

Área: Ciência de Alimentos

COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NA CASCA E NO FRUTO INTEIRO DE CAMU-CAMU

Paula Ferreira de Araujo Ribeiro*, Flávia Marquini Ramos, Igor Hiroshi, Isadora Rebouças Nolasco de Oliveira, Paulo Cesar Stringheta

Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Itaqui, RS; Laboratório de Compostos Bioativos e Corantes Naturais, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

**E-mail: pr.unipampa@gmail.com*

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar, comparativamente, os teores de polifenóis totais, antocianinas totais e ácido elágico (livre e total) na casca e no fruto inteiro (polpa + casca) de camu-camu, bem como a capacidade antioxidante *in vitro* dos mesmos. Os teores de polifenóis e antocianinas totais foram determinados por análise espectrofotométrica, com base no reagente de Folin-Ciocalteu e no método de pH único, respectivamente. As quantificações de ácido elágico livre e total foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência e a capacidade antioxidante dos frutos através do método ABTS. A casca do camu-camu, quando comparada ao fruto inteiro (polpa + casca), apresentou menor teor de polifenóis totais e conseqüentemente, menor ($p \leq 0,05$) capacidade antioxidante *in vitro*. Entretanto, os teores de antocianinas totais foram maiores nesta porção do fruto e desta forma, foi possível observar que as antocianinas não são os principais polifenóis responsáveis pela capacidade antioxidante do camu-camu. Em relação ao conteúdo de ácido elágico total e livre, não se verificou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores determinados na casca e no fruto inteiro de camu-camu.

Palavras-chave: polifenóis, antocianinas, ácido elágico, capacidade antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

A região Amazônica se destaca pela grande biodiversidade de frutos com diferentes composições nutricionais e bioativas. O camu-camu (*Myrciaria dubia*), pertencente à família *Myrtaceae*, é um arbusto originário da Amazônia Brasileira e Peruana. Seu habitat natural é à beira de rios e igarapés ou regiões permanentemente alagadas, onde a parte inferior de seu caule permanece submersa (ZANATTA et al., 2005; ZANATTA e MERCADANTE, 2007). O interesse no estudo de frutas exóticas tem ocorrido, principalmente, em virtude do crescente reconhecimento do valor terapêutico desses alimentos. Ao mesmo tempo, o potencial dos mesmos para a agroindústria chama a atenção da comunidade como uma possível fonte de renda para a população local (ALVES et al., 2008).

O principal atrativo do camu-camu é o elevado teor de vitamina C (ZANATTA e MERCADANTE, 2007). Entretanto, também é capaz de apresentar alto conteúdo de polifenóis totais, substâncias que chamam a atenção pela

capacidade antioxidante que conferem aos alimentos que os contém (GONÇALVES et al., 2010). Os frutos são arredondados e possuem coloração roxo-escuro ao final da maturação, devido à presença de antocianinas, que estão concentradas em maior proporção na casca (ZANATTA et al., 2005). Além disso, estudos mostram que a casca, em relação ao restante do fruto (polpa), também pode apresentar maior concentração de outras substâncias bioativas, como compostos fenólicos não antocianínicos (VILLANUEVA-TIBURCIO et al., 2010). Em função disso e da dificuldade de separar a casca da polpa, o camu-camu geralmente é consumido e processado sem ser descascado.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, comparativamente, os teores de polifenóis totais, antocianinas totais e ácido elágico (livre e total) na casca e no fruto inteiro (polpa + casca) de camu-camu, bem como a capacidade antioxidante *in vitro* dos mesmos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram investigados frutos de camu-camu provenientes do estado de Roraima (região Norte do Brasil), cultivados em solo alagado, coletados as margens do médio Rio Branco, localizado 30 km a norte de Boa Vista (latitude 2°49'12" norte, longitude 60°40'19" oeste), em abril de 2011. Os frutos foram coletados em estágio ideal de maturação, caracterizado pela coloração vermelha da casca, ou seja, pela presença de antocianinas, as quais aparecem nos frutos conforme os avanços dos processos de maturação. Foram provenientes de diferentes arbustos e coletados durante vários dias de forma aleatória. Ao final da colheita, foram misturados, formando uma única matriz de análise. Para a análise dos frutos inteiros, as sementes foram separadas manualmente e o restante (polpa e casca) triturado em processador do tipo "mixer". Para a análise das cascas, as mesmas foram separadas manualmente dos frutos e trituradas, utilizando-se o mesmo equipamento.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (Statistical Analysis System), versão 9.2.

