



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

SÉRGIO HENRIQUE BRABO DE SOUSA

COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
FRUTOS DE ACESSOS DE BACABA-DE-LEQUE.

BELÉM - PARÁ

2017

SÉRGIO HENRIQUE BRABO DE SOUSA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
FRUTOS DE ACESSOS DE BACABA-DE-LEQUE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Vânia Carvalho

Coorientadora: Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto

BELÉM - PA

2017

SÉRGIO HENRIQUE BRABO DE SOUSA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
FRUTOS DE ACESSOS DE BACABA-DE-LEQUE.**

Data da Avaliação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Vânia Carvalho
(EMBRAPA/PPGCTA/UFPA - Orientadora)

Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto
(Embrapa Amazônia Oriental - Coorientadora)

Prof. Dr. Renan Campos Chisté
(UFPA/ITEC/FEA – Membro interno)

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro interno)

Profa. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas
(ICEN/UFPA – Membro externo)

Aos meus pais, Raimundo Palheta e Ivanete Felicidade, e a Família Brabo e Sousa pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido forças nos momentos difíceis e força para superar as dificuldades enfrentadas ao longo dessa jornada. Não posso deixar também de mencionar a grande alma caridosa e imaculada que me sustenta e guia meu caminhar Nossa Senhora de Nazaré.

Aos meus queridos pais, Raimundo Palheta e Ivanete Felicidade, por todo apoio.

Às minhas orientadoras Prof.^a Dr^a Ana Vânia Carvalho e Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto, pela sempre orientação, pelas inúmeras oportunidades, pelas palavras de apoio e motivação, pelo incentivo, por terem sido verdadeiras amigas nessa jornada. Meu muito obrigado!

Às pesquisadoras Dra. Alessandra Ferraiolo e Dra. Laura Abreu, pelo apoio e incentivo a pesquisa, por proporcionarem os meios necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, em especial ao Prof. Dr. Renan Chisté pelo apoio incondicional na reta final do trabalho, pela grande colaboração nas análises por HPLC-DAD e PCA com muita paciência e atenção, muito obrigado. Ao Prof. Dr. Rosinelson da Silva, pelas importantes e significativas contribuições apresentadas.

Às amigas e companheiras Elaine Souza, Thaise Oliveira e Bianca Negrão pela amizade, cumplicidade e apoio nos bons e maus momentos. Que me toleraram em todos os momentos difíceis, principalmente, durante o período do desenvolvimento do trabalho. Às técnicas do laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental Lorena Maciel e Conceição pelo auxílio nas horas de dúvidas. Aos amigos de convivência no laboratório, por toda a ajuda prestada e amizade construída.

Agradeço a Embrapa Amazônia Oriental pelas inúmeras oportunidades de estágio num ambiente tão amigável e acolhedor que é o laboratório de Agroindústria. Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de concluir esta etapa em um curso de tamanha excelência.

Muito obrigado!

RESUMO

Os frutos de bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart), palmeira nativa da Amazônia brasileira, apresentam diversas possibilidades de exploração. A valorização desse importante recurso natural estimula estudos da composição em compostos bioativos de seus frutos. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição em compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos frutos de 32 acessos de *Oenocarpus distichus* Mart, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, a fim de colher subsídios quanto a composição em compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos frutos para apoiar o programa de melhoramento genético da espécie. Os materiais foram caracterizados quanto ao teor em compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanois totais, antocianinas monoméricas e a capacidade antioxidante total, além do perfil de compostos fenólicos para os cinco acessos que se destacaram em termos de teores totais. Os resultados demonstraram haver diferença estatística entre as médias dos acessos selecionados para todas as variáveis estudadas. De maneira geral, os frutos apresentaram teores de compostos fenólicos totais com variação de 81,86 a 363,01 mg AGE/100g, para flavonoides totais foi observada uma variação de 9,53 a 38,19 mgQE/100g, para flavanois totais de 32,36 a 259,18 mgCE/100g e para antocianinas monoméricas totais de 3,05 a 67,76 mg Cia-3-rut/100g. Para a capacidade antioxidante total utilizando o método TEAC, também foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os acessos estudados, com variações entre 18,77 a 77,99 μ M Trolox/g; para o método DPPH a variação foi de 1510,48 a 6721,47 g fruta/g DPPH. Os compostos fenólicos apresentaram correlação com a capacidade antioxidante dos frutos de *O. distichus* e contribuem de forma significativa na estabilização ou sequestro de radicais livres *in vitro*. Os acessos com melhores resposta para o teor de compostos fenólicos (B3, B7, B3, SJ-1 e SJ-4) foram selecionados para a identificação e quantificação da composição de fenólicos individuais por HPLC-DAD. Os resultados obtidos sugerem que os frutos de *O. distichus* apresentam variações de composição em ácidos fenólicos e flavonoides. Os principais compostos fenólicos identificados foram o ácido clorogênico (0,71 a 64,56 μ g/g), seguido da rutina (13,98 a 56,76 μ g/g). A principal antocianina identificada, com auxílio de padrão externo, permitiu pela primeira vez a identificação e quantificação da cianidina-3-*O*-rutinosídeo (48,47 a 196,51 μ g/g), como pigmento fenólico majoritário em frutos dessa espécie. Portanto, tais informações indicam que os frutos de *O. distichus* possuem potencial na suplementação de antioxidantes naturais na dieta humana.

Palavras-chave: *Oenocarpus distichus* Mart, fitoquímicos antioxidantes, polifenóis.

