

**CURSO SUPERIOR DE BACHARELADO EM QUÍMICA  
COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS**

**KAREN ELBERT LEAL MAZZA**

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ARILOS DOS  
FRUTOS DE *Clusia fluminensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA**

**IFRJ – CAMPUS NILÓPOLIS**

**2015**

KAREN ELBERT LEAL MAZZA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ARILOS DOS  
FRUTOS DE *Clusia fluminensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Bacharelado em Química com  
Atribuições Tecnológicas, como cumprimento  
parcial das exigências para conclusão de curso.  
Orientador: D.Sc. Manuela Cristina Pessanha  
de Araujo Santiago  
Co-Orientador: D.Sc. Helena de Souza  
Torquillo

**IFRJ – CAMPUS NILÓPOLIS  
2º SEMESTRE/2015**

IFRJ – CAMPUS NILÓPOLIS

KAREN ELBERT LEAL MAZZA

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ARILOS DOS  
FRUTOS DE *Clusia fluminensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Bacharelado em Química com  
Atribuições Tecnológicas, como cumprimento  
parcial das exigências para conclusão de curso.

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

Conceito: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
D. Sc. Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago (Orientador/Embrapa)

\_\_\_\_\_  
Profº D. Sc. Helena de Souza Torquilha (Co-Orientador/IFRJ)

\_\_\_\_\_  
Profº D. Sc. Ana Maria Pereira da Silva (IFRJ)

\_\_\_\_\_  
D. Sc. Sidney Pacheco (Embrapa)

*Dedico esta monografia primeiramente a Deus,  
por não me abandonar, e à minha família e amigos por todo apoio.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por olhar sempre por mim, me fornecer a oportunidade de tantas experiências, e de grandes amizades;

À toda minha família, de forma inigualável meus pais, Paulo e Valeria, pois me apoiaram em todos os momentos e ao meu irmão, Kaio, por me aturar nas épocas de provas e trabalhos;

Ao meu namorado, Felipe, pela compreensão e por me estimular a perseverar sempre;

À minha orientadora, Manuela Santiago, por toda doçura e paciência e à co-orientadora Helena Torquillo, pelo auxílio;

Aos pesquisadores D. Sc. Ronel Godoy e D. Sc. Renata Borguini, por terem me proporcionado a oportunidade de aprender as técnicas analíticas da área de Alimentos;

Ao analista Sidney Pacheco, pelo total apoio e incentivo;

À técnica Luzimar Nascimento, por dividir experiências profissionais e pela amizade construída;

Aos “Embrapianos”, estagiários do laboratório, no qual destaco Vítor de Carvalho, Jéssica Rocha, Elaine Braga, Alessandra Duarte e Igor Julião, pois além de serem grandes representantes do IFRJ, campus Nilópolis, com eles as análises foram mais divertidas;

Aos alunos de Pós-Graduação, especialmente Carolina Passos e Amanda Martins, amigas e grandes exemplos;

Às colegas, sobretudo amigas, do IFRJ, Alessandra Carvalho, Ana Carolina, Andreza Santos e Beatriz Luna;

Aos parceiros da UFRJ, onde fiz minha primeira Iniciação Científica, que me ensinaram a apreciar a pesquisa, de maneira especial a Professora Sonia Costa, Professora Ana Maria Landeira; aos queridos amigos e companheiros de bancada, Jacqueline, Lívia, Talita, Yves e Raissa;

Aos estimados professores do IFRJ, que propiciaram um ensino de qualidade e estiveram a disposição sempre que foi preciso, principalmente Ana Maria, Priscilla, Carmelita, Sérgio Henrique, José Celso, Álvaro, Edimar, Priscila, Luiz Fernando, Márcia Angélica e Daniele, aos quais não esquecerei;

Por último, mas não menos importantes, a todos os amigos que se preocuparam comigo neste momento importante.

*“Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”*

*O Pequeno Príncipe. Antoine de Saint-Exupéry.*

## RESUMO

A química de produtos naturais tem como propósito separar, elucidar estruturalmente e caracterizar os compostos presentes nas plantas. A *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, nativa e endêmica do Brasil, conhecida popularmente como abaneiro e mangue-de-praia, pertence à família *Clusiaceae* e é encontrada principalmente na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. O Brasil é o país de maior biodiversidade e muitas de suas espécies são endêmicas. O estudo de tais espécies pode ser relevante para a economia. O objetivo deste trabalho é identificar e quantificar, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), compostos bioativos (vitamina C, carotenoides, flavonoides e ácidos fenólicos) presentes nos arilos do fruto de *Clusia fluminensis*. Para este estudo, os frutos foram coletados na Barra da Tijuca e Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro. Os padrões utilizados foram disponibilizados pela Embrapa Agroindústria de Alimentos. Foram identificados os ácidos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e o ácido 4-hidroxicinâmico; o flavonoide rhamnetina; os carotenoides luteína, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina; e o teor de vitamina C registrado foi  $3,77 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Portanto, com esta avaliação foi possível identificar a presença de compostos bioativos nos arilos do fruto de *Clusia fluminensis*, o que agrega valor ao fruto estudado.

## ABSTRACT

The chemistry of natural products aims to separate, structurally elucidate and characterize the compounds presents in plants. The *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, native and endemic to Brazil, popularly known as *abaneiro* and *mangue-de-praia* belongs to the *Clusiaceae* family, and is found especially in Bahia, Espírito Santo and Rio de Janeiro. Brazil is the country with the greatest biodiversity and many of its species are endemic. The study of such species may be relevant to the economy. The objective of this work is to identify and quantify, by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), bioactive compounds (vitamin C, carotenoids, flavonoids and phenolic acids) presents in the arils of the fruit of *Clusia fluminensis*. For this study, the fruits were collected in Barra da Tijuca and Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro. The standards used were provided by Embrapa Agroindústria de Alimentos. It was identified the phenolic acids: protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid); the flavonoid rhamnetin (7-Methoxyquercetin); carotenoids lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin; and the vitamin C content recorded was 3.77 mg.100g<sup>-1</sup>. Therefore, with this assessment it was possible to identify the presence of bioactive compounds in the arils of the fruit of *Clusia fluminensis*, which adds value to the studied fruit.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de biomas do Brasil.....	15
Figura 2: Desenho da espécie <i>Clusia fluminensis</i> . ....	17
Figura 3: Frutos de <i>Clusia fluminensis</i> em crescimento (A) e maduro (B).....	17
Figura 4: Estrutura do ácido benzoico (A) e do ácido cinâmico (B).....	18
Figura 5: Estrutura do ácido gálico (A) e do ácido cafeico (B).....	19
Figura 6: Estrutura do núcleo fundamental de flavonoides.....	19
Figura 7: Estrutura do ácido ascórbico (vitamina C).....	20
Figura 8: Estrutura do beta caroteno.....	21
Figura 9: Esquema ilustrativo de um sistema cromatográfico líquido.....	24
Figura 10: Sistema cromatográfico modular.....	25
Figura 11: Sistema cromatográfico de unidade integrada.....	25
Figura 12: Padrões dos ácidos fenólicos utilizados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: ácido 4-hidroxibenzoico; 4: ácido cafeico;.....	32
Figura 13: Padrões dos flavonoides utilizados (1: epicatequina; 2: rhamnetina; 3: rutina; 4: narirutina.....	36
Figura 14: Padrões dos flavonoides utilizados (1: hesperidina; 2: diosmina; 3: mirecetina; 4: quercetina; 5: kaempferol).....	37
Figura 15: Equação para quantificação de carotenoides totais.....	42
Figura 16: Cálculo do teor do composto de interesse.....	42
Figura 17: Cálculo do teor das substâncias identificadas na amostra.....	42
Figura 18: Cromatograma dos padrões de ácidos fenólicos utilizados (Pico 1: ácido gálico; pico 2: ácido protocatecuico; pico 3: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 4: ácido cafeico; pico 5: ácido 4-hidroxicinâmico; pico 6: ácido ferúlico; pico 7: ácido sinápico). ....	43
Figura 19: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos livres (Pico 1: ácido protocatecuico; pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).....	44
Figura 20: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos da hidrólise básica (Pico 1: ácido protocatecuico; Pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).....	44
Figura 21: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos da hidrólise ácida (Pico 1: ácido protocatecuico; Pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).....	45
Figura 22: Estrutura da rhamnetina.....	48
Figura 23: Cromatograma e espectro do padrão de rhamnetina.....	49
Figura 24: Cromatograma e espectro da amostra.....	49
Figura 25: Espectro UV-Vis referente ao flavonoide majoritário desconhecido.....	50
Figura 26: Cromatograma e espectro do padrão de ácido ascórbico (vitamina C).....	51
Figura 27: Cromatograma e espectro da amostra.....	52
Figura 28: Estruturas dos carotenoides presentes nos arilos de <i>C. fluminensis</i> .....	53
Figura 29: Cromatograma e espectros da amostra. (Pico 1: luteína; Pico 2: zeaxantina; Pico 3: $\beta$ -criptoxantina). ....	53
Figura 30: Espectros dos carotenoides identificados na amostra.....	54
Figura 31: Cromatograma da segunda extração de carotenoides (pico 1: zeaxantina, pico 2: $\beta$ -criptoxantina, pico 3: zeaxantina*, pico 4: zeaxantina*, pico 5: zeaxantina*). ....	55



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos ácidos fenólicos.....	35
Tabela 2: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos flavonoides .....	39
Tabela 3: Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos carotenoides.....	41
Tabela 4: Tempos de retenção das substâncias identificadas na amostra e dos respectivos padrões.....	45
Tabela 5: Substâncias identificadas na amostra e seus respectivos espectros.....	46
Tabela 6: Quantificação dos ácidos fenólicos identificados.....	47
Tabela 7: Dados das curvas analíticas .....	47
Tabela 8: Comparação entre os teores de vitamina C da <i>Clusia fluminensis</i> com os da laranja pêra e do jambo em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . .....	51
Tabela 9: Dados da curva analítica.....	52
Tabela 10: Quantificação de carotenoides da <i>C. fluminensis</i> em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .....	56
Tabela 11: Comparação entre os teores de carotenoides da <i>C. fluminensis</i> com milho em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .....	56

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

°C - graus Celsius

% - porcentagem

$A_{1cm}^{1\%}$  - absorvidade molar

abs - absorvância: valor da leitura no espectrofotômetro

AFL - ácidos fenólicos livres

BHT - butil hidroxi tolueno

C<sub>18</sub> - Fase estacionária reversa octadecilsilano

C<sub>30</sub> - Fase estacionária com estrutura alifática de 30 carbonos ligada ao grupamento silanol

CL - Cromatografia líquida

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

cm - Unidade de comprimento: centímetro

CSI - Crime Scene Investigation: série de TV

D.Sc. - Doutor em ciências

DAD - arranjo de fotodiodo

dil = diluição

FE - fase estacionária

FM - fase móvel

g - unidade de massa: grama

g.L<sup>-1</sup> - Unidade de concentração: grama por litro

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Ácido fosfórico

HA - hidrólise ácida

HB - hidrólise básica

HCl - Ácido clorídrico.

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDR - ingestão diária recomendada

L - Unidade de volume: litro

m - Unidade de comprimento: metro.

M - Unidade de concentração molar

mg.100g<sup>-1</sup> - Unidade de concentração: miligrama por 100 grama

mL - Unidade de volume: mililitro

mL.h<sup>-1</sup> - Unidade de fluxo: mililitros por hora.

mL.L<sup>-1</sup> - Unidade de concentração: mililitro por litro

mL.min<sup>-1</sup> - Unidade de fluxo: mililitros por minuto

mm - Unidade de comprimento: milímetro

N<sub>2</sub> - Gás nitrogênio

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Unidade de comprimento: nanômetro

PA - Grau de pureza de produtos químicos: para análise

TV - televisão

UV-Vis - ultravioleta e visível

V - volume

v/v - volume por volume

µL - Unidade de volume: microlitro

µm - Unidade de comprimento: micrometros

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	13
2 – DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1 – BIODIVERSIDADE BRASILEIRA.....	14
2.2 – FAMÍLIA <i>CLUSIACEAE</i> .....	15
2.3 – GÊNERO <i>CLUSIA</i> .....	16
2.4 – A ESPÉCIE <i>Clusia fluminensis</i> Planch. & Triana.....	16
2.5 – COMPOSTOS BIOATIVOS.....	18
2.5.1 – ÁCIDOS FENÓLICOS.....	18
2.5.2 – FLAVONOIDES.....	19
2.5.3 – VITAMINA C.....	20
2.5.4 – CAROTENOIDES.....	21
2.6 – A CROMATOGRAFIA.....	22
2.6.1 – BREVE HISTÓRICO.....	22
2.6.2 – TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	22
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 – REAGENTES E SOLVENTES.....	26
3.2 – EQUIPAMENTOS E MATERIAL.....	27
4 – EXPERIMENTAL.....	29
4.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	29
4.2 – PREPARO DA AMOSTRA.....	30
4.3 – ÁCIDOS FENÓLICOS.....	31
4.3.1 – PADRÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	31
4.3.2 – ANÁLISE DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	33
4.3.2.1 – ÁCIDOS FENÓLICOS LIVRES.....	33
4.3.2.2 – HIDRÓLISE BÁSICA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NÃO LIVRES.....	33
4.3.2.3 – HIDRÓLISE ÁCIDA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NÃO LIVRES.....	34
4.3.3 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	34
4.3.4 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	35

4.4 – FLAVONOIDES .....	35
4.4.1 – PADRÃO DE FLAVONOIDES .....	35
4.4.2 – ANÁLISE QUALITATIVA DE FLAVONOIDES .....	38
4.4.3 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO DA ANÁLISE DE FLAVONOIDES .....	38
4.5 – VITAMINA C .....	39
4.5.1 – PADRÃO DE VITAMINA C .....	39
4.5.2 – ANÁLISE DE VITAMINA C .....	39
4.5.3 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO DA ANÁLISE DE VITAMINA C .....	40
4.5.4 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINA C .....	40
4.6 – CAROTENOIDES .....	40
4.6.1 – PADRÃO DE CAROTENOIDES .....	40
4.6.2 – ANÁLISE DE CAROTENOIDES .....	40
4.6.3 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE CAROTENOIDES.....	41
4.6.4 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES.....	42
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1 – ÁCIDOS FENÓLICOS .....	43
5.1.1 – CURVAS ANALÍTICAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	47
5.2 – FLAVONOIDES .....	48
5.3 – VITAMINA C .....	50
5.3.1 – CURVA ANALÍTICA DE VITAMINA C .....	52
5.4 – CAROTENOIDES .....	52
6 – CONCLUSÕES.....	57
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais é conhecida pelo homem desde a antiguidade. No Brasil, o comércio destes produtos, as populares especiarias, são de grande importância na história (BARREIRO, 2006).

Alguns organismos, como animais e microrganismos, precisam consumir as plantas para obter certas substâncias não sintetizadas por eles. Estes compostos orgânicos formados pelas plantas podem ser metabólitos primários ou metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os compostos bioativos (DEWICK, 2002; SIMÕES, 2003).

A fim de separar, identificar e quantificar os componentes de espécies químicas, podem ser utilizadas certas tecnologias, como a cromatografia. A química de produtos naturais tem como propósito separar, elucidar estruturalmente e caracterizar os compostos presentes nas plantas (COLLINS, 2006; CUNHA, 2013).

A *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, popularmente conhecida como abaneiro e mangue-de-praia, pertence à família *Clusiaceae*. Esta espécie é bastante empregada como planta ornamental. Ela é nativa e endêmica do Brasil, tendo grande ocorrência na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (BRASIL, 1999; PEREIRA, 2010; SILVA, 2012; BITTRICH, 2014).

O fruto da espécie em questão chama atenção por ser bastante consumido por animais, além de possuir arilos com cor característica da presença de carotenoides.