Em relação à quantificação de polifenóis e antocianinas totais, o procedimento de extração desses compostos foi realizado a partir de 10 g de amostra maceradas com 100 mL de solução aquosa de etanol 70 % (v/v) por 24 horas e sob refrigeração ($7 \pm 1^\circ\text{C}$). O extrato final ficou com pH próximo de 2,0. O teor de polifenóis totais foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia espectrofotométrica proposta por Singleton e Rossi (1965). As amostras foram primeiramente eluídas em cartucho de separação C18 (Sep-Pak Vac 35cc – Waters) visando à remoção de interferentes da análise, como ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos, conforme Noratto et al. (2010). A determinação de polifenóis totais foi realizada com base em curva padrão de ácido gálico (0 – 200 ppm). As leituras foram realizadas a 760 nm e o resultado expresso em mg AGE (ácido gálico equivalente) por 100 g de fruto. O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de pH único, de acordo com Lees e Francis (1972). As leituras foram realizadas a 535 nm e o resultado expresso em mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de fruto.

A extração e quantificação de ácido elágico livre em camu-camu foi realizada conforme Pinto et al. (2008) com modificações. As amostras foram extraídas com uma mistura de metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v) na proporção de 1:25 (m/v). A quantificação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se coluna C18 de 5 μm (250 x 4,0 mm) em fase reversa e detector UV-Visível (Shimadzu SPD – 10 AV). A

fase móvel foi em gradiente de solventes constituído por: A – água:tetrahydrofurano:ácido trifluoroacético (98:2:0,1 v/v) e B – acetonitrila, na proporção de 17 % de B por 2 minutos aumentando para 25 % de B após 5 minutos, 35 % de B após mais 8 minutos e 50 % de B após mais 5 minutos. Os cromatogramas foram lidos no comprimento de onda de 254 nm e o teor de ácido elágico livre foi determinado por meio de curva padrão de ácido elágico (5 – 95 ppm).

A extração e quantificação de ácido elágico total foi realizada de acordo com Pinto et al. (2008), com modificações. As amostras de camu-camu foram homogeneizadas com 50 mL de acetona 80 % (v/v). Uma alíquota de 4 mL do extrato foi evaporada até secagem completa em evaporador analítico e hidrolisada com 4 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 2 N a 120°C por 60 minutos. Após a hidrólise, foram adicionados 4 mL de álcool butílico e o extrato foi novamente evaporado. Após a secagem, foi ressuspenso com 1 mL de metanol e filtrado em filtro de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,45 µm. A quantificação do teor de ácido elágico total foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas mesmas condições descritas para a quantificação de ácido elágico livre.

Quanto à capacidade antioxidante *in vitro* das amostras, para a quantificação da mesma foram utilizados os extratos elaborados para a determinação de polifenóis e antocianinas totais. A avaliação foi realizada através do ensaio TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) utilizando o radical ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonado), segundo metodologia descrita por Re et al. (1999), com modificações. Para a determinação, o antioxidante padrão utilizado foi o Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), sendo os resultados expressos em µM equivalente de Trolox por grama de amostra. A reação das amostras com o cátion ABTS ocorreu no tempo de 6 minutos (Re et al., 1999), sendo as leituras espectrofotométricas realizadas no comprimento de onda de 734 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os resultados das avaliações realizadas na casca e no fruto inteiro de camu-camu.

Tabela 1 – Teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante *in vitro* em casca e fruto inteiro de camu-camu (valores expressos em peso de amostra seca)

Determinações	Casca	Fruto inteiro (polpa + casca)
Umidade (%)	86,70 ± 0,08 ^b	91,79 ± 0,15 ^a
Polifenóis totais (mg AGE/100 g)	10.611,08 ± 130,36 ^b	12.216,84 ± 5,02 ^a
Antocianinas totais (mg CIN/100 g)	171,87 ± 5,37 ^a	158,86 ± 1,20 ^b
Ácido elágico livre (mg/100g)	28,71 ± 1,21 ^a	27,50 ± 3,54 ^a
Ácido elágico total (mg/100 g)	357,29 ± 118,29 ^a	348,31 ± 40,22 ^a
CAT <i>in vitro</i> – ABTS (µM equivalente de Trolox/g)	997,07 ± 16,44 ^b	1.209,08 ± 65,66 ^a

Os valores representam a média de 3 repetições ± desvio padrão; Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$); AGE: ácido gálico equivalente; CIN: cianidina-3-glicosídeo; CAT: capacidade antioxidante total.

Quando comparada ao fruto inteiro, a casca do camu-camu apresentou menor ($p \leq 0,05$) umidade, bem como menores teores de polifenóis totais e capacidade antioxidante. Entretanto, apresentou maiores teores de antocianinas totais

($p \leq 0,05$). Quanto aos teores de ácido elágico livre e total, estatisticamente, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores encontrados na casca e no fruto inteiro.