ABSTRACT

The fruits of bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart), a native palm tree of the Brazilian Amazon, present different possibilities of exploitation. The appreciation of this important natural resource stimulates studies of its composition of bioactive compounds. The goal of this study was to evaluate the composition of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the fruits of 32 accesses of *Oenocarpus distichus* Mart, which belong to the Embrapa Amazônia Oriental Germplasm Active Bank (GAB). It also had the objective to obtain subsidies to support the species-breeding program. Total phenolic compounds, total flavonoids, total flavanoids, monomeric anthocyanins and total antioxidant capacity, as well as the profile of phenolic compounds for five accesses that stood out in terms of total contents characterized the materials. The results showed that there was a statistical difference among the means of the selected accesses for all the variables studied. In general, the fruits presented total phenolics content ranging from 81.86 to 363.01 mg AGE/100g. The total flavonoids value showed variation of 9.53 and 38.19 mg QE/100 g, the total flavanoids ranged from 32.36 to 259.18 mgCE/100 g and the total monomeric anthocyanins content ranged from 3.05 to 67.76 mg Cia-3-rut/100g. For the total antioxidant capacity determined by the TEAC method, differences ($p > 0.05$) were also observed among the samples studied, with variations between 18.77 and 77.99 μ M Trolox/g; for the DPPH method, from 1510.48 to 6721.47 g fruit/g DPPH. The results of phenolic compounds showed a strong correlation with the antioxidant capacity of the fruits of *O. distichus*, which contribute significantly to the stabilization or sequestration of free radicals *in vitro*. The accesses with the best response to phenolic compounds content (B3, B7, B3, SJ-1 and SJ-4) were selected for the identification and quantification of the individual phenolic composition by HPLC-DAD. The results obtained suggest that the fruits of *O. distichus* present composition variations in phenolic acids and flavonoid. The main phenolic compounds identified were chlorogenic acid (0.71 to 64.56 μ g/g) and rutin (13.98 to 56.76 μ g/g). The main anthocyanin identified with the aid of an external standard allowed, for the first time the identification and quantification of cyanidin-3-O-rutinoside (48.47 to 196.51 μ g/g) as the major phenolic pigment in fruits of this species. Therefore, such information indicates that the fruits of *O. distichus* have potential of natural antioxidants supplementation in the human diet.

Keywords: *Oenocarpus distichus* Mart, phytochemical antioxidant, polyphenols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Indivíduo adulto de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart (bacaba-de-leque) situado no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental; (B) Frutos maduros de bacaba-de-leque	19
Figura 2. Estrutura química dos principais grupos de compostos fenólicos	22
Figura 3. Estrutura química básica de um flavonoide	23
Figura 4. Estrutura química dos principais flavonoides	23
Figura 5. Estrutura química de um flavonol.....	24
Figura 6. Estrutura química básica de um flavan-3-ols e a formação de proantocianidinas A e B a partir das subunidades de ligação	25
Figura 7. Estrutura básica do pigmento antocianidina, o cátion flavilium.....	26
Figura 8. Mudança estrutural do pigmento antocianina em meio aquoso em função do pH 1 e 4,5	27
Figura 9. Estabilidade do radical ABTS ^{•+} por adição de um composto antioxidante	30
Figura 10. Estrutura da reação do radical DPPH ^{•+} livre, com um antioxidante, onde a molécula doadora produz um radical estável A [•]	31
Figura 11. (a) Frutos maduros de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart (bacaba-de-leque); (b) Despoldadeira vertical; (c) Obtenção da polpa; (d) Polpa liofilizada	34
Figura 12. Fluxograma do processamento dos frutos de bacaba-de-leque (<i>Oenocarpus distichus</i> Mart) para obtenção da polpa	35
Figura 13. Cromatograma a 320 nm dos extratos de bacaba-de-leque: Pico 1: ácido 3,4 dihidroxibenzóico; pico 2: ácido clorogênico; pico 3: cianidina 3- <i>O</i> -rutinosideo; pico 4: ácido siríngico; pico 5: rutina; pico 6: ácido ferúlico.....	53
Figura 14: Perfil cromatográfico completo obtido por HPLC-DAD registrado a 520 nm para os extratos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart. Nota: espectro de absorção identificado para o pico 3, cianidina 3- <i>O</i> -rutinosideo.....	54
Figura 15. Espectros de absorção máxima dos compostos fenólicos identificados nos acessos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart.....	56
Figura 16. Classificação das variáveis respostas no plano formado pelas respostas ativas e complementares por análise estatística multivariada. (a) Projeção das variáveis pela análise de componentes principais (PCA); (b) Scatterplot para os diferentes acessos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart por PCA, com grupos sugeridos pelo HCA; (c) Dendrograma por HCA.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanois totais e antocianinas monoméricas referentes a frutos de 32 acessos de bacaba-de-leque (<i>Oenocarpus distichus</i> Mart), oriundos de três diferentes localidades no estado do Pará.....	43
Tabela 2. Avaliação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos de bacaba-de-leque (<i>Oenocarpus distichus</i> Mart)	47
Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os compostos bioativos e a capacidade antioxidante dos acessos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart.....	49
Tabela 4. Tempo de retenção, absorção máxima e compostos fenólicos detectados nos acessos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 GÊNERO <i>Oenocarpus</i>	18
3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	20
3.2.1. Compostos fenólicos	21
3.2.1.1 Flavonoides.....	22
3.2.1.2 Antocianinas.....	26
3.3 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES.....	28
3.3.1. Métodos in vitro de determinação da capacidade antioxidante.....	29
3.3.1.1 Método TEAC.....	30
3.3.1.2 Método DPPH.....	31
3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Matéria-prima.....	34
4.2 Métodos.....	36
4.2.1 Obtenção dos extratos.....	36
4.2.2 Determinação de compostos fenólicos	36
4.2.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais.....	36
4.2.2.2 Flavonoides totais.....	37
4.2.2.3 Flavanois totais.....	37
4.2.2.4 Antocianinas monoméricas totais	38
4.2.3 Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>.....	39
4.2.3.1 Método TEAC.....	39
4.2.3.2 Método DPPH.....	39
4.2.4 Caracterização da composição fenólica por HPLC-DAD.....	40
4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	42
5.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	46

