

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Agroindustrial



Tese

Caracterização físico-química, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.)

LÍRIO INÁCIO RECKZIEGEL HAAS

Pelotas, 2011

LÍRIO INÁCIO RECKZIEGEL HAAS

Caracterização físico-química, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Prof. Dr. Wilfried Schwab

Dr. Fábio Clasen Chaves

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(**Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744**)

H112c Haas, Lírio Inácio Reckziegel

Caracterização físico-química , fitoquímica, atividade antioxidante in vitro e in vivo, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá(*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba(*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.) / Lírio Inácio Reckziegel Haas ; orientador Cesar Valmor Rombaldi , Wilfried Schwab e Fábio Clasen Chaves. - Pelotas,2011.-107f. ; il.- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Ácido L-ascórbico 2.Terpenóides 3.Compostos fenólicos
4.Antioxidante 5.Antiproliferativa 6.Antimicrobiana I
ROMbaldi, Cesar Valmor(orientador) II .Titulo.

CDD 664.8

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Universidade Federal de Pelotas. Orientador

Prof^a Dr^a Josiane Freitas Chim. Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Leonardo Nora. Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Valdecir Carlos Ferri. Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Amauri Costa da Costa. Instituto Federal Sul-Rio-Grandense

Campus Pelotas - Visconde da Graça

As minhas irmãs, mãe Anita e pai Lauro (in
memoriam), com carinho e gratidão.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Fabio Glasen Chaves, pela incansável motivação para a conclusão desse trabalho.

Em especial ao Prof Cesar Valmor Rombaldi, pelo desprendimento na orientação e aos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof Dr Wilfried Schwab por possibilitar a permanência em seu grupo de pesquisa pelo período de um ano.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

HAAS, Lírio Inácio Reckziegel. Caracterização físico-química, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.). 2011. 107f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

O araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.) pertencem a família Myrtaceae e são frutos nativos das zonas temperadas do Brasil e se destacam pelas propriedades bioativas atribuídas as suas espécies. Nesse estudo foram avaliados os constituintes com potencial funcional, nutracêutico e terapêutico a partir de extratos dos seus frutos. Para o araçá, estudaram-se os extratos aquosos e acetônicos de acessos vermelhos e amarelos. Foi demonstrado que o araçá é um fruto pobre em carotenoides totais, ácido ascórbico e antocianinas e rico em compostos fenólicos (768 mg.g⁻¹ na polpa dos frutos) com destaque para a epicatequina. De modo geral, o extrato de acetona extraiu mais compostos que o aquoso. Houve uma correlação positiva dos altos teores de compostos fenólicos com os efeitos antiproliferativos, antimicrobianos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Os frutos da guabiroba são relativamente pequenos, com coloração amarelo intenso, medianamente ácidos (pH 4,3), doces (14 °Brix), ricos em compostos fenólicos totais (616,90 mg EAG.100g⁻¹) e ácido L-ascórbico (1773,95 mg.100g⁻¹) e com alto potencial antioxidante (72,18 % de inibição - DPPH). Para os compostos fenólicos individuais destaca-se a presença da epicatequina (339,70 mg.100g⁻¹), ácido gálico (155,86 mg.100g⁻¹) e ácido elágico (7,04 mg.100g⁻¹). Os extratos apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e também protegeram as células de levedura nos ensaios da atividade antioxidante *in vivo*. Nos frutos foram identificados 36 compostos voláteis. O isolamento dos constituintes majoritários presentes nos extratos metanólicos mostrou a presença de duas chalconas, uma flavanona e ácido abscísico. Ambas as frutas mostram grande potencial para serem exploradas, necessitando de maiores estudos para aprofundar os conhecimentos sobre os potenciais identificados.

Palavras-chave: ácido L-ascórbico, terpenóides, compostos fenólicos, antioxidante, antiproliferativa, antimicrobiana

ABSTRACT

HAAS, Lírio Inácio Reckziegel. Physico-chemical, phytochemical, antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, and antiproliferative effects of extracts of the araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.). 2011. 107p. Thesis (Doctorate degree). Post-Graduate Program in Agro-industrial Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas-RS.

The guava, or strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.) belong to the Myrtaceae family, are wildtype fruits from the temperate zone of Brazil and are rich in bioactive compounds. In this study we evaluated compounds in fruit extracts with potential functionality, nutraceutical and therapeutic. To the strawberry guava, studied the aqueous and acetone extracts of red and yellow peel and it show that the strawberry guava fruit had low concentration in total carotenoids, total anthocyanins and L-ascorbic acid and are rich in phenolic compounds (768 mg.g⁻¹ in the pulp of fruit), especially epicatechin. In general, the acetone extract performed better than the aqueous. There was a positive correlation of high levels of phenolic compounds with the antiproliferative effects, antimicrobial and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. The fruits of guabiroba are relatively small, with intense yellow color and moderately acidic (pH 4.3), sweet (14 °Brix), rich in total phenolic compounds (616.90 EAG.100g mg⁻¹), L-ascorbic acid (1773.95 mg.100g⁻¹) and high antioxidant potential (72.18% inhibition – DPPH method). For the individual phenolic compounds epicatechin shows the high levels than (339.70 mg.100g⁻¹) gallic acid (155.86 mg.100g⁻¹) and ellagic acid (7.04 mg.100g⁻¹). The extracts showed antiproliferative activity against breast tumor cell (MCF-7) and also protected the yeast cells in the tests of antioxidant activity *in vivo*. Were identified 36 volatile compounds in the fruit's. Two chalcones, one flavanone and abscisic acid were the major compounds isolated and elucidated from methanol extracts. Both fruits show great potential to be exploited, requiring further studies to enhance knowledge on the potential identified.

Keywords: L-ascorbic acid, terpenoids, phenolic compounds, antioxidant activity, antiproliferative, antimicrobial

Lista de Figuras

Artigo 1

Figure 1. Red and yellow Araçá52

Artigo 2

Figura 1. Árvore e frutificação de guabiroba.....92

Figura 2. Estruturas isoladas dos frutos da guabiroba.93

Lista de Tabelas

Artigo 1

- Table 1.** Soluble solids, pH, titratable acidity, total anthocyanins, total carotene, and L-ascorbic acid of yellow (Access numbers AR27, AR46 and AR72) and red (Access numbers AR09, AR19, and AR29) strawberry guava fruit53
- Table 2.** Total phenolics (expressed as mg of gallic acid equivalent 100 g fresh fruit pulp) and antioxidant capacity (expressed as % inhibition of DPPH radical) of strawberry guava extracts (extracted with water and acetone).....54
- Table 3.** Individual phenolic composition of strawberry guava extracts (mg.g⁻¹)55
- Table 4.** Antioxidant activity of strawberry guava extracts towards *Saccharomyces cerevisiae* XV185-14c56
- Table 5.** Antimicrobial activity of strawberry guava extracts against *Salmonella* Enteritidis using the disk diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC)57
- Table 6.** Antiproliferative activity of aqueous and acetone extracts of red (AR9) and yellow (AR27) strawberry guava tested at different concentrations 80 µg.mL⁻¹, 60 µg.mL⁻¹ and 40 µg.mL⁻¹ against human cancer cells MCF-7 (breast) and Caco-2 (colon) and rat embryonic fibroblasts 3T3 were used as control58

Artigo 2

- Tabela 1.** Peso dos frutos (g), cor da casca e polpa (CIE L*, a*, b* e ângulo hue) de guabiroba84
- Tabela 2.** Caracterização de pH, sólidos solúveis, antocianinas totais, carotenoides totais, fenóis totais, ácido L-ascórbico, atividade antioxidante em frutos de guabiroba85
- Tabela 3.** Compostos fenóis individuais (mg.100g⁻¹) em frutos de guabiroba.....86
- Tabela 4.** Efeito antiproliferativo de extratos aquosos e etanólicos de guabiroba testados a 100, 75, 50 e 25 µg.mL⁻¹ frente a células cancerosas humanas MCF-7 (mama) e fibroblastos embrionários de ratos 3T387
- Tabela 6.** Compostos voláteis em frutos de guabiroba89

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.2	OBJETIVO GERAL E HIPÓTESE	23
	Artigo 1 - Araçá (<i>Psidium cattleianum</i> Sabine) fruit extracts with in vitro and in vivo antioxidant activity, antimicrobial activity and antiproliferative effect on human cancer cells	26
	Artigo 2 - Caracterização físico-química, fitoquímica e antiproliferativa de extratos do fruto da <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.	59
3.3	CONCLUSÕES	94
3.4	CONCLUSÕES GERAIS	95
3.5	REFERENCIAS	96

INTRODUÇÃO GERAL

A América do Sul é um centro de origem que acolhe grande variedade de espécies frutíferas e algumas delas têm sido domesticadas. No Brasil, especialmente nas regiões de clima equatorial e tropical seco se concentra a maior biodiversidade de espécies, à semelhança do que ocorre em outros centros. A lista de espécies frutíferas identificadas nos trópicos, incluindo a América, Ásia, Austrália e África, é de 2000 espécies. Dessas, cerca de mil espécies foram catalogadas e caracterizadas nos Estados Unidos, distribuídas em 80 famílias. Dessas espécies, pelo menos 400 também ocorrem no Brasil (Alves et al., 2008; Rufino et al., 2010). No entanto, é amplamente sabido que o Brasil, com seus macrobiomas que incluem a Amazônia, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e as planícies do Pampa, e num contexto de clima sub-tropical a temperado, é o maior centro de origem de espécies vegetais e animais (Simarelli, 2007). Mesmo assim, diferentemente do que ocorreu nos continentes Asiático, Europeu e da América do Norte, poucas espécies nativas do Brasil foram domesticadas e exploradas em escala comercial. Em alguns casos, já ocorre significativa participação de produtos oriundos de espécies nativas no mercado nacional e internacional, com é o caso do açaí e de castanha do Brasil, por exemplo, mas a atividade ainda se caracteriza pelo extrativismo (Carvalho & Müller, 2005; Simarelli, 2007).

Embora o bioma amazônico seja conhecido internacionalmente como grande centro da biodiversidade mundial, tanto de espécies vegetais, quanto animais e de microrganismos, há que se considerar que, nas regiões de clima sub-tropical temperado do Brasil e de países vizinhos localizados nessa condição (Uruguai,

Argentina e Paraguai), há significativa biodiversidade, com destaque para espécies frutíferas preditas como potencialmente viáveis do ponto de vista agrônomo e alimentar (Lorenzi, 2000; Silva et al., 2003; Santos, 2006). Como exemplos, podem ser citados o butiá (*Butia capitata*), a uvaia (*Eugenia uvalha* C.), a goiaba serrana (*Feijoa sellowiana* O. Berg), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), o araçá (*Psidium guajava* L.), a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg), a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* O. Berg), dentre outros.

Em trabalhos realizados pelo Grupo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Frutos e Hortaliças (<http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=0045507HR3AKU9>), nos quais se fez uma pesquisa exploratória com vários frutos nativos da região de clima sub-tropical a temperado, foi demonstrado que se tratam de frutos ricos em moléculas fitoquímicas (Zaikovski, 2008; Medina, 2009). A partir desses estudos, selecionaram duas espécies (araçá e guabiroba), da mesma família (Myrtaceae) para aprofundar os estudos. As razões dessa escolha foram baseadas no fato de que: 1) são nativas; 2) há o saber popular dos benefícios potenciais à saúde, mas se carece de conhecimento científico que embase ou valide esse saber; 3) há coleção de acessos de araçá junto à Embrapa Clima Temperado, com ampla variabilidade fenotípica e de respostas agrônomicas (ciclo, produção, produtividade, tamanho de fruto, coloração, suscetibilidade a fitopatias, arquitetura de planta, uniformidade de produção, dentre outros); 4) comprovada a qualidade dos frutos do ponto de vista nutricional e potencial funcional, pode-se propor a valorização em produtos derivados com elevado valor agregado (polpas diferenciadas, liofilizados, extratos, frações enriquecidas, cremes, supergelados, outros); 5) ainda não há coleções formais de guabiroba, tampouco informações acerca do seu comportamento

fitotécnico ou de seu potencial como alimento. Nesse contexto, a seguir serão apresentados dados referentes a essas espécies que constituem o objeto de estudo dessa tese.

No Brasil, a tribo Myrteae está representada por, aproximadamente, 1.000 espécies, essas agrupadas em 23 gêneros. Estima-se que menos da metade das espécies tenha sido avaliadas botanicamente com a devida profundidade. Mesmo assim, os gêneros mais representativos são *Myrcia* (400 espécies), *Eugenia* (350), *Calyptanthes* (100), *Psidium* (70) e *Campomanesia* (24) (Landrum & Kawasaki, 1997).

Dentre as fruteiras nativas do Brasil, a Família Myrtaceae é uma das mais conhecida, devido ao grande potencial tecnológico que a ela é atribuído. Essa família abrange 140 gêneros, dos quais o *Eugenia* apresenta espécies de valor comercial, pelo seu potencial do ponto de vista alimentar e de aproveitamento para a obtenção de fármacos. De modo geral, esse gênero tem como característica espécies que produzem pequenos frutos, entre 4 e 12g. No Sul do País, esses gêneros e espécies são encontrados tanto no ambiente silvestre quanto cultivados em pomares domésticos. Os frutos são considerados, pela maioria dos consumidores, saborosos quando consumidos *in natura* e também na forma de doces, geleias ou licores. Dentre os principais frutos se destacam a goiaba (*Psidium guajava* L.), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), o araçá (*Psidium cattleianum* S.), a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* B.), o cambucá (*Marlierea edulis* N.), o cambuci (*Paivea langsdorffii* B), o camu-camu (*Myrciaria dúbia*), a guabiroba (*Campomanesia fenzliana* B) e a uvaia (*Eugenia uvalha* C.) (Lorenzi, 2000; Silva et al., 2003; Santos, 2006).

Além desses aspectos relacionados ao consumo dos frutos como alimento, várias espécies da família Myrtaceae são amplamente utilizadas como “medicamentos” na medicina popular para tratar, principalmente, distúrbios gastrointestinais, hemorragias e doenças infecciosas, provavelmente por causa de sua adstringência, que decorre da presença de taninos. As folhas e cascas são as partes mais comumente usadas e se constituem nos órgãos mais estudados dessas espécies, já havendo conhecimento científico acerca do tema (Coelho de Souza et al. 2003; Markman et al. 2004, Bonilla et al. 2005; Fiaschi & Pirani, 2009; Souza-Moreira et al. 2011).

O araçazeiro (*Psidium cattleianum*) pertence à família botânica das Mirtáceas, e encontra-se naturalmente distribuído em uma extensa área do Brasil, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. O fruto é uma baga de coloração amarelada ou vermelhada, de acordo com o genótipo, cuja safra ocorre nos meses de fevereiro a abril (Manica, 2000). A polpa é branca, amarelada ou avermelhada, mucigelatinosa, aromática, contendo muitas sementes. No Brasil não há relatos de plantações que objetivam a exploração industrial. O fruto é consumido na forma *in natura*, em sucos, geleias e sorvetes (Haminiuk et al., 2006). Além do aproveitamento doméstico dos frutos e da madeira, utilizam-se também as raízes, cascas e folhas no preparo de infusões, amplamente difundidos na medicina popular.

A mirtácea *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, conhecida no Brasil como guabiroba, ocorre no Cerrado, regiões Sul e Sudeste do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Longhi, 1995). A família é composta por espécies tanto arborícolas como arbustivas: as arborícolas medem entre 8 e 15m, podendo chegar até 25m, e as

arbustivas, entre 0,80 e 1,5m, essas últimas ocorrendo normalmente em moitas. Durante o período de inverno há caducifolia e na primavera (início do mês de setembro) as plantas rebrotam e florescem abundantemente (Almeida et al., 2000; Peixoto et al., 2005). Florescem de setembro a novembro e as flores são pequenas, de coloração creme-esbranquiçada e o fruto do tipo baga globoso, apresenta uma coloração que varia do verde-claro até o amarelo-alaranjado, quando maduro (Backes & Irgang, 2002). A frutificação se dá de dezembro a maio. Por seu formato e tamanho, a guabiroba se assemelha a alguns araçás, razão pela qual também é denominada de pequena goiaba. Porém, observam-se variações morfológicas marcantes entre frutos de plantas diferentes, ou seja, há diferença de ciclo, tamanho, coloração e suscetibilidade à abscisão (Peixoto et al., 2005; Teixeira et al., 2005; Vallilo et al., 2006; Alvarez-Herrera et al., 2009)

Entre as espécies nativas do gênero *Campomanesia*, há aquelas com potencial para cultivo comercial em função das suas características agrônômicas desejáveis, como alto rendimento e elevados teores de sólidos solúveis totais (Teixeira et al., 2005; Melchior et al., 2006). Os frutos são ricos em vitaminas e apresentam componentes próprios para fabricação de flavorizantes (Peixoto et al., 2005; Teixeira et al., 2005; Vallilo et al., 2006). Esses frutos também são consumidos na forma de licores, sorvetes, doces, geleias ou mesmo *in natura*, além de serem utilizados para fins medicinais (Peixoto et al., 2005; Vallilo et al., 2006). Como componentes mais prováveis desses benefícios como antidiarréicos, depurativos e anti-inflamatórios, são citados os flavonóides, as saponinas e os taninos (Feskanich et al., 2000; Markman et al. 2004; Leja et al. 2003; Michels et al., 2006). Destaca-se, no entanto, que esses estudos incluíram, como material de estudo, folhas e cascas. Dados referentes aos frutos ainda são escassos.