Sendo o Brasil detentor da maior biodiversidade do planeta, muitas espécies do país são endêmicas, como os frutos: abacaxi, caju e açaí, que possuem destaque na economia global. O estudo de outros frutos originários da flora brasileira torna-se importante, pois além de explorar a diversidade observada no país, agrega informações sobre a composição química dos mesmos, possibilitando uma maior relevância tanto no cenário econômico nacional quanto mundial (BRASIL, 2014).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar os compostos bioativos (vitamina C, carotenoides, flavonoides e ácidos fenólicos) presentes nos arilos do fruto de *Clusia fluminensis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

## 2. DESENVOLVIMENTO

A partir das plantas, muitos compostos orgânicos podem ser sintetizados por meio de materiais obtidos na fotossíntese. Os vegetais englobam grande variedade de compostos químicos com propriedades diversas. Eles podem ser metabólitos primários, responsáveis por manter a vida do organismo produtor, e metabólitos secundários, que atuam na adaptação do organismo ao meio, como por exemplo, a defesa contra agentes externos ou para perpetuação das espécies por meio de dispersores de sementes ou polinizadores (DEWICK, 2002; SIMÕES, 2003).

Uma das principais características dos compostos químicos das plantas é a atividade antioxidante, e tal propriedade é encontrada nos compostos bioativos estudados neste trabalho (SILVA, 2010).

Tendo em vista o arsenal químico que pode ser fornecido pelas plantas, é notada a relevância do Brasil na contribuição ao desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, uma vez que este é o maior detentor da biodiversidade global (BRASIL, 2014).

### 2.1 BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Entende-se por biodiversidade a variedade de organismos vivos existentes, seja qual for a origem, abrangendo os ecossistemas onde habitam, sejam terrestres, marinhos ou de outros ambientes aquáticos, envolvendo também a diversidade dentro de espécies, entre espécies e ecossistemas (BRASIL, 1994).

O Brasil é o país com maior biodiversidade, a estimativa é que existam mais de 2 milhões de espécies vegetais, animais e de microrganismos. Ele é um país de território extenso, em que há grande variação climática, o que resulta em diferentes zonas biogeográficas e biomas (SIMÕES, 2003; BRASIL, 2014).

A figura 1 (p. 15) representa o Brasil e seus respectivos biomas, sendo eles: a Floresta Amazônica; o Pantanal; o Cerrado; a Caatinga; os Pampas; e a Mata Atlântica, sendo este último, o bioma em que a *Clusia fluminensis* está distribuída (BRASIL, 2014).





Figura 1: Mapa de biomas do Brasil.

Fonte: IBGE, 2004.

No Brasil há muitas espécies endêmicas com ampla participação na economia, dentre as quais podemos destacar o abacaxi, amendoim, castanha do Pará, aipim, caju e carnaúba. Devido tamanha diversidade biológica, é preconizado o estudo de outros frutos endêmicos da flora brasileira, a fim de que a riqueza de biomas do país possa ser explorada, com a possibilidade de posterior participação no mercado econômico mundial (BRASIL, 2014).

## 2.2 FAMÍLIA *CLUSIACEAE*

A família *Clusiaceae*, também chamada de *Guttiferae*, é quase exclusivamente de clima tropical, e abrange cerca de 40 gêneros e 1200 espécies. Estudos fitoquímicos mostraram que a família *Clusiaceae* é rica em metabólitos secundários, tais como xantonas, triterpenoides, flavonoides, lactonas e ácidos orgânicos (CUESTA-RUBIO, 2005).

### 2.3 GÊNERO CLUSIA

De acordo com Araújo e Scarano (2007) *apud* Gallegos (2015), Lüttge (2007) *apud* Gallegos (2015), Lippok (2013) *apud* Gallegos (2015), o gênero *Clusia* tem ampla distribuição na América do Sul e Central, podendo ser encontrado em diversos habitats, desde floresta tropical à savana. As suas sementes comumente são dispersas pelos animais. Espécies de *Clusia* são tolerantes à sombra, além disso, também têm capacidade de crescer em ambientes abertos.

### 2.4 A ESPÉCIE *Clusia fluminensis* Planch. & Triana

No Brasil, a espécie *Clusia fluminensis* (Figura 2, p. 17), tem como sinônimo heterotípico *Clusia ildefonsiana* A. Rich. ex Planch. & Triana, está distribuída principalmente na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, tendo por domínio geográfico a Mata Atlântica. Esta espécie é nativa e endêmica do Brasil, seu tipo de vegetação é de floresta ombrófila e restinga. Conhecida popularmente como abaneiro ou mangue-da-praia, esta espécie é utilizada como ornamental, se apresentando em forma de arbustos ou árvores, geralmente podendo alcançar de 2 a 3 metros de altura (PEREIRA, 2010; BITTRICH, 2014).

Seus frutos são verdes e possuem cápsulas contendo arilos, membrana de cor alaranjada onde as sementes encontram-se dispersas, como mostra a figura 3 (p. 17). Por apresentar coloração chamativa, é esta membrana a parte consumida por aves (CORREIA, 2013).

Não foram encontradas muitas informações referentes à composição dos frutos da espécie estudada na literatura.

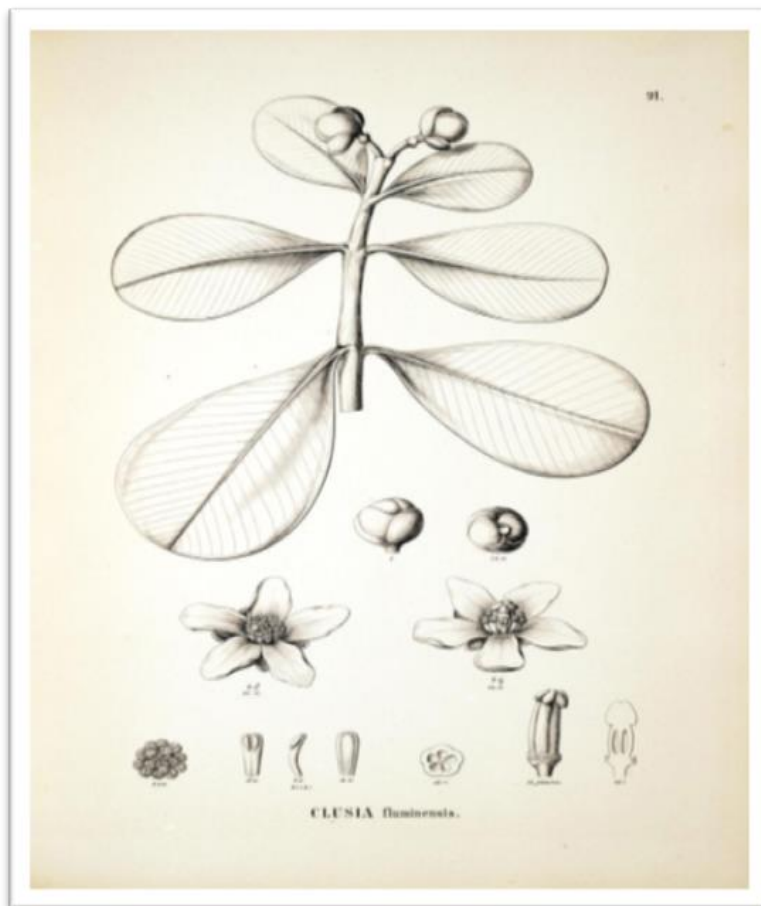


Figura 2: Desenho da espécie *Clusia fluminensis*.

Fonte: FLORA BRASILIENSIS, 1888.



Figura 3: Frutos de *Clusia fluminensis* em crescimento (A) e maduro (B).

Fonte: Foto do autor (A); Foto de Sidney Pacheco (B).

## 2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS

### 2.5.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos se caracterizam por possuir ao menos um anel aromático, que tem no mínimo um hidrogênio substituído por uma hidroxila (ANGELO, 2007).

A maioria dos microrganismos e os vegetais podem sintetizar compostos fenólicos, porém é conhecido que os animais não possuem a capacidade de sintetizar anéis aromáticos, sendo necessária a ingestão destas substâncias em sua dieta (SIMÕES, 2003).

São chamados ácidos fenólicos aqueles que derivam do ácido benzoico (C6-C1) (Figura 4 A) ou do ácido cinâmico (C6-C3) (Figura 4 B). O que os difere é a posição e número de metoxilas ou hidroxilas presentes no anel aromático (SOARES, 2002; MATTILA 2002; NEO, 2010).

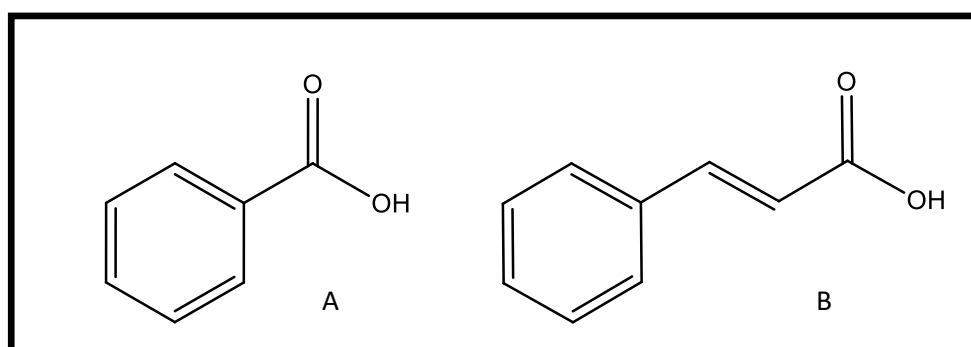


Figura 4: Estrutura do ácido benzoico (A) e do ácido cinâmico (B).

Um exemplo de derivado do ácido benzoico é o ácido gálico (Figura 5 A, p. 19), já como derivado do ácido cinâmico podemos citar o ácido cafeico (Figura 5 B, p. 19) (MATTILA, 2002).

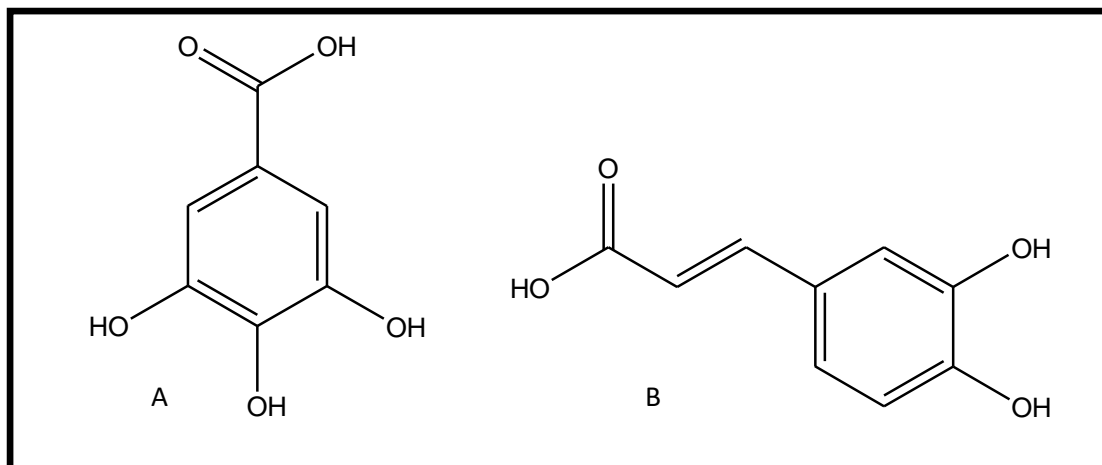


Figura 5: Estrutura do ácido gálico (A) e do ácido cafeico (B).

### 2.5.2 FLAVONOIDES

Amplamente distribuídos no reino vegetal, os flavonoides são uma das mais importantes e diversificadas classes de produtos naturais contendo grupos fenólicos. Derivados das vias acetato e ácido chiquímico, eles possuem basicamente uma estrutura C6-C3-C6, com dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, conforme estrutura fundamental apresentada na figura 6. Dependendo da posição, número e grupamentos presentes no anel C, são originadas as subclasses de flavonoides (flavonas, flavonóis, antocianidinas, isoflavonas, etc.). São frequentemente ligados a açúcares, podendo então ser chamados de *O*-heterosídeos (quando a parte glicosídica é ligada à uma hidroxila) e *C*-heterosídeos (quando a parte glicosídica é ligada à um carbono). Quando não se ligam a açúcares são chamados agliconas (SOARES, 2002; ANGELO, 2007; CUNHA, 2013).

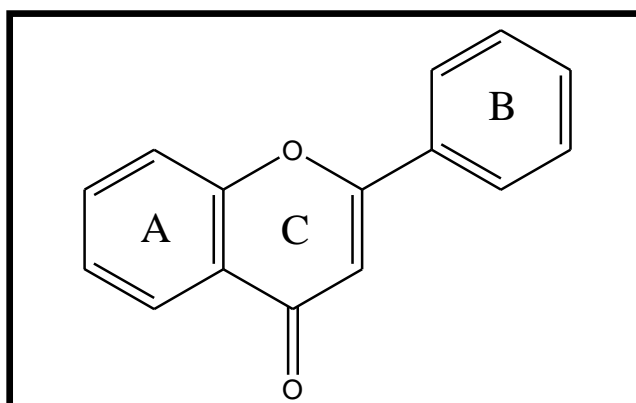


Figura 6: Estrutura do núcleo fundamental de flavonoides.

Geralmente as agliconas são cristais amarelos pouco solúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade, enquanto os heterosídeos são bastante solúveis em água e outros solventes polares. Isto ocorre devido ao aumento da polaridade da molécula (a presença de hidroxilas na estrutura dos açúcares) (SIMÕES, 2003).

### 2.5.3 VITAMINA C

A maioria dos animais pode sintetizar a vitamina C, enquanto outros, como humanos, morcegos e certas aves, não podem, e dessa forma precisam incluir a ingestão desta vitamina em sua dieta (DEWICK, 2002; ROSA, 2007).

A vitamina C, nome dado ao ácido 2,3-enediol-*L*-gulônico, também conhecido por ácido ascórbico (Figura 7), é um ótimo antioxidante e possui fórmula química  $C_6H_8O_6$ . O ácido ascórbico está presente em diversos frutos e legumes, como por exemplo, na goiaba, no pimentão e, principalmente, na acerola. Esta substância é um ácido bastante solúvel em água e se degrada facilmente em contato com o ar. Ela é primordial para a formação de colágeno, proteína principal para a estrutura da pele, tendões, ossos, e ligamentos. Sendo assim, a carência de vitamina C leva a baixos níveis de hidroxilação desta proteína, podendo causar o escorbuto, doença que tem como características fragilidade nos vasos sanguíneos, dores nos músculos, ferimentos na pele, perda dentária e também sangramento na gengiva (DEWICK, 2002; ROSA, 2007; PEREIRA, 2008; TACO, 2011).

Dentre os frutos da flora brasileira conhecidos pela presença de vitamina C, a laranja pêra tem destaque, pois é a mais consumida dentre os brasileiros (IBGE, 2009).

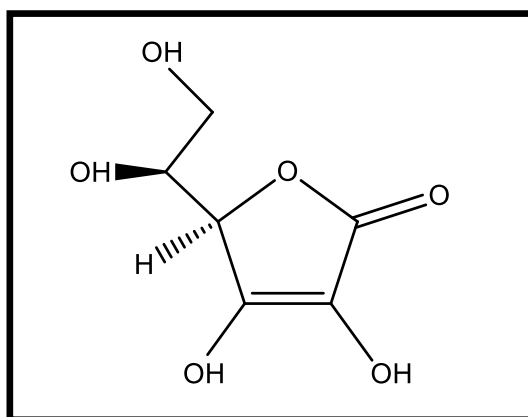


Figura 7: Estrutura do ácido ascórbico (vitamina C).

#### 2.5.4 CAROTENOIDES

Os carotenoides são tetraterpenos (C<sub>40</sub>), uma família de compostos em que fazem parte mais de 600 compostos (DEWICK, 2002; KRINSKY, 2005).

Solúveis em gordura, os carotenoides são um dos grupos responsáveis pela coloração de muitas espécies de plantas, gerando as cores vermelhas, amarelas e laranjas, comumente encontradas em vegetais, tais como frutas, legumes e até mesmo nos vegetais verde-escuros, como o espinafre, onde podem estar mascarados devido a cor escura. Os carotenoides que apresentam maior abundância são: licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, beta-criptoxantina, alfa-caroteno, gama-caroteno e beta-caroteno (Figura 8), sendo o último, o mais estudado, e um dos mais consumidos em nossa dieta (KRINSKY, 2005; SCHMITZ, 1991 e ENGER, 1996 *apud* KRINSKY, 2005; SASS-KISS, 2005).