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS BIOATIVOS E A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	49
5.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD.....	50
5.5 CORRELAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS ACESSOS DE <i>Oenocarpus distichus</i> Mart POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA.....	56
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia alberga uma das maiores biodiversidades do mundo. Vários são os grupos vegetais que fazem parte da paisagem amazônica, onde as palmeiras, segundo Kahn (1988), constituem um dos componentes mais característicos desse bioma, as quais ainda são pouco conhecidas quanto ao seu potencial de exploração, sobretudo com relação às características funcionais e sua contribuição nutricional às populações locais e para a sociedade de um modo geral (NACIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1975; MARCIA et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Em meio à grande diversidade de palmeiras nativas e exóticas existentes na região amazônica, o gênero *Oenocarpus* spp é um dos mais explorados pelo extrativismo regional, dado o grande potencial econômico, ecológico e alimentar que as espécies pertencentes a este gênero apresentam para a região (MOSCOSO; ALBERNAZ; SALOMAO, 2010; OLIVEIRA; RIOS 2012; PEREIRA et al., 2013). Para este gênero são aceitas seis espécies como nativas do Brasil, mas não endêmicas, dentre elas tem-se quatro popularmente denominadas bacabeiras: *O. bacaba* Mart., *O. distichus* Mart., *O. minor* Mart e *O. mapora* H. Kartern e uma denominada de patauazeiro, *O. pataua* Mart. (LEITMAN et al., 2013).

A parte economicamente viável das bacabeiras são os frutos, os quais são utilizados para a fabricação de polpa processada (refresco) ou para obtenção de óleo; porém a exploração ainda é abastecida pelo extrativismo regional (OLIVEIRA; RIOS, 2012). Segundo alguns autores, a polpa da bacaba-de-leque apresenta grandes possibilidades de competir no mercado com os frutos do açaí, por serem produtos mais próximos em termos de sabor (BALICK, 1979; OLIVEIRA; RIOS, 2012).

A bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart), uma das representantes do gênero *Oenocarpus*, é bastante utilizada na região amazônica para o preparo de uma bebida energética e nutritiva popularmente denominada “vinho de bacaba”, semelhante à bebida preparada a partir do açaí, e possui promissor potencial de exploração comercial (HANDERSON, 1995; LORENZI et al., 2010).

Em razão do grande potencial alimentar, pesquisas para domesticação da espécie *Oenocarpus distichus* Mart foram desenvolvidas por meio de programas de melhoramento genético, visando a manutenção e uso sustentável desse importante recurso natural. Por isso, entre as décadas de 80 a 90 esforços foram envidados pela Embrapa Amazônia Oriental para implantação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de bacabeiras, formado por acessos

provenientes de populações naturais e melhoramento genético, constituindo o único repositório de bacabeiras no Brasil (OLIVEIRA; RIOS, 2012).

Apesar do potencial sócio-econômico, cultural e nutricional dos frutos de bacaba-de-leque, as informações disponíveis na literatura ainda são escassas para a espécie, constituindo fator limitante para o maior conhecimento de seu valor nutricional e potencial de exploração, bem como para os programas de melhoramento genético apoiados, especialmente, na seleção de acessos promissores com relação à presença de compostos bioativos. Assim, a caracterização funcional aliada ao melhoramento genético representa um importante passo para os programas de melhoramento genético de palmeiras do gênero *Oenocarpus*, resultando em base de informações para a seleção de acessos promissores para o desenvolvimento de novas cultivares com atributos melhorados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar a polpa de diferentes acessos de *Oenocarpus distichus* Mart pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de bacabeiras da Embrapa Amazônia Oriental, quanto aos teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante total, além de determinar o perfil de compostos fenólicos nos frutos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais na polpa de diferentes acessos de *Oenocarpus distichus* Mart;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos acessos;
- Selecionar 5 acessos de *Oenocarpus distichus* Mart mais promissores com relação aos teores em compostos fenólicos e capacidade antioxidante e determinar o perfil de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GÊNERO *Oenocarpus*: ASPECTOS GERAIS

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética de frutíferas com grande utilidade à população (SCHROTH et al., 2001; DONADIO et al., 2004), sendo a Amazônia Brasileira a maior detentora, e relativamente bem conhecidas no que concerne aos aspectos botânicos (UHL; DRANSFIELD, 1987; CAVALCANTE, 2010). Na literatura disponível, as palmeiras nativas da Amazônia constituem uma fonte importante de recursos de valor socioeconômico, cultural e nutricional, relacionada com a vida e os costumes das comunidades ribeirinhas da região (PRANCE et al., 1987; BRUM et al., 2008).

De acordo com Henderson et al. (1995), o gênero *Oenocarpus* é constituído por nove espécies: *O. bacaba* Mart.; *O. distichus* Mart.; *O. pataua* Mart.; *O. circumtextus* Mart.; *O. balickii* Kahn.; *O. makeru* B.G.H.; *O. mapora* H. K.; *O. minor* Mart e *O. simplex* B.G.H. Muitas destas espécies estão distribuídas de forma natural no norte da América do Sul, estendendo-se para América Central. Na região amazônica, os frutos das espécies *O. bacaba*, *O. distichus* e *O. pataua* são bastante utilizados para o preparo de uma bebida energética. Os frutos destas espécies apresentam sabor agradável, oferecendo uso similar aos frutos do açaizeiro. Exibem como característica comum frutos de coloração roxo-escuro quando maduros. A composição química dos frutos é bastante diversificada e apontam ser fontes promissoras de compostos bioativos antioxidantes (ABADIO-FINCO et al., 2012; REZAIRE et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). Estas espécies representam um importante recurso à população amazônica e ao mercado regional, e participação significativa na economia de subsistência das populações ribeirinhas e indígenas (BALICK, 1979).