Outro aspecto importante a ressaltar é o manifesto interesse demonstrado pela indústria de alimentos na valorização de produtos nativos, tendo em vista que tem havido crescente aceitação por produtos derivados, como é o caso de fermentados, polpas, sucos e sorvetes (Simarelli, 2007). Isso é decorrência do fato de que: a) vários frutos nativos apresentam boa qualidade sensorial; b) há crescente conscientização para a valorização de produtos locais; c) há popularização do conhecimento de que esses produtos são benéficos à saúde (porém, na maioria das vezes, sem a devida validação científica); d) está-se em sintonia com as tendências atuais, que buscam dar valor aos produtos em seus centros de origem, com “sotaques locais”. O Brasil possui um grande número de espécies frutíferas nativas com potencial para serem exploradas economicamente (Alves et al., 2008).

Embora apresentem potencial econômico, os frutos nativos têm consumo restrito devido à produção ainda limitada, à difícil colheita, à exigência em mão-de-obra e aos cuidados com o transporte e armazenamento, tendo em vista serem, na grande maioria, altamente perecíveis. Dessa forma, duas grandes estratégias podem ser propostas para ampliar a oferta: 1) domesticarem-se as espécies, transformando a produção majoritariamente extrativista num perfil de produção frutícola comercial; 2) desenvolver métodos de processamento diferenciados, de modo a preservar e valorizar a qualidade dos produtos (Souza Filho et al. 2000; Carvalho & Müller, 2005; Simarelli, 2007).

Grande parte dos atributos potencialmente funcionais (na sua grande maioria ainda não comprovada) dos frutos nativos é atribuída às moléculas que tem como origem o metabolismo secundário. As plantas produzem um conjunto muito diversificado de moléculas orgânicas, algumas das quais são tradicionalmente

consideradas como não participantes de maneira direta dos principais processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento. Essas substâncias são universalmente denominadas de metabólitos secundários (Hartmann, 2007). Entretanto, há discussões acerca desse conceito, tendo em vista que moléculas como a lignina ocorrem em todo o sistema vascular e parietal das plantas, ou o ácido salicílico que também atua como um hormônio. Mesmo assim, a denominação metabolismo secundário, e, por conseguinte, os metabólitos secundários, são moléculas diferencialmente sintetizadas (presença/ausência) pelo mesmo órgão numa espécie, frente a variações bióticas, abióticas e hormonais. De acordo com a nomenclatura adotada pela British Nutrition Foundation, o metabolismo secundário de plantas pode ser dividido em quatro grupos: terpenóides (cerca de 25 mil compostos), alcalóides (cerca de 12 mil compostos), compostos fenólicos (cerca de 8000 componentes) e compostos enxofrados (Poiroux-Gonord et al. 2010). Ao contrário dos metabólitos primários, os metabólitos secundários são geralmente distribuídos de forma desigual entre os grupos taxionômicos dentro do reino vegetal. Muitos deles têm efeitos positivos sobre a saúde humana e a alguns deles são mesmo essenciais à vida, como as vitaminas (tais como os tocoferóis e tocotrienóis).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que há uma associação positiva entre a alta ingestão de frutos e legumes e a redução da ocorrência de doenças cardiovasculares (Hu, 2003) e certos tipos de câncer (Riboli & Norat, 2003). Juntamente com outros compostos antioxidantes (por exemplo, flavonóides), os polifenóis presentes em frutos e vegetais têm sido relatados como possíveis candidatos na redução de doenças cardiovasculares (Ikram et al., 2009). O efeito protetor pode ser devido às propriedades como sequestradores de radicais livres,

doando hidrogênios supressores de oxigênio singlete e / ou quelantes do íon metálico (Ikram et al., 2009).

Está provado que os radicais livres desempenham um papel importante na indução de muitas doenças, como por exemplo, danos cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e envelhecimento precoce (Ikram et al., 2009). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a ingestão de frutos e legumes tem uma forte correlação inversa com o risco de desenvolvimento de muitas doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares e o câncer (Poiroux-Gonord et al. 2010). São exceções, os estudos que demonstram o contrário (Boffeta et al., 2010). Esses autores, num amplo estudo de coorte, puseram em evidência que há baixa correlação entre consumo de vegetais e prevenção de câncer. Esse estudo é uma exceção no contexto de todas as citações dessa tese. Todos os demais trabalhos atribuem às vitaminas e aos polifenóis dos frutos e vegetais a capacidade antioxidante e imuno ativadora, necessárias à manutenção da homeostase celular (Poiroux-Gonord et al. 2010). Aliás, em relatório divulgado conjuntamente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (2003), há recomendação de se aumentar as quantidades de frutas e hortaliças frescas na dieta, pelo menos em 400 g, de preferência 800g de fruto e produtos hortícolas que devem ser consumidos diariamente. Mesmo assim, os estudos de Boffeta et al. (2010) não podem ser relegados, tendo em vista que houve acompanhamento, durante 8 anos, com aproximadamente 470.000 pessoas, em dez países. Nesse contexto, os frutos nativos têm despertado o interesse da pesquisa por apresentarem propriedades interessantes para a alimentação humana. Essas propriedades são atribuídas à riqueza em compostos, muitos resultantes do metabolismo secundário, cujas

moléculas têm características que lhes conferem propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antitumorais (Hartmann, 2007). No caso específico do araçá e da guabiroba, essas variáveis não foram estudadas, tanto *in vitro*, tampouco *in vivo*.

OBJETIVO GERAL E HIPÓTESE

Espécies de frutíferas nativas cultivadas em ecossistema de seleção para melhoramento agronômico ou em seu ecossistema nativo, araçá (*Psidium cattleyanum*), e guabiroba *Campomanesia xanthocarpa*, respectivamente, não submetidas a fortes pressões de seleção para os critérios normalmente inclusos nos programas de melhoramento (produção, produtividade, tamanho de fruto, resistência a fitopatias, arquitetura de planta), expressam teores elevados de produtos naturais que podem ser relacionados com a potencial resposta funcional nos alimentos.

Frutos oriundos das Mirtáceas, araçá (*Psidium cattleyanum*), e guabiroba *Campomanesia xanthocarpa*, coletados em ecossistema sob condições de seleção para melhoramento da espécie e em ecossistema nativo, respectivamente, apresentam altos teores das moléculas de produtos naturais, os quais apresentam atividades biológicas como atividade antioxidante, antimicrobiana ou antiproliferativa.

Objetivo Geral

Considerando o referencial teórico apresentado, buscou-se através de uma pesquisa majoritariamente descritiva, caracterizar frutos de duas espécies de Mirtáceas, araçá e guabiroba, sob os aspectos físico-químicos, composição de produtos naturais, e a sua potencial atividade funcional.

Objetivos específicos

Para o modelo de estudo “araçá” visou-se:

- a) avaliar a composição físico-química geral;
- b) caracterizar os principais compostos fitoquímicos;
- c) testar solventes com diferentes polaridades na extração de compostos fenólicos;
- d) avaliar as atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*;
- e) testar o potencial de extratos com diferentes solventes frente ao crescimento microbiano e células tumorais.

Para o modelo de estudo “guabiroba” visou-se:

- f) avaliar a composição físico-química geral;
- g) caracterizar os principais compostos fitoquímicos;
- h) avaliar as atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*;
- i) testar o potencial de extratos frente às células tumorais;
- j) identificar os principais compostos voláteis;
- k) isolar e identificar os principais compostos dos extratos metanólicos.

A estrutura da tese, a partir desse referencial teórico, é constituída de dois textos, cada um correspondendo a um artigo científico, ambos com características majoritárias de pesquisa descritiva. No primeiro artigo foram contemplados os objetivos específicos previstos para araçá, e no segundo, a abordagem é similar para guabiroba. Os títulos propostos para os artigos são:

- 1) Artigo 1 -----Dados doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.119

- 2) Artigo 2.....Visando encaminhamento para o Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Artigo 1 - Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with in vitro and in vivo antioxidant activity, antimicrobial activity and antiproliferative effect on human cancer cells

Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity, antimicrobial activity and antiproliferative effect on human cancer cells

Aline Medina¹, Lírio Haas¹, Fábio Clasen Chaves¹, Miriam Salvador², Rui Carlos Zambiasi¹,
Wladimir Padilha da Silva¹, Leonardo Nora¹, Cesar Valmor Rombaldi^{1*}

¹ UFPel/FAEM, Dept. Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C.P. 354, CEP 90010-900,
Pelotas, RS, Brasil

² Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, CEP 95070-560, Caxias do Sul,
RS, Brasil

*Corresponding author - Phone/Fax: + 55 53 32757258; email: chavesfc@gmail.com

Abstract

Araçá or strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) is an attractive tasty small fruit native of temperate zones of Brazil. In this study, functional chemical constituents and the nutraceutical and therapeutical potential of aqueous and acetone extracts of red and yellow accessions of araçá were characterized. While carotenes, ascorbic acid, and anthocyanins were present as minor constituents, araçá fruit presented high levels of phenolic compounds (up to 768 mg.g⁻¹ fresh fruit pulp, ffp) particularly (-)-epicatechin (up to 26.6 mg.g⁻¹ ffp) which were in general more efficiently extracted with acetone over water. Predominance of phenolic compounds was positively correlated with high *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity, antimicrobial and antiproliferative effects.

Key words: Araçá; (-)-epicatechin; phenolic compounds; *Salmonella* Enteritidis; MCF-7; Caco-2.

1. Introduction

Brazil possess the richest plant biome in the planet, with 55,000 higher plant species (22% identified), being 25% endemic, distributed in five main biomes: Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia, Pantanal and Pampa (Souza, Silva, Loir, Rees, Rogez & Larondelle, 2008; Fiaschi & Pirani, 2009). In spite of the potential, the number of domesticated native species utilized for fruit production or fruit derived products is still limited. Successful examples include açai (*Euterpe oleraceae* Mart.), graviola (*Annona accidentale* L.), Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), cashew (*Anacardium occidentale* L.), feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.), among others. Difficulties with domestication, propagation, plant architecture adaptation for commercial cultivation, the highly perishable characteristics of the fruit, and the lack of information regarding their physicochemical and biological potential have been indicated as limiting factors preventing the widespread utilization and consumption of potentially relevant fruit (Proteggente et al., 2002). From the sub-tropical and temperate biomes an example of a potentially marketable native fruit is the strawberry guava, also known as araçá (*Psidium cattleianum* Sabine). With yellow or red berries (Fig. 1), araçá has a nice balance between soluble solids and acidity, and ripens in Brazil in late summer between February and May (Drehmer & Amarante, 2008). Preliminary exploratory studies have suggested high antioxidant activity and high phenolic content variable among strawberry guava genotypes (Rombaldi et al. unpublished results). The few investigations with strawberry guava suggest nutritional and functional potential (Coelho de Souza, Haas, von Poser, Schapoval & Elisabetsky, 2003; Galho, Lopes, Bacarin & Lima, 2007). To the best of our knowledge a more detailed characterization of this potentially marketable fruit has not been done.

Similar to other fruit, strawberry guava has optimum sensory attributes when harvested ripe (Galho et al., 2007). However, strawberry guava is highly perishable when ripe, lasting one to two days at room temperature requiring, in order to extend the conservation period, to be harvested during the pre-climacteric stage or stored under refrigeration (7°C). Processed fruit can be easily stored after flash pasteurization (90°C) for ten minutes due to the low pH of the fruit (Drehmer & Amarante, 2008).

Psidium species occur in areas under constant abiotic stress conditions, including water and temperature extremes (Coelho de Souza et al., 2003; Haminiuk, Sierakowski, Vidal & Masson, 2006). Given the species adaptability to harsh conditions, it is believed that aside from the appealing appearance and flavor, these fruit are rich in bioactive compounds, and consequently possess functional properties of interest (Jacques, Pertuzatti, Barcia & Zambiasi, 2009).

Although traditionally appreciated for its sensory attributes and expected pharmacological properties, araçá is still poorly characterized and limited scientific information is available about this fruit. It is widely known that species rich in phenolic compounds, ascorbic acid and carotenoids are associated with increased protection against cellular oxidation. In addition to their antioxidant potential, phenolic compounds tend to exhibit other prominent biological properties such as antimicrobial and anticarcinogenic activity (Katalinić et al., 2010; Link, Balaguer & Goel, 2010; Proteggente, 2002; Sun, Chu, Wu & Liu, 2002).

Species with combined agronomical, nutritional and functional value can generate new commercial products from high quality fruit, essential in the prevention of chronic-degenerating diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes

and neurodegenerative diseases (Bazzano et al., 2002; Liu et al., 2004). The beneficial effects of fruit and vegetable consumption in the prevention of chronic–degenerating diseases have been challenged (Boffetta et al., 2010). However, the majority of studies suggest that the increased consumption of fruit, vegetables and grains contributes to prevent these illnesses (Bazzano et al., 2002; Liu et al., 2004; Schroeter et al., 2005).

In this study, fruit from six araçá accessions were characterized by quantification of individual phenolic compounds, L-ascorbic acid, total phenolic, total anthocyanin, and total carotene content. Acetone and water fruit extracts were analyzed in terms of radical scavenging power, antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae*, antimicrobial effect against *Salmonella* Enteritidis and antiproliferative effect on human cancer cells, MCF-7 (breast) and Caco-2 (colon).

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and experimental design

Red (accessions AR9, AR19 and AR29) and yellow (accessions AR27, AR46 and AR72) strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit, also known as araçá, were harvested from a research orchard (germplasm collection from Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil) when fruit was ripe. Five hundred grams of fruit from three plants (clones) of each accession were harvested. Each plant represented an experimental unit. Fruit were washed and the seeds removed. Seedless fruit were then flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses. All analyses were performed in triplicate.

2.2. Soluble solids (SS), pH and titratable acidity (TA)

Soluble solids content was determined by refractometry, and the results expressed as % (w/w). Total acidity (TA) and pH were measured directly in the extracted fruit juice. TA was determined by titration and results were expressed as milligrams of citric acid per 100 grams of fresh fruit pulp ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ffp}$).

2.3. Phenolic compounds

Phenolic compounds were extracted following the method described by Souza et al. (2008). Frozen pulp (ten grams) was ground in a mortar and pestle, extracted with 20 mL deionized water (DW) and placed on an orbital shaker set at 200 rpm for one hour at room temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), in the dark. Extracts were then centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C and the supernatant was concentrated in a freeze-drier and the final volume adjusted to 10 mL DW. The same extraction was performed using acetone instead of water. In this case the extract was concentrated in a rotary evaporator at 40°C under reduced pressure and the residue was redissolved in 10 mL of DW.

Total phenolic content was determined using the method described by Dewanto, Wu, Adom, and Liu (2002). 125 μL of each extract was combined with 500 μL of DW and 125 μL of Folin Ciocalteu reagent (2 N). The solution was allowed to rest for six minutes and 1.25 mL of sodium carbonate (7% m/v) and 1 mL of DW was added adjusting the final volume to 3 mL. The mixture was allowed to rest for 90 minutes at room temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ C}$), in the dark, then absorbance was measured at 760 nm in a UV/Vis spectrophotometer using DW as control. Total

phenolic content was expressed in milligrams of gallic acid equivalents per 100 grams of fresh fruit pulp (mg GAE 100.g⁻¹ ffp).

Quantification of individual phenolic compounds was performed in aqueous and acetone extracts according to Hakkinen and Torronen (2000). One mL extract was hydrolyzed with 35 mL of acidified methanol. Extracts were kept in a water bath at 35°C for 24 hours, in the dark, then filtered (Whatman n^o1), concentrated (rotary evaporator at 40°C) and resuspended in methanol (10 mL). Sample was centrifuged (12,000 x *g* for ten minutes), filtered in a 0.45µm membrane and an aliquot of 20µL was injected in the HPLC. The analysis was performed in a Shimadzu 10A_{VP}, using a Nova-Pak C₁₈ (3.9 cm x 150 mm x 4 µm) column. The mobile phase was composed of A – acidified water (1% acetic acid v/v) and B – 100% methanol. The elution gradient started at 100% A; then linearly went to 60% A at 25 minutes; held for two minutes; then 95% A at 37 minutes; held for five minutes and back to the initial conditions. Flow rate was 0.9 mL min⁻¹, and column temperature was kept at 25°C. Individual phenolic compounds ((-)-epicatechin, gallic acid, coumaric acid, ferulic acid, myricetin, quercetin) were identified by retention time and UV absorption spectral comparisons. UV-Vis detector was set at 280 nm. Individual phenolics were quantified by external standard calibration curves (all standards were dissolved in methanol) and results were expressed as mg g⁻¹ ffp.

2.4. Anthocyanins

In order to determine total anthocyanins content, frozen fruit pulp, equivalent to ten grams of fresh pulp, was ground and suspended in 20 mL cold methanol and left for two hours in the dark, followed by centrifugation at 12,000 x *g* for 15 minutes at 4°C. The supernatant was injected into a C18 Sep-Pack column, preconditioned

with acidified methanol (HCl 0.01%). The column was washed with water, followed by ethyl acetate and the elution was carried out with acidified methanol (0.01% HCl). The anthocyanin fraction was measured at 530 nm in a spectrophotometer, and total content was expressed as milligram of cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 gram of fresh fruit pulp ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of ffp) (Giusti & Wrolstad, 2001).

2.5. Carotenes

Frozen fruit pulp, equivalent to ten grams of fresh fruit pulp (ffp), was ground under liquid nitrogen using a mortar and pestle, suspended in 20 mL of acetone (80% v/v), stirred for 15 minutes and filtered (the extraction was repeated three times). The filtrate was then centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 minutes and the supernatant was concentrated and brought to 40 mL with acetone. Absorbance was measured at 646, 663 and 470 nm in an UV/Vis spectrophotometer. Total carotene content was determined using the equations described by Lichtenthaler and Welburn (1983) and expressed as microgram of β -carotene per gram of fresh fruit pulp ($\mu\text{g } \text{g}^{-1}$ ffp).