Diferentemente das plantas, os animais são incapazes de biossintetizar carotenoides, dependendo da sua ingestão na dieta, podendo ser ou não seletivamente absorvidos ou até convertidos em vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Outra característica importante de alguns carotenoides é a relação com a visão. A luteína e zeaxantina apresentam esta função. Elas se encontram na mácula da retina, e tem papel de proteger as células nervosas encarregadas pela visão das cores. Também estão presentes na região do cristalino, em que já foi relatada a redução do risco de catarata (KRINSKY & JOHNSON, 2005 *apud* PACHECO, 2009; PACHECO, 2014).

Com extenso território e um clima que propicia a presença de inúmeras fontes de carotenoides, o Brasil pode ser considerado um dos países com mais recursos naturais disponíveis para produzir esta classe de substâncias (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

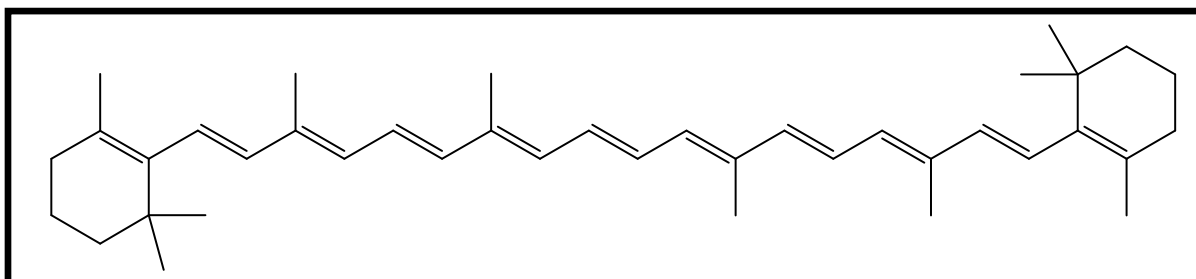


Figura 8: Estrutura do beta caroteno.

## 2.6 A CROMATOGRAFIA

### 2.6.1 BREVE HISTÓRICO

O termo “cromatografia”, palavra derivada do grego *chroma* (cor) e *graphein* (escrever), surgiu em 1906, com os trabalhos de Mikhael Tswett, que fez a separação de substâncias coloridas do extrato de folhas verdes, com o uso de um tubo de vidro recheado com carbonato de cálcio e carregando os componentes com éter de petróleo. Apesar de o processo não depender da cor, mas apenas utilizá-la para haver melhor facilidade em identificar os diferentes componentes separados (COLLINS, 2006; SKOOG, 2006; LANÇAS, 2009).

### 2.6.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Há diferentes técnicas cromatográficas. Elas podem ser em papel, cromatografia em camada delgada, ou em tubos (geralmente de vidro ou metal), chamada cromatografia em coluna, que se divide em outras três técnicas: a cromatografia líquida (fase móvel é um líquido), a cromatografia gasosa (fase móvel é um gás inerte) e a cromatografia com fluido supercrítico (fase móvel é um fluido supercrítico) (DEGANI, 1998).

A cromatografia é uma técnica com destaque devido à capacidade de separação, de componentes químicos de uma mistura e também de identificação e quantificação, quando são utilizados padrões analíticos para comparação. Neste método físico-químico, a separação ocorre através da distribuição dos componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Basicamente, o que acontece é que há uma fase estacionária (FE) e outra fase móvel (FM), em que a FE é responsável por reter os componentes que tem mais afinidade com ela, enquanto a fase móvel carrega os componentes em que a afinidade é maior por ela (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida se subdivide em: cromatografia líquida clássica (CL) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DEGANI, 1998; COLLINS, 2006; LANÇAS, 2009).

➤ A CL é realizada a pressão atmosférica ou baixas pressões, e faz uso de coluna de vidro, tubos abertos contendo recheios que se diferem, alterando o mecanismo



de separação, que podem ser: adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho (DEGANI, 1998).

➤ Na CLAE, a FM é eluída sob pressão. Sua coluna é fechada e possui um recheio de partículas muito pequenas (comumente 2,4 a 5  $\mu\text{m}$ ). A amostra a ser separada deve ser solúvel na FM (COLLINS, 2006).

➤ A CLAE é reconhecida por sua alta resolução, eficiência e detectabilidade. Ela possui uma série de vantagens, como a separação de misturas complexas, de compostos tanto orgânicos como inorgânicos, com a utilização de apenas alguns miligramas de amostra e curto tempo de análise, podendo levar poucas horas ou apenas alguns minutos (SKOOG, 2006; COLLINS, 2006).

A CLAE é uma ferramenta analítica com aplicações em diversas áreas, como na bioquímica, em ciências ambientais, em química farmacológica, na toxicologia, nas ciências dos alimentos ou até em ciências forenses. Skoog (2006) chama atenção para o uso frequente desta técnica na TV: “Os laboratórios criminais e os programas de televisão policiais e forenses, como CSI, CSI Miami, Crossing Jordan e Law and Order, frequentemente empregam a CLAE no processo de obtenção de evidências criminais.”

Vale a pena ressaltar que a CLAE é a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada dos últimos 40 anos, perdendo apenas para balança e pHmetro, em presença nos laboratórios (ENGELHARDT, 2004 *apud* PACHECO, 2014; MALDANER, 2009).

Os cromatógrafos utilizados para análises podem ser um sistema modular ou uma unidade integrada (COLLINS, 2006).

A figura 9 (p. 24) ilustra um sistema cromatográfico.

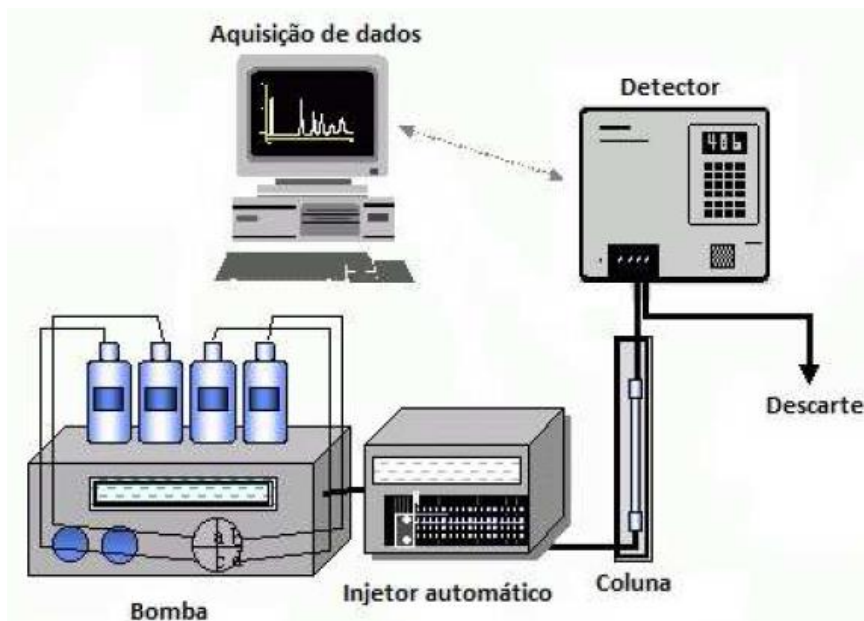


Figura 9: Esquema ilustrativo de um sistema cromatográfico líquido.

Fonte: SANTIAGO (2014).

A FM fica em um reservatório para ser bombeada, com vazão determinada, através da coluna, com o auxílio de uma bomba. A amostra é introduzida por uma válvula de injeção, onde a FM a carrega pela coluna. Na coluna, são eluídas primeiro as substâncias com maior afinidade pela FM e ficam mais retidos os compostos que interagem mais com a FE. Conforme a FM com as substâncias da amostra eluem da coluna, há a passagem pelo detector, que geram um sinal proporcional à concentração do soluto e que ao ser enviado para um sistema de aquisição de dados, produz um cromatograma (COLLINS, 2006; LANÇAS, 2009).

Como fora supracitado, para um cromatograma ser gerado, é necessária a presença de um detector. De acordo com a natureza da amostra escolhe-se o detector mais adequado (SKOOG, 2006).

Na CLAE, os detectores mais utilizados são o de absorção da radiação ultravioleta ou visível (UV-Vis). Estes demandam substâncias com absorção de luz, em comprimento de onda determinado, em que as substâncias mais adequadas são as que possuem uma ou mais ligações duplas (com o aumento da insaturação ou conjugação, aumenta-se a absorvidade), e também as que têm elétrons não ligados ou não compartilhados (COLLINS, 2006; LANÇAS, 2009).

As figuras 10 e 11 são fotos dos sistemas cromatográficos do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos utilizados na realização deste trabalho.



Figura 10: Sistema cromatográfico modular.



Figura 11: Sistema cromatográfico de unidade integrada.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises realizadas na execução do presente trabalho têm como base os métodos de Mattila (2002) para ácidos fenólicos, Klump (2001) para flavonoides, Rosa (2007) para vitamina C e Rodriguez-Amaya (2001) para carotenoides.

Todas as análises mencionadas acima foram executadas no laboratório de Cromatografia Líquida, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada na cidade do Rio de Janeiro.

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

- Acetato de etila grau HPLC;
- Acetona grau HPLC;
- Acetonitrila grau HPLC;
- Ácido acético concentrado PA
- Ácido clorídrico concentrado PA;
- Ácido fórmico concentrado PA;
- Ácido Sulfúrico concentrado PA;
- Água Ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>) recém recolhida;
- BHT (butil hidroxil tolueno);
- Celite 545;
- Cloreto de Sódio PA;
- Éter de petróleo grau HPLC;
- Éter Etílico grau HPLC;
- Hidróxido de Sódio;
- Metanol grau HPLC;
- Óxido de Magnésio PA;
- Padrão de ácido *L*-ascórbico (99% pureza) – Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
- Padrões de flavonoides (epicatequina, rutina, rhamnetina, narirutina, mirecetina, diosmina, hesperidina, quercetina e kaempferol) (99% pureza) – Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;

- Padrões de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocateico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido ferúlico e ácido sinápico) (99% pureza) – Sigma-Aldrich®;
- Sulfato de sódio anidro PA.

### 3.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAL

- Agitador tipo vórtex modelo Genie 2 – Scientific Industries®;
- Ar comprimido microfiltrado;
- Balança analítica de quatro casas decimais (Marte® AY220);
- Balões volumétricos de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 2 L;
- Banho de ultrassom - Branson 2210;
- Banho-maria com agitação (Gyromax™ 929);
- Becheres de 25 mL, 50 mL e 100 mL;
- Centrífuga (Hsiangtai®);
- Coluna Cromatográfica YMC *Carotenoid* C<sub>30</sub> S-3 de 4,6 mm x 250 mm; 3 mm;
- Coluna Cromatográfica de troca iônica forma ácida BIO RAD HPX 87H (7,8 x 300 mm);
- Coluna Cromatográfica Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 µm)
- Cromatógrafo Líquido com forno para colunas e injetor automático Alliance® 2695 Waters®; Detector de Arranjo de Fotodiodos Waters® W2996;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Modular W600 com Detector de Arranjo de Fotodiodos Waters® W2996; injetor automático modelo 717 *plus* - Waters®;
- Espátula de aço inox;
- Espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800);
- Frascos de vidro âmbar;
- Funil de separação de 500 mL;
- Funil de vidro sinterizado número de 150 mL;
- Funis raiados de vidro;
- Gral e pistilo de porcelana;
- Kitassato de 250 e 500 mL;

- Lã de vidro (fibra média);
- Medidor de Celite (dosador de aproximadamente 3 g);
- Microcentrífuga - Hsiangtai®;
- Nitrogênio grau 4.6 – White Martins®;
- Papel absorvente para limpeza de ponteiros;
- Papel de filtro qualitativo;
- pHmetro (Bel®);
- Pipetadores automáticos capacidade de 10-100 µL e 100-1000 µL;
- Pipetador de borracha;
- Ponteiros para pipeta automática - Brand®;
- Proveta de 10 mL, 20 mL e 1000 mL (com e sem tampa);
- Redutor de volume (*Insert*) para *vial* de 1,5 mL;
- Seringa de capacidade 5 mL ou 10 mL;
- Sistema de aquisição de dados software Empower® Waters®;
- Sistema de Purificação de água Milli-Q A10 - Millipore® e Ellix/Rios 5;
- Suportes universais e argolas;
- Tampões de pH 4,00 e 7,00;
- Tubos para microcentrífuga de 2 mL;
- Unidades filtrantes descartáveis tipo FHUP 0,22 µm (teflon hidrofílico);
- *Vial* transparente e âmbar de injetor automático com tampa - 1,5 mL - Waters®;

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

- Solução de Metanol (com BHT 2 g.L<sup>-1</sup>) e Ácido Acético 10% (85:15, v/v)

Foi pesado 1g de BHT e, após transferir para frasco de 500 mL, adicionou-se 425 mL de metanol ao frasco, agitando até a dissolução do BHT; foram acrescentados 67,5 mL de água Milli-Q e 7,5 mL de ácido acético glacial ao frasco. A mistura foi homogeneizada.

- Solução de Éter Etílico e Acetato de Etila (1:1, v/v)

Foram adicionados 250 mL de éter etílico e 250 mL de acetato de etila em um frasco de vidro. A mistura foi homogeneizada.

- Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 2 M

Pesou-se 8g de NaOH em béquer de plástico de 200 mL; foram acrescentados aproximadamente 60 mL de água Milli-Q a fim de solubilizar; a mistura foi transferida quantitativamente para balão de 100 mL e avolumou-se com água Milli-Q. Foi feita homogeneização e a solução foi armazenada em frasco de plástico.

- Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 3M

Pesou-se 30g de NaOH em béquer de plástico de 500 mL, foram acrescentados 100 mL de água Milli-Q a fim de solubilizar; e, após transferido quantitativamente para frasco plástico, acrescentados 150 mL de água Milli-Q. A mistura foi homogeneizada.

- Solução de Metanol:Água (80:20, v/v)

Foram medidos 800 mL de metanol em proveta de 1000 mL com tampa, acrescentados 200 mL de água Milli-Q e a mistura foi homogeneizada.

- Fase Móvel de Ácidos Fenólicos – Solução de Ácido Fosfórico ( $H_3PO_4$ )  $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$

Adicionou-se 1,5 mL de ácido fosfórico em 1000 mL de água Milli-Q e após homogeneizou-se a mistura.

- Fase Móvel de Vitamina C – Solução de Ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0,05 M

Em um balão volumétrico de 2 L, adicionou-se aproximadamente 1,8 L de água Milli-Q; acrescentou-se 5,6 mL de  $H_2SO_4$  concentrado com auxílio de pipetador automático; o balão foi avolumado com água Milli-Q; homogeneizou-se a solução e o balão foi levado ao ultrassom por cerca de 15 minutos.

- Fase Móvel de flavonoides – Solução de Ácido Fórmico ( $CH_2O_2$ ) 1%

Em balão volumétrico de 1000 mL foi colocada água Milli-Q até a metade, acrescidos 10 mL de ácido fórmico (previamente medido em proveta); avolumou-se o balão com água Milli-Q; e a mistura foi homogeneizada.

#### 4.2 PREPARO DA AMOSTRA

Foram realizadas duas coletas para a realização deste trabalho.

Na primeira, foram coletados cerca de 40 g de frutos maduros de *C. fluminensis* no Rio de Janeiro, bairro da Barra da Tijuca ( $22^\circ 58' 13.886'' \text{ S}$ ;  $43^\circ 23' 10.759'' \text{ W}$ ) em junho e julho de 2014. Após seleção, foram separados manualmente os arilos com sementes, da casca, sendo a casca descartada. As análises foram realizadas com os arilos junto das sementes devido à dificuldade em separá-los. Parte dos arilos com sementes foi separada para a análise de vitamina C; o restante foi armazenado em frascos de vidro e acondicionado em freezer a  $-18^\circ \text{C}$  até o momento das outras análises (flavonoides, ácidos fenólicos e carotenoides).