As bacabeiras apesar de apresentarem excelente potencial econômico, as informações disponíveis para a maioria das espécies do gênero *Oenocarpus* ainda são incipientes, a respeito das características nutricionais e funcionais, e do potencial antioxidante (MILLER, 2002; VALOIS, 2010; ABADIO-FINCO, 2013). Entre as diversas espécies pertencentes ao gênero *Oenocarpus*, uma se destaca, a *Oenocarpus distichus* Mart., vulgarmente conhecida como bacaba-de-leque ou bacaba-de-azeite. A bacaba-de-leque exhibe excelentes propriedades de exploração, em razão, sobretudo da qualidade de seus frutos para exploração comercial; bem como o grande potencial de uso seja para obtenção de óleo ou da bebida “bacaba”, muito consumida pela população ribeirinha amazônica, tendo a base de exploração alicerçada no extrativismo (PESCE, 2009).

A espécie *O. distichus* Mart ocorre com maior incidência na Amazônia brasileira, em relação às outras espécies do gênero *Oenocarpus*, com maior dispersão no Sul e Leste do Estado do Pará (LORENZI et al., 2010). Os frutos da palmeira *O. distichus* são globosos com formato elipsoide; e medi de 1,8 a 2 cm (Figura 1) e apresentam coloração roxo-escura quando maduros. Os frutos são comestíveis, podendo ser preparados em forma de bebida (*Oenocarpus* significa “fruto de vinho”). A produção de frutos em plantios experimentais alcança cerca de 4000 frutos por cacho, com rendimento em polpa de 58,6%, e oferecem grande potencial tecnológico de exploração para polpa processada (HENDERSON et al., 1995; MIRANDA et al., 2001). A polpa dos frutos é rica em proteínas e apresenta seu maior potencial econômico na culinária local, para o preparo de refrescos e na fabricação de sorvetes pelas indústrias locais da região (ROCHA; SILVA, 2005). Apesar do reconhecido potencial econômico, existem poucas informações na literatura sobre a espécie *O. distichus* Mart, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de estudos que venham a contribuir para o conhecimento e uso sustentável de seus recursos alimentares.



Figura 1: (A) indivíduo adulto de *Oenocarpus distichus* Mart (bacaba-de-leque), situado no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental; (B) frutos maduros de bacaba-de-leque. Foto: O autor.

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos são amplamente difundidos entre frutas e hortaliças. São metabólitos secundários presentes em todo reino vegetal e que são vitais para a manutenção da saúde humana (SAXENA; PRADHAN, 2012). Cabe destacar que os compostos bioativos apresentam propriedades antioxidantes e suas aplicações evidenciam efeitos benéficos sobre a modulação de processos metabólicos, e sua associação à redução de doenças crônicas e outros fatores de risco (CAMARA et al., 2010; THOMAS-BARBERAM; ANDRES-LACUEVA, 2012; BHAT; PALIYATH, 2016).

Muitos vegetais já receberam o título de “alimento funcional”, pois além de atenderem os requisitos básicos de nutrição, possuem a capacidade de proporcionar benefícios fisiológicos adicionais ao organismo humano (KAUR; KAPOOR, 2001). As frutas, em especial, são alimentos essenciais para a manutenção da saúde, pois além da função básica de nutrir, contribuem para um bom funcionamento do organismo humano. Consideradas excelentes fontes de compostos bioativos antioxidantes, que apresentam importante papel na prevenção de distúrbios patológicos (IGNAT; VOLF; PAPO, 2011). Ricas em compostos reconhecidos como antioxidantes naturais, tais como os carotenoides (CHISTÉ et al., 2012), os compostos fenólicos (BALASUNDRA et al., 2006), os alcaloides, os compostos que contêm nitrogênio e os compostos orgânicos de enxofre, que estão presentes de forma abundante em frutas e hortaliças (LIU, 2003; LIU, 2004).

Os compostos bioativos variam extensamente em estrutura química e, conseqüentemente, na função biológica, no entanto, possuem algumas características em comum: Estão presentes em frutas e hortaliças; são substâncias orgânicas, geralmente, de baixo peso molecular (IGNAT; VOLF PAPO, 2011); não são sintetizadas pelo organismo humano e apresentam capacidade de desativar espécies reativas (MANACH et al., 2005; CHISTÉ et al., 2012). Apontados como agentes eficazes de proteção, quando consumidos como parte de uma dieta equilibrada (TOMÁS-BARBERÁN; ANDRÉS-LACUEVA, 2012).

Dentre os compostos bioativos, os mais estudados são os compostos fenólicos, em razão dos efeitos benéficos à saúde humana. Atuam como antioxidantes primários, reagindo diretamente com os radicais livres, ou como antioxidantes secundários regenerando ou potencializando outros sistemas antioxidantes (SCALBERT et al., 2005; MALTA et al., 2013; TUDOR et al., 2015). Por essas razões, grande esforço tem sido realizado para identificar, isolar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos tecidos de diferentes plantas, especialmente daquelas que ainda não foram adequadamente estudadas (KHANAMA et al., 2012).

3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo heterogêneo de metabólitos secundários que proporcionam funções na reprodução e crescimento do vegetal. São metabólitos derivados exclusivamente dos fenilpropanóides e policetídeos, originados a partir da via do ácido chiquímico (QUIDEAU et al., 2001).

As substâncias fenólicas constituem um grupo de metabólitos com estruturas amplamente diversificadas, com mais de 8000 moléculas conhecidas, que podem variar desde moléculas fenólicas simples, como o ácido gálico e o ácido caféico, até compostos altamente polimerizados, como as proantocianidinas (CHEYNIER, 2012; ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Quimicamente, os compostos fenólicos se encontram divididos em várias classes, conforme o esqueleto carbônico e a posição dos substituintes na estrutura química (D'ARCHIVIO et al., 2007; MOUKETTE et al., 2015).