2.6. L-ascorbic acid

L-ascorbic acid was determined using the method described by Vinci, Rot and Mele (1995). Frozen fruit pulp, equivalent to 5 g of fresh fruit pulp (ffp), was ground using a mortar and pestle under liquid nitrogen, suspended in 30 mL of a cold (4°C) metaphosphoric acid solution (4.5% w/v in water), stored at 4°C for one hour in the dark and then brought to 50 mL with DW water. The sample was filtered and the filtrate centrifuged at $12,000 \times g$ for ten minutes at 4°C . The supernatant was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Durapore membrane, and a $25 \mu\text{L}$ aliquot was injected in a HPLC Shimadzu system, using a reverse phase Shim-Pak CLC-ODS column ($3.9 \text{ cm} \times 150$

mm x 4 m). An elution gradient started at 100% acetic acid 0.1% v/v (A), then linearly reduced to 98% of A and 2% of methanol (B) at five minutes; then held for two minutes and returned to initial conditions at ten minutes. Flow rate was 0.8 mL min⁻¹ and the UV detector was set at 254 nm. Identification was based on retention time comparison to an L-ascorbic acid standard. Quantification was based on an external standard calibration curve and results were expressed as mg of L-ascorbic acid per 100 g of ffp.

2.7. Antioxidant activity (*in vitro*)

Antioxidant potential was determined using the DPPH radical scavenging method described by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995). 100 µL of each extract (diluted 10 fold) added to 3.9 mL of DPPH solution in methanol (100 mM) was stirred and kept in a closed flask in the dark. The control treatment was composed of methanol and water. Preliminary assays were used to determine reaction time, by measuring absorbance at 517 nm at 20 minute intervals for six hours. Sixty minutes corresponded to the exponential phase of the reaction and the radical scavenging capacity was expressed as % inhibition according to the equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Absorption Control} - \text{Abs. Sample})}{\text{Abs. Control}} \times 100$$

2.8. Antioxidant activity (*in vivo*)

Physicochemical results and radical scavenging capacity indicated AR9 (red) and AR27 (yellow) as the most promising genotypes to be further investigated. *In vivo* antioxidant activity was carried out using *Saccharomyces cerevisiae* XV 185-14C (*MAT α* , *ade 2-1*, *arg 4-17*, *his 1-7*, *lys 1-1*, *trp 1-1*, *trp 5-48*, *hom 3-10*) yeast,

provided by Dr. R. C. Von Borstel (Genetics Department, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada). *S. cerevisiae* was cultivated in YPD solid media containing yeast extract (1% m/v), agar (2% m/v), glucose (2% m/v) and peptone (2% m/v) (Merck). Cell suspensions were diluted in a NaCl (Reagem) solution at (0.9% m/v). In order to determine the antioxidant capacity, 2×10^6 cells/mL yeast was treated with AR27 and AR9 extracts diluted 1:4 (extract:water). The final concentration of the extract was 115 mg of total phenolic compounds in 100 mL^{-1} of water (this dilution was the highest non-cytotoxic concentration determined in preliminary assays). The oxidative agent used was a solution of 50 mM hydrogen peroxide (Merck) in sterilized distilled water prepared immediately prior to use. The oxidative solution was added after the extracts and incubated at 28°C for one hour under constant stirring. The samples were then diluted in a sodium chloride solution (0.9% w/v), seeded into a complete culture medium (10 g.L^{-1} of yeast extract, 20 g.L^{-1} of peptone, 20 g.L^{-1} of dextrose and 20 g.L^{-1} of agar-agar) and incubated at 28°C for 48 hours. After incubation, the colonies were counted. The total number of colonies observed on the control plate (untreated cells) was defined as 100% survival.

2.9. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of the extracts was tested against *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) by the disk diffusion method and by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). *S. Enteritidis* was kept at 5°C in trypticase soy agar media (Acumedia) and cell suspensions at 10^7 CFU mL^{-1} obtained by the turbidity standard McFarland N^o 0.5, were standardized adjusting the optical density to 0.1 when measuring absorbance at 625 nm. The antibiotic ciprofloxacin (166 mg mL^{-1})

was utilized as positive control, and pure water as negative control. A *S. Enteritidis* suspension was spread in Agar Mueller-Hinton (Acumedia) in 15 cm diameter plates. Filter paper disks (6 mm diameter) were soaked in the extracts for five hours. The disks were then dried at room temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) and placed on the surface of the inoculated plates and incubated at 37°C for 24 hours. The diameter of the inhibition zones was measured in millimeter. Inhibition zones were compared to those of control disks. Minimal inhibitory concentration was defined as the lowest concentration that inhibited the growth of the microorganism detected visually and the extract concentrations were tested at 100%, 40%, 16%, 10% and 5%.

2.10. Antiproliferative activity

The antiproliferative effect of the extracts was tested on human cancer cells MCF-7 (breast) and Caco-2 (colon) while rat embryonic fibroblast cells 3T3 were used as control. RPMI 1640 media (Gibco BRL) containing bovine fetal serum (20% v/v) in the presence of antibiotics (100 units mL^{-1} penicillin G, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin) was used for cell culturing (5×10^5 mL/cells). Cell lines were placed in 96 well plates, depositing $100\mu\text{L}$ per well, and kept for 24 hours at 37°C in atmosphere containing 95% of O_2 and 5% of CO_2 and 100% relative humidity. Cells were then exposed to three extract concentrations ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), having three replicates for each concentration. After incubating for 48 hours, cells were fixed by adding trichloroacetic acid (50% m/v) and placed at 4°C for one hour. These concentrations were chosen, based on preliminary studies that verified from a pool of aqueous araçá extracts an IC_{50} at $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ in 48 hours of treatment. The colorimetric assay was performed by adding sulforhodamine B solution at 0.4% (m/v) in acidified water (acetic acid 1% v/v) in each of the wells. After

30 minutes at room temperature, the non-fixed solution was discarded by washing it off with acidified water. The dye fixed to cellular proteins was resolubilized using buffer Tris 10 mM (pH 10.0) under orbital stirring at 50 rpm, at room temperature for five minutes. Optical density readings were performed in a spectrophotometric ELISA plate reader at 540 nm. Absorbance data was correlated with the standard curve of viable cells and the results were expressed in % cell survival compared to the control treatment composed of MCF-7 human cancer cells cultivated in RPMI 1640 media.

2.11. Statistical Analysis

Results were evaluated using ANOVA and means comparison by Tukey's test at 5% probability using SAEG 9.1 software. Percentage data was normalized according to the equation $f(x) = \arcsin \sqrt{X}$ before statistical analysis.

3. Results

3.1. Physicochemical characterization of araçá fruit

Araçá fruit presented pH varying from 3.1 to 3.7, acidity from 7.3 to 16.2% of citric acid equivalent, and soluble solids from 6.0 to 11.8%. Differently from what was expected, araçá fruit is relatively poor in L-ascorbic acid (0.1 to 7.2 mg 100 g⁻¹ ffp), carotenes (3.9 to 11.3 µg g⁻¹ ffp) and anthocyanins (0.2 to 6.3 mg 100 g⁻¹ ffp) when compared to other fruit (Jacques et al., 2009). Although higher than the yellow ones the red araçá showed a total anthocyanin content around 6.3 mg 100 g⁻¹ ffp.

Araçá had expressive total phenolic content ranging from 400.8 to 610.7 mg GAE100 g⁻¹ ffp (Table 2). In general, acetone improved extractability of phenolic compounds compared to the aqueous extraction, except for AR19, in which phenolic

content was the same (Table 2). The use of acetone improved the extraction of total phenolic compounds but maintained the same proportion among types of individual phenolic compounds. When analyzing aqueous and acetone extracts of yellow (AR27) and red (AR9) araçá both presented (-)-epicatechin followed by gallic acid as the main phenolic compounds, with approximately 70% and 25%, respectively. Coumaric acid, ferulic acid, myricetin and quercetin, present as minor components, representing respectively approximately, 1.0%, 0.2%, 0.05% and 0.05% of araçá total phenolic compounds (Table 3).

3.2. Antioxidant activity (*in vitro*)

Extracts with higher radical scavenging power also showed higher phenolic content (Table 2). Acetone extracts which had higher antioxidant activity also had higher levels of phenolic compounds (Table 2), except for genotype AR72, in which there was no variation in the levels of phenolic compounds extracted with water or acetone. When comparing genotypes, in general, the red ones presented higher antioxidant activity, varying from 35.2% (AR29) to 45.3% (AR9) of inhibition of the DPPH radical, while yellow fruit provided 19.7% (AR72) to 34.6% (AR27) inhibition.

3.3. Antioxidant activity (*in vivo*)

Antioxidant capacity was also evaluated by comparing the survival rate of *S. cerevisiae* XV185-14c yeast treated with hydrogen peroxide in the presence of araçá extracts prior to the application of this stress agent (Table 4). Araçá extracts, independent of the extraction solvent, provided survival rates above 80%; being capable of minimizing the cytotoxic effects induced by hydrogen peroxide (Table 2). Although AR9 acetone extracts had higher levels of total phenolic compounds, higher

antioxidant activity by the DPPH method (Table 2) and higher levels of (-)-epicatechin and gallic acid, this extract did not show a higher protection of *S. cerevisiae* XV185-14c towards H₂O₂ (Table 4). Extract concentration was set in 25%, because this was the maximum concentration that did not cause cytotoxic effects. Although antioxidant activity through the DPPH radical scavenging was not as expressive (27.6% and 45.3%) the yeast protective experiment indicated potential protective action against oxidative stress (Table 4).

3.4. Antimicrobial activity

Antimicrobial potential of araçá extracts towards *Salmonella* Enteritidis was evaluated looking at the inhibition halo formation and determining minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts (Table 5). All araçá extracts showed antimicrobial activity. MIC were at 5% of the concentration of extracts except for the water extract of red strawberry guava AR9 (16%).

3.5. Antiproliferative activity

All extracts significantly reduced the proliferation of MCF-7 and Caco-2 cells independent of the genotype and extraction solvent (Table 6). In addition, extract activity was concentration dependent. Incubation of fibroblast cells (3T3) with 80 µg mL⁻¹, for all extracts did not affect survival rates, confirming that the response obtained in MCF-7 and Caco-2 cells was not due to a toxicity action.

4. Discussion

Araçá is an acidic fruit relatively poor in L-ascorbic acid, carotene and anthocyanin; however, this fruit is a rich source of total phenolic compounds ranging from 400.8 to 610.7 mg of gallic acid equivalents (GAE) 100 g^{-1} ffp, similar to other fruit such as Surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) and blackberry (*Rubus* L.) containing respectively between 201.8 to 420.8 and 645.5 to 731.4 and mg GAE 100 g^{-1} ffp (Jacques et al., 2009), and significantly richer than strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) and grape (*Vitis vinifera* L.) reported to contain 182 and 147.8 mg GAE 100 g^{-1} ffp respectively (Sun et al., 2002).

Among the evaluated strawberry guava accessions, the red ones (AR9, AR19, AR29) had higher total soluble solids, acidity, total phenolic compounds and total anthocyanin, and consequently higher antioxidant activity towards the DPPH radical (Table 1). These results are in partial agreement with Luximon-Ramma, Bahorun and Crozier (2003), who found strawberry guava rich in phenolic compounds (537 to 563 mg GAE 100 g^{-1}). However, there is a significant difference regarding L-ascorbic acid content, while Luximon-Ramma et al. (2003) studying northern Mauritius strawberry guava found 20 to 24 mg 100 g^{-1} , strawberry guava from Southern Brazil showed 0.1 to 7.2 mg 100 g^{-1} ffp.

Phenolic compounds were high in strawberry guava fruit, and on average, acetone allowed for higher extractability of these compounds when compared to water respectively, 594mg/100g and 256mg/100g. Some studies have shown that the extraction solvent has strong influence in the extractability of phenolic compounds and therefore on the extract's bioactivity (Rusak, Komes, Likic, Horzic, & Kovac, 2008; Zhao & Hall III, 2008). Acetone extracts richer in phenolic compounds presented higher DPPH scavenging capacity, indicating a positive correlation between phenolics and antioxidant potential, which has also been seen in other fruit,

plants, juices and wine (Rusak et al., 2008; Zhao & Hall III, 2008). Although in some cases the correlation between phenolic compounds and L-ascorbic acid with antioxidant potential is absent, the majority of studies show a positive correlation (Luximon-Ramma et al., 2003; Sun et al., 2002; Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris & Diamantidis, 2007).

Of the six accessions studied, the red ones showed on average higher antioxidant activity; particularly the AR9 acetone extract which had 45.2% inhibition of the DPPH radical, in agreement with the fact that fruit containing anthocyanins have high antioxidant potential (Sun et al., 2002; Pantelidis et al., 2007). However, total anthocyanin in red strawberry guava was relatively low (4.82 to 5.05 mg of cyanidin-3-glycoside 100 g⁻¹), when compared to most red fruit including Surinam Cherry (9.6 to 138.9), *Morus* sp. (45.2 to 47.7) and blueberry (72.0 to 128.0 expressed in mg of cyanidin-3-glucoside 100 g⁻¹ ffp) (Jacques et al., 2009).

(-)-epicatechin, followed by gallic acid, represented 69.2% and 29.5%, respectively of the total phenolic compounds. Studies have shown (-)-epicatechin present in foods to contribute to the reduction in the risks of developing cardiovascular diseases, due to its role on vasodilation, lowering blood pressure and as an antioxidant defense system, besides its antimicrobial potential (Katalinić et al., 2010; Schroeter et al., 2005). Polyphenols could play an important role in cancer prevention by epigenetics mechanisms mainly by DNA methylation, preventing histone modification and regulation of *mRNA* expression (Link et al., 2010).

Quercetin and myricetin, are flavonols found in amoras, blueberries, apples, teas and garlic, usually in higher levels on the skin of fruit (Riihinen, Jaakola, Kärenlampi & Hohtola, 2008); however, in strawberry guava these compounds were present in very low levels (Table 3). In addition to antioxidant properties against

cardiovascular diseases, it has antimutagenic potential, and anticarcinogenic, probably preventing histone modification (Link et al., 2010).

Richness of phenolic compounds in strawberry guava suggests potentially antimicrobial and antiproliferative properties. Although extracts rich in phenolic compounds can cause cytotoxicity, *in vivo* studies with ethanolic leaf extracts of strawberry guava did not show mutagenic or cytotoxic effects (Costa et al., 2008). In addition, to the best of our knowledge no *in vivo* studies with the fruit have been done.

Another strategy employed to evaluate the antioxidant potential of strawberry guava fruit is the use of yeast sensitive to oxidative stress. Using this method, strawberry guava, independently of the genotype and extraction method, constituted a good antioxidant protection towards eukaryotic cells. All accessions induced more than 82% survival while cells not previously treated with the extracts showed a survival rate of 44.5%. H_2O_2 , a common product formed during normal cellular aerobic metabolism, and/or under certain pathophysiological conditions is able to induce damage in proteins and lipids as well as in DNA, mainly by the generation of hydroxyl radicals via the Haber-Weiss/Fenton reaction (Caillet, Yu, Lessard, Lamoureux, Ajdukovic & Lacroix, 2007). The mechanisms of the antioxidant action of phenolic compounds are complex and are still being studied. In a general manner, they can avoid reactive species formation either by inhibition of enzymes or by chelation of trace elements involved in free radical production, they can scavenge reactive species, and they can up-regulate or protect antioxidant defense. Some compounds can also act similarly to enzymatic defenses, since they are able to neutralize reactive species such as superoxide anions and hydrogen peroxide. In general, flavanoids are capable of stabilizing free radicals, avoiding oxidative stress

and limiting the production of more free radicals (Caillet et al., 2007). The antioxidant capacity of phenolic compounds is directly associated to the structure and reactivity of its hydroxyl groups. In flavonoids, hydroxyls located in the B ring are determinants of the sequestering activity of reactive oxygen species (Caillet et al., 2007).

The antioxidant activity of aqueous extracts significantly increased yeast survival treated with hydrogen peroxide, demonstrating an important antioxidant capacity, however results obtained through the DPPH method have shown relatively low antioxidant capacity ranging from 17.8% to 35.0% for the aqueous extracts of yellow (AR27) and red (AR9) strawberry guava respectively.

The strawberry guava exhibited an antimicrobial effect against *Salmonella* Enteritidis as expected due to their phenolic content. The mechanism for the antimicrobial activity of many plant extracts have been attributed to phenolic compounds that react with the cell membrane, and inactivation of essential enzymes and or complexation with metallic ions, limiting their availability to the microbial metabolism. Antimicrobial effects particularly from yellow strawberry guava extracts did not correlate with antioxidant activity measured by DPPH. The difference in mode of action of the phenolic compounds on the antioxidant activity towards the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and antimicrobial activity against *Salmonella* Enteritidis can be explained in the structural differences of these organisms. Phenolic compounds could act directly in the destabilization of the bacterial cell membrane, primary responsible for the respirations of this microorganism. In yeast, phenolics could act as metal chelators or scavenging free radicals which are otherwise harmful to the cell. In this case, cell membrane is not affected and consequently mitochondria, vital in respiration, is not affected by the action of phenolic compounds.

