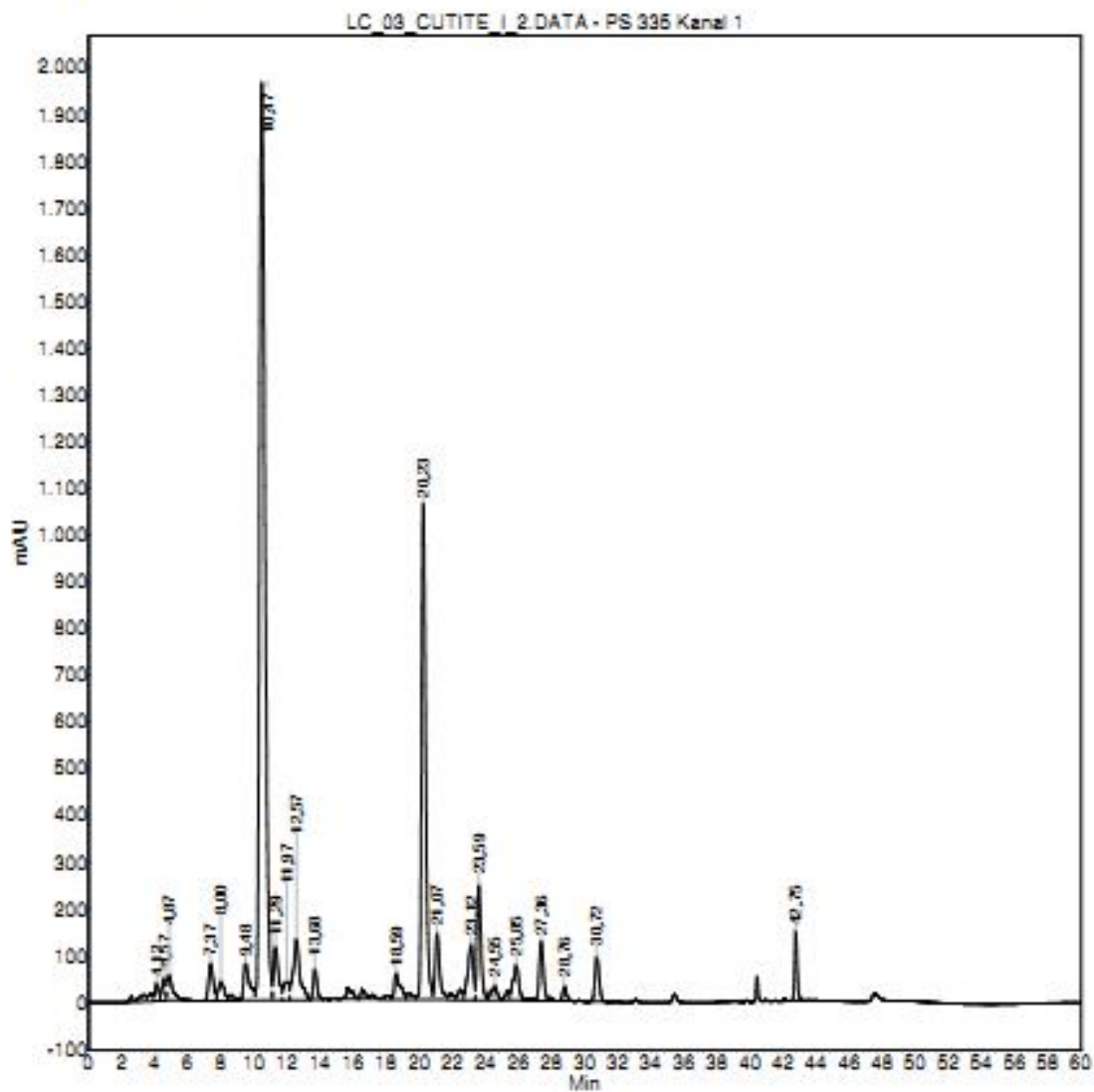
Apêndice E: Dados do experimento de identificação do ácido gálico no extrato dos frutos de cutite.

Übersicht der Standard-Lösungen

System : LC_03
Methode : Jambosa_anthocyanins
User : Andrea Mammeshamer
Probenname : N.A.