Vários são os grupos que constituem a classe dos compostos fenólicos. Em geral são classificados como simples fenóis, os ácidos fenólicos (não-flavonoides), os flavonoides, os estilbenos, os álcoois fenólicos e as lignanas (NACZK; SHAHIDI, 2004) (Figura2). A estrutura química desses metabólitos secundários é um fator determinante na atividade como sequestradores de radicais livres e como agentes quelantes de metais, contribuindo, desse modo, para as diferentes capacidades antioxidantes apresentadas por cada grupo de composto (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Nos últimos anos, os compostos fenólicos têm sido foco de interesse de muitas pesquisas, devido, principalmente, às funções biológicas, incluindo capacidade antioxidante (sequestro e desativação de espécies reativas). Vários estudos comprovam o potencial no combate aos radicais livres, causadores do estresse oxidativo e, conseqüentemente, aos danos a tecidos e biocélulas do organismo humano (KAUR; KAPOOR, 2001; KANG et al., 2010; THOMÁS-BARBERAM; ANDRÉAS-LACUEVA, 2012). À vista disso, os compostos fenólicos apresentam importante papel na prevenção de distúrbios patológicos, além de serem compostos que apresentam grande aplicação industrial, muito utilizados na indústria farmacêutica e em aplicações como corantes naturais e conservantes de alimentos (IGNAT et al., 2011).

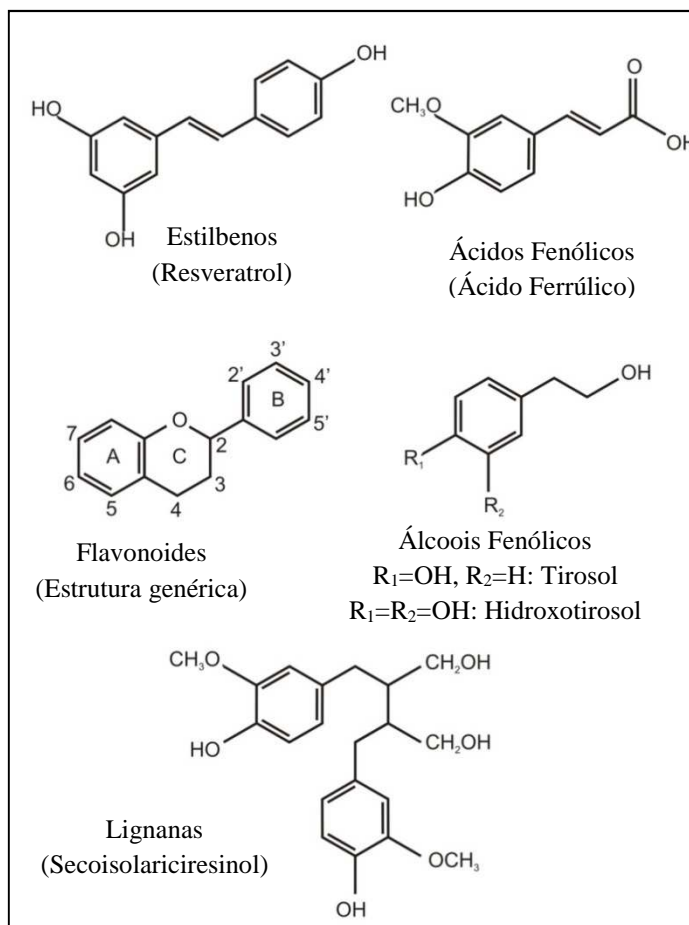


Figura 2: Estrutura química dos principais grupos de compostos fenólicos.

Fonte: Adaptado de D'Archivio et al. (2007); Karabin et al. (2015).

3.2.1.1 Flavonoides

O grupo dos flavonoides compreende uma variedade de estruturas fenólicas que são os mais abundantes nas plantas e frutas. Como resultado, constitui a maioria dos polifenóis que são consumidos diariamente na dieta, compreendendo mais de 4000 estruturas conhecidas (CROZIER et al., 2006; AGATI et al., 2012; KARABIN et al., 2015). São sintetizados pela via polipropanoide, e tem como componente de partida a molécula fenilalanina (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

Os flavonoides apresentam estrutura genérica que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbonos, que geralmente integram a um anel heterocíclico oxigenado (Figura 3). Com 15 átomos de carbono dispostos em uma configuração C₆-C₃-C₆, com um ou mais substituintes hidroxílicos na estrutura química (CROZIER et al., 2006; AGATI et al., 2012; KARABIN et al., 2015).

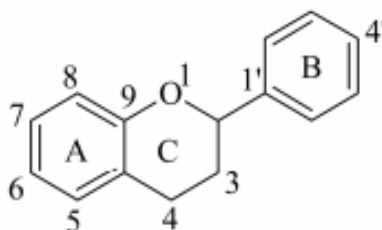


Figura 3: Estrutura química básica de um flavonoide.

Fonte: Adaptado de Karabin et al. (2015).

Os flavonoides têm se mostrado antioxidantes eficientes, em diferentes ensaios biológicos. Apresentam estrutura muito semelhante entre si, apresentando como diferença entre os derivados o grupamento ligante entre os anéis aromáticos e a presença ou ausência de dupla ligação. Encontrados na forma aglicona, porém é mais frequentemente encontrado, nos vegetais, na forma glicosilada. São subdivididos em diferentes subgrupos, tais como: flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianinas e flavanóis (ROSS; KASUN, 2002; KARABIN et al., 2015) (Figura 4).