Strawberry guava extracts reduced survival rates of breast cancer cells (MCF-7) and colon cancer cells (Caco-2), by a mechanism other than toxicity since this extracts did not affect fibroblast cells (3T3). MCF-7 cell survival was more affected by extracts rich in polyphenols than by extracts rich in anthocyanin which is the case of Green tea and strawberry guava.

In contrast to the benefits, some phenolic compounds have been reported as pro-oxidants and genotoxic *in vitro*, associating this behavior with the reactive oxygen species produced during the redox cycle (Lopes, Saffi, Echeverrigaray, Henriques & Salvador, 2004). An exception to this affirmative comes from Boffetta et al. (2010) that, found modest association between the consumption of fruit and vegetable with cancer prevention. However, these authors emphasize the need for interpreting these results with caution, since there is a likelihood of mistakes originating from answers provided by the investigated people.

5. Conclusion

This study showed antioxidant activity and antimicrobial and antiproliferative effects of strawberry guava extracts. Acetone extracts showed higher antioxidant activity, which was correlated to high levels of phenolic compounds. Extracts from all strawberry guava cultivars possessed all the investigated phenolic compounds, with epicatechin as the predominant, followed by gallic acid. Aqueous extracts were efficient on antioxidant assays towards *Saccharomyces cerevisiae*, providing protection against hydrogen peroxide above 80%. Extracts also exhibited an important antimicrobial activity against a pathogenic bacteria *Salmonella* Enteritidis. This indicated that strawberry guava could be a source of natural antioxidants and antimicrobial agents with application in the food and pharmaceutical industry. Further

studies must be developed to prove its therapeutical efficacy and antimicrobial potential against other microorganisms.

Acknowledgments

To CNPq for financial support and a scholarship and to CAPES for a scholarship.

References

Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L., & Whelton, P. K. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 93–99.

Boffetta, P., Couto, E., Wichmann, J., Ferrari, P., Trichopoulos, D., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Duijnhoven, F. J., Büchner, F. L., Key, T., Boeing, H., Nöthlings, U., Linseisen, J., Gonzalez, C. A., Overvad, K., Nielsen, M. R., Tjønneland, A., Olsen, A., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., Morois, S., Lagiou, P., Naska, A., Benetou, V., Kaaks, R., Rohrmann, S., Panico, S., Sieri, S., Vineis, P., Palli, D., van Gils, C. H., Peeters, P. H., Lund, E., Brustad, M., Engeset, D., Huerta, J. M., Rodríguez, L., Sánchez, M. J., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Hallmans, G., Johansson, I., Manjer, J., Sonestedt, E., Allen, N. E., Bingham, S., Khaw, K. T., Slimani, N., Jenab, M., Mouw, T., Norat, T., Riboli, E., & Trichopoulou, A. (2010). Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute*, 102(8), 529–537.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30.

Caillet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux, G., Ajdukovic, D., & Lacroix, M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, *100*(2), 542–552.

Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., & Elisabetsky, E. (2003). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, *90*(1), 135–143.

Costa, T. D. A., Vieira, S., Andrade, S. F., & Maistro, E. L. (2008). Absence of mutagenicity effects of *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) extract on peripheral blood and bone marrow cells of mice. *Genetics and Molecular Research*, *7*(3), 679–686.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 3010–3014.

Drehmer, A. M. F., & Amarante, C. V. T. do. (2008). Post-harvest preservation of red strawberry-guavas as affected by maturity stage and storage temperature. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *30*(2), 322–326.

Fiaschi, P., & Pirani, J. R. (2009). Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution*, *47*(5), 477–496.

Galho, A. S., Lopes, N. F., Bacarin, M. A., & Lima, M. G. S. (2007). Chemical composition and growth respiration in *Psidium cattleianum* Sabine fruits during the development cycle. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(1) 61–66.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E., editor. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons. p 1–13.

Hakkinen, S. H., & Torronen, R. (2000). Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influences of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33(6), 517–524.

Haminiuk, C. W. I., Sierakowski, M. R., Vidal, J. R. M. B., & Masson, M. L. (2006). Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (*Psidium cattleianum* sabine). *LWT – Food Science and Technology*, 39(4), 426–430.

Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., & Zambiasi, R. C. (2009). Bioactive compounds in small fruits cultivated in the southern region of Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(2), 123–127.

Katalinić, V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), 715–723.

Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591–592.

Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, doi:10.1016/j.bcp.2010.06.036.

Liu, S., Serdula, M., Janket, S. J., Cook, N. R., Sesso, H. D., Willet, W. C., & Manson, J. E., & Buring, J. E. (2004). A prospective study of fruit and vegetable intake and the risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 27(12), 2993-2996.

Lopes, M. I. L., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J. A. P., & Salvador, M. (2004). Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 437–445.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., & Crozier, A. (2003). Antioxidant actions and phenolic and vitamin contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 83(5), 496–502.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved Standard M7-A6. Wayne, PA: NCCLS.

Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777–783.

Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., van de Put, F., Dacombe, C., & Rice-Evans, C. A. (2002). The

antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217–233.

Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110(1), 156–160.

Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., & Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852–858.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H., & Kelm, M. (2005). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1024–1029.

Souza, J. N. S., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*, 106(1), 331–339.

Sun, J., Chu, Y., Wu, X., & Liu, R. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454.

Vinci, G., Rot, F., & Mele, G. (1995). Ascorbic acid in fruits, a liquid chromatographic investigation. *Food Chemistry*, 53(2), 211–214.

Zhao, B., & Hall III, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry*, 108(15), 511–518.



Figure 1. Red and yellow Araçá

Table 1. Soluble solids, pH, titratable acidity, total anthocyanins, total carotene, and L-ascorbic acid of yellow (Access numbers AR27, AR46 and AR72) and red (Access numbers AR09, AR19, and AR29) strawberry guava fruit

Color	Access	Soluble solids ^a	pH	Titratable acidity ^b	Total anthocyanin ^c	Total carotene ^d	L-ascorbic acid ^e
Yellow	AR27	9.0 c	3.65 a	7.42 d	0.21 d	10.84 a	0.10 d
	AR46	10.8 b	3.71 a	9.47 c	0.55 c	7.00 b	7.20 a
	AR72	6.0 c	3.66 a	7.30 d	0.28 d	3.89 d	4.72 b
Red	AR09	10.4 b	3.21 b	15.23 a	5.05 b	11.34 a	0.12 d
	AR19	11.8 a	3.31 b	12.22 b	6.29 a	7.57 b	0.45 c
	AR29	10.0 b	3.11 b	16.19 a	4.82 b	5.45 c	0.12 d

Values are the means of three replicates. Means followed by same letter in a column are not significantly different by Tukey's test at $p > 0.05$.

^aSoluble solids expressed as °Brix

^bTitratable acidity expressed as % of citric acid equivalents per 100 g⁻¹ ffp

^cTotal anthocyanin are expressed as mg of cyaniding-3,5-diglucoside 100 g⁻¹ ffp

^dTotal carotene expressed as µg of β-carotene equivalents g⁻¹ ffp

^eL-ascorbic acid expressed as mg of acid per 100 g⁻¹ ffp

Table 2. Total phenolics (expressed as mg of gallic acid equivalent 100 g fresh fruit pulp) and antioxidant capacity (expressed as % inhibition of DPPH radical) of strawberry guava extracts (extracted with water and acetone)

Solvent	Genotype	Yellow				Red	
	<i>Analysis</i>	AR27	AR46	AR72	AR9	AR19	AR29
Water	<i>phenolic</i>	528.30 C b	452.01 D b	402.68 E b	632.56 A b	581.02 B b	590.32 B b
	<i>DPPH</i>	27.63 B b	22.36 C b	15.98 D a	39.89 A b	29.29 B b	30.25 B b
Acetone	<i>phenolic</i>	672.21 B a	586.23 C a	532.48 D a	768.21 A a	655.36 B a	657.97 B a
	<i>DPPH</i>	34.58 B a	26.68 C a	19.65 D a	45.32 A a	37.69 B a	35.27 B a

Values are the means of three replicates. Means in each analysis followed by the same upper case letter in a row are not significantly different by Tukey's test at $p>0.05$. Means in each analysis followed by the same lower case letter in a column are not significantly different by Tukey's test at $p>0.05$.

Table 3. Individual phenolic composition of strawberry guava extracts (mg.g⁻¹)

Genotype	Extracts	(-)-Epicatechin	Gallic acid	Coumaric acid	Ferulic Acid	Myricetin	Quercetin
Red							
AR9	Water	21.304 a	8.010 a	0.077 b	0.033 a	0.006 b	0.005
	Acetone	10.593 b	6.971 b	0.317 a	0.060 a	0.047 a	nd
AR19	Water	7.784 a	3.630 a	0.057 a	0.075 a	0.004 b	0.002 a
	Acetone	5.287 b	3.877 a	0.077 a	0.038 b	0.072 a	0.017 a
AR29	Water	6.158 a	3.083 a	0.042 a	0.081 a	0.002 b	0.004 b
	Acetone	2.639 b	1.932 b	0.033 a	0.047 a	0.140 a	0.066 a
Yellow							
AR27	Water	7.925 b	6.349 a	0.026 b	0.023 a	0.001 b	nd
	Acetone	17.149 a	6.164 a	0.360 a	0.020 a	0.038 a	nd
AR46	Water	4.629 b	2.974 b	0.042 b	0.044 a	0.002 a	0.068 a
	Acetone	11.176 a	4.329 a	0.101 a	0.036 a	0.002 a	0.027 b
AR72	Water	7.205 b	4.2370 b	0.042 b	0.029 a	nd	nd
	Acetone	26.595 a	7.2670 a	0.491 a	0.020 a	0.018	0.020

nd – not detected

Values are the means of three replicates. Means in each analysis followed by the same lower case letter in a column are not significantly different by Tukey's test at $p > 0.05$.

Table 4. Antioxidant activity of strawberry guava extracts towards *Saccharomyces cerevisiae* XV185-14c

Treatments	%Survival
Water	100.0 a
H ₂ O ₂ 50 mM	44.5 c
Water extract AR27 + H ₂ O ₂ 50 mM	85.7 b
Acetone extract AR27 + H ₂ O ₂ 50 mM	83.0 b
Water extract AR9 + H ₂ O ₂ 50 mM	82.0 b
Acetone extract AR9 + H ₂ O ₂ 50 mM	85.0 b

Values are the means of three replicates. Means followed by the same letter in a column are not significantly different by Tukey's test at $p > 0.05$.

Table 5. Antimicrobial activity of strawberry guava extracts against *Salmonella* Enteritidis using the disk diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC)

Genotype	Extraction	Inhibition halo (mm)	MIC (% extract)
Control		55.0	
AR27	Acetone	16.3 A	5
	Water	15.3 A	5
AR9	Acetone	8.6 B	5
	Water	17.0 A	16

Means followed by the same letter in a column are not significantly different by Tukey's test at ($p < 0.05$)

Table 6. Antiproliferative activity of aqueous and acetone extracts of red (AR9) and yellow (AR27) strawberry guava tested at different concentrations $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against human cancer cells MCF-7 (breast) and Caco-2 (colon) and rat embryonic fibroblasts 3T3 were used as control

Cultivar	Concentration	Extraction	Cell survival (%)		
			3T3	MCF-7	Caco-2
Control	0		98.0 A	98.0 A	99.7 A
AR27	$80 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water	95.0 A	49.7 GH	48.0 DE
		Acetone	96.7 A	52.0 GH	48.3 DE
AR9	$80 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water	96.7 A	49.7 GH	50.7 DE
		Acetone	97.7 A	52.7 GH	48.0 DE
AR27	$60 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water		50.0 GH	51.0 DE
		Acetone		51.3 GH	49.7 DE
AR9	$60 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water		50.0 GH	51.0 DE
		Acetone		55.7 FGH	53.0 CD
AR27	$40 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water		66.7 DEFG	63.0 B
		Acetone		69.7 CDEF	62.0 BC
AR9	$40 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Water		82.0 BCE	63.3 B
		Acetone		73.7 CDEF	66.3 B

Means followed by the same letter in a column are not significantly different by Tukey's test at ($p < 0.05$)

Artigo 2 - Caracterização físico-química, fitoquímica e antiproliferativa de extratos do fruto da *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.

Caracterização físico-química, fitoquímica e antiproliferativa de extratos do fruto da *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.

Resumo

A guabiroba é uma frutífera popularmente conhecida pela intensidade de sabor e aroma dos seus frutos e pelas suas propriedades medicinais, sendo muito consumida pelas populações nativas e usada na medicina popular para curar diversas enfermidades. O objetivo desse estudo descritivo/exploratório foi avaliar as propriedades potencialmente funcionais e antiproliferativas de seus compostos voláteis. Os frutos são relativamente pequenos, com coloração amarelo intenso, medianamente ácidos (pH 4,33), doces (14 °Brix), ricos em compostos fenólicos totais (616,90 mg EAG.100g⁻¹) e ácido L-ascórbico (1773,95 mg.100g⁻¹) e com alto potencial antioxidante (72,18 % de inibição). Entre os compostos fenólicos individuais destaca-se a presença da epicatequina (339,70 mg.100g⁻¹), do ácido gálico (155,86 mg.100g⁻¹) e do ácido elágico (7,04 mg.100g⁻¹). Os extratos apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e também protegeram as células de levedura nos ensaios da atividade antioxidante *in vivo*. A presença de compostos do grupo dos terpenos é intensa na composição de voláteis. Assim, a guabiroba mostra-se um fruto com grande potencial para ser explorado, necessitando de estudos mais aprofundados para os potenciais identificados.

Palavras-chave: guabiroba, compostos voláteis, ácido L-ascórbico, atividade antioxidante, compostos fenólicos, antiproliferativa

1. Introdução

Embora o Brasil abrigue o maior bioma vegetal do planeta, com 55 mil espécies de plantas superiores (22% de todas as espécies já descritas), sendo 25% delas endêmicas, o número de espécies domesticadas ou exploradas para a produção de frutos ou derivados ainda é baixo (aproximadamente 150 espécies) (Giulietti et al., 2005). Além disso, ainda há dificuldades para a domesticação, multiplicação e adaptação desses genótipos para transformá-los em cultivos comerciais, também em função da elevada perecibilidade dos frutos. Mesmo para cultivos explorados e ou domesticados existe limitado conhecimento sobre as suas características físico-químicas, potenciais biológicos e funcionais, exceto o saber popular (Boscolo et al., 2005; Silva et al., 2008; Clerici et al., 2011; Tajkarimi et al., 2011). A caracterização desse potencial físico-químico leva a valorização de espécies locais, como é o caso da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.), uma espécie nativa amplamente distribuída na América do Sul e encontrada em maior abundância no Brasil, Paraguai e Argentina. De modo geral, essa espécie floresce entre setembro e novembro, com o amadurecimento dos frutos ocorrendo entre outubro e dezembro (Silva, et al. 2009).

Os frutos da guabirobeira têm coloração amarela, com sabor equilibrado doce-ácido (Alvarez-Herrera et al., 2009), aroma pronunciado quando estão maduros, podendo ser consumidos na forma *in natura* ou processados (Freitas, et. al., 2008, Santos, et. al., 2009, Duarte et al., 2011; Oliveira, et. al., 2011). A colheita deve ser realizada quando os frutos estão completamente maduros, tendo em vista que em estádios menos avançados, além do excessivo sabor ácido, os frutos manifestam elevada adstringência e pungência (Vallilo et. al., 2008; Silva et. al.,

2009). Porém, ao se realizar a colheita das guabirobas maduras, a conservabilidade como fruto *in natura* é baixa, de 2 a 3 dias (Alvarez-Herrera et al., 2009, Alvarez et al. 2009).

As poucas informações sobre o gênero *Campomanesia* concentram-se em estudos com partes vegetativas da planta. Por exemplo, infusões preparadas com folhas são comumente usadas como depurativos, antidiuréticos, purificadores do sangue, antirreumático e para baixar o teor de colesterol (Ballvé et al., 1995). Além de atividade anti-úlceras apresentada pelo extrato alcoólico das folhas (Markman et al., 2004), Fernandes e Vargas (2003) demonstraram o potencial mutagênico e antimutagênico de extratos aquosos de folhas da *C. xanthocarpa* em testes com *salmonela*, onde observaram sinais de atividade mutagênica de inserção/deleção (frameshift), em cepas TA97a de salmonela sem metabolismo exógeno (fração S9).

O tratamento de ratos obesos com a infusão de folhas de *C. xanthocarpa* levou a uma diminuição significativa da massa corporal, assim como a redução da glicemia (Biavatti et al., 2004). Dickel et al. (2007) citaram que a infusão de folhas da *C. xanthocarpa* é popularmente usada para reduzir a massa corporal pela população de Porto Alegre/RS, Brasil.

Schmeda-Hirschmann (1995) relataram a presença de compostos flavonóides como a quercetina, miricetina, quercitrina e rutina. Markman et al. (2004), citam a presença de saponinas e taninos. Em sua composição, os óleos essenciais provenientes de suas folhas, se destacam a presença de E-nerolidol (28.8%) e linalool (17.2%) (Limberger et al., 2001), e baixos teores de mono e sesquiterpenos (Vallilo et al., 2004; Vallilo et al., 2006a,b; Coutinho et al., 2008). Bonilla et al. (2005) relataram em seus estudos o isolamento de três pigmentos amarelos, denominados

champanonas (β -tricetonas), a partir das sementes de *C. lineatifolia*. Terpenos foram identificados em extratos para voláteis a partir da polpa, casca, folhas e sementes de *C. lineatifolia*, obtidos por extração líquido-líquido de maneira contínua de pentano / diclorometano (1:1) (Osório et al., 2006).