Aufnahme am : 29.09.2010 14:13:37
Bearbeitet am : 05.10.2010 10:18:02
Gedruckt am : 05.10.2010 10:58:12

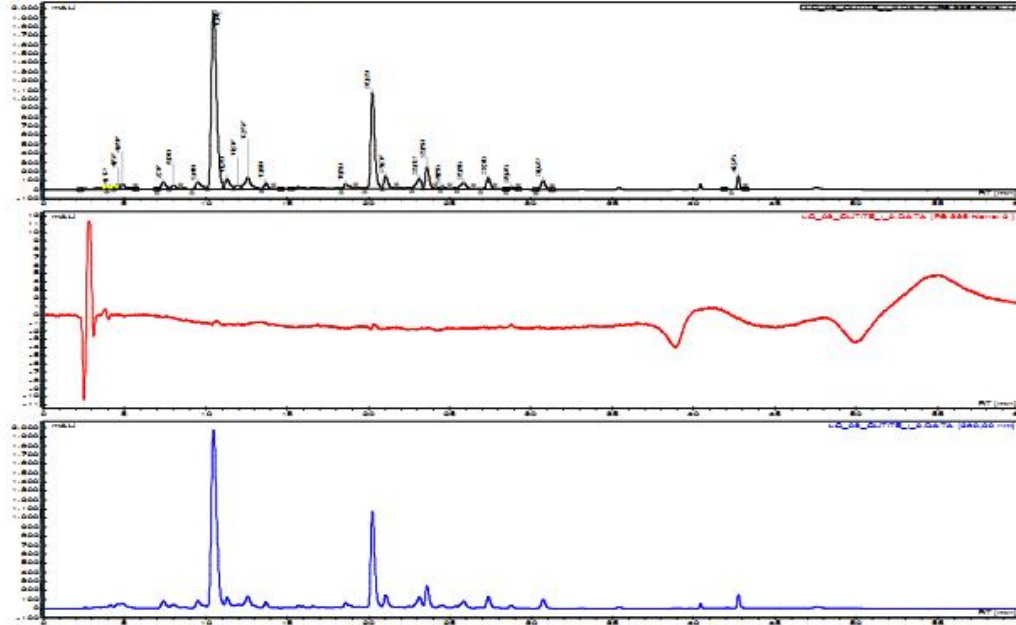
Aque-Böue, Fluss 0,2ml/min



LC_03_OUTITE_I_2
 System : LC_03
 Methode : Jambolao_anthocyanins
 User : Andrea Memmesheimer

Aufnahme am : 29.09.2010 14:13:37
 Bearbeitet am : 05.10.2010 10:18:02
 Gedruckt am : 05.10.2010 10:57:01
 Vial : 25

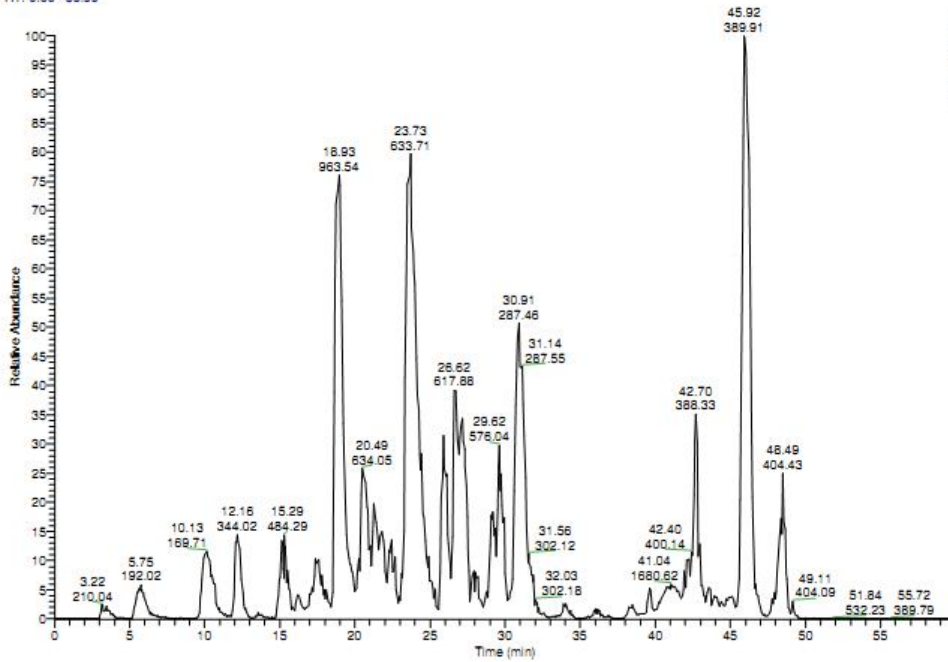
Description: Aqua-Säule, Fluss 0,2ml/min