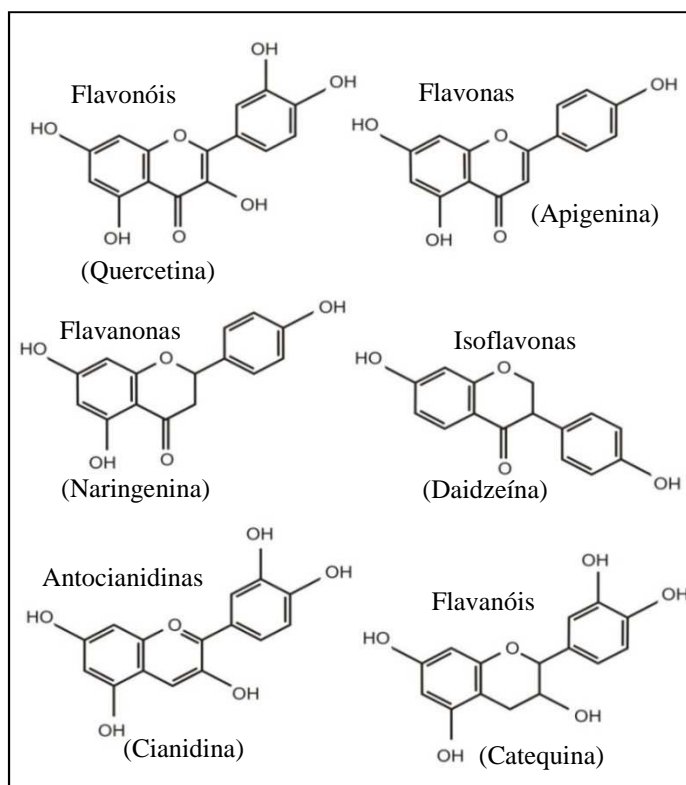


Figura 4: Estrutura química dos principais flavonoides.

Fonte: Adaptado de D'Archivio et al. (2007); Karabin et al. (2015).

Entre os flavonoides, os flavonóis constituem os mais distribuídos na natureza e apresentam uma grande diversidade estrutural. Encontram-se comumente ligados a açúcares (glicosídeos), e possuem tendência de acumular-se na casca de frutas e nas folhas das plantas, tendo a biossíntese estimulada pela luz (KARABIN et al., 2015; SANTOS et al., 2015).

Os flavonóis são reconhecidos como os principais responsáveis pela capacidade antioxidante em frutas, em função, sobretudo, dos substituintes hidroxílicos presentes na estrutura química, que atuam na estabilização de espécies reativas (D'ARCHIVIO et al., 2007; KARABIN et al. 2015). A uma dupla ligação entre C₂ e C₃, com um grupo hidroxila na posição C₃ (Figura 5). Os flavonóis representam os flavonoides mais comuns em alimentos e os exemplos incluem a quercetina, o kaempferol e a miricetina, sendo a quercetina o composto mais representativo encontrado em frutas e hortaliças (D'ARCHIVIO et al., 2007).

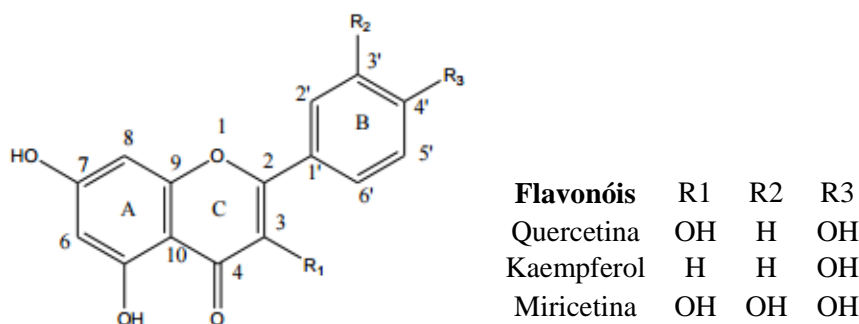


Figura 5: Estrutura química de um flavonol.

Fonte: Adaptado de D'andrea 2015.

Os flavanóis, subclasse dos flavonoides constituem outro importante grupo de compostos fenólicos. São compostos que apresentam cadeia de três carbonos saturados, geralmente com um grupo hidroxila no C₃ (Figura 6). Encontra-se nas formas monomérica (catequina) e polimérica (proantocianidinas) (VIDAL et al., 2003; D'ARCHIVIO et al., 2007; PASCUAL-TERESA et al., 2010). As proantocianidinas conhecidas como taninos condensados são formadas, pela polimerização de catequinas e epicatequinas ligadas, covalentemente (MARTEL; MONTEIRO; CALHAU, 2010).

As proantocianidinas são oligômeros e polímeros de flavan-3-ols, formadas principalmente pelas subunidades de (+)-catequina e seu isômero (-)-epicatequina (HO; RAFI; GHAI, 2010). Quando as subunidades estão envolvidas (ligadas), as moléculas são conhecidas

como procianidinas, a forma mais comum encontrada na natureza. No entanto, outras subunidades de ligação são possíveis, dando origem a moléculas diferentes e mais complexas (WALTON et al., 1983). Apresentar heterogeneidade quanto ao grau de polimerização, havendo diferenças nos tipos de ligação entre as subunidades de flavan-3-ols, podendo ser ligações do tipo simples (B) ou ligações do tipo éter (A), essa última a menos comum (GU et al., 2004; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009). Tais estruturas estão apresentadas na Figura 6.

As proantocianidinas têm se mostrado importantes agentes terapêuticos antioxidantes. Tais propriedades estão ligadas, especialmente, às suas estruturas químicas que apresentam facilidade em doar prótons e quelar metais, agindo como neutralizadores de espécies reativas (radicais livres), o que implica no alto potencial antioxidante observado para esses compostos (BEECHER et al., 2004; WADA et al., 2007; SPRANGER et al., 2008).