Em pesquisa exploratória preliminar, nossa equipe verificou que esse fruto se caracteriza pela riqueza em compostos relacionados ao metabolismo secundário, envolvidos em sistemas antioxidantes e potencialmente participantes em propriedades funcionais e sensoriais dos frutos (Zaicovski, 2008). Esses aspectos são importantes, pois é sabido que as espécies reativas de oxigênio e radicais livres são fortes indutores do desenvolvimento de doenças decorrentes do envelhecimento celular, mutagêneses, carcinogêneses, doenças cardiovasculares, diabetes e neurodegeneração (Wu & Ng, 2007). Para a prevenção desses distúrbios duas vias de proteção são ativadas em organismos autotróficos e heterotróficos: a) ativação do sistema antioxidante enzimático; e/ou b) consumo ou síntese de compostos antioxidantes. Neste segundo caso, compostos fenólicos (flavonoides, isoflavonoides, ácidos fenólicos, ligninas), ácido ascórbico e carotenoides têm destaque na proteção à oxidação celular (Shukla, et al., 2009).

Além de antioxidantes, os compostos fenólicos podem exibir outras funções biológicas, como atividade antimicrobiana, anticarcinogênica e antiproliferativa (Thitilertdech, et al., 2008). Propriedades antimicrobianas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, importantes no prolongamento da vida de prateleira dos alimentos, para inibição do crescimento de microrganismos (Dung, et al., 2008). Para a maioria dos estudos há uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos e de ácido L-ascórbico com o potencial antioxidante dos frutos (Liu et al.,

2002; Meyer et al., 2003; Bao et al., 2005; Serrano et al., 2005; Thitilertdecha, et al., 2008.), podendo (Medina et al., 2011) ou não haver correlação com as respostas à atividade antiproliferativa de células de câncer ou bacterianas (Liu et al., 2002; Meyer et al., 2003). Entretanto, pela amplitude de estudos nessa temática, tem sido demonstrado que, em geral, os frutos mais ricos em compostos de metabolismo secundário são os que proporcionam melhores respostas biológicas, seja em ensaios frente à proliferação de células tumorais (Weston, 2010), ou bacterianas (Souza-Moreira, et al., 2011) ou animais (Alonso-Castro, et al., 2011, Dembitsky, et al., 2011).

Em muitos casos, os frutos com acelerado metabolismo primário de consumo são caracterizados por uma maior síntese de compostos do metabolismo secundário, resultando em frutos com maior valor nutricional e funcional (Badjakov et al., 2008; Szajdek et al., 2008; Puerta-Gomez et. al., 2011). Neste estudo, parte-se da hipótese de que os frutos provenientes de plantas em seu ecossistema nativo, conhecido por ser indutor de estresses abióticos e bióticos moderados, possam expressar teores elevados de compostos com propriedades potencialmente funcionais (antioxidantes), sensoriais (compostos voláteis) e antiproliferativas (células tumorais).

O objetivo geral do estudo foi caracterizar frutos de *C. xanthocarpa*, com destaque para a composição físico-química básica, em fitoquímicos e em potenciais propriedades funcionais e antiproliferativas.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Foram utilizados frutos de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.), colhidos em plantas com idade média estimada de 15 anos, localizadas nos municípios de Crissiumal (28°29'58"S, 55°53'48"W, altitude 410m), exsicata 23958 e 23959, Boa Vista do Buricá (28°20'05"S, 55°53'57"W, altitude 291m), exsicata 23960 e 23961 e Pelotas (32°19'35"S, 53°33'27"W, altitude 60m), exsicata 23962 e 23963, entre novembro e dezembro de 2007 e 2009. A confirmação botânica da espécie foi realizada a partir da avaliação morfológica dos ramos, folhas, flores e frutos (PhD Raquel Duque, IB-UFPel). As exsicatas foram depositadas no herbário da UFPel (Pelotas/RS-Brasil). Os frutos foram colhidos no estágio maduro, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultra-freezer a – 80 °C até a realização das análises. A figura 1 mostra a árvore e o fruto da guabiroba.

2.2 Reagentes e Padrões Cromatográficos

O ácido L-ascórbico, etanol, acetona, DPPH, Folin-Ciocalteu, ácido gálico, meio de cultura, foram adquiridos da Roth (Karlsruhe, Alemanha), e o metanol e o ácido acético da J.T. Baker (Deventer, Países Baixos). Os padrões do ácido elágico, do ácido p-cumárico e do ácido ferúlico foram adquiridos da Fluka (Steinheim, Alemanha). A epicatequina foi adquirida da Extrasynthese (Genay, França). O ácido gálico foi adquirido da Aldrich (Steinheim, Alemanha).

2.3 Métodos

2.3.1 Análises físico-químicas

A caracterização físico-química geral dos frutos (após remoção das sementes) foi feita da polpa em 6 genótipos através da análise de: teor de sólidos solúveis, acidez titulável, pH, cor, ácido L-ascórbico, compostos fenólicos totais e individuais, carotenoides totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante pelo método do DPPH. A partir desse estudo descritivo inicial, que demonstrou tratar-se de um fruto rico em compostos com potencial fitoquímico, aprofundou-se a pesquisa identificando os principais compostos voláteis mediante uma amostra média dos genótipos. Além disso, foi escolhido o genótipo com os maiores teores de compostos fenólicos totais para o teste *in vivo* da atividade antioxidante e, para o ensaio *in vivo*, testando o potencial antimicrobiano de extratos de guabiroba frente às linhagens de células 3T3 (fibroblastos), MCF-7 (câncer de mama).

2.3.2 Coloração da casca e da polpa

A cor da casca foi medida em dois pontos opostos na região equatorial de cada fruto e a cor da polpa em dois pontos diferentes para cada fruto, usando o colorímetro Minolta Chroma Meter, modelo CR-300 (Konica Minolta Sensing, Inc.). Os resultados foram expressos nas coordenadas CIE- L^* , a^* e b^* , e ângulo hue ($h^\circ = \tan^{-1} b^*/a^*$) (McGuire, 1992). Para cada amostra foram utilizados 20 frutos.

2.3.3 Sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), e pH

Os teores de SS foram determinados por refratometria e os resultados expressos em °Brix. A AT e o pH foram medidos diretamente a partir do suco extraído por maceração e centrifugação (10.000 g x 15 min x 4 °C). A AT foi

determinada por titulação e os resultados expressos em gramas de ácido cítrico. 100g^{-1} de matéria fresca (mf). O pH foi medido com um pHmetro digital (HANNA instruments, modelo HI 221) calibrado com as soluções tampão pH 4 e 7.

2.3.4 Carotenoides totais

Dez gramas de polpa foram pesados e macerados com nitrogênio líquido, incubados por 15 minutos em 20 mL de acetona 80% (v/v) e filtrado (a extração foi repetida 3 vezes). O filtrado foi centrifugado ($10.000\text{ g} \times 15\text{ min} \times 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o sobrenadante elevado 40 mL com acetona. A absorvância foi medida a 647, 663 e 470 nm em um espectrofotômetro UV/Vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Os carotenoides totais foram determinados através da equação descrita por Lichtenthaler (1987) e expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria fresca (mf).

2.3.5 Antocianinas totais

Dois gramas de polpa foram pesados e macerados em nitrogênio líquido, incubados com 50 mL de etanol acidificado (0,01% HCl v/v), que foi colocado no escuro por 1 hora e a solução foi agitada em intervalos de 5 min. Depois, a solução foi centrifugada ($10.000\text{ g} \times 15\text{ min} \times 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). As leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech), a 520 nm. O espectrofotômetro foi zerado com etanol acidificado (0,01% HCl v/v). Os resultados foram expressos em g de cianidina-3-glucosídeo por 100 g matéria fresca (mf).

2.3.6 Ácido L-ascórbico

Cinco gramas do fruto foram pesados e macerados em nitrogênio líquido, e adicionados de 30 mL de uma solução gelada (4 °C) de ácido metafosfórico (4,5% m / v em água). A mistura foi mantida a temperatura de 4°C por 1 hora na ausência de luz. A solução foi filtrada e o volume obtido centrifugado (10.000 g x 10 min x 4 °C). O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana Durapore 0,45 µm. Do filtrado, 25 µL foram injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu, equipado com uma coluna de fase reversa RP-18 (4,6 cm x 150 mm x 5 µm), e com injetor automático. A fase móvel foi composta pelo solvente A, água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v / v) e solvente B, metanol 100%. O gradiente de eluição começou com 100% do solvente A, seguindo uma redução linear até 98% aos 5 min, mantido nessa condição por 2 min e retornado as condições iniciais, perfazendo um tempo de eluição de 12 min por amostra, seguindo a metodologia adaptada de Vinci et al. (1995) e Ayhan et al. (2001). O fluxo adotado foi de 0,8 mL.min⁻¹, a temperatura do forno da coluna mantido a 25 °C e o detector UV ajustado a 254 nm. A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção para o padrão de ácido L-ascórbico. A quantificação foi feita o padrão externo do ácido L-ascórbico e os resultados expressos em mg 100 g⁻¹ matéria fresca (mf).

2.3.7 Atividade antioxidante (*in vitro* e *in vivo*)

O potencial antioxidante foi determinado utilizando os método de sequestro do radical DPPH, descrito por Brand-Williams et al. (1995). Cinco gramas de polpa foram pesadas, maceradas em nitrogênio líquido e centrifugadas (10.000 rpm x 15 min x 4 °C). O sobrenadante foi guardado a 4 °C e no escuro. Para a reação, 0,1 mL

de extrato foram adicionados a 3,9 mL da solução de DPPH em metanol (100 mM) (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A solução foi agitada e mantida abrigada da luz até o momento da leitura. Para o controle foi utilizado água e metanol. Ensaios preliminares foram realizados para determinar as condições ideais para a reação (diluição do extrato e tempo), indicando que uma diluição de 100 vezes seria a adequada. A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa em percentual (%) remanescente do radical DPPH após 1 min de reação. Para efetuar o cálculo foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância da Amostra}) \times 100}{\text{Absorbância do Controle}}$$

2.3.8 Compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo o método descrito por Souza et al. (2008). Dez gramas de polpa foi pesada, macerada na presença de nitrogênio líquido; incubada com 20 mL de água deionizada e agitada em um agitador orbital (200 rpm x 1 h), em temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) e no escuro. A solução foi centrifugada (10.000 rpm x 15 min x 4°C), o sobrenadante foi concentrado e o volume final foi ajustado para 10 mL com água deionizada. A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método descrito por Dewanto et al. (2002). Ao volume de 125 μL da amostra foi adicionado 500 μL de água deionizada e 500 μL do reagente Folin Ciocalteau (2 M) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A solução foi deixada em repouso por 6 min em ambiente escuro e foi adicionado 1,25 mL de carbonato de sódio (7% m/v) e 1 mL de água deionizada para ajustar o volume final a 3 mL. A solução foi deixada em repouso por 90 min a temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) e no escuro. A absorbância

foi medida no comprimento de onda 760 nm em um espectrofotômetro UV/Vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech), usando água deionizada como amostra em branco. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa fresca (mg GAE 100 g⁻¹ mf).

A quantificação dos compostos fenólicos individuais foi realizada em extrato aquoso conforme descrito por Hakkinen e Torronen (2000) e Zambiasi (1997). Um mililitro de cada extrato foi hidrolisado adicionando 35 mL de metanol acidificado (HCl 15% v / v). A solução foi colocada em banho-maria a 35°C por 24 h, no escuro. Após ela filtrada (Whatman n°1), foi concentrada (rotaevaporador a 40°C) e o volume final foi completado com 10 mL com metanol. Os extratos foram centrifugados (12.000 rpm x 10 min x 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana Durapore 0,45 µm. Do filtrado, 20 µL foi injetado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu. A análise foi realizada em equipamento Shimadzu 10AVP, equipado com uma coluna de fase reversa Shim-Pak CLC-ODS (3,9 cm x 150 mm x 4 µm), com injetor automático. A fase móvel foi composta do solvente A – água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v / v) e solvente B – 100% metanol. O gradiente de eluição começou com 100% A; seguindo uma redução linear para 60% de A aos 25 min, mantido nessa condição por 2 min, subindo para 95% de A aos 37 min, e mantido nessa condição por 5 min, voltando para as condições iniciais, perfazendo um tempo de eluição de 45 min por amostra. O fluxo adotado foi de 0,9 mL.min⁻¹, a temperatura do forno da coluna mantido a 25 °C e o detector UV foi ajustado a 280 nm. Os compostos fenólicos individuais ((-)-epicatequina, ácido gálico, ácido elágico, ácido ferúlico e ácido p-cumarico) foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões (Sigma–Aldrich,

Saint Louis, MO, USA). Todos os compostos fenólicos individuais foram quantificados usando padrões externos e construindo suas respectivas curvas de calibração (todos os padrões foram dissolvidos em metanol) e os resultados expressos em $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de matéria fresca (mf).

2.3.9 Atividade Antiproliferativa

A atividade antiproliferativa foi avaliada na linhagem de células tumorais humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e na linhagem de células não tumorais 3T3 (fibroblastos embrionários de ratos) utilizada como controle. As células foram adquiridas do Banco Celular da Universidade do Rio de Janeiro/RJ. As células foram cultivadas em monocamada (Monks et al., 1991). Em placas de poliestireno, após 24 horas a 37 °C e 100 % de UR (umidade relativa) as células foram expostas durante 48 h aos extratos aquosos e etanólicos de guabiroba, em quatro diluições calculadas em função do teor de compostos fenólicos totais (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), comparadas a um grupo controle. Foram realizadas três repetições técnicas para cada repetição biológica. Após o período de incubação, nas condições de 37 °C, 5 % de CO_2 e 100 % de UR, as células foram fixadas mediante a adição de TCA (ácido tricloroacético) e incubadas em refrigerador a 4 °C durante 1 h. O ensaio colorimétrico foi realizado mediante a adição de solução de sulforodamina B 0,4 % (p / v, com ácido acético a 1%) em cada uma das cavidades da placa de cultivo. Essa placa permaneceu em repouso, em temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), por 30 min, e posteriormente, a solução não fixada foi desprezada mediante lavagens com ácido acético a 1 %. O corante fixado nas proteínas celulares foi ressolubilizado com tampão Tris Base 10 mM (pH 10,0) sob agitação, em uma velocidade de 50 rpm, à temperatura ambiente, por um tempo de 5 min

(Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990). A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro com leitor de placa ELISA, nos comprimentos de onda de 492 e 560 nm (Itharat et al., 2004; Skehan et al., 1990). A medida da viabilidade e sobrevivência celular, segundo Monks et al. (1991) foi expressa em %T/C [(densidade óptica das células tratadas /densidade óptica do controle celular) x 100].

2.3.10 Atividade antioxidante (*in vivo*)

A atividade antioxidante frente a um modelo biológico foi realizada utilizando a linhagem haplóide da levedura *Saccharomyces cerevisiae* XV 185-14C (MAT α , ade2-2, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp5-48, hom3-10), cedidas pelo Dr. R. C. Von Borstel (Genetics Department, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada) (Lopes et al., 2004). O cultivo da linhagem *S. cerevisiae* XV185-14c foi realizado em meio YPD sólido contendo extrato de levedura (1 % m / v), glicose (2 % m / v), peptona (2 % m / v) e ágar (2 % m / v), todos adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Para a diluição da suspensão celular foi empregada uma solução de NaCl (Reagem) a 0,9% (m/v). Como agente de indução de oxidação foi utilizado 50mM de peróxido de hidrogênio, preparado imediatamente antes do uso, em água destilada deionizada e estéril. Para determinar a capacidade antioxidante, 2×10^7 UFC.mL⁻¹ da linhagem XV185-14c foram tratadas com extratos de diferentes diluições (1:1 até 1:10, extrato:água), para determinar a maior concentração não citotóxica para os extratos. Para os extratos de *C. xanthocarpa*, as maiores concentrações não citotóxicas para o extrato aquoso foi 1:6 e para o extrato metanólico foi de 1:8. O acesso de guabiroba escolhido foi o 23962, por apresentar as maiores concentrações de fenóis totais. Nesse estudo a concentração de células

de levedura foi de $2,21 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹. A incubação na presença do extrato foi realizada a 28 °C por 2 h. A oxidação foi induzida com peróxido de hidrogênio (50 mM), preparado imediatamente antes do uso com água estéril e adicionado após os extratos sendo incubadas a 28 °C por 1 h, sob agitação. Alíquotas foram diluídas em solução salina e incubadas por 72 h a 28 °C em meio YPD. A viabilidade celular foi determinada contando as colônias e comparando a contagem com o tratamento controle que foi considerado como tendo 100% de sobrevivência.

2.3.11 Compostos voláteis (CG-EM)

Cinco gramas de polpa do fruto foram macerados e pesados em vial "headspace" de 20 mL, acondicionado na plataforma de amostragem para incubação (250 rpm x 40 min x 40 °C), sendo a agitação 5:2 (agitando:parado), acoplada a um sistema de cromatografia a gás Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies, USA), acoplado a um espectrômetro de massas Agilent Technologies 5975C (CG-EM) (Agilent Technologies, USA). Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com uma biblioteca de espectros de massa (NIST/2002). O CG é equipado com uma coluna capilar de polietileno glicol (PEG) Zebron™ ZB-WAX (60 m x 250 µm x 0.25 µm) (Phenomenex,U.S.A.), com temperatura programada em 35 °C por 15 min , 35 a 50 °C numa taxa de aquecimento (TA) de 3 °C.min⁻¹, 50 a 110 °C numa TA de 4 °C.min⁻¹, 110 a 150 °C numa TA de 5 °C.min⁻¹, 150 a 250 °C numa TA de 10 °C.min⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 10 min. Foi utilizado hélio como gás de arraste no fluxo de 1,0295 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor 280°C e do detector 250°C. Para a extração, foram utilizadas duas fibras SPME: CAR/PDMS (carboxen/polidimetilsiloxano) e DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano), para a extração dos

compostos voláteis do vial "headspace". Com tempo de exposição de 30 min e 6 min de desorção no injetor.