A segunda coleta foi feita a fim de quantificar os carotenoides presentes no fruto, pois a primeira análise de carotenoides realizada foi apenas qualitativa. Nesta segunda coleta foram selecionados cerca de 5 g de frutos maduros de *C. fluminensis* no Rio de Janeiro, bairro do Recreio dos Bandeirantes ( $23^\circ 00' 58.7'' \text{ S}$ ;  $43^\circ 30' 59.4'' \text{ W}$ ) em agosto de



2015. O fruto foi acondicionado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise de carotenoides. Foram separados manualmente os arilos com sementes, da casca, sendo a casca descartada.

### 4.3 ÁCIDOS FENÓLICOS

#### 4.3.1 PADRÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Uma solução, já existente no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, contendo diversos padrões (ácido gálico, ácido protocateico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido ferúlico e ácido sinápico) foi utilizada para identificação dos ácidos fenólicos presentes na matriz estudada.

As estruturas químicas dos ácidos fenólicos estão na figura 12 (p. 32).

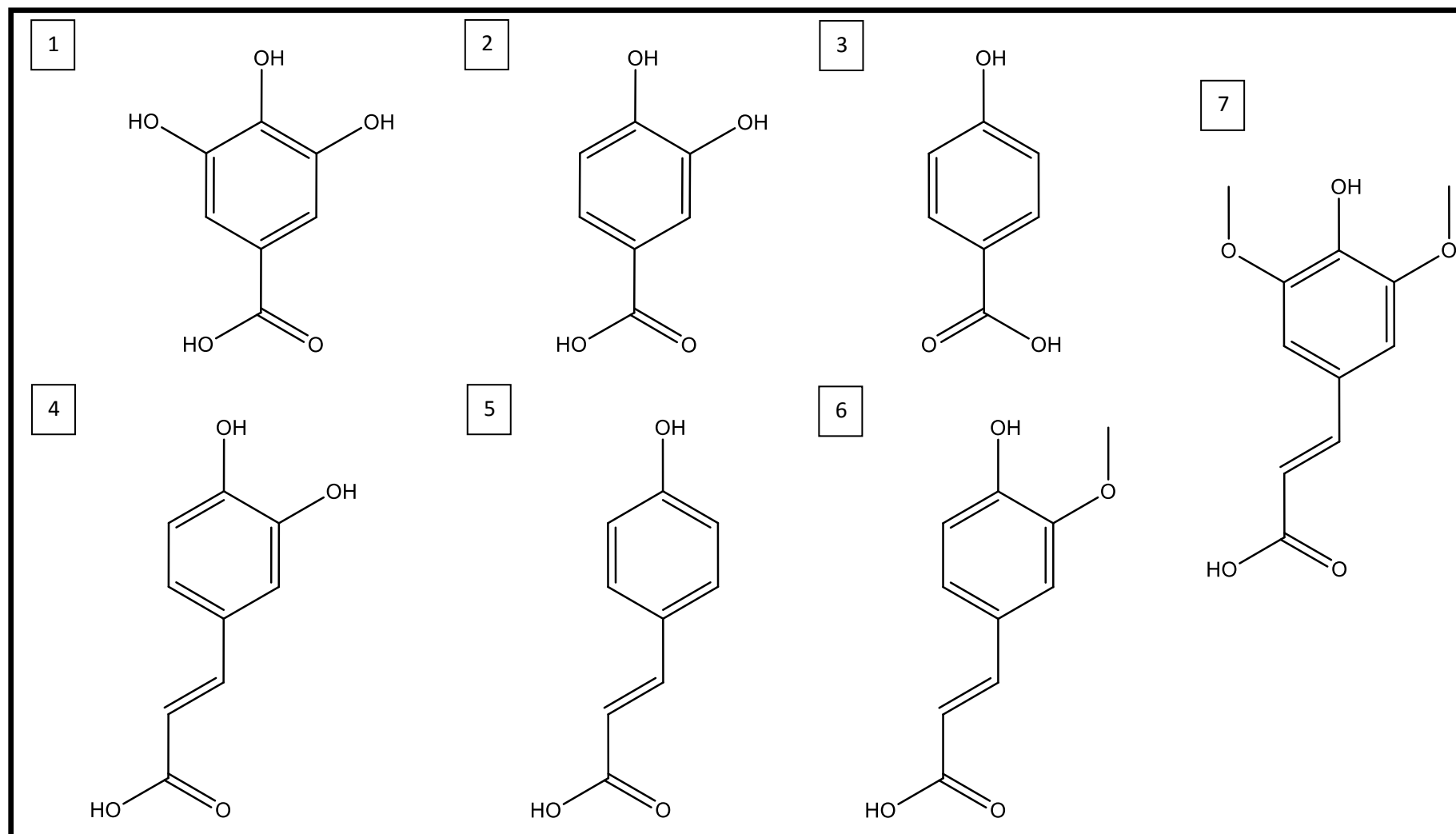


Figura 12: Padrões dos ácidos fenólicos utilizados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: ácido 4-hidroxibenzoico; 4: ácido cafeico; 5: ácido 4-hidroxicinâmico; 6: ácido ferúlico; 7: ácido sinápico).

#### 4.3.2 ANÁLISE DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Com o propósito de determinar a presença dos ácidos fenólicos tanto na forma livre quando esterificado ou glicosilado, o método de extração utilizado foi o de Mattila (2002), com modificações realizadas de acordo com o protocolo do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, ainda não publicado, como descrito nos itens a seguir.

Foram feitas três etapas em sequência. A primeira detecta os ácidos fenólicos livres, ou seja, que não estão ligados a outras estruturas, ao passo que a hidrólise básica disponibiliza a maioria dos fenólicos ligados e a ácida é utilizada com a intenção de liberar os que não conseguiram ser detectados nas etapas anteriores (MATTILA, 2002).

##### 4.3.2.1 ÁCIDOS FENÓLICOS LIVRES

Pesou-se, em duplicata, aproximadamente 1 grama de arilos com sementes do fruto *C. fluminensis*. As amostras foram maceradas e, em seguida, adicionados 10 mL da mistura: metanol (contendo BHT 2 g.L<sup>-1</sup>) / ácido acético 10% (85:15, v/v). Depois de agitação vigorosa, as amostras foram levadas ao ultrassom por 30 minutos. Após aguardar a decantação, transferiu-se uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para redutor de volume e prosseguiu-se com a análise cromatográfica.

##### 4.3.2.2 HIDRÓLISE BÁSICA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NÃO LIVRES

A seguir, no mesmo recipiente, adicionou-se 17 mL de NaOH 3 M e borbulhou-se N<sub>2</sub> por cerca de 1 minuto. Em seguida as amostras permaneceram sob agitação mecânica por 16 h. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para béquer de 100 mL, a fim de adicionar 7 mL de HCl 6 M, agitar e então ajustar o pH para 2,0 ± 0,1 com HCl 6 M em medidor de pH. O resíduo sólido foi reservado no frasco original. O sobrenadante foi transferido para funil de separação e procedeu-se a extração 3 vezes com 15 mL de éter etílico / acetato de etila (1:1, v/v), para cada amostra. As fases etéreas (superior) das 3 extrações foram unidas em balão volumétrico de 50 mL e avolumou-se com a mistura éter etílico / acetato de etila (1:1, v/v). Uma alíquota de 1 mL foi seca em *vial* sob fluxo de N<sub>2</sub>,

sendo seu resíduo dissolvido com 100  $\mu$ L de metanol, e em seguida foi realizada a análise cromatográfica.

#### 4.3.2.3 HIDRÓLISE ÁCIDA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NÃO LIVRES

Dando continuidade à análise, na fase aquosa (contendo o resíduo sólido) foram adicionados 2,5 mL de HCl concentrado. Levou-se então a estufa à 85 °C por 35 minutos. Posteriormente ao resfriamento até temperatura ambiente, transferiu-se cada amostra para béqueres de 100 mL, adicionou-se 5 mL de NaOH 3 M e agitou-se, tendo o pH novamente ajustado para  $2,0 \pm 0,1$  com NaOH 3 M em pHmetro. O sobrenadante foi novamente transferido para funil de separação e mais uma vez foram feitas 3 extrações com 15 mL de éter etílico / acetato de etila (1:1). Do mesmo modo, foram combinadas as fases etéreas das 3 extrações em balão volumétrico de 50 mL e avolumou-se com éter etílico / acetato de etila (1:1). Uma alíquota de 1 mL foi seca em N<sub>2</sub>, e o resíduo restante foi dissolvido com 100  $\mu$ L de metanol, para então proceder a análise cromatográfica.

#### 4.3.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis dos picos observados nos cromatogramas da amostra e da mistura de padrões de ácidos fenólicos. Tanto os padrões quanto as amostras foram injetados sob as mesmas condições cromatográficas.

A separação foi feita por CLAE. As condições cromatográficas foram: coluna Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4  $\mu$ m), com a temperatura da coluna igual a 30°C; fluxo de 1,0 a 1,2 mL.min<sup>-1</sup> em modo de eluição gradiente de ácido fosfórico 1,5 mL.L<sup>-1</sup> em água (solução A) e acetonitrila (solução B), como exibido na tabela 1 (p. 35); tempo de análise de 28 minutos e volume padrão de injeção de 10  $\mu$ L; o detector utilizado foi o DAD varredura 210 a 400 nm, com os cromatogramas extraídos em 270 e 310 nm.

Tabela 1: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos ácidos fenólicos

<b>Tempo</b>	<b>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0,00	1,0	95,0	5,0
6,00	1,0	95,0	5,0
12,00	1,2	88,0	12,0
18,00	1,2	80,0	20,0
20,00	1,2	50,0	50,0
24,00	1,2	50,0	50,0
25,00	1,2	95,0	5,0
28,00	1,0	95,0	5,0

\* Fase A – ácido fosfórico 1,5 mL.L<sup>-1</sup> em água; Fase B – acetonitrila.

#### 4.3.4 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

A quantificação de ácidos fenólicos foi realizada por padronização externa com curva analítica construída a partir de diluições da solução padrão. Após a quantificação, os resultados foram somados com o intuito de quantificar os ácidos fenólicos totais presentes na amostra, já que a análise é uma sequência que ocorre na mesma amostra.

#### 4.4 FLAVONOIDES

##### 4.4.1 PADRÃO DE FLAVONOIDES

Uma solução contendo os padrões: epicatequina, rutina, rhamnetina, narirutina, mirecetina, diosmina, hesperidina, quercetina e kaempferol, já existentes no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos foi utilizada para identificação dos flavonoides presentes na matriz estudada.

As estruturas químicas dos flavonoides epicatequina, rhamnetina, rutina e narirutina estão na figura 13 (p. 36) e dos flavonoides hesperidina, diosmina, mirecetina, quercetina e kaempferol na figura 14 (p. 37).

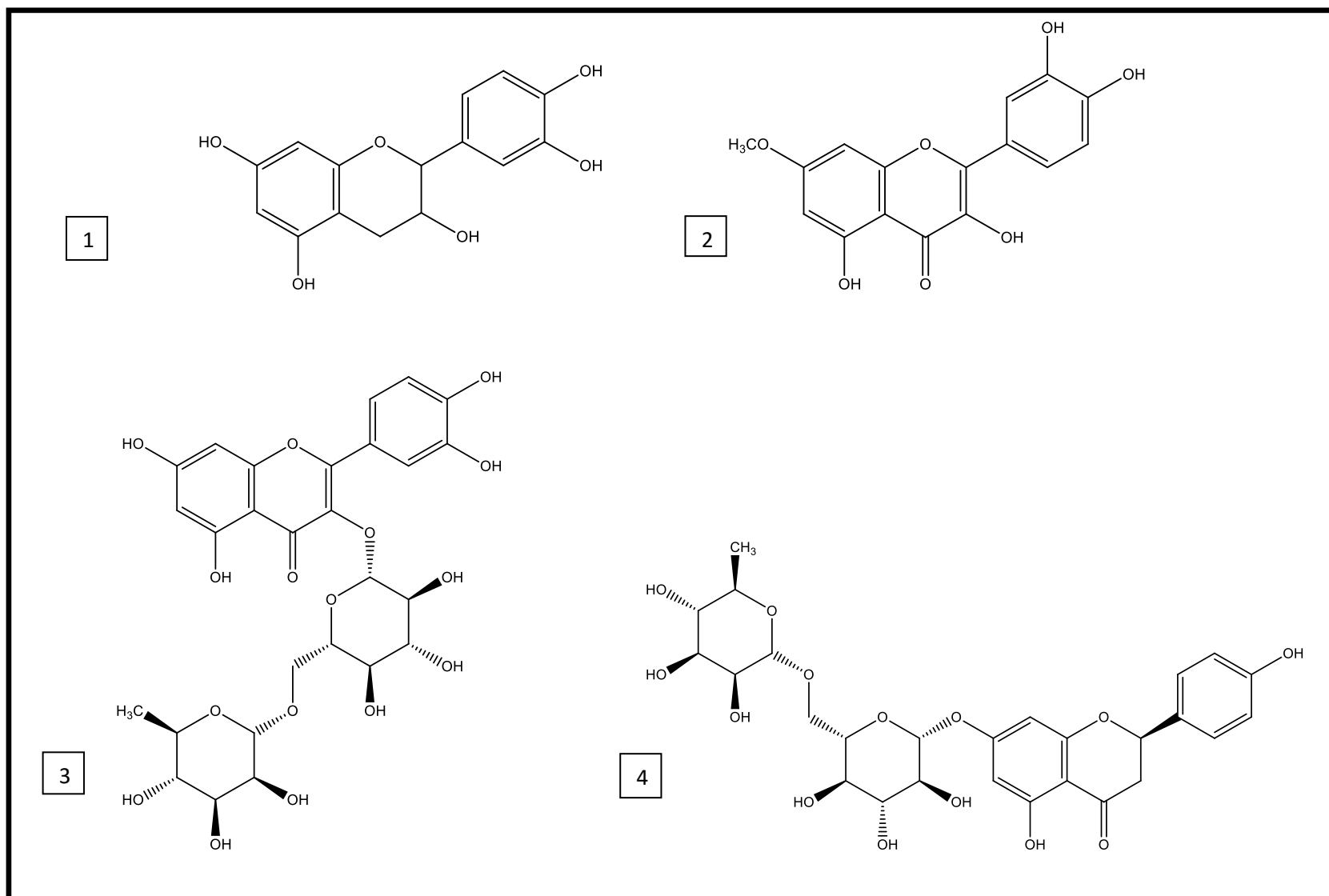


Figura 13: Padrões dos flavonoides utilizados (1: epicatequina; 2: rhamnetina; 3: rutina; 4: narirutina).