Vielj010e|Bruno|Cutite

10/1/2010 2:16:17 PM

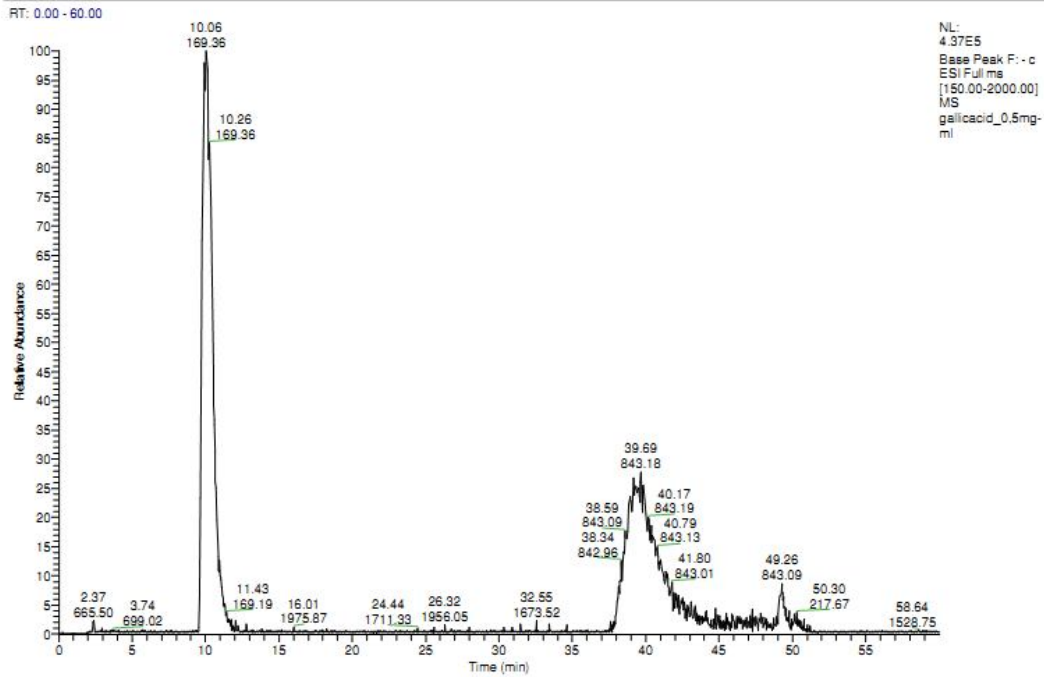
RT: 0.00 - 59.99



NL:
 8.38E6
 Base Peak F:
 - c ESI Full ms
 (150.00-
 2000.00) MS
 Cutite

Yieju310e...gallicacid_0.5mg/ml

10/6/2010 5:17:00 PM

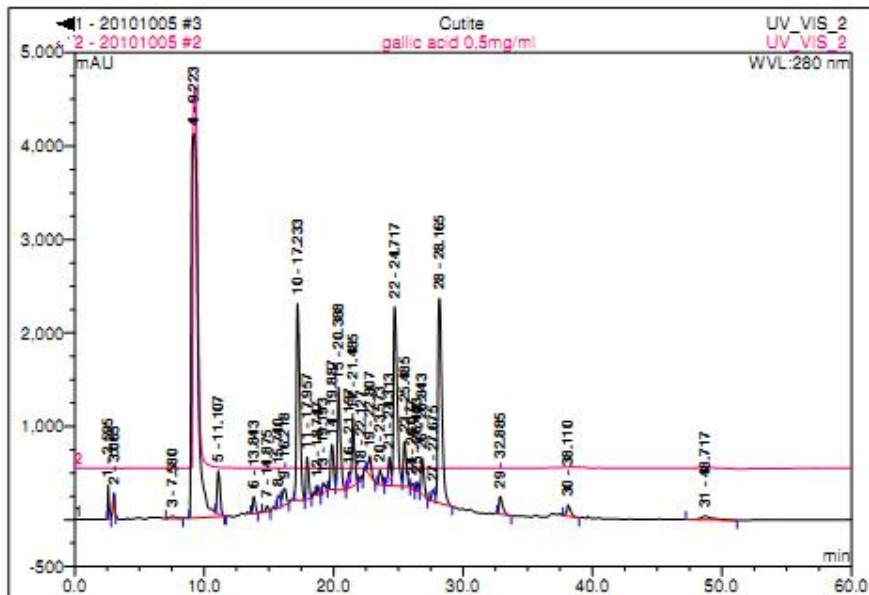


Operator: elju310e Timebase: LMC-XPC1_1 Sequence: 20101005

Page 1-2
10/8/2010 4:51 PM

3 Cutite

Sample Name:	Cutite	Injection Volume:	5.0