2.3.12 RMN

2.3.12.1 Pré-preparo da amostra

Aproximadamente 500 g de frutos foram liofilizados. Ao material liofilizado foi adicionado igual volume de água deionizada (100 g de fruto liofilizado + 100 mL água deionizada) e a mistura foi homogeneizada em Ultraturax (10000 rpm x 3 min). O solução resultante foi centrifugada (10000 rpm x 10 min x 4 °C) e o sobrenadante recolhido. Esse procedimento foi repetido três vezes. O volume total do sobrenadante recolhido foi aproximadamente 150 mL, o mesmo foi filtrado e eluido através de uma coluna cromatográfica (40 x 3 cm), preenchida com uma fase estacionária de XAD, pré-condicionada com 200 mL de metanol e água deionizada na proporção de 1:1. O volume eluido foi descartado. A coluna foi lavada com 200 mL de água deionizada e o eluido descartado (expressão repetida). Após foi feita eluição dos compostos da fase estacionária com aproximadamente 500 mL de metanol, sendo o eluido recolhido e concentrado sob vácuo (SpeedVac®, ± 5 h, ≤ 40 °C) até o volume de 3 mL. Uma amostra desse concentrado foi preparada e injetado 25 µL em um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas (CL-EM/EM) para determinar a presença de compostos nessa amostra.

2.3.12.2 Preparo da amostra para confirmação do pico

Após a confirmação da ocorrência de picos no espectro de massas obtido a partir da leitura cromatográfica por CL-EM/EM, procedeu-se o preparo da amostra para o isolamento dos seis principais picos identificados no cromatograma. Uma coluna

RP18 foi pré-condicionada com acetonitrila e água deionizada na proporção de 200 mL para 150 mL, respectivamente. Os 3 mL de amostra concentrada foram dissolvidos com acetonitrila e água deionizada na proporção de 500 μ L para 500 μ L, respectivamente, e a solução colocada na coluna sobre a fase estacionária. Para a eluição da amostra foi utilizado água deionizada e acetonitrila, começando pela proporção de 90:10 e 50 mL de volume, seguindo-se para a proporção de 80:10, sempre com intervalos de 10% e 50 mL de volume até atingir a proporção de 00:100. O volume eluído foi de aproximadamente 500 mL, recolhido em frascos de 15 mL, totalizando 35 frações. Uma amostra de cada fração foi preparada e injetada o volume de 25 μ L em um CL-EM/EM para determinar a presença de compostos nas frações. Foram identificados picos no espectro de massas nas frações 14, 18-19, 23-24, 26-27, 28-29, e 30-31.

2.3.12.3 Preparo da amostra após confirmação do pico

Essas frações (14, 18-19, 23-24, 26-27, 28-29, e 30-31) foram submetidas a um novo fracionamento para melhorar o isolamento dos compostos. As frações a seguir foram agrupadas aos pares conforme estão descritas (18-19, 23-24, 26-27, 28-29, e 30-31) e cada par foi considerado uma única amostra isoladamente. As seis frações resultantes foram concentradas sob vácuo (SpeedVac[®], \pm 3 h, \leq 40 °C) até o volume de 1 mL. A amostra concentrada foi dissolvida com acetonitrila e água deionizada na proporção de 750 μ L para 250 μ L, respectivamente, e a solução colocada na coluna sobre a fase estacionária RP18 pré-condicionada com acetonitrila e água deionizada na proporção de 200 mL para 150 mL, respectivamente. Para a eluição da amostra foi utilizado água deionizada e acetonitrila, começando na proporção de 90:10 e no volume de 50 mL, seguindo-se para a proporção de 85:15, continuado

com intervalos de 5% e volume de 50 mL até atingir a proporção de 50:50 de água deionizada:acetonitrila. O volume eluído foi de aproximadamente 500 mL, recolhido em frascos de 15 mL, totalizando 35 frações. Uma amostra de cada fração foi preparada e injetada 25 µL em um CL-EM/EM para determinar em qual fração se encontrava o composto.

2.3.12.4 Preparo da amostra para RMN

Identificadas as frações com a presença dos compostos, elas foram novamente concentradas sob vácuo (SpeedVac®, ± 3 h, ≤ 35 °C). As amostras foram dissolvidas com metanol D4 (grau de deuterização mín. 99,8 % para espectroscopia RMN da Roth) e metanol D4 (grau de deuterização mín. 99,8 % + TMS para espectroscopia RMN da Aldrich) até atingir 4 cm em varetas para leitura de RMN.

2.3.12.5 Espectrometria de NMR

As amostras foram dissolvidas em tetradeuterometanol (MeOD₄) contendo tetrametilsilano 0,03% (TMS). Foram feitas as leituras unidimensional (¹H e ¹³C) e bidimensional (HMBC). Análises de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker DMX-400 Avance III (Bruker, Rheinstetten, Alemanha). As frequências utilizadas no espectrômetro foram 500 Hz e 125 Hz para a determinação de deslocamentos químicos dos núcleos de ¹H e ¹³C, respectivamente. Estes deslocamentos químicos determinados usando TMS como padrão interno na dimensão próton e do sinal de carbono de MeOD₄ na dimensão de carbono. A avaliação dos dados espectrais de RMN foi feita usando o software MestReNova (www.mestrelab.com).

As leituras de confirmação da presença dos compostos foram efetuadas em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1100 HPLC, equipado com uma bomba quaternária (Agilent 1100) e um detector de arranjo de diodos (Agilent 1100) (Agilent, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massas Bruker Esquire 3000 plus (Bruker, Bremen, Alemanha). Foi utilizada uma coluna Eurospher C18 (5 μm , 10 cm \times 2 mm) (Grom Analytik & HPLC GmbH, Rottenburg, Alemanha). Para a fase móvel foi utilizado o gradiente de 0% acetonitrila e 100% de água (acidificada com ácido fórmico 0,05%) para acetonitrila 50% e 50% de água ácida aos 50 min, seguindo por 20 min até 100% acetonitrila, permanecendo por 10 min nessas condições, voltando para as condições iniciais em 5 min. A vazão utilizada foi de 0,2 mL.min⁻¹. O comprimento de onda para detecção foi de 280 nm.

2.3.13 Análise Estatística

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa Statistix 9 (Tallahassee, FL, USA). Os dados em porcentual foram normalizados, segundo a equação $f(x) = \arcsin \sqrt{x}$ antes da análise estatística.

Resultados

Descrição

O peso médio dos frutos variou entre 6,75 e 10,86 g. Os valores de L^* (luminosidade) para a casca variaram entre 48,65 e 62,07 e na polpa entre 48,59 e 52,98. Os valores de a^* (cromaticidade – verde a vermelho) ficaram entre 17,77 e 23,04 para a casca e 10,41 a 13,81 na polpa. Para os valores de b^* (cromaticidade – azul a amarelo), a variação na casca foi de 41,03 a 58,04 e de 39,94 a 43,82 na

polpa. Os valores de Hue (ângulo hue) variaram de 62,96 a 72,89 e de 72,83 a 76,46 para casca e polpa, respectivamente (Tabela 1).

As guabirobas caracterizaram-se como frutos medianamente ácidos, com pH variando entre 4,10 e 4,58 e acidez total entre 0,30 e 0,48 % de ácido cítrico, e relativamente ricos em sólidos solúveis totais, entre 12,68 e 15,57 °Brix (Tabela 2). O teor total de carotenóides, entre 32,19 e 72,19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ β -Caroteno e o teor de antocianinas totais, entre 3,24 e 11,68 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Contrastando com esses dados, os teores de compostos fenólicos totais e de ácido L-ascórbico foram, respectivamente, entre 431,60 e 813,70 $\text{mg EAG}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e 809,10 e 3243,30 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. A atividade antioxidante, mensurada pelo método de sequestro do radical DPPH, havendo percentuais de redução acima de 57% após 1 min de reação, com os valores variando entre 57,48 e 91,0%.

À semelhança do observado para o teste de atividade antioxidante mensurado pelo DPPH (Tabela 2), os testes *in vivo* (Tabela 5), contra *S. cerevisiae* XV185-14c, confirmaram que se trata de um fruto com propriedades protetoras frente à oxidação. Os extratos proporcionaram uma significativa proteção das células eucariotas frente à ação de potente oxidante, o peróxido de hidrogênio.

Entre os compostos fenólicos individuais avaliados (Tabela 3), os majoritários foram a epicatequina com os teores variando de 197,74 a 576,04 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, e o ácido gálico, que variou de 82,20 a 305,08 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, e em menor concentração o ácido elágico, variando os seus teores de 0,01 a 12,36 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, o ácido ferúlico variou os seus teores de nd a 4,10 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, e para o p-cumárico, os teores variaram de nd a 1,55 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Esse conjunto de dados mostra que o fruto da

guabiroba é rico nesses compostos quando comparado ao araçá (Medina et al. 2010).

Ao se testar os extratos de frutos de guabiroba na atividade antiproliferativa de células de câncer MCF-7, verificou-se que há uma redução de células viáveis quando se usam extratos nas concentrações crescentes de 25 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4), obtendo-se uma resposta dependente da concentração. Os mesmos extratos frente à linhagem de células de fibroblastos (3T3), os extratos com maior concentração (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram o percentual de células viáveis.

Foram detectados 36 compostos voláteis na avaliação por headspace desses compostos nos frutos. O grupo com maior destaque foi o dos terpenóides (mono e sesquiterpenos), com a presença menor de ésteres e álcoois (Tabela 6). Dentre os terpenos destaca-se a presença de cariofileno e limoneno. Houve uma pequena variação na detecção em função da fibra utilizada.

O fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos dos frutos da *C. xanthocarpa* culminou com o isolamento e elucidação de quatro estruturas das frações 18-19 (ácido abscísico), 23-24 (7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona), 26-27 (2,4-diidroxil-3-metil-6-metoxichalcona) e 30-31 (2,4-diidroxil-3,5-dimetil-6-metoxichalcona) (Figura 2). Das frações 14 e 28-29 não foi possível a elucidação dos compostos presentes. As estruturas foram elucidadas por métodos espectroscópicos, em particular RMN ^1H , ^{13}C , 1D e 2D. Das estruturas isoladas, todas já haviam sido descritas na literatura.

2.4 Discussão

Popularmente, frutos, folhas e casca da guabiroba são recomendados e usados por apresentarem “propriedades medicinais”. Porém, poucas são as comprovações científicas desse fato (Ballvé et al., 1995; Markman et al., 2004; Biavatti et al., 2004; Dickel et al., 2007), tampouco se tem uma caracterização físico-química desse material. Por isso, realizou-se essa pesquisa, inicialmente descritiva, visando caracterizar esse fruto, que tem como centro de origem a América do Sul, especialmente em regiões de clima subtropical e temperado (Silva, et al. 2009).

O conjunto de dados para o peso e coloração (Tabela 1), indica que se trata de frutos relativamente pequenos, assemelhando-se a pequenas goiabas, com coloração amarelada, tanto na casca como na polpa (Alvarez et al. 2009, Alvarez-Herrera et al., 2009).

Os frutos de guabirobas em ecossistema nativo são caracterizados por elevados teores de SS e mediana acidez, o que, em geral é interessante para o equilíbrio gustativo, bastante apreciado nesse fruto. Entretanto, há que se considerar que o pH, entre 4,00 e 4,68, enquadra esse fruto numa faixa crítica para o processamento térmico, caso haja necessidade de processamento térmico ou formação de géis, tendo em vista que, na maioria dos casos haverá necessidade de aumento da acidez, pela adição de ácido orgânico exógeno. Também se demonstrou que é um fruto altamente rico em compostos fenólicos totais, com valores de até 813,70 mg EAG.100g⁻¹ quando comparado a goiaba (159,8 mg EAG.100g⁻¹), mamão (88,1 mg EAG.100g⁻¹) e a manga (59,8 EAG.100g⁻¹) (Oliveira et al. 2011) (Tabela 2). Além disso, os resultados mostraram altos teores de ácido ascórbico, atingindo valores de até 3242,30 mg.100⁻¹. São poucos os frutos que

apresentam essa característica. Como exemplos de frutos ricos nessa molécula tem-se a acerola ($1357 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), a camu-camu ($1882 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (Rufino et al., 2010) e o kiwi com valores de até $163 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Rassam e Laing, 2005). O fato de os frutos de guabiroba apresentarem elevados teores de compostos fenólicos e de ácido L-ascórbico provavelmente seja a causa do elevado potencial antioxidante avaliado pelo método do DPPH (Tabela 2). Houve redução de mais do que 50% desse radical, após 1 min de reação com um extrato 10x mais diluído do que a maioria dos trabalhos publicados (Brand-Williams, 1995, Oliveira et al. 2011). Esse comportamento pode ser explicado principalmente pela elevada concentração de ácido L-ascórbico nesses frutos, molécula conhecida como altamente redutora do radical DPPH (Brand-Williams). Em função disso, o método de DPPH não é o mais recomendado para monitorar o potencial antioxidante desse fruto. Além disso, destaca-se que há diferenças significativas entre os acessos, sem poder-se atribuir a uma causa específica, por se tratar de plantas ainda não domesticadas. Essa variação ampla é comum quando são avaliados produtos provenientes de acessos com significativa variabilidade genética, como foi o caso do araçá caracterizados por Medina et al (2011) no mesmo bioma. Fato similar foi observado em 18 frutos nativos de clima tropical e equatorial do Brasil (Rufino et al., 2010), assim como em 100 frutos nativos da Índia (Fu et al., 2010).

Ao se avaliarem os principais compostos fenólicos, houve predominância de epicatequina ($576,04 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$), ácido gálico ($305,08 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$) e ácido elágico ($12,36 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$), nessa ordem. Ocorreu uma grande variabilidade qualitativa e quantitativa destes compostos entre diferentes espécies frutíferas (Reynertson et al., 2008; Rufino et al., 2010). A guabiroba pode ser classificada como um fruto rico nesses compostos devido aos altos teores. Destaca-se a

presença de ácido elágico de até $12,36 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$, como fator positivo para esse fruto, porque esse composto apresenta propriedades funcionais (Watterm e Shetty, 2005). Com o intuito de ilustrar essa variabilidade, em frutos nativos da América do Norte, Pande (2010), identificou que a predominância de ácidos fenólicos nos frutos foi o ácido gálico ($1,5$ a $6,4 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$) e o ácido elágico ($0,2$ a $33,8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$), e o flavonóide mais abundante foi a catequina ($12,2$ a $37,8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ mf}$). (Watterm e Shetty, 2005, Reynertson et al., 2008; Rufino et al., 2010)

Buscando colocar em evidência potenciais propriedades *in vivo*, também foram testados os extratos frente a células eucariotas submetidas a estresse oxidativo. Desse ensaio, verificou-se que, efetivamente, o extrato aquoso de frutos de guabiroba protege as leveduras da oxidação por peróxido de hidrogênio. Esse nível de proteção também foi obtido com frutos de araçá (Medina et al., 2011), embora esses tivessem baixíssimos teores de ácido L-ascórbico. Além do potencial antioxidante, foi verificado que os extratos aquosos de guabiroba reduzem o percentual de células viáveis da linhagem MCF-7. Esse aspecto é importante, pois indica que esse extrato contém moléculas capazes, não só de reduzir a proliferação, mas também de reduzir a população de células causadoras de câncer de mama cultivadas *in vitro*. No entanto, deve-se considerar que, nas doses acima de $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, houve citotoxicidade, comprovada pela redução de células viáveis de fibroblastos (3T3) (Baliga et al. 2011). Isso demonstra que os extratos de guabiroba apresentam um poder antiproliferativo frente as células de câncer MCF-7, mas em dosagens elevadas (acima de $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) são citotóxicos, reduzindo o percentual de células de fibroblastos.

Cardoso et al.,(2010), trabalhando com óleo essencial extraído das flores de *C. xanthocarpa* e analisado por CG e CG-EM, identificou 34 compostos , sendo o ledol o composto majoritário (18,90%).

Limberger et al. (2001), trabalhando com óleo essencial de algumas espécies do gênero campomanesia, demonstrou a presença dos sesquiterpenos espatulenol (27,7%) e do óxido de β -cariofileno (29,0%) em *C. guazumifolia*; o biciclogermacreno (13,6%) e o globulol (10,8%) em *C. rombea* e o {E}-nerolidol (28,8%) em *C. xanthocarpa*.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES pela concessão da bolsa, a Universidade Técnica de Munique por possibilitar o intercambio e a Embrapa por permitir a coleta de material vegetal no horto experimental.