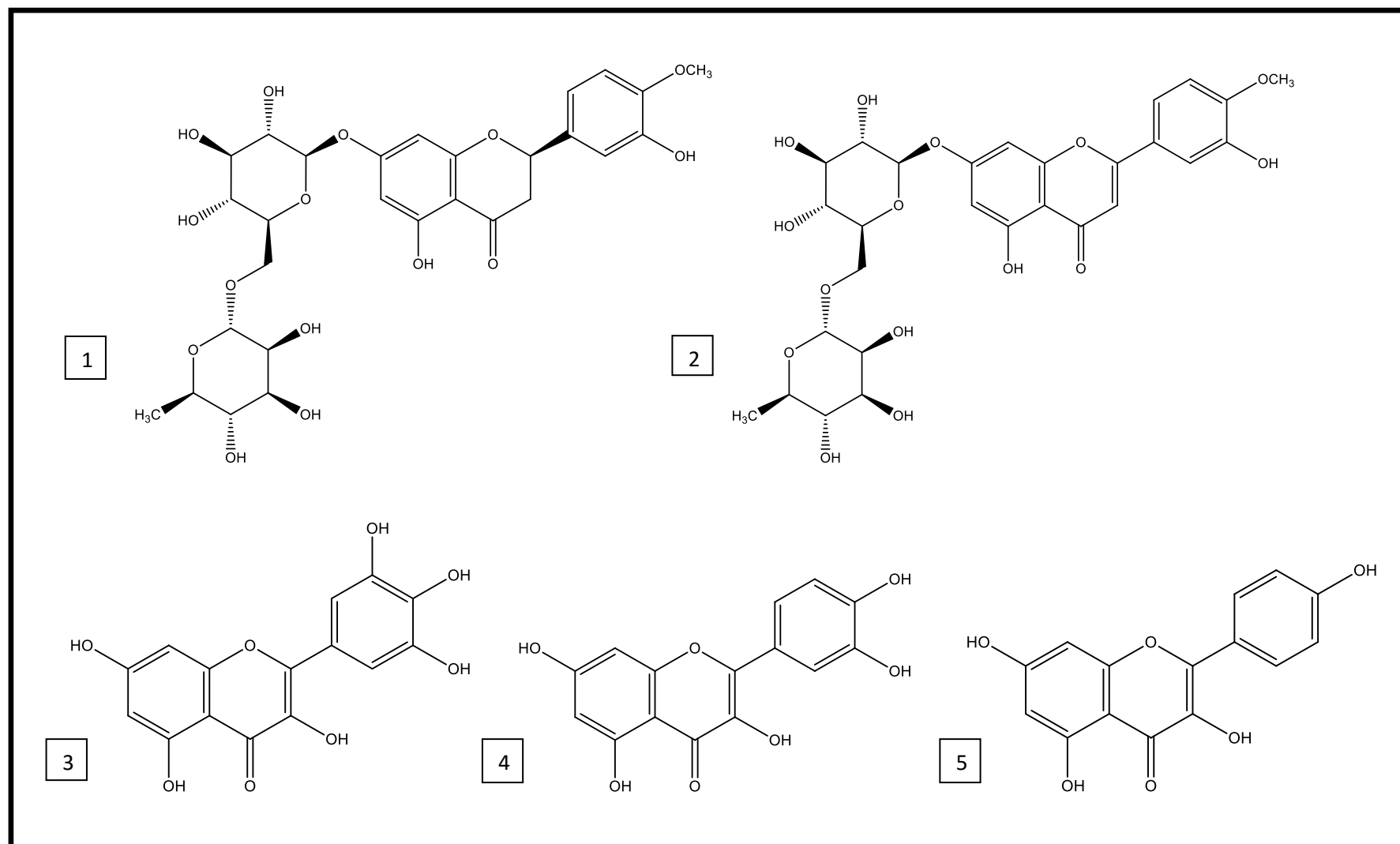


Figura 14: Padrões dos flavonoides utilizados (1: hesperidina; 2: diosmina; 3: mirecetina; 4: quercetina; 5: kaempferol).

#### 4.4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE FLAVONOIDES

A extração de flavonoides foi realizada com base no método de Klump (2001). Foram pesados, em duplicata, entre 0,8 g e 1 g de arilos (com sementes) do fruto *C. fluminensis*. As amostras foram maceradas e adicionados 10 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Os frascos contendo as amostras foram mantidos em estufa por 2,5 h a 65°C; após retirar da estufa e aguardar esfriar até temperatura ambiente, foram acrescentados 600 µL de NaOH 2M, e os frascos foram agitados vigorosamente. Depois de repousar por 10 minutos, acrescentou-se 200 µL de ácido acético glacial e agitou-se. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a decantação do material sólido, para então transferir 1000 µL do sobrenadante para *vial* de injeção. Em seguida, foi feita a análise cromatográfica.

#### 4.4.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DA ANÁLISE DE FLAVONOIDES

A identificação dos flavonoides foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis da mistura de padrões de flavonoides injetada sob as mesmas condições cromatográficas da amostra.

O método de análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições: coluna Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 µm), com a temperatura da coluna estando a 45 °C e temperatura do injetor sendo de 15°C; fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em modo de eluição gradiente de ácido fórmico 1% em água (solução A) e acetonitrila (solução B), conforme a tabela 2 (p. 39); tempo de análise de 28 minutos e volume padrão de injeção de 10 µL; o detector utilizado foi o DAD varredura 210 a 600 nm; a comparação de amostra e padrão foi realizada em 290 nm.



Tabela 2: Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos flavonoides

<b>Tempo</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0,00	95,0	5,0
15,00	95,0	5,0
23,00	88,0	12,0
24,00	80,0	20,0
28,00	50,0	50,0

\* Fase A – ácido fórmico 1% em água; Fase B – acetonitrila.

## 4.5 VITAMINA C

### 4.5.1 PADRÃO DE VITAMINA C

Foram pesados 25 mg do padrão de ácido ascórbico em balança analítica, diretamente para balão volumétrico de 25 mL; posteriormente foi feita solubilização com solução de ácido sulfúrico 0,05 M, avolumando-se em seguida o balão com a mesma solução. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 25 mL. Avolumou-se o mesmo com a solução de ácido sulfúrico 0,05 M. A partir desta solução padrão foi feita uma série de diluições a fim de se obter uma curva analítica. Transferiu-se aproximadamente 1,5 mL desta solução padrão para um *vial* e foi feita análise cromatográfica.

### 4.5.2 ANÁLISE DE VITAMINA C

A análise de vitamina C teve por base o método de Rosa (2007), com modificações. As amostras de *C. fluminensis* foram maceradas e homogeneizadas, para então serem pesadas em frasco de vidro (com capacidade aproximada de 40 mL), em duplicata, de 0,3 g a 1 g dos arilos (com sementes) do fruto. Com a adição de 10 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, as amostras foram para ultrassom por 10 minutos; o conteúdo foi filtrado em papel de filtro diretamente para um *vial*. Em seguida foi realizada análise cromatográfica.

#### 4.5.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DA ANÁLISE DE VITAMINA C

A análise cromatográfica foi realizada sob as seguintes condições: coluna de troca iônica Aminex<sup>®</sup> HPX-87H da Bio-Rad (7,8 x 300 mm), com a temperatura da coluna estando a 30°C e temperatura do injetor sendo de 15°C; fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> em modo de eluição isocrático com ácido sulfúrico 0,05 M.; tempo de análise de 10 minutos e volume de injeção de 20 µL; detector de arranjo de fotodiodos Waters<sup>®</sup> 2996 em 243 nm.

#### 4.5.4 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINA C

A quantificação da vitamina C foi realizada por padronização externa com curva analítica construída a partir de diluições da solução padrão preparada conforme descrito no item 4.5.1.

### 4.6 CAROTENOIDES

#### 4.6.1 PADRÃO DE CAROTENOIDES

Os padrões disponibilizados para análise foram previamente preparados no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, de acordo com o método de Rodriguez-Amaya (2001), a partir de matrizes naturais conhecidas, já que não são todos os carotenoides existentes em alimentos que se encontram disponíveis comercialmente. Os padrões utilizados para comparação foram: violaxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno e licopeno.

#### 4.6.2 ANÁLISE DE CAROTENOIDES

Conforme o método de Rodriguez-Amaya (2001), foi realizada a análise de carotenoides. Foram pesados, em duplicata, cerca de 1 g de arilos (com sementes) de *C. fluminensis*; as amostras foram misturadas com celite, em gral; maceradas com acetona e filtradas em funil de vidro sinterizado sob vácuo, sendo este processo repetido até que cada amostra não apresentasse mais coloração característica; foram então transferidas para funil de separação de 500 mL tendo aproximadamente 4 mL de éter de petróleo; esta solução foi

lavada com água Milli-Q® a fim de separar completamente a acetona da fase etérea; logo, eliminou-se a fase aquosa; a fase etérea foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, passando por um funil de vidro com sulfato de sódio anidro e avolumando o balão com éter de petróleo. Em uma alíquota foi feita leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se éter de petróleo como branco, e dessa forma, a partir da leitura, foi medida a concentração de carotenoides totais.

#### 4.6.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE CAROTENOIDES

A identificação dos carotenoides foi realizada por comparação com espectros de UV-Vis de padrões de carotenoides, injetados sob as mesmas condições cromatográficas da amostra.

A análise cromatográfica foi realizada segundo Pacheco (2014). As condições cromatográficas foram: coluna YMC *Carotenoid C<sub>30</sub> S-3* de 4,6 x 250 mm, com a temperatura da coluna igual a 33°C e temperatura do injetor sendo de 15°C, fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> em modo de eluição gradiente de metanol / éter metil *terc*-butílico, tempo de análise de 28 minutos e volume de injeção de 15 µL, assim como apresentado na tabela 3; o detector utilizado foi o de arranjo de fotodiodos UV/Vis de 300 a 600 nm, com quantificação em 450 nm.

Tabela 3: Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos carotenoides

<b>Tempo</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0,00	80,0	20,0
0,50	75,0	25,0
15,00	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,50	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,00	80,0	20,0

\* Fase A – metanol; Fase B – éter metil *terc*-butílico.

#### 4.6.4 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Para obter a concentração de carotenoides totais ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de amostra), utiliza-se a equação da figura 15.

$$C \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \left( \frac{\text{abs} \times \text{dil} \times \text{vol} (\text{mL}) \times 10.000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{massa amostra} (\text{g})} \right) / 100$$

Onde:  
 abs = absorvância: valor da leitura no espectrofotômetro em 450 nm  
 dil = diluição do extrato caso seja necessário (se a leitura ultrapassar 0,8)  
 vol: volume (mL) do balão utilizado ao final da extração  
 massa amostra: massa pesada da amostra (g)  
 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = \text{Absortividade Molar} = 2592$

Figura 15: Equação para quantificação de carotenoides totais.

De acordo com Martins (2015), o método mais apropriado para que quantifique os carotenoides é o de normalização.

Neste método o teor do composto é quantificado por porcentagem. O cálculo é feito medindo-se a área da substância de interesse dividida pela soma das áreas de todos os picos identificados multiplicado por 100 (Figura 16).

$$\% \text{ do composto de interesse} = \left( \frac{\text{área do composto de interesse}}{\sum \text{áreas de todos os compostos identificados}} \right) \times 100$$

Figura 16: Cálculo do teor do composto de interesse.

Após calcular a porcentagem do composto (Figura 16) usa-se a equação (Figura 17) para calcular do teor das substâncias identificadas na amostra. Para isso precisa-se primeiro calcular o teor de carotenoides totais pelos cálculos da equação da figura 15.

$$\left( \frac{\% \text{ do composto de interesse}}{100} \right) \times (\text{teor total de carotenoides totais})$$

Figura 17: Cálculo do teor das substâncias identificadas na amostra.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

Pela análise de ácidos fenólicos presentes nos arilos dos frutos de *Clusia fluminensis*, com a identificação realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis da mistura de padrões de ácidos fenólicos, foram identificados o ácido protocatecuico, o ácido 4-hidroxibenzoico e o ácido 4-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico), nas etapas de ácidos fenólicos livres, de hidrólise básica e de hidrólise ácida.

O cromatograma dos padrões encontra-se na figura 18. Nas figuras 19 (p. 44), 20 (p. 44) e 21 (p. 45) podem ser vistos os cromatogramas de cada etapa da análise de ácidos fenólicos da amostra.

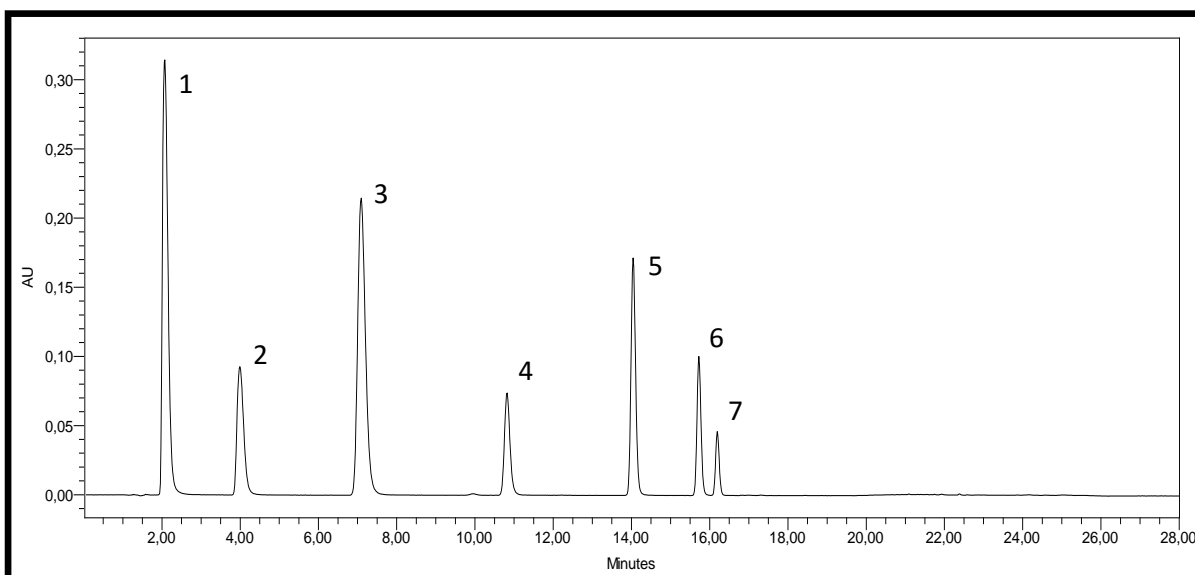


Figura 18: Cromatograma dos padrões de ácidos fenólicos utilizados (Pico 1: ácido gálico; pico 2: ácido protocatecuico; pico 3: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 4: ácido cafeico; pico 5: ácido 4-hidroxicinâmico; pico 6: ácido ferúlico; pico 7: ácido sinápico).

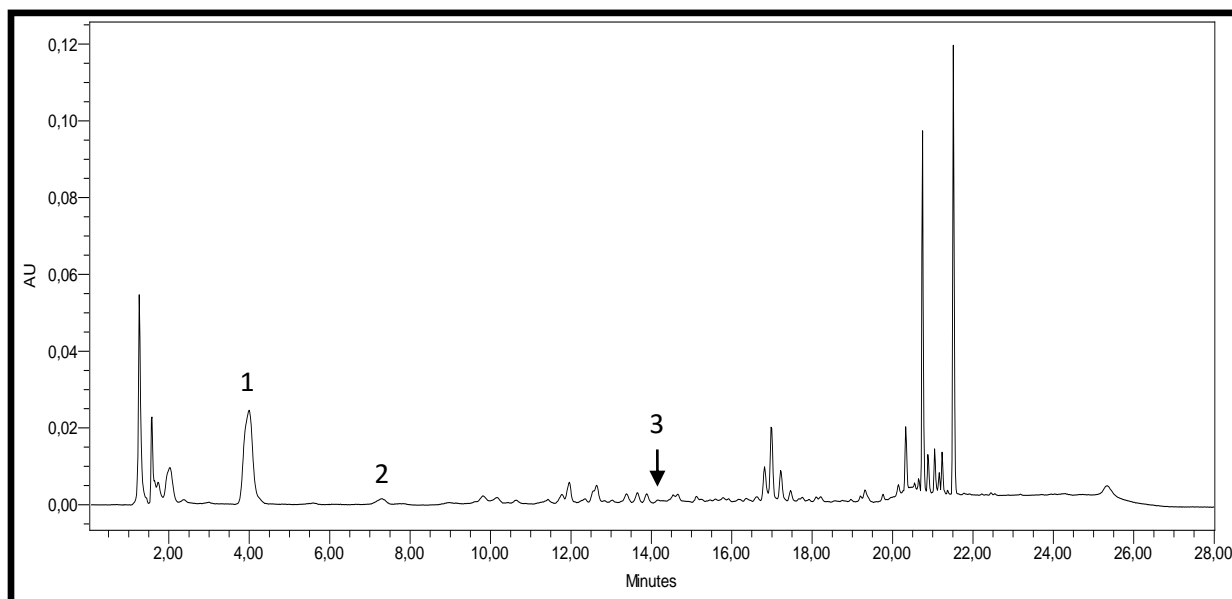


Figura 19: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos livres (Pico 1: ácido protocatecuico; pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).