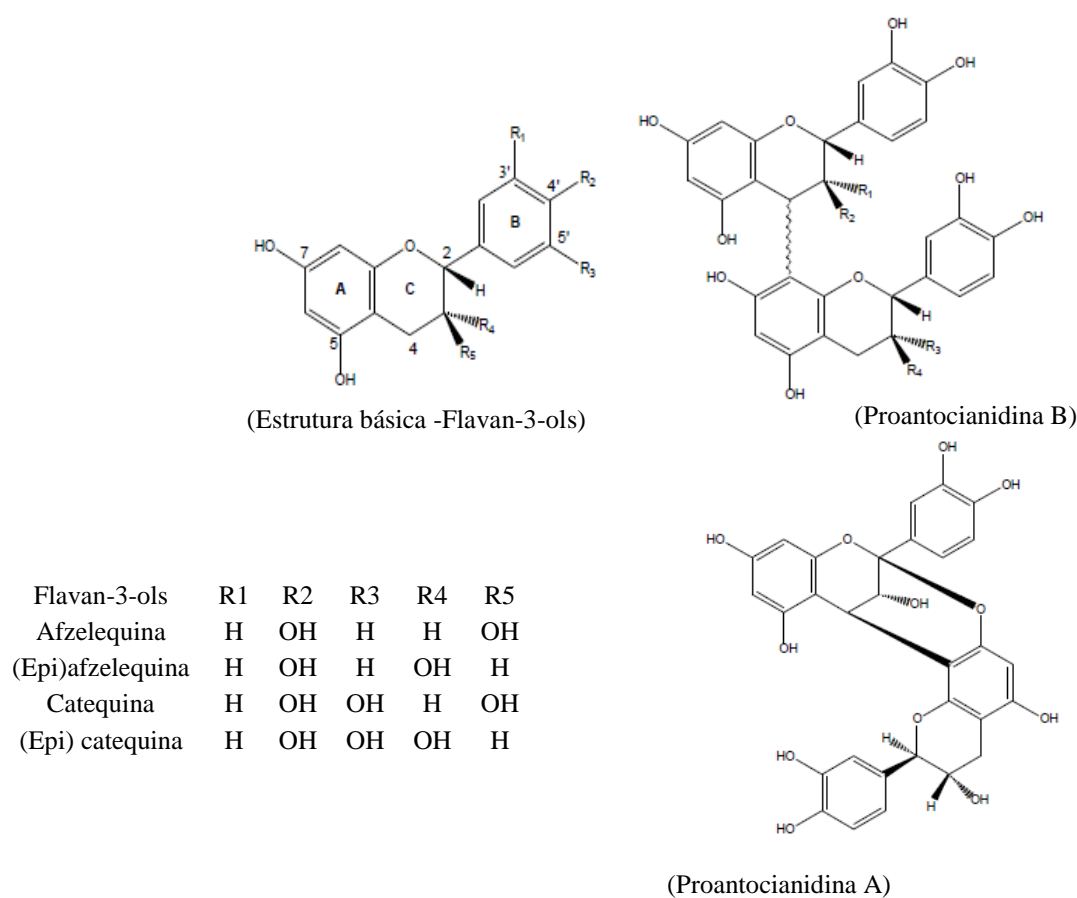


Figura 6: Estrutura química básica do flavanóis e a formação de proantocianidinas A e B a partir das subunidades de ligação.

Fonte: Adaptado de Pascual-Teresa et al. (2010).

3.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas compreendem o maior grupo de pigmentos no reino vegetal; são solúveis em água e responsáveis, em grande parte, pelas cores atrativas de flores, frutos e folhas (BROUILLARD 1983). Quimicamente são derivados glicosilados das antocianidinas, cuja estrutura fundamental é o cátion flavílio (2-fenilbenzopirilium) (Figura 7), no qual o anel A é derivado do ciclo acetato malonato e o anel B é derivado da fenilalanina (PADAYACHEE et al., 2012; KARABIN et al., 2015).

As diferenças entre as várias moléculas de antocianinas estão relacionadas com o número de grupos hidroxílicos na estrutura, no grau de metilação destes grupos, na natureza, e no número de moléculas de açúcares ligadas à estrutura molecular, bem como a posição dessas ligações e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) na estrutura do pigmento (BROUILLARD, 1983; KARABIN et al., 2015).

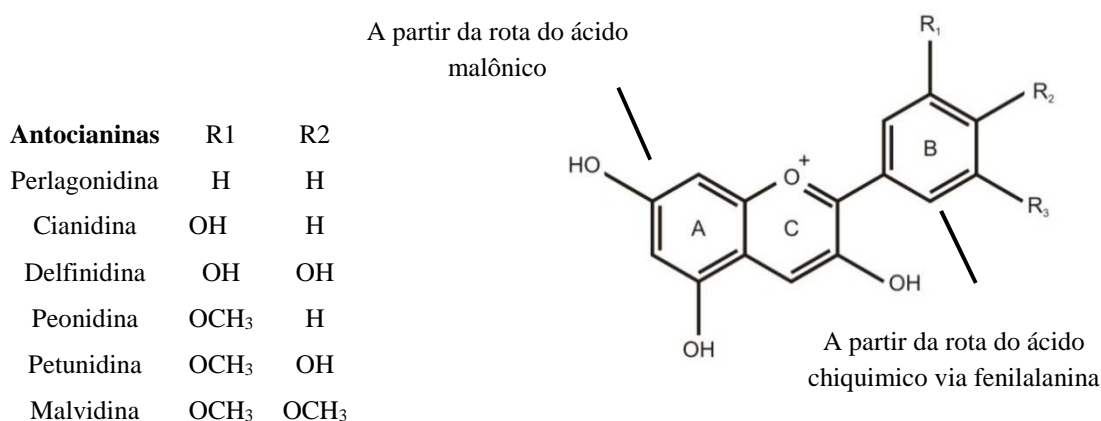


Figura 7: Estrutura básica do pigmento antocianidina, o cátion flavilium.

Fonte: Adaptado de Pascual-Teresa et al. (2010).

Com a mesma origem biossintética dos outros flavonoides, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto estrutural contendo 15 átomos de carbono na forma C₆-C₃-C₆. No entanto, ao contrário dos outros flavonoides, as antocianinas absorvem fortemente luz na região do UV-visível do espectro, conferindo uma grande diversidade de cores (BROUILLARD, 1983; PADAYACHEE et al., 2012). As estruturas mais comuns encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: perlagonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina. São fitoconstituintes

antioxidantes importantes na dieta, citados como tendo ampla atividade farmacológica, associados a prevenção de diversas doenças (AZEVEDO et al., 2010; HUSSEIN et al., 2016; MA et al., 2016).