Tabela 1. Peso dos frutos (g), cor da casca e polpa (CIE L*, a*, b* e ângulo hue) de guabiroba

Genótipo	Peso	Cor da Casca				Cor da Polpa			
		L	a	b	Hue	L	a	b	Hue
23958	10,86 ^a	50,40 ^{bc}	22,41 ^{ab}	43,49 ^{bc}	62,96 ^c	48,95 ^{bc}	12,59 ^a	43,22 ^{ab}	73,71 ^{bc}
23959	10,32 ^{ab}	52,31 ^b	23,04 ^a	45,68 ^b	63,22 ^{bc}	52,98 ^a	10,41 ^b	39,94 ^b	75,26 ^{ab}
23960	6,75 ^c	48,65 ^c	18,59 ^c	41,03 ^c	65,64 ^{bc}	48,79 ^c	13,81 ^a	44,80 ^a	72,83 ^c
23961	7,96 ^c	52,30 ^b	19,91 ^{bc}	45,45 ^b	66,41 ^b	48,59 ^c	13,02 ^a	42,46 ^{ab}	72,86 ^c
23962	8,02 ^{bc}	62,07 ^a	17,77 ^c	58,04 ^a	72,89 ^a	51,54 ^{abc}	11,99 ^{ab}	42,56 ^{ab}	74,21 ^{abc}
23963	7,43 ^c	49,42 ^c	21,70 ^{ab}	43,42 ^{ab}	63,42 ^{bc}	52,82 ^{ab}	10,46 ^b	43,82 ^{ab}	76,46 ^a

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 2. Caracterização de pH, sólidos solúveis, antocianinas totais, carotenoides totais, fenóis totais, ácido L-ascórbico, atividade antioxidante em frutos de guabiroba

Genótipo	pH	SS ¹	AT ²	Ant.T ³	CT ⁴	FT ⁵	Ac L-asc ⁶	AA ⁷ (DPPH)
23958	4,24 ^{ab}	13,73 ^{bc}	0,44 ^b	3,24 ^{cde}	72,19 ^a	763,8 ^a	809,10 ^c	57,48 ^e
23959	4,40 ^{ab}	14,29 ^{abc}	0,40 ^c	5,83 ^{bcd}	47,24 ^b	638,6 ^b	3243,30 ^a	69,77 ^c
23960	4,52 ^a	13,15 ^{bc}	0,33 ^d	7,46 ^b	50,38 ^b	505,8 ^{cd}	1606,50 ^{bc}	91,00 ^a
23961	4,58 ^a	12,68 ^c	0,30 ^e	4,47 ^{be}	48,59 ^b	431,6 ^d	2153,00 ^b	84,72 ^b
23962	4,10 ^b	14,60 ^{ab}	0,48 ^a	11,68 ^a	37,86 ^c	813,7 ^a	914,20 ^c	66,33 ^d
23963	4,13 ^b	15,57 ^a	0,31 ^e	5,32 ^{bd}	32,19 ^d	548,0 ^{bc}	1917,60 ^b	63,83 ^d

*Medias seguida da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

¹Sólidos solúveis expressos em °Brix

²Acidez titulável expressa em % equivalente de ácido cítrico por 100g⁻¹ mf

³Antocianinas totais expressas em mg de cianidina-3,5-glucosídeo por 100g⁻¹ mf

⁴Carotenóides totais expressos em µg de β-Caroteno por g⁻¹ mf.

⁵Fenóis totais expressos em mg de equivalentes de ácidos gálico (EAG) por 100g⁻¹ mf

⁶Ácido L-ascórbico expresso em mg de ácido L-ascórbico por 100g⁻¹ mf

⁷Atividade antioxidante expressa em % de inibição do radical DPPH em 1 min de reação.

Tabela 3. Compostos fenóis individuais (mg.100g⁻¹) em frutos de guabiroba

Genótipo	(-)-epicatequina	Ac. gálico	Ac. elágico	Ac. ferulico	Ac. p-cumarico
23958	463,90 ^b	129,29 ^d	0,01 ^c	2,05 ^{bc}	0,57 ^b
23959	314,90 ^c	158,15 ^b	10,75 ^a	1,57 ^{bc}	0,43 ^b
23960	212,26 ^e	82,20 ^e	12,36 ^a	2,29 ^{ab}	1,55 ^a
23961	273,28 ^d	133,62 ^c	5,11 ^b	0,65 ^{bc}	1,44 ^a
23962	576,04 ^a	305,08 ^a	7,29 ^b	nd	nd
23963	197,74 ^f	126,85 ^d	6,71 ^b	4,10 ^a	0,09 ^c

*Medias seguida da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0.05).

Tabela 4. Efeito antiproliferativo de extratos aquosos e etanólicos de guabiroba testados a 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a células cancerosas humanas MCF-7 (mama) e fibroblastos embrionários de ratos 3T3

Tratamentos	Concentração	Extratos	Sobrevivência (%)	
			3T3	MCF-7
Controle	0	água	97,87 ^{ab}	98,69 ^a
		etanol	98,39 ^a	98,39 ^{ab}
<i>C. xanthocarpa</i>	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	água	88,96 ^{de}	51,23 ^f
		etanol	85,65 ^{bc}	53,25 ^{de}
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	água	95,32 ^a	66,83 ^d
		etanol	93,21 ^a	63,54 ^{bc}
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	água	99,23 ^{cd}	71,26 ^f
		etanol	98,09 ^{cd}	72,36 ^e
	25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	água	98,31 ^{ab}	96,38 ^d
		etanol	98,23 ^a	93,56 ^c

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 5. Atividade antioxidante de extratos de guabiroba frente a *S. cerevisiae* XV185-14c

Tratamentos	% de Sobrevivência
Água	98,00a
H ₂ O ₂ 50 mM	42,67c
Extrato aquoso (50 µg.mL ⁻¹)	84,33b
Extrato metanólico (50 µg.mL ⁻¹)	84,00b

*Medias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0.05).

Tabela 6. Compostos voláteis em frutos de guabiroba

R.T.	Compostos	m/z abundancia	match	Rmatch	Probab	Fibra SPME	
						CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
8.5	Ethyl acetate	43(100), 29 (21), 61 (19), 70 (14), 45(14), 73 (6), 61(17), M ⁺ 88 (5)	891	936	96.5	x	x
10.35	Ethanol	29(<1), 31(100), 45(12), M ⁺ 46(1),	940	959	97.4		x
12.03	3-Pentanone	57(100), 29(45), 43(16), 207(13), 31(11), 45(9), 41(5), 69(5), 42(4), M ⁺ 86(27)	862	862	75.5	x	
12.33	2,3-Butanedione	43 (100), 86 (25), 42 (6), 44 (3)	948	948	71		x
13.97	1-Penten-3-one	55(100), 29(10), 57(7), 56(7), 83(5), 39(2), 42(1), 53(1), 85(1), 41(1), M ⁺ 84(18)	912	933	92.5	x	
14.28	3-Ethyl-1,5-octadiene	69(100), 41(73), 68(52), 109(47), 67(47), 95(30), 53(22), 81(17), 79(16), M ⁺ 138(<1)	768	768	75	x	
16.72	Hexanal	56(100), 44(96), 41(85), 57(69), 43 (61), 29(38), 39(34), 72(31), 82(26), M ⁺ 100(1)	921	923	68.6	x	x
18.77	2-Pentalenal	55(100), 83(75), 39(39), 41(24), 53(20), 56(18), 50(10), 57(10), 51(10), M ⁺ 84(51)	892	892	53.5	x	
18.77	2-Pentalenal, (E)-	55(100), 83(72), 39(48), 41(45), 69(23), 56(19), 53(19), 43(11), 50(10), M ⁺ 84(59)	942	943	58.1	x	
20.49	1-Penten-3-ol	57(100), 29(24), 31(7), 41(6), 43(6), 39(5), 58(5), 55(4), 53(3), 59(3), 71(2), M ⁺ 86(1)	914	914	69.3		x
21.64	Eucalyptol	43(100), 81(73), 108(63), 71(60), 111(57), 84(52), 69(47), 93(45), 139(43), M ⁺ 154(48)	951	952	91.2	x	x
21.76	2-Hexenal, (E)-	83(100), 55(77), 41(67), 69(62), 39(53), 42(30), 56(21), 97(19), 57(19), 70(19), M ⁺ 98(17)	897	898	62.8	x	
22.93	Hexanoic acid, ethyl ester	88(100), 99(57), 43(56), 41(41), 60(35), 55(35), 70(32), 101(30), 73(29), 42(26) M ⁺ 144(<1)	771	771	85.2	x	x
23.92	1-Pentanol	42(100), 55(96), 70(87), 41(65), 31(63), 43(40), 104(39), 39(36), 56(30), 45(29), M ⁺ 88(<1)	782	848	57.8	x	x
25.1	Octanal	43(100), 57(92), 56(84), 42(72), 69(70), 84(66), 68(64), 41(62), 39(59), 81(56), 82(54), M ⁺ 128(<1)	825	825	83.1	x	x
26.00	2-Penten-1-ol, (Z)-	57(100), 41(26), 68(26), 29(25), 39(22), 44(20), 67(18), 43(15), 55(15), 53(11), 31(10), M ⁺ 86(3)	944	952	77.2		x
26.95	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	43(100), 108(59), 41(53), 69(46), 55(45), 111(25), 67(22), 58(21), 39(20), 71(19), M ⁺ 126(9)	894	929	79.9	x	x
27.6	1-Hexanol	56(100), 55(49), 43(47), 41(36), 42(33), 69(33), 29(23), 31(18), 39(12), 84(5), 54(5), M ⁺ 102(<1)	912	919	52.6	x	x
31.06	α-Cubebene	161(100), 119(91), 105(90), 91(40), 55(30), 41(27), 81(26), 93(25), 120(25), 56(25), M ⁺ 204(24)	830	839	53.3	x	x
31.91	Ylangene	119(100), 105(85), 93(74), 120(71), 161(61), 91(47), 92(43), 107(41), 121(39), 77(34), M ⁺ 204(25)	795	804	64	x	
33.11	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	67(100), 87(98), 71(92), 43(86), 88(83), 45(81), 117(76), 60(75), 42(60), 39(51), 41(48), 61(42), 89(36), M ⁺ 132(<1)	722	769	56.1	x	x
33.4	Benzaldehyde	105(90), 77(82), 51(34), 50(19), 78(18), 107(11), 74(10), 52(7), 73(6), M ⁺ 106(100)	898	918	67.3		x
33.93	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	71(100), 93(85), 41(51), 43(50), 55(50), 69(43), 80(33), 121(27), 67(20), M ⁺ 154(<1)	928	928	66.1		x
34.34	1-Octanol	56(100), 55(100), 41(76), 69(70), 70(68), 43(65), 84(52), 83(51), 42(46), 57(41), 31(23), 39(22), 68(21), 32(21), 45(17), M ⁺ 130(<1)	907	917	54.3	x	
34.79	2(10)-Pinen-3-one, (ñ)-	81(100), 53(87), 108(87), 107(59), 79(53), 135(48), 41(38), 39(37), 69(35), 77(29), M ⁺ 150(21)	850	850	65.5	x	x
35.54	α-Isophoron	82(100), 39(12), 54(11), 41(8), 95(8), 83(7), 55(7), 67(6), 53(5), 79(5), 32(4), M ⁺ 138(25)	864	869	58.2	x	x
35.72	(-)-Terpinen-4-ol	71(100), 111(67), 93(54), 43(31), 55(23), 86(23), 69(22), 41(21), 110(16), 136(13), 94(13), M ⁺ 154(24)	818	818	55.6		x
36.39	α-Cyclocitral	137(100), 109(73), 123(71), 81(58), 67(54), 107(35), 95(33), 79(31), 55(30), 39(30), 43(28), 91(27), M ⁺ 152(97)	859	888	60.3	x	
37.85	α-Caryophyllene	93(100), 80(33), 121(30), 147(21), 91(19), 92(18), 79(17), 107(16), 41(15), 77(14), 94(14), 67(12), M ⁺ 204(7)	943	947	66.3	x	x
40.42	Cadinene	161(100), 105(37), 91(31), 119(29), 93(27), 133(21), 79(21), 83(18), 81(16), 41(16),	922	924	51.1	x	x

41.33	Myrtenol	77(15) M ⁺ 204(23) 79(100), 91(51), 108(31), 105(23), 77(21), 93(20), 119(19), 41(16), 67(13), 39(12), 107(12), M ⁺ 152(<1)	862	900	63.3	x	x
42.44	Cadina-1,3,5-triene	159(100), 160(15), 128(10), 129(9), 131(7), 144(7), 115(6), 143(6), 105(4), 141(4), M ⁺ 202(11)	923	929	88.3	x	x
44.71	α -Calacorene	157(100), 142(47), 141(32), 156(22), 158(15), 115(12), 153(9), 128(8), 143(8), 155(7), M ⁺ 200(25)	824	877	70.7	x	x
45.18	α -Ionone	177(100), 43(24), 133(13), 178(13), 135(12), 91(11), 93(8), 41(7), 77(7), 121(7), 105(7), 107(6), M ⁺ 192(4)	895	901	61.8	x	x
49.73	Spathulenol	205(100), 91(75), 43(75), 119(71), 105(59), 159(57), 93(55), 41(52), 79(47), 147(47), M ⁺ 220(<1)	880	880	53.2	x	x
51.72	Bulnesol	107(100), 135(94), 59(75), 161(74), 93(70), 105(51), 79(39), 81(38), 91(38), 189(37), 108(33)	888	888	57.1	x	

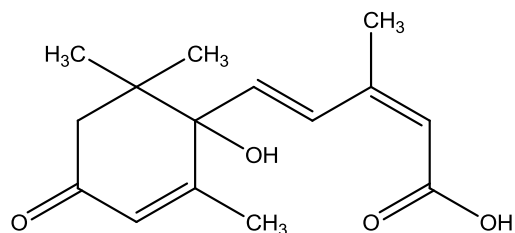
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN (^{13}C e ^1H , δ em ppm) para os compostos 1-4.

Número	1 - ácido abscísico (18-19)		2 - 7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona (23-24)		3 - 2,4-dihidroxi-3-metil-6-metoxichalcona (26-27)		4 - 2,4-dihidroxi-3,5-dimetil-6-metoxichalcona (30-31)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J em Hz)
1	48,25	-	163,81	-	135,7	-	135,3	-
2	198,90	5,77 (s)	112,95	7,53 (m)	128,3	7,70 (m)	128,9	7,64 (m)
3	126,31	5,98 (s)	162,62	7,37 (m)	128,9	7,43 (m)	128,4	7,39 (m)
4	166,67	6,17 (s)	107,64	7,37 (m)	130,0	7,43 (m)	130,2	7,39 (m)
5	78,60	7,81 (s)		7,37 (m)	128,9	7,43 (m)	128,4	7,39 (m)
6	38,31	-	98,45	7,53 (m)	128,3	7,70 (m)	128,9	7,64 (m)
7	24,97	-	190,21	-	127,9	7,99 (d; 15,7)	126,7	7,98 (d;15,7)
8	24,97	-	45,11	-	141,5	7,74 (d; 15,7)	142,9	7,83 (d;15,7)
9	133,07	-	78,78	-	105,3	-	108,9	-
10	-	-	139,26	-	164,1	-	162,0	-
11	20,05	-	125,87	-	103,7	-	106,7	-
12	135,31	-	128,10	-	161,6	-	159,4	-
13	154,71	2,59 (d, 17,1)	128,27	6,31 (s)	90,7	6,15 (s)	109,1	-
14	-	-	128,10	-	161,5	-	158,8	-
OH - 10	-	7,63 (d; 16,6)	-	5,45 (d; 3,0 e 12,0)	-	-	-	13,59 (s)
OH - 12	-	6,64 (d; 16,6)	-	2,94 (d; 12,0 e 18,0)	-	14,49 (s)	-	5,4 (s)
CH3 - 13	-	4,41 (d, 1,2)	-	2,65 (d; 3,0 e 18,0)	-	9,24 (s)	7,6	2,12 (s)
CH3 - 15	-	6,18 (s)	-	9,44 (s)	-	1,94 (s)	8,2	2,15 (s)
CH3 - 16	-	5,96 (s)	-	2,02 (s)	-	3,93 (s)	62,3	3,65 (s)
CO	-	-	-	3,74 (s)	-	-	193,4	-

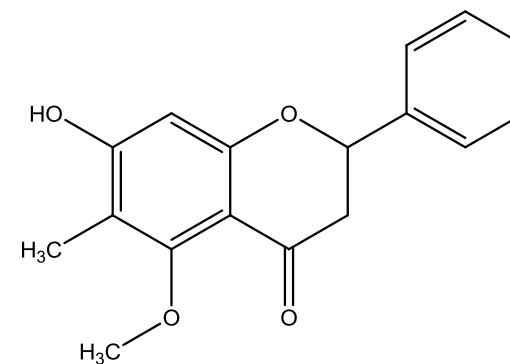
Figuras

Figura 1. Árvore e frutificação de guabiroba.

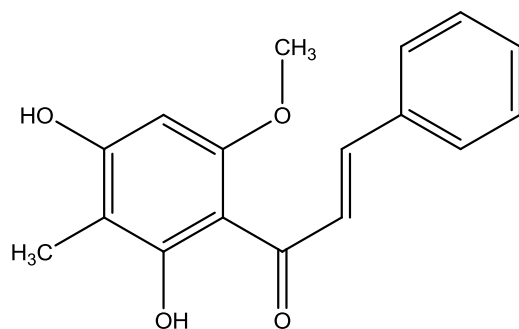
Fonte: Fotos do autor, 2009.



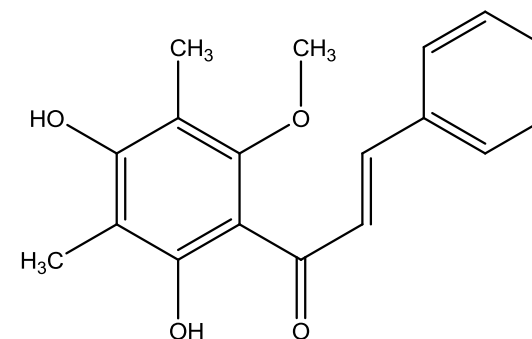
Composto 1 – ácido abscísico (18-19)



Composto 2 - 7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona (23-24)



Composto 3 - 2,4-diidroxi-3-metil-6-metoxichalcona (26-27)



Composto 4 – 2,4-diidroxi-3,5-dimetil-6-metoxichalcona (30-31)

Figura 2. Estruturas isoladas dos frutos da guabiroba.