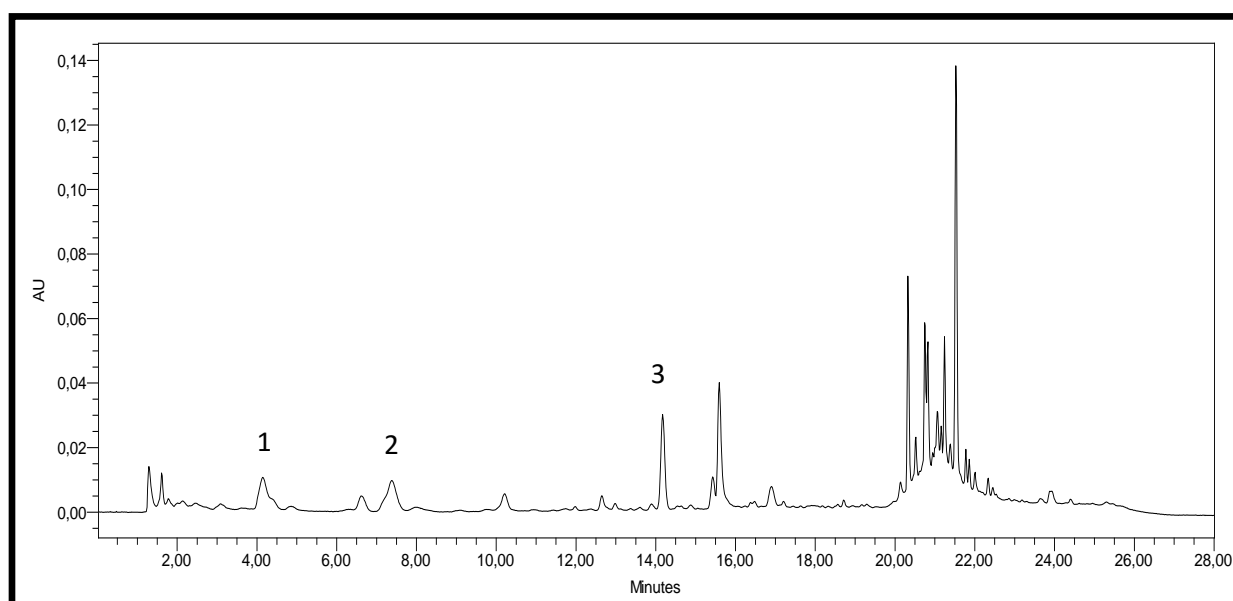


Figura 20: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos da hidrólise básica (Pico 1: ácido protocatecuico; Pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).

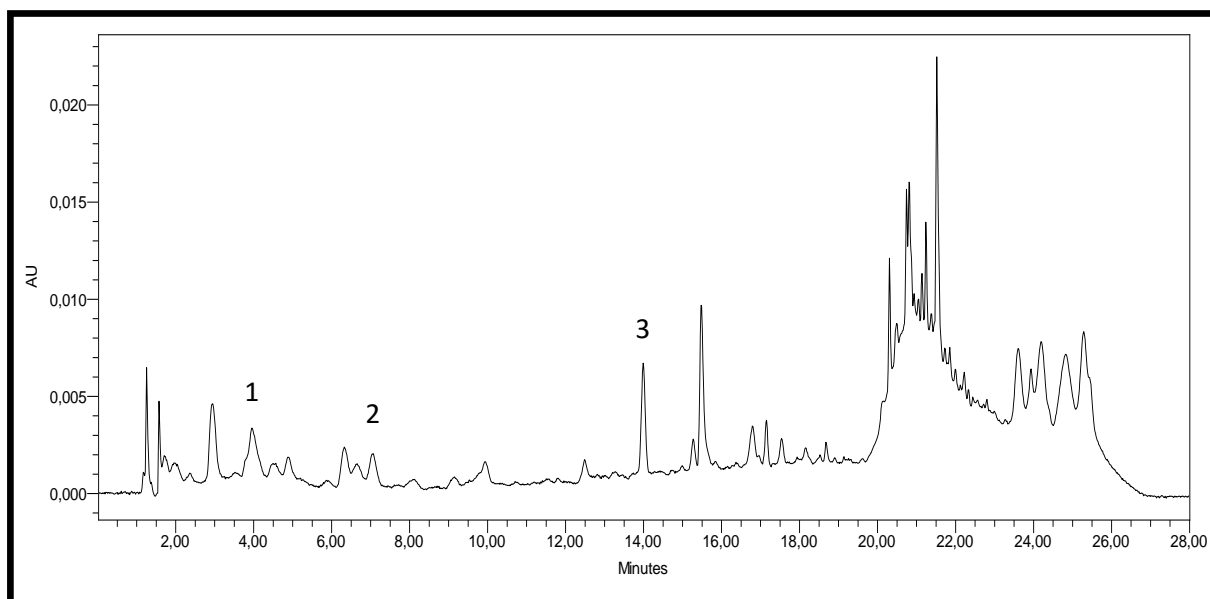


Figura 21: Cromatograma referente aos ácidos fenólicos da hidrólise ácida (Pico 1: ácido protocatecuico; Pico 2: ácido 4-hidroxibenzoico; pico 3: ácido 4-hidroxicinâmico).

Os tempos de retenção das substâncias identificadas na amostra e dos respectivos padrões são apresentados na tabela 4.

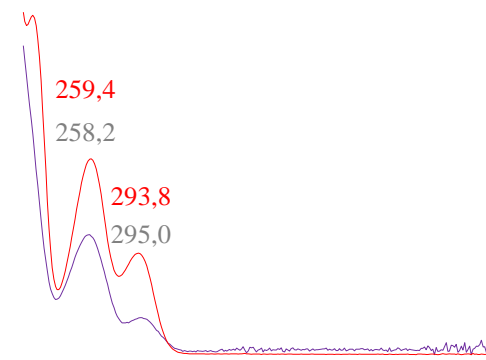
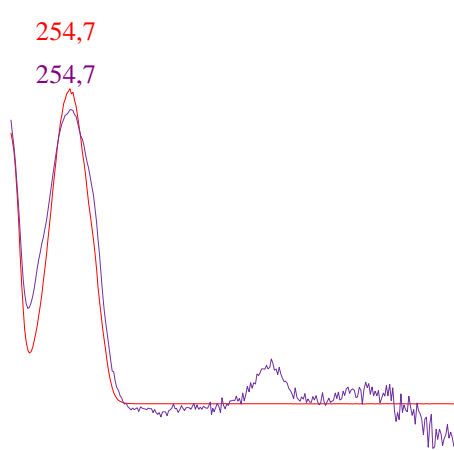
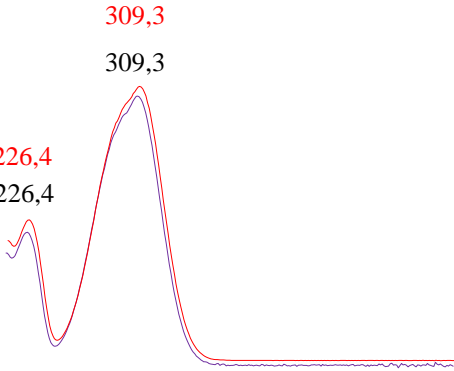
Tabela 4: Tempos de retenção das substâncias identificadas na amostra e dos respectivos padrões

Substância	$t_R$ padrão (min)	$t_R$ amostra AFL (min)	$t_R$ amostra HB (min)	$t_R$ amostra HA (min)
Ácido protocatecuico	4,03	3,99	4,15	4,12
Ácido 4-hidroxibenzoico	7,21	7,29	7,38	7,22
Ácido 4-hidroxicinâmico	13,96	14,16	14,17	14,07

\* AFL – ácidos fenólicos livres; HB – hidrólise básica; HA – hidrólise ácida.

Os tempos de retenção dos padrões de ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido 4-hidroxicinâmico foram similares aos tempos de retenção de três picos da amostra, sugerindo ser a mesma substância, o que pôde ser confirmado através da comparação entre os espectros de UV-Vis da amostra e do padrão, que foram correspondentes (Tabela 5, p. 46).

Tabela 5: Substâncias identificadas na amostra e seus respectivos espectros

<b>Substância</b>	<b>Espectro UV-Vis</b> (amostra em roxo, padrão em vermelho)
<b>Ácido protocatecuico</b>	 <p>The UV-Vis spectra for protocatechuic acid show two traces: a red trace (standard) and a purple trace (sample). The red trace has peaks at 259.4, 293.8, and 295.0 nm. The purple trace has peaks at 258.2 and 295.0 nm.</p>
<b>Ácido 4-hidroxibenzoico</b>	 <p>The UV-Vis spectra for 4-hydroxybenzoic acid show two traces: a red trace (standard) and a purple trace (sample). Both traces show a prominent peak at 254.7 nm.</p>
<b>Ácido 4-hidroxicinâmico</b>	 <p>The UV-Vis spectra for 4-hydroxycinnamic acid show two traces: a red trace (standard) and a purple trace (sample). The red trace has peaks at 226.4 and 309.3 nm. The purple trace has a peak at 226.4 nm.</p>



Em todas as etapas de extração (ácidos fenólicos livres, hidrólise básica e hidrólise ácida) os ácidos fenólicos identificados foram os mesmos, contudo pôde ser notada que a presença de ácido protocatecuico foi majoritária na primeira etapa, sugerindo que este não se encontra ligado a outras estruturas.

Na tabela 6 são apresentados os valores da quantificação dos ácidos fenólicos livres e totais presentes nos frutos de *Clusia fluminensis*, em que observa-se que o ácido protocatecuico presente na etapa de ácidos fenólicos livres é a substância majoritária dentre as identificadas. Também pode-se perceber que tanto o ácido protocatecuico quanto o ácido 4-hidroxicinâmico encontram-se nas mesmas quantidades dentre os ácidos fenólicos totais presentes na amostra.

Tabela 6: Quantificação dos ácidos fenólicos identificados

<b>Ác. Protocatecuico (mg.g<sup>-1</sup>)</b>		<b>Ác. 4-hidroxibenzoico (mg.g<sup>-1</sup>)</b>		<b>Ác. 4-hidroxicinâmico (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	
<b>Livre</b>	<b>Total</b>	<b>Livre</b>	<b>Total</b>	<b>Livre</b>	<b>Total</b>
0,11	0,05	0,01	0,02	0,01	0,05

### 5.1.1 CURVAS ANALÍTICAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Curvas analíticas referentes aos padrões utilizados foram construídas, a partir de diluições dos padrões, obtendo-se os dados da tabela 7.

Tabela 7: Dados das curvas analíticas

<b>Substância</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Ácido protocatecuico</b>	$Y = 2,70e+004x - 7,58e+003$	0,999
<b>Ácido 4-hidroxibenzoico</b>	$Y = 3,62e+004x - 1,54e+004$	0,999
<b>Ácido 4-hidroxicinâmico</b>	$Y = 2,61e+004x - 9,26e+003$	0,999

## 5.2 FLAVONOIDES

Na análise qualitativa de flavonoides, com a identificação realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis da mistura de padrões de flavonoides, foi identificada a rhamnetina (7-metoxiquercetina) (Figura 22) nos arilos dos frutos de *Clusia fluminensis*.

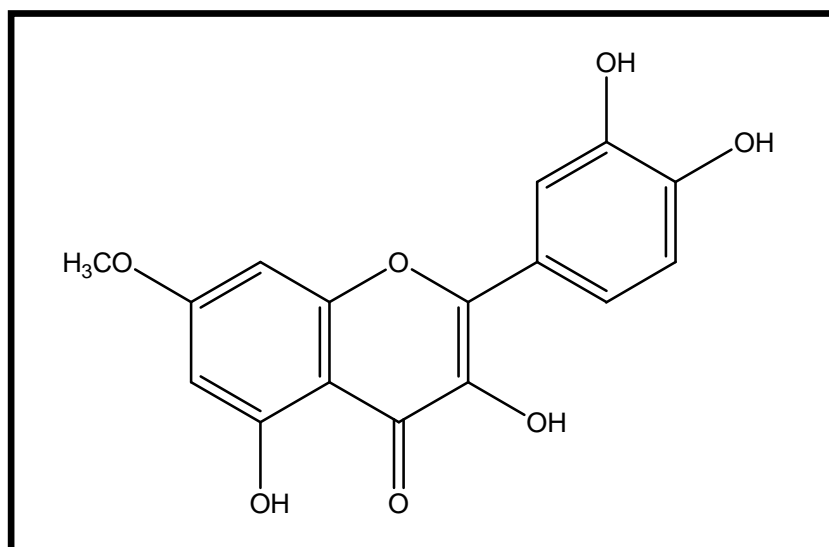


Figura 22: Estrutura da rhamnetina.

O tempo de retenção do padrão de rhamnetina foi de 13,88 minutos, enquanto a amostra foi de 13,78 minutos, sendo estes similares, sugerindo ser a mesma substância, o que pôde ser confirmado pela correspondência entre os espectros de UV-Vis da amostra e padrão quando comparados.

O cromatograma do padrão e seu respectivo espectro UV-Vis, em 290 nm, encontram-se na figura 23 (p. 49) e o cromatograma da amostra e seu respectivo espectro encontram-se na figura 24 (p. 49).

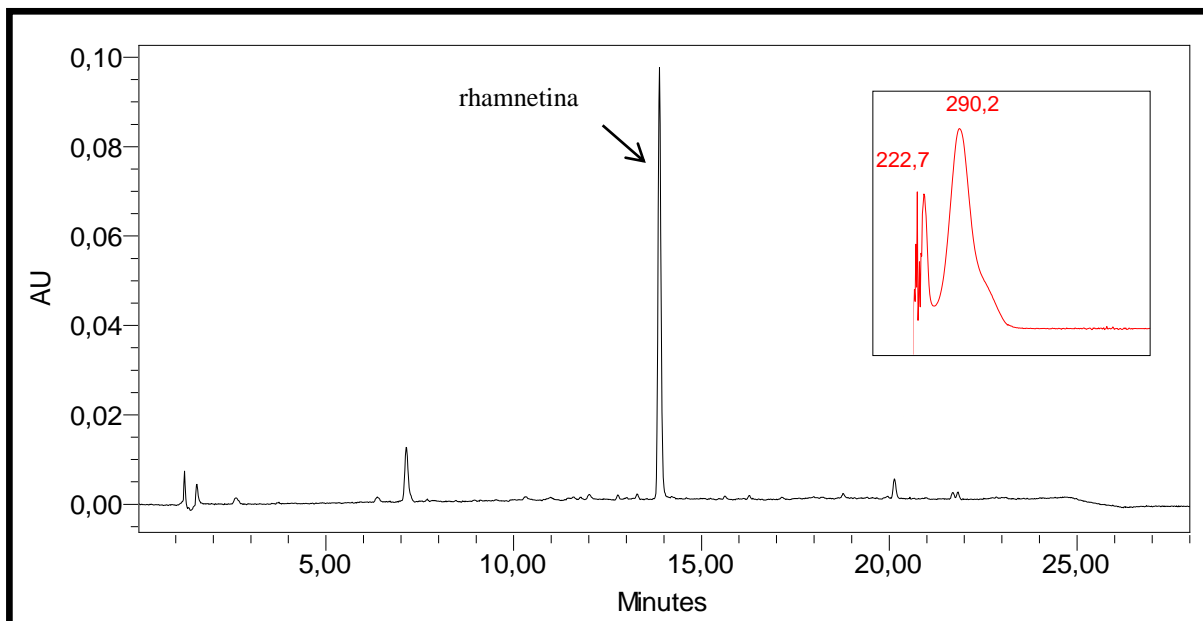


Figura 23: Cromatograma e espectro do padrão de rhamnetina.