Vial Number:	RA3	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Bruno	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Test2	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	10/6/2010 9:28	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	60.00	Sample Amount:	1.0000



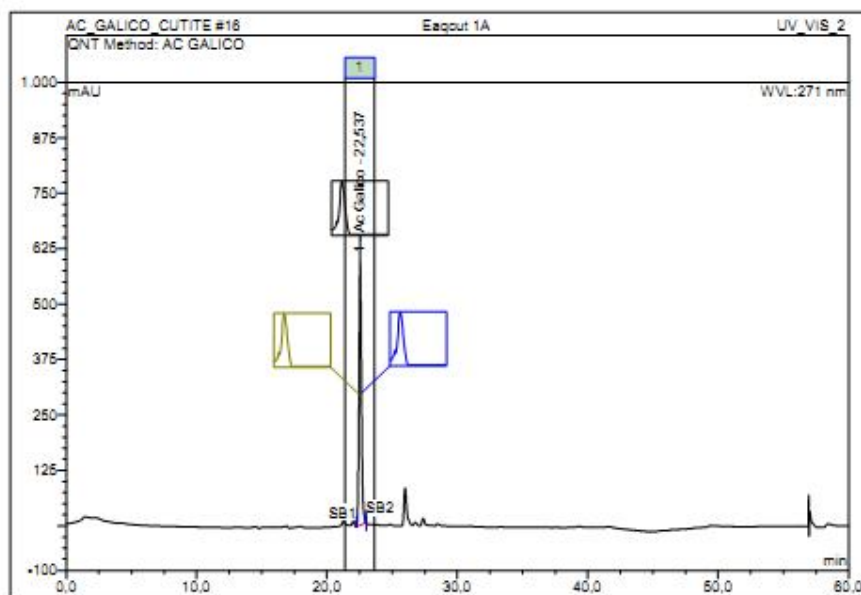
Apêndice F: Dados do experimento de quantificação do ácido gálico no extrato dos frutos de cutite.