CONCLUSÕES

Os frutos da guabiroba são medianamente ácidos com bons teores sólidos solúveis, sendo essas características de interesse para a transformação desse fruto em produto.

O atrativo aromático que a fruta apresenta é confirmado pelos compostos voláteis pertencentes majoritariamente ao grupo do terpenóides.

Os extratos dos frutos da guabiroba são ricos em compostos classificados dentro dos produtos naturais, e a essa riqueza pode ser atribuída à atividade antioxidante frente ao DPPH, atividade antiproliferativa de células MCF-7 e atividade antioxidante frente a leveduras.

Os compostos isolados (chalconas e flavanovas), a partir dos extratos metanólicos, e as estruturas elucidadas por RMN, são relatados na literatura como compostos que ocorrem na espécie *C. xanthocarpa*, porém em diferentes partes do vegetal.

CONCLUSÕES GERAIS

Os frutos das mirtáceas nativas estudadas, araçá e guabiroba, demonstraram serem ricas em produtos naturais, como a composição em ácidos fenólicos, e devido a esses compostos do metabolismo secundário, os extratos estudados desses frutos apresentaram potenciais atividades *in vivo* e *in vitro* que são oriundos desses metabólitos secundários.

Os frutos estudados tem potencial para exploração econômica, pelas potenciais propriedades funcionais demonstradas, os frutos ou seus processados poderão fazer parte de novos produtos, ou utilizados como novos produtos para atender um público consumidor seletivo para atender as suas preocupações com a alimentação.

O metabolismo secundário das duas espécies estudadas é distinto, metabolismo de frutos vermelhos e amarelos, para o araçá e a guabiroba, respectivamente, demonstrando conforme a composição de produtos naturais de cada espécie. Podendo-se inferir que essas características são estratégias evolutivas de cada espécie, e esses compostos podem ser de interesse para a escolha desses frutos para compor uma dieta funcional.

REFERENCIAS

Agudo A., Cabrera L., Amiano P., Ardanaz E., Barricarte A., Berenguer T., Chirlaque M.D., Dorronsoro M., Jakszyn P., Larrañaga N., Martínez, C., Navarro C., Quirós J.R., Sánchez M.J., Tormo M.J., González C.A.. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain)', *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, n. 6, 2007, p. 1634-1642

Almeida M.J.F., Naves R.V., Ximenes P.A.. Influência das abelhas (*Apis mellifera*) na polinização da gabioba (*Campomanesia* spp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v.30, n.2, p. 25-28, 2000.

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar- Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A., Review: Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n 3, 2011, p. 945-972

Alvarez, G.J., Balaguera, E.H., Cardenas, J.F.. Physiological characterization of champa fruit (*Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pavón) during postharvest. *Revista U.D.C.A Actualidad & & Divulgación Científica*, v. 12, n. 2, 2009, p.125-133

Alvarez-Herrera, J. G., Galvis, J. A., Balaguera-Lopez, H. E.. Determination of physical and chemical changes during champa fruit maturation (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Agronomía Colombiana*, v. 27, n. 2, 2009 p. 253-259

Alves R.E., Brito E.A., Rufino M.S.M., Sampaio C.G.. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola, *Acta Horticulturae*, v. 773,

2008, p. 299–305

Ayhan, Z.; Yeom, H. W.; Zhang, Q. H.; Flavour, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 49, n. 2, p.669-674, 2001.

Backes P., Irgang B.. *Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 326 p. 2002.

Badjakov, I., Nikolova, M., Gevrenova, R., Kondakova, V., Todorovska, E., Atanassov, A. Bioactive compounds in small fruits and their influence on human health, *Biotechnology Biotechnological Equipment*, v. 22, n. 1, 2008, p. 581-587

Baliga M.S., Bhat H.P., Baliga B.R., Wilson R., Palatty P.L.. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review, *Food Research International*, v. xx, n. xx, 2011, p. xxxx-xxxx

Bao, S., Wang, Y., Sweeney, P., Chaudhuri, A., Doseff, A.I., Marsh, C.B., Knoell, D. L.. Keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells. *American Journal of Physiology –Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 288, n. 1, 2005, p. 36-42

Biavatti, M.W., Koerich, C.A., Henck, C.H., Zucatelli, E., Martineli, F.H., Bresolin, T.B., Leite, S.N.. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 59, n. 3-4, 2004, p. 197-200

Bonilla, A.; Duque, C.; Garzon, C.; Takaishi, Y.; Yamaguchi, K.; Hara, N.; Fujimoto, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry*, v. 66, n. 14, 2005, p. 1736-1740

Boscolo, O.H.; Mendonça-Filho, R.F.W.; Menezes, F.S.; Senna-Valle, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. The antioxidant power of some restinga plants cited as medicines. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9, n. 1, 2007, p. 8-12

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset, C.. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, 1995, p. 25–30

Cardoso, C.L., Kataoka, V.M.F., Ré-Poppi, N. Leaf oil of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, n. 4, 2010, p. 303-304

Carvalho J.E.U., de Müller C.H.. Biometria e Rendimento Percentual de Polpa de Frutas Nativas da Amazônia. In: Embrapa- Comunicado Técnico 139, 2005, Belém. Proceedings... Belém: EMBRAPA, 2005. p. 4.

Clerici, M.T.P.S.; Carvalho-Silva L.B.. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil, *Food Research International*, v. xx, n. xx, 2011, p. xxxx-xxxx

Coutinho I. D., Poppi N. R., Cardoso C. L.. Identification of the volatile compounds of leaves and flowers in Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg). *Journal of Essential Oil Research*, v. 20, n. 5, 2008, p. 405-407

Dembitsky V. M., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtenberg S., Gorinstein S.. Review: The multiple nutrition properties of some exotic fruits Biological activity and active metabolites, *Food Research International*, v. xx, n. xx, 2011, p. xxx–xxx

Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H.. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 3010–3014

Dickel, M. L., Rates, S. M. K., Ritter, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre-South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 1, 2007, p. 60 – 71

Duarte W. F., Dias D. R., Oliveira J. M., Teixeira J. A., Almeida e Silva J. B., Schwan R. F.. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. *LWT – Food Science and Technology*, v. 43, n. 10, p. 2010, 1564-1572

Dung N. T., Bajpai V. K., Yoon J. I., Kang S. C., Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds, *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 12, 2009, p. 449–453

Fernandes, J.B.F.; Vargas, V.M.F.; Mutagenic and Antimutagenic Potential of the Medicinal Plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*, *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 3, 2003, p. 269–273

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, n. 22, 2000, p. 1812-1823.

Freitas, J. B. de; Candido, T. L. N.; Silva, M. R.. Gabirola jelly: evaluation of

acceptability and physical and chemical characteristics, *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, v. 38, n. 2, 2008, p. 87-94

Fu L., Xu B. T., Xu X. R., Qin X. S., Gan R. Y., Li H. B.. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*, v. 15, n. 12, 2010, p. 8602-8617

Giulietti, A. M., Harley R. M., Queiroz, L. P. de, Wanderley, M. das G. L., Van Den Berg, C., Biodiversidade e Conservação de das Plantas no Brasil. *Revista Megadiversidade*, v. 1, n. 1, 2005, p. 52 – 61

Hakkinen S. H., Torronen R.. Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influences of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, v. 33, n. 6, 2000, p. 517–524

Haminiuk C. W. I., Sierakowski M. R., Vidal J. R. M. B., Masson M. L.. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (*Psidium cattleianum* Sabine). *LWT - Food Science and Technology*, v. 39, n.4, 2006, p. 427-431

Hartmann T.. Review From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *Phytochemistry*, v. 68, n. 22-24, 2007, p. 2831-2846

Hu F. B.. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 78, n. 3, 2003, p. 544S-551S

Ikram E. H. K., Khoo H. E., Jalil A. M. M., Smail A., Idris S., Azlan A., Mohd Nazri H. S., Mat Diton N. A., Mohd Mokhtar R. A.. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, n. 5, 2009, p. 388-393

Itharat A., Houghton P. J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J., Sampson J.H., Raman A. .
In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer.
Journal of Ethnopharmacology, v. 90, n. 1, 2004, p. 33-38

Landrum L.R., Kawasaki M.L.. The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated
synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v. 49, n. 4, 1997, p. 508-536

Leja M., Mareczek A., Ben J.. Antioxidant properties of two apple cultivars during
long-term storage. *Food Chemistry*. v. 80, n. 3, 2003, p. 303-307.

Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.. Determinations of total carotenoids and
chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society
Transactions*, v. 11, n. 5, 1983, p. 591-592

Limberger, R.P.; Apel, M.A.; Sobral, M.; Moreno, P.R.H.; Henriques, A.T.; Menut, C.
Aromatic plant from Brazil: chemical composition of essential oils from some
Campomanesia species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 2,
2001, p. 113-115

Liu M., Li X.Q., Weber C., Lee C.Y., Brown J., Liu R.H.. Antioxidant and
antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
v. 50, n. 10, 2002, p. 2926–2930

Longhi, R. A. Livro das árvores: árvores e arvoretas do sul. Porto Alegre: Editora
L&PM, 176 p., 1995.

Lopes M. I., Saffi J., Echeverrigaray S., Henriques J.A., Salvador M.. Mutagenic and
antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of
Ethnopharmacology*, v. 95, n. 2-3, 2004, p. 437-45

Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Vol 1, 3 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

Manica I.. Frutas nativas, silvestres e exóticas. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000, p. 91-129

Markman B. E., Bacchi E. M., Kato E. T.. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 1, 2004, p. 55-57

McGuire, R. G.. Reporting of objective color measurements. *HortScience*, , v.27, n.12, 1992, p.1254-1255

Medina A. L., Haas L. I. R., Chaves F. C., Salvador M., Zambiasi R. C., Silva W. P. da, Nora L., Rombaldi C. V.. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells, *Food Chemistry*, v. 128, n. 4, 2011, p. 916-922

Melchior S. J., Custódio C. C., Marques T. A., Machado Neto N. B.. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. - Myrtaceae) e implicações na germinação. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 28, n. 3, 2006, p.141-150,

Michels K.B., Giovannucci E., Chan A.T., Singhanian, R.; Fuchs, C.S.; Willett, W.C. Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the nurses' health study, *Cancer Research*, v. 66, n. 7, 2006, p. 3942-3953

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J.,

Boyd, M.. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, 1991, p. 757-766

Oliveira, D. da S., Aquino P.P., Ribeiro S.M.R., Proença R.P. da C., Pinheiro-Sant'Ana H.M.. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais, *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 33, n. 1, 2011, p. 89-98

Oliveira, R.C. de; Rossi, R.M.; Barros, S.T.D. de.. Estudo do efeito da temperatura sobre o comportamento reológico das polpas de gabioba e goiaba, *Acta Scientiarum. Technology*, v. 33, n. 1, 2011, p. 31-37

Osório, C.; Alarcon, M.; Moreno, C.; Bonilla, A.; Barrios, J.; Garzon, C.; Duque, C. J. Characterization of odor-active volatiles in Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 2, 2006, p. 509–516

Pande, G., Akoh, C. C.. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops, *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, 2010, p. 1067-1075

Peixoto N., Silva E., Teixeira F.G., Moreira F.M.. Avaliação de crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1., JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 3., 2005, Anápolis. Anais... Anápolis, 2005.

Poiroux-Gonord F., Bidel L. P., Fanciullino A. L., Gautier H., Lauri-Lopez F., Urban L.. Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and

Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 23, 2010, p. 12065–12082

Puerta-Gomez A. F., Cisneros-Zevallos L.. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence, *Postharvest Biology and Technology*, v. 60, n. 3, 2011, p. 220–224

Rassam M., Laing W.. Variation in Ascorbic Acid and Oxalate Levels in the Fruit of *Actinidia chinensis* Tissues and Genotypes, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n. 6, 2005, p. 2322–2326

Reynertson K. A., Yang H., Jiang B., Basile M. J., Kennelly E. J.. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits, *Food Chemistry*, v 109, n. 4, 2008, p. 883-890

Riboli E., Norat T.. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk, *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 78, n. 3, 2003, p. 559S-569S

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J.; Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil, *Food Chemistry*, v. 121, n. 4, 2010, p. 996-1002

Santos, M. S. Caracterização físico-química e aproveitamento tecnológico do *Psidium cattleianum* Sabine (Araçá-vermelho), 2006, 177f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

Santos, M. D.; Carneiro, P. I. B.; Wosiacki, G.; Petkowicz, CldeO; Carneiro, E. B. B.. Physicochemical characterization, extraction and analysis of pectins from fruit of *Campomanesia Xanthocarpa* B. (Gabiropa). *Semina-Ciencias Agrárias*, v. 30, n. 1, 2009, 101-106

Schmeda-Hirschmann, G.. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, v. 66, n. 4, 1995, p. 373-374

Serrano M., Guillén F., Martínez-Romero D., Castillo S., Valero D.. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 7, 2005, p. 2741–2745

Shukla S., Mehta A., Bajpai V. K., Shukla S.. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxixology*, v. 47, n. 9, 2009, p. 2338-2343

Silva, C. V.; Bilia, D. A. C.; Maluf, A. M.; Barbedo, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 2003, n. 26, p. 213-221.

Silva, E. P. da; Boas, E. V. de B. V.; Rodrigues, L. J.; Siqueira, H. H.. Physical, chemical and physiological characterization of gabiropa fruit (*Campomanesia pubescens*) during its development, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, 2009, p. 803-809

Silva, M. R.; Lacerda, D. B. C. L.; Santos, G. G.; Martins, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciencia Rural*. v. 38, n. 6, 2008, p. 1790-1793

Simarelli M.. Frutas nativas compõem o acervo riquíssimo da biodiversidade

brasileira, que o fruticultor pode ajudar a preservar. Frutas e derivados. Ano 2, Ed. 8, p.33-35, 2007.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H; Kenney, S.; Boyd, M.R.. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. Journal of National Cancer Institute, v. 82, n. 13, 1990, p. 1107-1112

Souza Filho M.S.M., Lima J.R., Nassu R.T., Moura C.F.H., Borges M.F.. Formulações de néctares de frutas nativas das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Boletim Ceppa, v. 18, n. 2, 2000, p. 275-283

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, v. 106, n. 1, 2008, p. 331-339

Souza-Moreira T. M., Salvagnini L. E., Santos E., Silva V. Y., Moreira R. R., Salgado H.R., Pietro R.C.. Antidiarrheal Activity of Campomanesia xanthocarpa Fruit. Journal of Medicinal Food, v. 14, n. 5, 2011, p. 528-531

STATISTIX®. Statistix 9 analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008

Szajdek A., Borowska E. J.. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review, Plant Foods for Human Nutrition, v. 63, n. 4, 2008, p. 147-156

Tajkarimi, M. M.; Ibrahim, S. A.; Cliver D. O.. Review - Antimicrobial herb and spice compounds in food, Food Control, v. 21, n. 9, 2010, p. 1199-1218

Teixeira F. G., Silva E. S., Moreira F. M., Peixoto N.. Avaliação de crescimento de plantas de *Campomanesia pubescens* O. Berg em diferentes substratos. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 3., JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 1., 2005, Anápolis. Anais... 2005.

Thitilertdech N.; Teerawutgulrag A.; Rakariyatham N.. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts, v. 41, n. 10, 2008, p. 2029-2035

Vallilo M. I., Bustillos O. V., Aguiar O. T.. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg- Myrtaceae. Revista do Instituto Florestal, v. 18, n. único, 2006, p. 15-22

Vallilo M.I., Lamardo L.C.A., Gaberlotti M.L., Oliveira E, Moreno P.R.H.. Chemical composition of *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg fruits.. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 4, 2006, p. 805-810

Vallilo M.I., Moreno, P.R.H., de Oliveira, E., Lamardo, L.C.A., Garbelotti, M.L.. Chemical composition of *Campomanesia xanthocarpa* Berg -Myrtaceae fruit, Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 0, 2008, p. 231-237

Vallilo M.I.; Crestana C. de S.M.; Aued-Pimentel S.; Tavares M.; Kumagai E. E.; Garbelotti M. de L.. Seed chemical composition of *Archontophoenix alexandrae* H. Wendl. & Drude (Arecaceae), Revista Árvore, v. 28, n. 5, 2004, p. 676 – 679

Wattam D. A., Shetty K.. Biological Functionality of Ellagic Acid: A Review, Journal of Food Biochemistry, v. 29, n. 3, 2005, p. 234-266

Vinci G., Botre F., Mele G., Ruggieri G.. Ascorbic acid in fruits, a liquid chromatographic investigation. Food Chemistry, v. 53, n. 2, 1995, p. 211–214

Weston R. J., Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review, *Food Chemistry*, v. 12, n 4, 2010, p. 923-926

Wu S. J.; Ng L. T.. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn, var *abbreviata* Ser. in Taiwan), *LWT Food Science and Technology*, v. 41, n. 2, 2007, p. 323–330

Wu X., Beecher G. R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L.. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 12, 2004, p. 4026-4037

Zaicovski, C. B. Caracterização de frutas nativas da Região Sul da América do Sul quanto à presença de compostos bioativos, da atividade antioxidante e da atividade antiproliferativa frente à celular tumorais. Universidade Federal de Pelotas, 2008, 91p.

Zambiasi, R. C. The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability. Manitoba: University of Manitoba Winnipeg, 1997. 304 p.