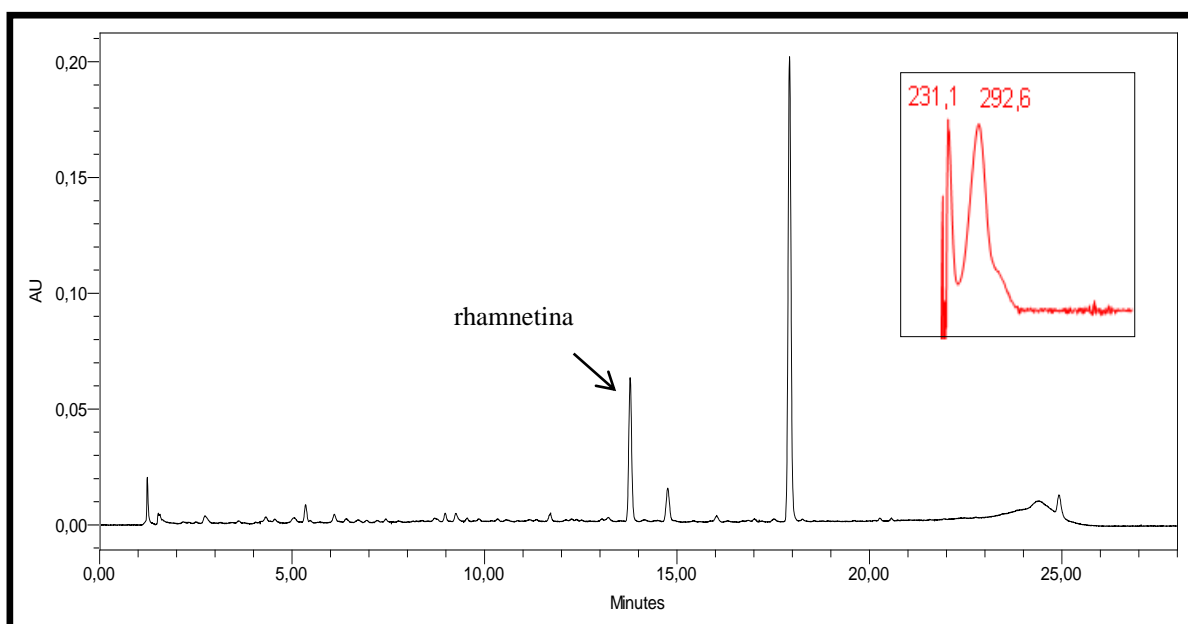


Figura 24: Cromatograma e espectro da amostra.

Os outros picos apresentados no cromatograma da amostra não puderam ser identificados, pois não foram correspondentes aos padrões utilizados para comparação. Sendo assim, para a identificação seria necessário o uso de outros padrões de flavonoides.

O pico majoritário ( $t_R = 17,9$  min) apresentou perfil de espectro característico de flavonoide, e, como esse espectro é similar ao da rhamnetina, sugere-se que seja um derivado deste flavonoide.

Na figura 25 encontra-se o espectro referente ao pico em questão.

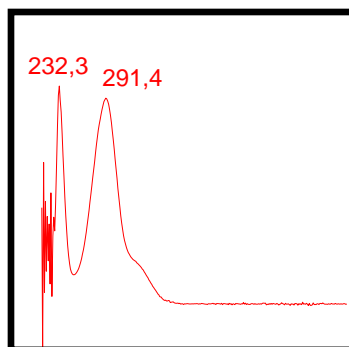


Figura 25: Espectro UV-Vis referente ao flavonoide majoritário desconhecido.

### 5.3 VITAMINA C

Na análise de vitamina C, a concentração média calculada nos frutos de *C. fluminensis* foi de  $3,77 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Este valor é bem inferior ao de outros frutos considerados fontes deste metabólito, como por exemplo, a laranja pêra, a qual possui um teor médio de vitamina C de  $53,7 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . A *Clusia fluminensis* não pode ser considerada fonte de ácido ascórbico, uma vez que a ingestão diária recomendada (IDR) desta vitamina é de  $45 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para um adulto, e de acordo com a RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012, apenas podem ser considerados fonte de tal metabólito matrizes que contenham o mínimo de 15% da IDR do mesmo. Também pode ser observado que o teor encontrado para a *Clusia fluminensis* foi similar ao descrito para o jambo (Tabela 8, p. 51) (ANVISA, 2003; TACO, 2011; ANVISA, 2012).

Tabela 8: Comparação entre os teores de vitamina C da *Clusia fluminensis* com os da laranja pêra e do jambo em mg.100g<sup>-1</sup>.

	Teor de vitamina C (mg.100g <sup>-1</sup> )
<b>Laranja pêra</b> ( <i>Citrus sinensis</i> )	53,7
<b><i>Clusia fluminensis</i></b>	3,77
<b>Jambo</b> ( <i>Eugenia malaccensis</i> L.)	3,8

Fonte: ANVISA, 2003; TACO, 2011.

O cromatograma do padrão de ácido ascórbico e seu respectivo espectro encontram-se na figura 26 e o cromatograma da amostra e seu respectivo espectro encontram-se na figura 27 (p. 52).

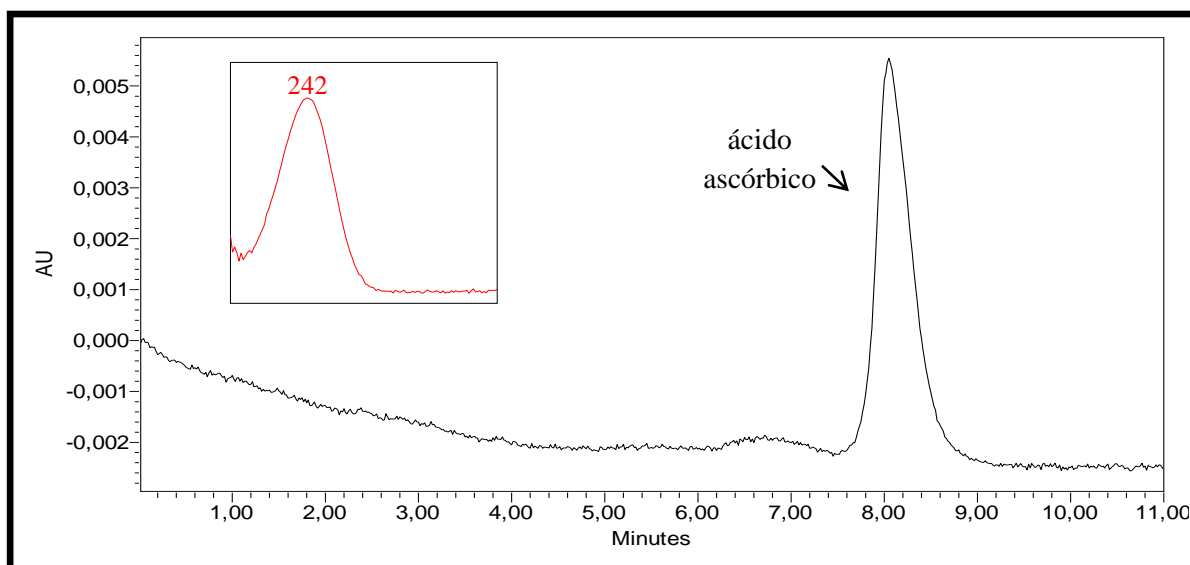


Figura 26: Cromatograma e espectro do padrão de ácido ascórbico (vitamina C).

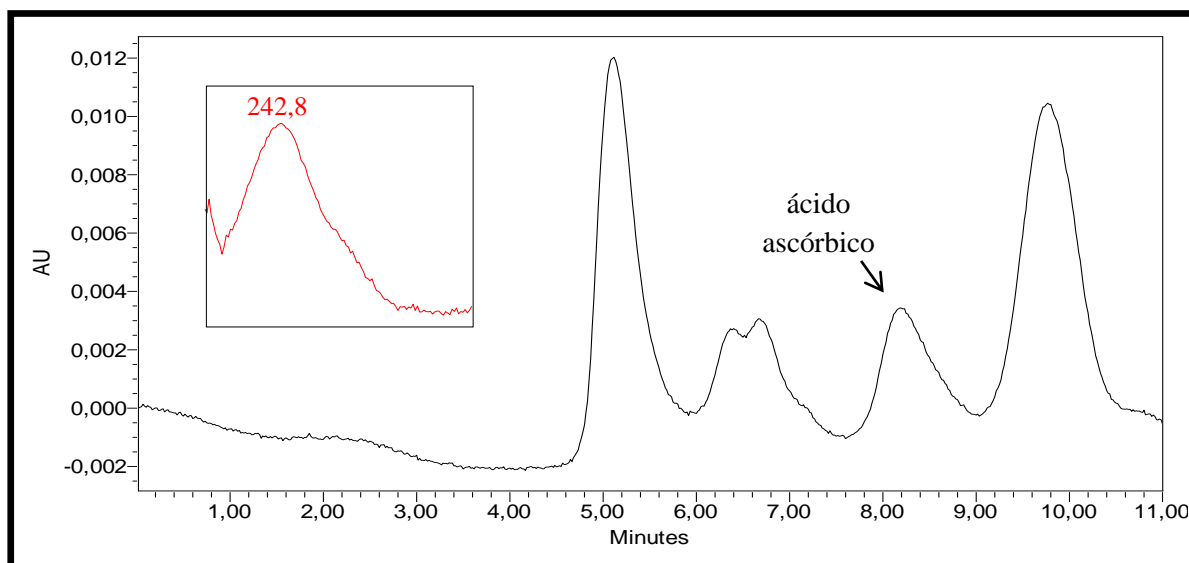


Figura 27: Cromatograma e espectro da amostra.

### 5.3.1 CURVA ANALÍTICA DE VITAMINA C

A partir das diluições do padrão utilizado foi construída a curva analítica, obtendo-se os dados da tabela 9.

Tabela 9: Dados da curva analítica

Substância	Equação da Reta	R <sup>2</sup>
Vitamina C	$Y = 1,70e+006x - 5,70e+003$	0,999

### 5.4 CAROTENOIDES

Na análise qualitativa de carotenoides, realizada com a primeira coleta dos frutos, com a identificação realizada por comparação entre tempos de retenção e espectros de UV-Vis de padrões de carotenoides (injetados sob as mesmas condições cromatográficas da amostra dos arilos de frutos de *C. fluminensis*), foi possível constatar a presença de luteína, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina (Figura 28) nos arilos do fruto estudado, podendo-se notar que a zeaxantina é o carotenoide majoritário dentre os identificados.

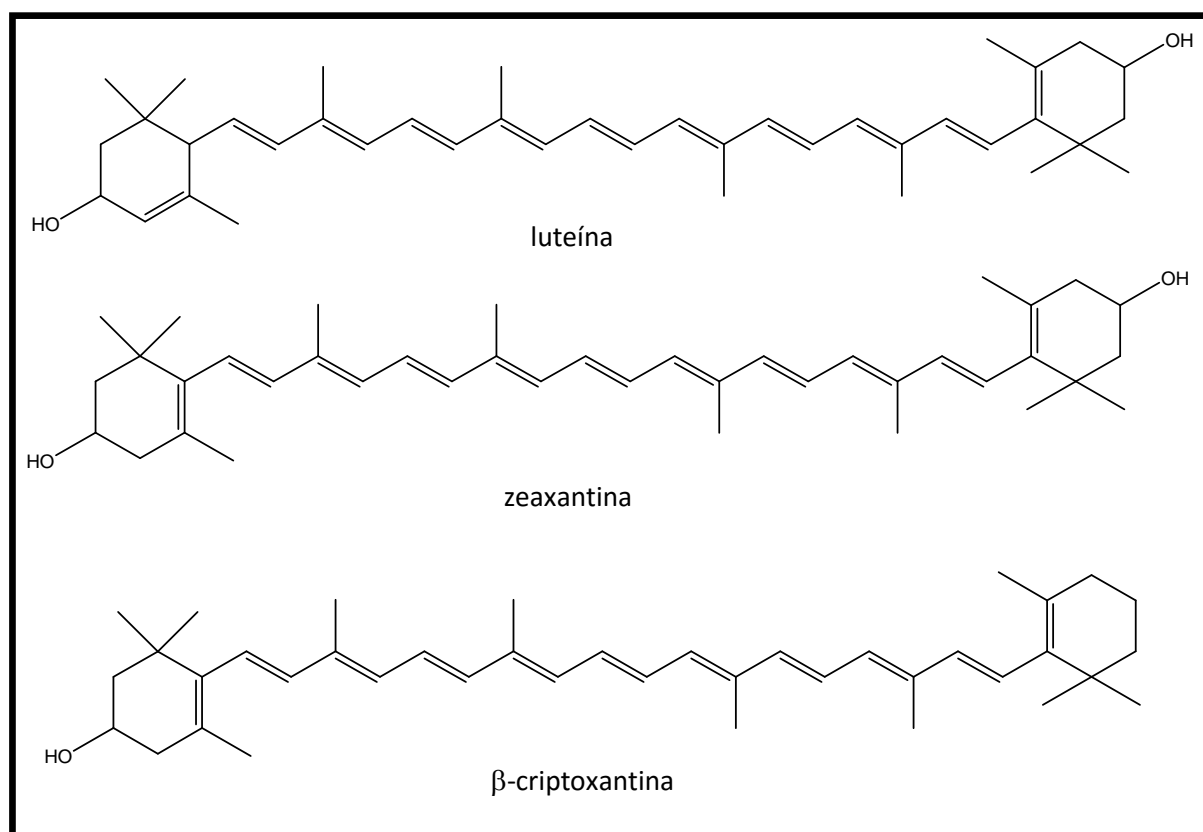


Figura 28: Estruturas dos carotenoides presentes nos arilos de *C. fluminensis*.

O cromatograma da amostra (coleta 1) encontra-se na figura 29 e seus respectivos espectros estão apresentados na figura 30 (p. 54).

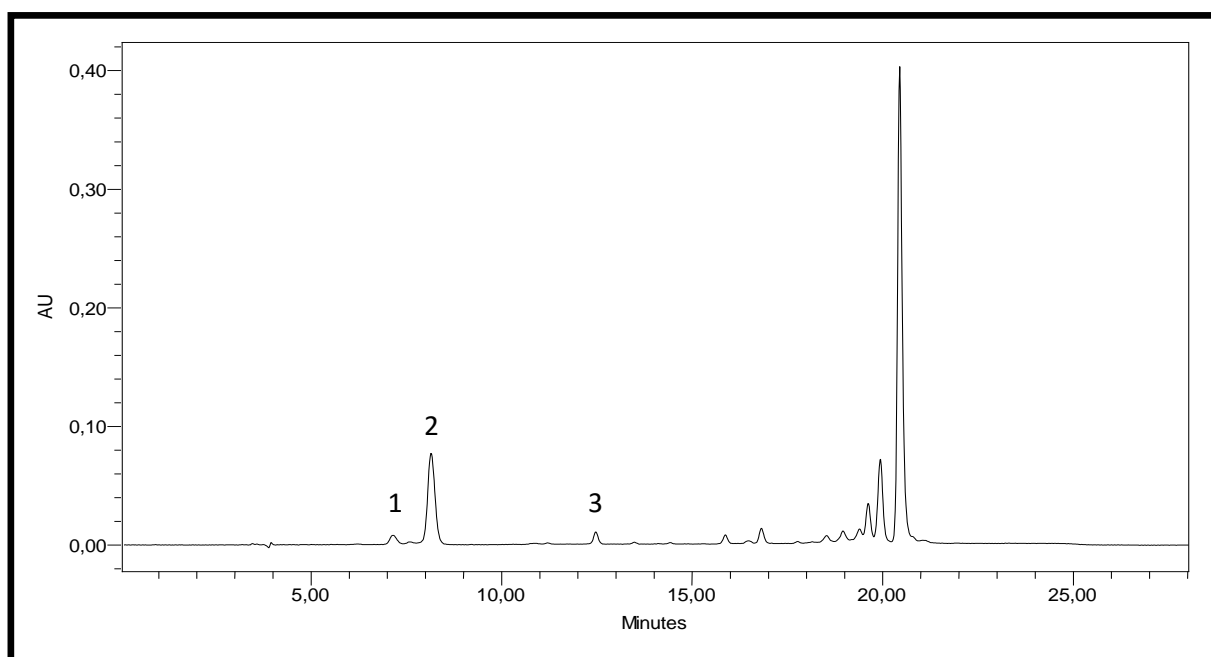


Figura 29: Cromatograma e espectros da amostra (Pico 1: luteína; Pico 2: zeaxantina; Pico 3: β-criptoxantina).