Operator:iacen Timebase:LABORATORIO_1 Sequence:AC_GALICO_CUTITE

Page 1-1
18/2/2011 9:16 PM

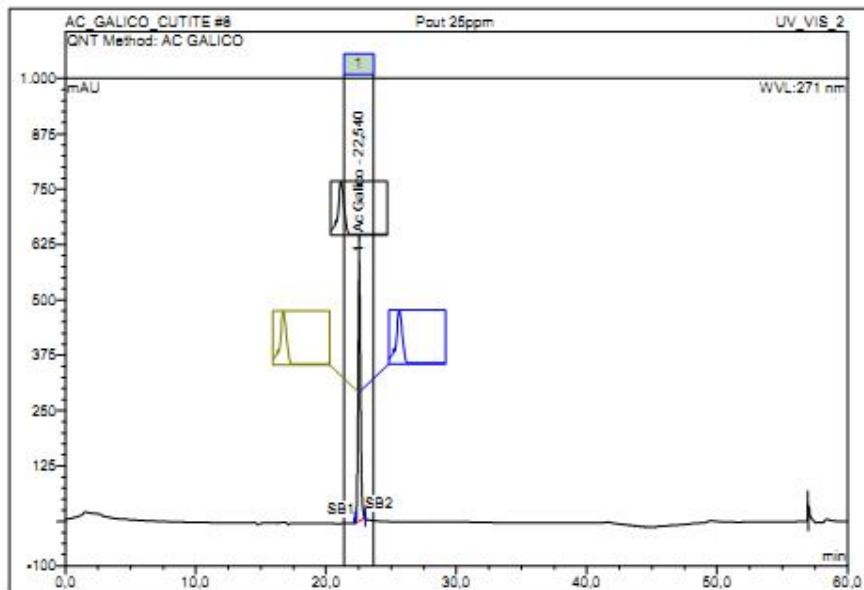
16 Eaquit 1A

Sample Name:	Eaquit 1A	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	RB1	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	271
Control Program:	CUTITE	Bandwidth:	1
Quantif. Method:	AC GALICO	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	11/2/2011 6:58	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	60,00	Sample Amount:	1,0000

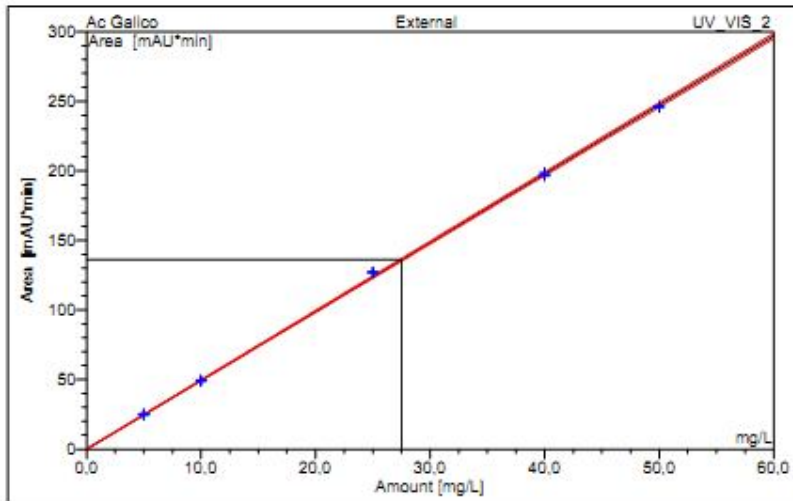


8 Pcut 25ppm

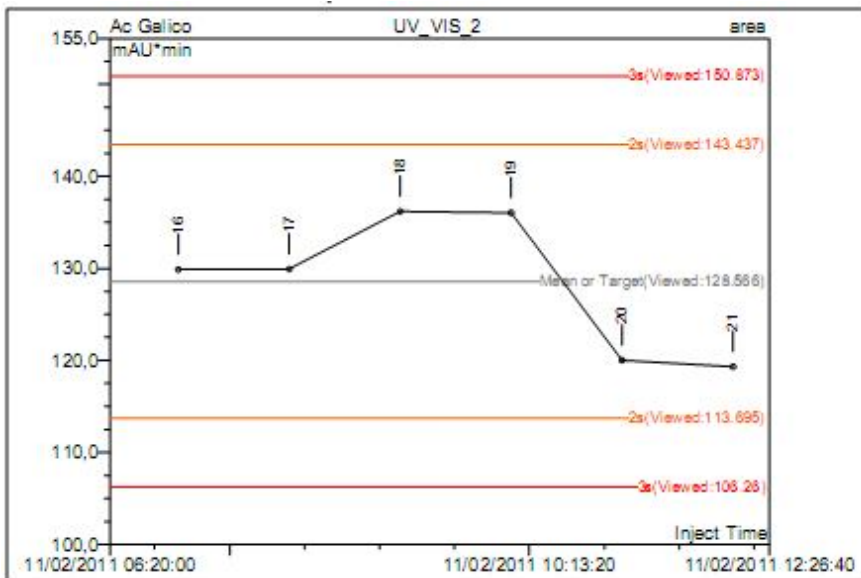
Sample Name:	Pcut 25ppm	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	RA4	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	standard	Wavelength:	271
Control Program:	CUTITE	Bandwidth:	1
Quantif. Method:	AC GALICO	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	10/2/2011 22:44	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	60,00	Sample Amount:	1,0000