Os maiores teores de umidade no fruto inteiro justificam-se pelos maiores teores de água que a polpa dos frutos costuma apresentar quando comparada à casca. Desta forma, a mistura polpa e casca no fruto inteiro faz aumentar o teor de umidade do mesmo quando o conjunto é avaliado.

Em relação aos teores de polifenóis totais, o fruto inteiro apresentou maior conteúdo quando comparado com a casca isolada, provavelmente em virtude dos polifenóis presentes na polpa do camu-camu que, em sua maioria, não devem ser compostos antocianínicos, uma vez que os teores de antocianinas totais foram determinados em maior quantidade na casca do fruto. Segundo Zanatta et al. (2005), as antocianinas no camu-camu estão concentradas principalmente na casca, estando em baixa concentração na polpa. A casca é a parte do fruto que fica mais exposta ao ataque de microrganismos, radiações e outras condições de estresse (injúrias mecânicas, por exemplo). Com isso, um maior conteúdo de alguns polifenóis na mesma, entre eles as antocianinas, é possível de ocorrer, pois os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, desencadeado mediante condições de estresse (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Em relação aos teores de ácido elágico livre e total, o fato de não haver diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores encontrados na casca e no fruto inteiro pode prever que no camu-camu o ácido elágico, independente da forma de apresentação, tem sua síntese concentrada em maior proporção na casca do fruto e não na polpa. Desta forma, é possível reforçar a ideia de que, em relação ao camu-camu, é importante que o consumo e o processamento ocorram em conjunto com a casca, pois a não utilização da mesma implicaria em um baixo aproveitamento do ácido elágico presente no mesmo, bem como das antocianinas, as quais, conforme dados apresentados na Tabela 1, encontram-se em maior proporção na casca do fruto.

A menor concentração de ácido elágico na forma livre indica que a proporção do mesmo na forma ligada, seja como elagitaninos ou glicosilado, é maior. Pinto et al. (2008) reportou que o teor de ácido elágico livre nos vegetais é geralmente baixo, estando o composto presente principalmente na forma de elagitaninos. Entretanto, é importante salientar que o conteúdo de ácido elágico livre no alimento é importante porque está diretamente relacionado com a absorção do composto pelo organismo, uma vez que quando na forma ligada o metabolismo do mesmo é mais lento (LANDETE, 2011).

A capacidade antioxidante *in vitro* foi estatisticamente maior ($p \leq 0,05$) no fruto inteiro, provavelmente impulsionada pelo maior conteúdo de polifenóis totais presente no mesmo, quando comparado com a casca. Tal resultado intensifica a relação existente entre os polifenóis e a capacidade antioxidante dos alimentos que os contém. Chirinos et al. (2010) encontrou uma correlação de 0,93 entre o teor de polifenóis totais e a capacidade antioxidante de frutos de camu-camu, sugerindo que o potencial antioxidante dos mesmos é derivado principalmente dos polifenóis presentes. Entretanto, é importante salientar o fato de que as antocianinas não sejam os polifenóis responsáveis, em sua totalidade, pela capacidade antioxidante do camu-camu, uma vez que foram os polifenóis presentes na polpa que impulsionaram a capacidade antioxidante do fruto inteiro. Tal observação é possível, pois as antocianinas foram determinadas em maior concentração na casca do camu-camu, se apresentando em menor proporção no fruto inteiro (Tabela 1), predizendo que na polpa a concentração das mesmas é baixa.

4 CONCLUSÃO

A casca do camu-camu, quando comparada ao fruto inteiro (polpa + casca), apresentou menor teor de polifenóis totais e conseqüentemente, menor capacidade antioxidante *in vitro*. Entretanto, os teores de antocianinas totais foram maiores nesta porção do fruto e desta forma, foi possível observar que as antocianinas não são os principais polifenóis responsáveis pela capacidade antioxidante do camu-camu. Em relação ao conteúdo de ácido elágico total e livre, não se verificou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores determinados na casca e no fruto inteiro de camu-camu.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; RUFINO, M. S. M.; SAMPAIO, C. G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. **Acta Horticulturae**, v. 773, n. 1, p. 299–305, 2008.
- CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019-1024, 2010.
- GONÇALVES, A. E. S. S., LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. G. Standardization of pigment analysis in cranberries. **Hortscience**, v.7, p.83-84, 1972.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NORATTO, G. D.; BERTOLDI, M. C.; KRENEK, K.; TALCOTT, S. T.; STRINGHETA, P. C.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4104-4112, 2010.
- PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1629-1635, 2008.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- SAS, Statistical Analysis System (SAS®), SAS software versão 9.2, Cary, 2008. 176p.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- VILLANUEVA-TIBURCIO, J. E.; CONDEZO-HOYOS, L. A.; ASQUIERI, E. R. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, p. 151-160, 2010.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.