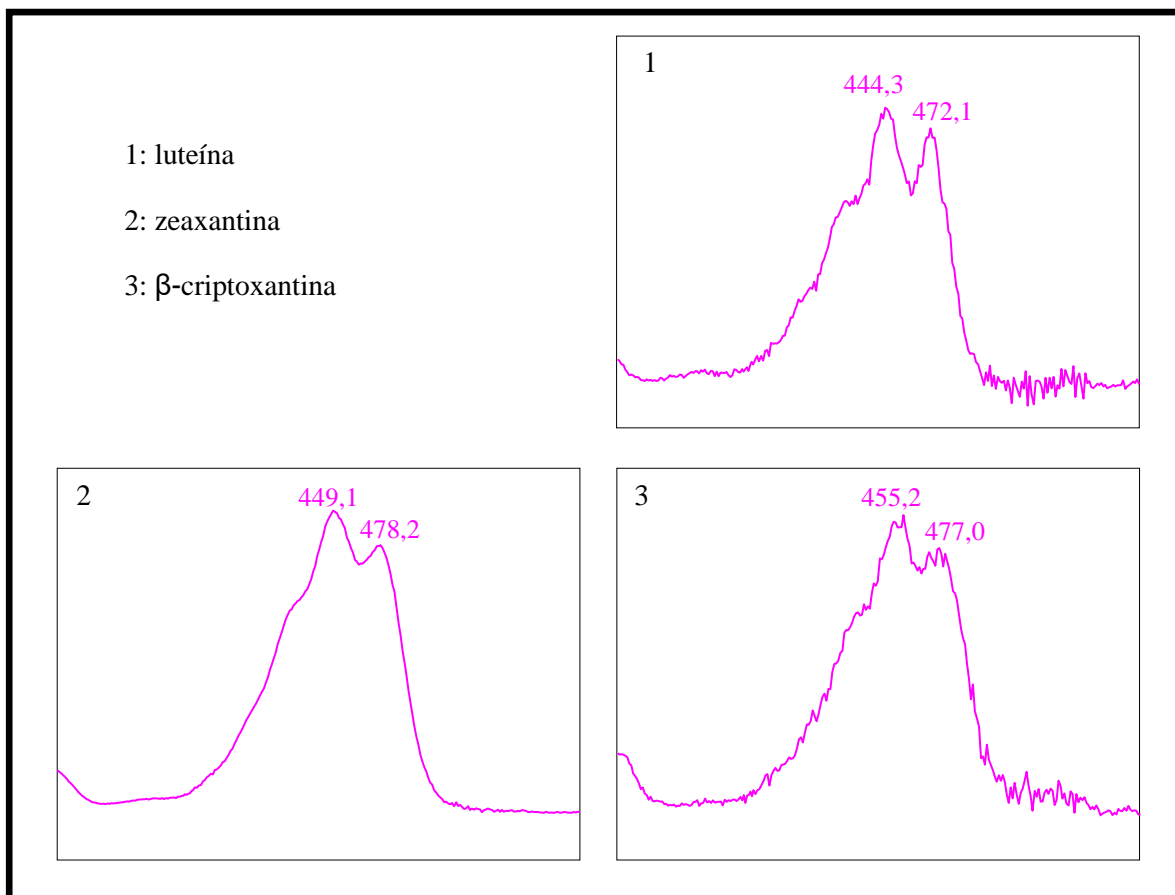


Figura 30: Espectros dos carotenoides identificados na amostra.

A presença de outros picos não identificados no cromatograma (Figura 29, p. 53) (com  $t_R$  de aproximadamente 20 min) pode estar relacionada à presença de carotenoides esterificados. Para que possam ser hidrolisados os ésteres, é necessário que se faça saponificação. A saponificação consiste em utilizar a fase etérea da extração de carotenoides com a adição da mesma quantidade de uma solução de hidróxido de potássio 10% p/v em metanol e manter a mistura em repouso por aproximadamente 16 horas. Após a saponificação, deve-se eliminar a base, sendo realizadas sucessivas lavagens com água. (LIAAEN-JENSEN, 1971 E DAVIES, 1976 *apud* KIMURA, 1990; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Deste modo, ao retirar os ésteres, os carotenoides livres seriam visualizados no cromatograma, logo, a quantidade de carotenoides livres aumentaria (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Como na primeira coleta não foi feita a quantificação dos carotenoides presentes nos frutos, esta análise foi refeita em uma segunda coleta.



Nesta segunda análise de carotenoides esperava-se quantificar tanto os carotenoides totais presentes na amostra não saponificada, como também os carotenoides presentes após a saponificação, contudo, houve perda da amostra saponificada, tendo sido feita então apenas a quantificação dos carotenoides presentes na etapa não saponificada.

O cromatograma da amostra (coleta 2) encontra-se na figura 31.

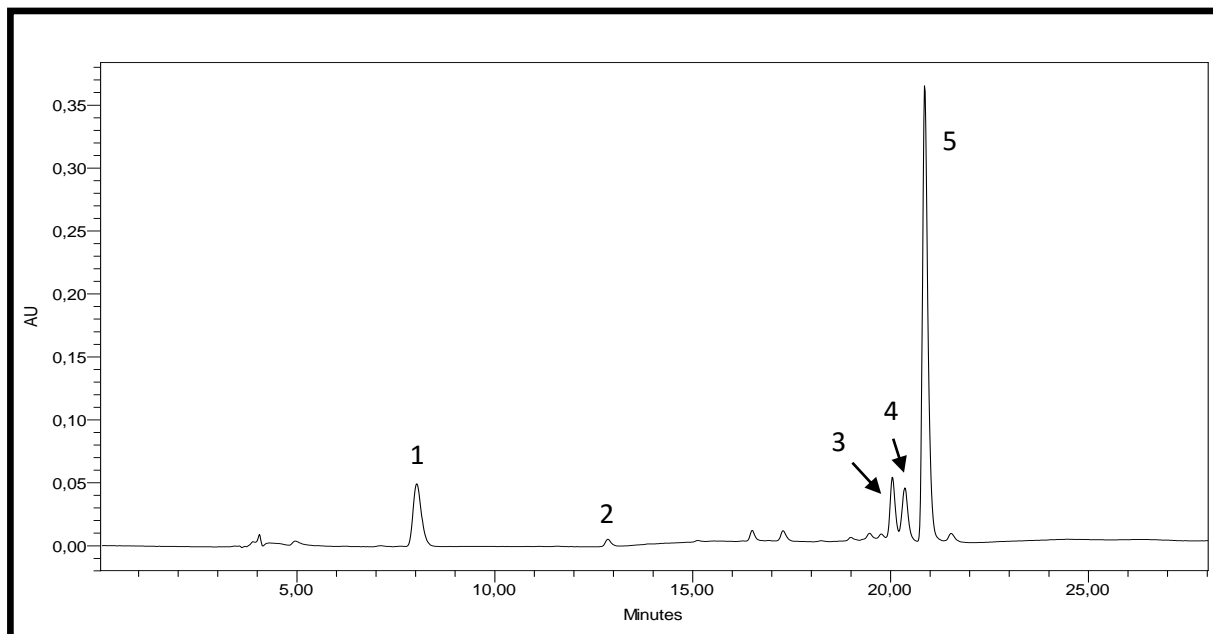


Figura 31: Cromatograma da segunda extração de carotenoides (pico 1: zeaxantina, pico 2:  $\beta$ -criptoxantina, pico 3: zeaxantina\*, pico 4: zeaxantina\*, pico 5: zeaxantina\*).  
\*carotenoide esterificado.

Nesta análise foi possível identificar os carotenoides zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. Os carotenoides com  $t_R$  20 a 22 min (picos 3, 4 e 5), foram considerados carotenoides ligados a ésteres, pois o perfil do espectro UV-Vis foi característico de carotenoides e a presença de ésteres não modifica o espectro, apenas altera o tempo de retenção da substância.

Em Pacheco (2014), houve a quantificação do extrato saponificado de *C. fluminensis* com a detecção de um pico majoritário identificado como zeaxantina e ausência de  $\beta$ -criptoxantina após a saponificação. De acordo com estas informações e pelos espectros UV-Vis dos picos 3, 4 e 5 do cromatograma da figura XX, considerou-se que todos os 3 picos (picos 3, 4 e 5) estão relacionados à zeaxantina esterificada, portanto os picos 1, 3, 4 e 5 foram quantificados como zeaxantina.

A quantificação dos carotenoides totais e dos identificados está apresentada na tabela 10.

Tabela 10: Quantificação de carotenoides da *C. fluminensis* em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

<b>Zeaxantina</b>	<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	<b>Carotenoides totais</b>
<b>208</b>	<b>0,26</b>	<b>380,7</b>

A zeaxantina está presente em quantidades muito baixas em diversas matrizes, porém em Goji e milho é o carotenoide predominante (PACHECO, 2014).

Na tabela 11, ao comparar a quantificação dos frutos de *C. fluminensis* com milho verde *in natura*, considerado a principal fonte deste carotenoide na dieta do brasileiro, nota-se que a *C. fluminensis* tem teor de zeaxantina 52 vezes superior ao do milho.

Tabela 11: Comparação entre os teores de carotenoides da *C. fluminensis* com milho em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

<b>Matriz</b>	<b>Zeaxantina</b>
<b><i>C. fluminensis</i></b>	208
<b>Milho</b>	4

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA (2008).

## 6. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foi possível avaliar de forma satisfatória, por uma técnica precisa e segura, a cromatografia líquida de alta eficiência, o perfil de carotenoides, vitamina C, flavonoides e ácidos fenólicos dos arilos do fruto de *Clusia fluminensis*.

Dentre os compostos bioativos avaliados, detectou-se a presença do carotenoide majoritário zeaxantina, e também de luteína e  $\beta$ -criptoxantina nos arilos do fruto de *C. fluminensis*, além do flavonoide rhamnina (7-metoxiquercetina) e dos ácidos fenólicos protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e o ácido 4-hidroxicinâmico (*p*-cumárico). Também foi detectada a presença de vitamina C, porém em baixa concentração (3,77 mg.100g<sup>-1</sup>).

Poucos trabalhos científicos publicados estão relacionados aos frutos da espécie estudada. Diante dos resultados obtidos, nota-se que foi possível identificar a presença de compostos bioativos nos arilos do fruto de *Clusia fluminensis*, o que agrega valor a este fruto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. M. JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.** Rev Inst Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 1-9. 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ec3966804ac02cf1962abfa337abae9d/Resolucao\\_RDC\\_n\\_360de\\_23\\_de\\_dezembro\\_de\\_2003.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ec3966804ac02cf1962abfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_360de_23_de_dezembro_de_2003.pdf?MOD=AJPERES)>, acesso em 01 de julho de 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 54, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54\\_2012.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES)>, acesso em 01 de julho de 2015.

BARREIRO, E. J. VIEGAS-JR., C. BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337. 2006.

BITTRICH, V. TRAD, R.J. CABRAL, F. NASCIMENTO-JR, J. E. *Clusiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6834>>. Acesso em: 08 Ago. 2014.

BRASIL. ARTIGO 2. Decreto Legislativo nº 2, de 1994. A Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade.

BRASIL. LEI ESTADUAL Nº 6194 DE 12 DE JANEIRO DE 1999. Dispõe sobre a proibição de extração das plantas arbustivas e arbóreas, denominadas de mangues e dá outras providências. **Secretaria de estado do meio ambiente, governo do Pará**. Disponível em: <<http://www.semas.pa.gov.br/1999/01/12/9754/>> Acesso em 19 de janeiro de 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>, acesso em 07 de dezembro de 2014.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia.** – Campinas, SP. Editora da UNICAMP. p. 17-42, 273-397. 2006.

CORREIA, M.C.R. LIMA, H.A. SILVA, R.C.P. Caracterização dos frutos, sementes e plântulas de espécies de *Clusiaceae* das restingas do Rio de Janeiro. *Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 64(1): 061-073. 2013.

CUESTA-RUBIO, O. PICCINELLI, A. L. RASTRELLI, L. *Chemistry and Biological Activity of Polyisoprenylated Benzophenone derivatives*. Attar-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier*, v. 32, p. 671-720. 2005.

CUNHA, C. P. **Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides**. 138p. Dissertação (Mestrado em Química, Química de Produtos Naturais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia, um breve ensaio. *Química Nova na Escola*. n° 7, p. 21-25. 1998.

DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2<sup>a</sup> ed. [S.l.], Editora Wiley. p. 7-8, 149-151, 226-298, 472-473. 2002.

FLORA BRASILIENSIS – A obra. Vol. XII, Part I, Fasc. 102 Prancha 91 Publicado em 01-Abr-1888. Disponível em <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/fviewer>>, acesso em 19 de janeiro de 2015.

GALLEGOS S. C. HENSEN, I. SAAVEDRA, F. SCHLEUNING, M. *Bracken fern facilitates tree seedling recruitment in tropical fire-degraded habitats*. *Forest Ecology and Management*. v. 337, p. 135–143. 2015.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_aquisicao/pof20082009\\_aquisicao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)>, acesso em 10 de agosto de 2015.

IBGE. Mapa de Biomas e de Vegetação. 2004. Disponível em : <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>, acesso em 23 de janeiro de 2015.

KIMURA, M. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. GODOY, H. T. *Assessment of the Saponification Step in the Quantitative Determination of Carotenoids and Provitamins A* *Food Chemistry* v. 35, p. 187-195. 1990.

KLUMP, S. P. ALFRED, M.C. MACDONALD, J. L. *Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: Collaborative study. Journal of AOAC International*, v. 84, n.2, p. 1865-1883. 2001.

KRINSKY, N. I. JOHNSON, E. J. *Carotenoid actions and their relation to health and disease. Molecular Aspects of Medicine*. v. 26, p.459–516. 2005.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. - Campinas, SP: Editora Átomo. Capítulos 1, 3 e 4. 2009.

MALDANER, L. JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, 2009.

MARTINS, A. M. D. **Efeito da esterilização sobre os teores de licopeno em molhos de tomates adicionados à conservas de sardinhas (*Sardinellas brasiliensis*)**. 120 p. Dissertação (mestrado) – Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

MATTILA, P. KUMPULAINEN, J. *Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3660-3667. 2002.

NEO, Y. P. ARIFFIN, A. TAN, C. P. TAN, Y. A. *Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. Food Chemistry*, v. 122, p. 353–359. 2010.

PACHECO, S. PEIXOTO, F. M. BORUINI, R. G. NASCIMENTO, L. S. M. BOBEDA, C. R. R. SANTIAGO, M. C. P. A. GODOY, R. L. O. *Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. Scientia Agricola*. v. 71, n. 5, p. 416-419. 2014.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida**. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

PACHECO, S. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência**. 161p. Tese (Doutorado em Ciência e

Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

PEREIRA, A. P. PUTZKE, J. **Dicionário Brasileiro de Botânica**. Curitiba, CRV, 2010. p. 10.

PEREIRA, V. R. **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria**. 2008. 39f. Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington D. C. *International Life Sciences Institute OMNI Press*, 64p. 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. CORADIN, L. KIMURA, M. AMAYA-FARFAN, J. BIODIVERSIDADE, M. D. M. A. S. D. B. E. F. D. D. C. D. **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Departamento de Conservação da Biodiversidade, 2008.

ROSA, J. S. GODOY, R. L. O. OIANO NETO, J. CAMPOS, R. S. MATTA, V. M. FREIRE, C. A. SILVA, A. S. SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.837-846. 2007.

SASS-KISS, A. KISS, J. MILOTAY, P. KEREK, M. M. TOTH-MARKUS, M. *Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables*. **Food Research International** v. 38, p. 1023–1029. 2005.

SANTIAGO, M. C. P. A. Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.). Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação, Rio de Janeiro. 2014.

SILVA, M. C. A PAIVA, S. R. *Antioxidant activity and flavonoid content of Clusia fluminensis Planch. & Triana*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 84, p. 609-616. 2012.

SILVA, M. L. C. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos naturais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul/set. 2010.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G. MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS / UFSC. 5ª Edição. Capítulos 1, 20 e 23. 2003.

SKOOG, A.D. WEST, DM. HOLLER, F.J. CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo-SP. p. 728-733, 924-930. 2006.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Rev. Nutr., Campinas, 15(1):71-81. 2002.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas, p. 161. 2011.