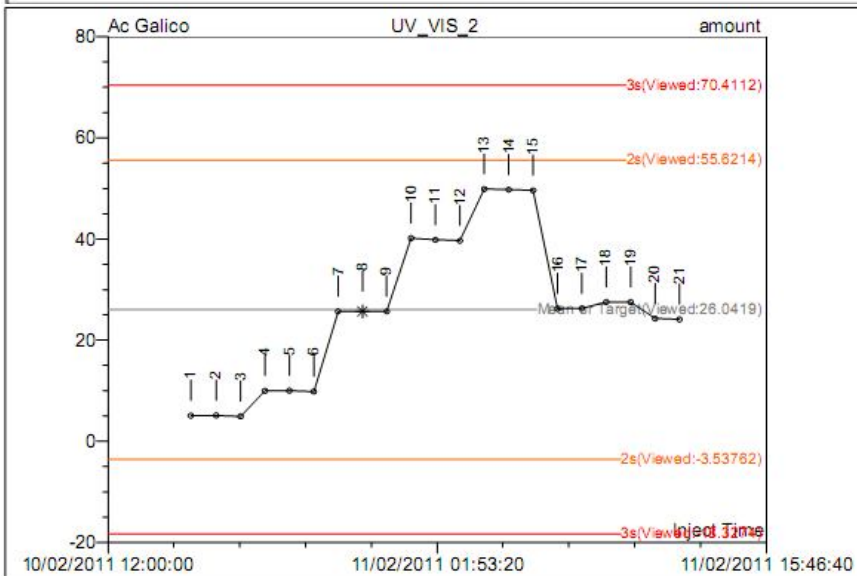
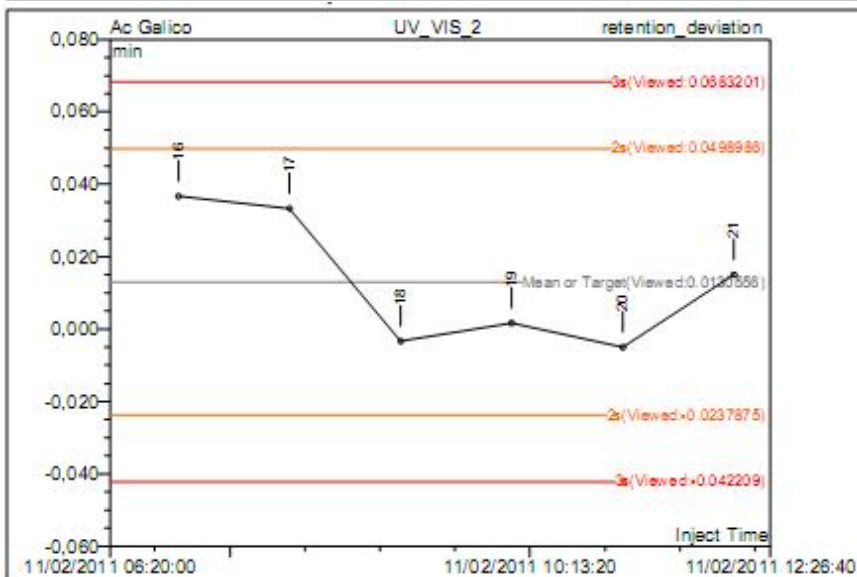
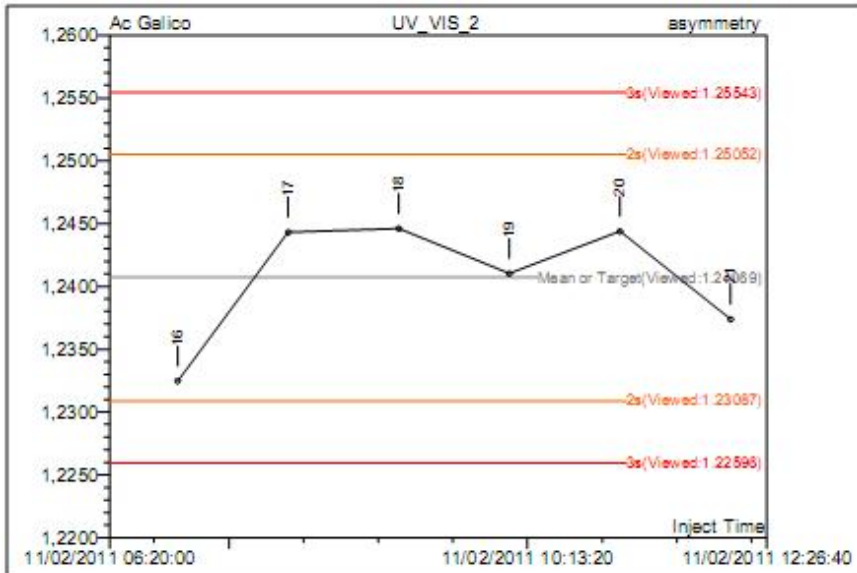


18 Eaqcute 2A			
Sample Name:	Eaqcute 2A	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	RB2	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	271
Control Program:	CUTITE	Bandwidth:	1
Quantif. Method:	AC GALICO	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	11/2/2011 9:01	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	60,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret. Time min	Peak Name	Cal. Type	Points	Coeff. Det. %	Offset	Slope	Curve
1	22.50	Ac Galico	Lin	15	99.9571	0.0000	4.9465	0.0000
Average:					99.9571	0.0000	4.9465	0.0000





Operator:lacen Timebase:LABORATORIO_1 Sequence:AC_GALICO_CUTITE

Page 1-1
18/2/2011 9:10 PM

Sample No.	Sample Name	Ret.Time	Area	Height	Amount	Type	Plates
		min	mAU*min	mAU	mg/L		(EP)
		Ac Galico	Ac Galico	Ac Galico	Ac Galico	Ac Galico	Ac Galico
		UV_VIS 2	UV_VIS 2	UV_VIS 2	UV_VIS 2	UV_VIS 2	UV_VIS 2
1	Pcut 5ppm	22,592	25,0691	116,46	5,0681	BMB	72857
2	Pcut 5ppm	22,542	25,2053	115,54	5,0956	BMB	71563
3	Pcut 5ppm	22,578	24,3715	112,89	4,9271	BMB	72771
4	Pcut 10ppm	22,558	49,3654	228,31	9,9800	BMB	72643
5	Pcut 10ppm	22,500	49,6432	225,30	10,0361	BMB	70468
6	Pcut 10ppm	22,482	48,6334	221,74	9,8320	BMB	71063
7	Pcut 25ppm	22,525	127,1486	584,51	25,7050	BMB	72062
8	Pcut 25ppm	22,540	126,9631	584,75	25,6675	BMB	72158
9	Pcut 25ppm	22,530	127,1298	583,80	25,7012	BMB	71730
10	Pcut 40ppm	22,535	198,6938	914,05	40,1689	BMB	71883
11	Pcut 40ppm	22,540	197,0519	907,48	39,8370	BMB	71915
12	Pcut 40ppm	22,523	196,1870	900,43	39,6622	BMB	71567
13	Pcut 50ppm	22,533	246,6596	1126,90	49,8659	BMB	70676
14	Pcut 50ppm	22,517	246,1649	1124,28	49,7659	BMB	70927
15	Pcut 50ppm	22,502	245,4339	1108,03	49,6182	BMB	69430
16	Eaqcut 1A	22,537	129,8758	592,36	26,2563	BMB	70697
17	Eaqcut 1B	22,533	129,9270	594,27	26,2667	BMB	71032
18	Eaqcut 2A	22,497	136,2061	618,76	27,5361	BMB	70329
19	Eaqcut 2B	22,502	136,0474	617,76	27,5040	BMB	70243
20	Eaqcut 3A	22,495	120,0252	545,85	24,2649	BMB	70436
21	Eaqcut 3B	22,515	119,3153	544,78	24,1214	BMB	71035
Average:		22,527	128,815	588,963	26,042		71309
Rel.Std.Dev:		0,121 %	56,792 %	56,649 %	56,792 %		1,287 %

Apêndice G: Dados do experimento de caracterização do aroma do fruto de cutite.