Uma característica intrínseca das antocianinas é fato de apresentarem mudanças estruturais em soluções aquosas ácidas (pH entre 1 e 2). Apresentam nessa faixa de pH coloração intensa avermelhada em virtude da predominância da forma cátion flavilium (AH^+). Já para um meio com pH 4 é observado um equilíbrio entre o cátion flavilium e uma estrutura conhecida como carbinol pseudobase (Figura 8) (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

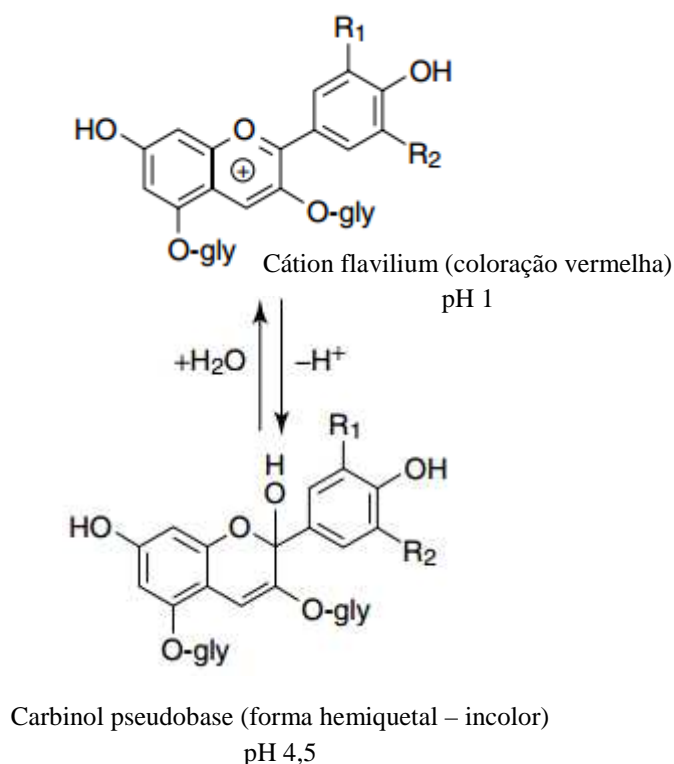


Figura 8: Mudança estrutural da antocianina em meio aquoso, em função do pH 1 a 4,5.

Fonte: Adaptado de Giusti e Wrolastad (2001).

As diferenças estruturais apresentadas pelas antocianinas, em meio aquoso ácido, influenciam gradamente nas propriedades químicas, estabilidade, equilíbrio em solução, na tonalidade (cor e saturação), nos efeitos de copigmentos e em suas propriedades antioxidantes (AZEVEDO et al., 2010; ROSSO; MERCADANTE, 2007). A ação antioxidante das antocianinas se deve à deficiência de elétrons do núcleo flavilium e à presença de hidroxilas livres, no grau de metilação destes grupos, bem como de outras estruturas químicas ligadas comumente às moléculas de açúcar, como os ácidos fenólicos (SOOBRAATTEE et al., 2005; WADA et al., 2007; SUN et al., 2012).

3.3 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

É conflitante que o oxigênio e nitrogênio, moléculas avaliadas como essenciais para os processos biológicos, sejam também consideradas como cofator para processos tóxicos e degenerativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KAUR; KAPOOR, 2001; BURTON et al., 2015). Esse mecanismo contraditório implica em processos prejudiciais aos sistemas biológicos (GIESE et al., 2015).

A formação de espécies reativas é um processo fisiológico e contínuo que ocorre no citoplasma, em membranas celulares e nas mitocôndrias (principais geradoras de radicais livres). Conseqüentemente, o sistema humano está sob contínuo processo oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), moléculas ativas que incluem os radicais livres, como o ânion superóxido, radicais hidroxilas e peróxila, bem como espécies não-radicalares, como peróxido de hidrogênio, peroxinitrato e oxigênio siglete, envolvidas em diversas funções biológicas da célula (HALLIWELL, 2001; CHEN et al., 2012).

Fatores exógenos que levam à formação acentuada das agentes reativos, tais como o fumo, a poluição do ar, o cigarro e os agentes praguicidas, contribuem para a formação excessiva de radicais livres. São instáveis e energizadas e apresentam como característica comum elétrons desemparelhados (McCORD, 2000; KAUR; KAPOOR, 2001), induzem a oxidação e causam sérios danos celulares envolvidas em várias disfunções biológicas (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Os radicais livres reagem com outros compostos na tentativa de capturar os elétrons necessários para adquirir estabilidade. Na maioria das vezes, eles atacam as moléculas estáveis mais próximas para “subtrair” sua carga de elétrons. Quando a molécula atacada perde o seu elétron, ela se torna um novo radical livre, dando início a uma reação em cadeia. Uma vez que o processo é iniciado, a reação pode ocorrer em cascata, que resulta na desestabilização e desintegração das membranas celulares, ou na oxidação de outros componentes celulares, tais como as proteínas e o DNA, resultando finalmente na ruptura das células (HALLIWELL et al., 1995; KAUR; KAPOOR, 2001). Em decorrência disso, os danos às membranas celulares e ao DNA podem provocar mutações cancerosas e inicializar a peroxidação lipídica, associada, muitas vezes, ao aparecimento das disfunções biológicas (infecções) (REYNERTSON et al., 2008).

Os antioxidantes atuam na neutralização das espécies reativas doando um de seus elétrons, para evitar a formação de novas espécies reativas, pois são estáveis nas duas formas

(KAUR; KAPOOR, 2001). Desse modo, eles também atuam evitando ou retardando a oxidação de lipídios e proteínas de constituição do DNA (ADIL et al., 2007).

Os processos envolvidos no processo antioxidante incluem: eliminação de radicais livres, hidrólise enzimática de ligações éster, sequestro de íons metálicos de transição e redução de peróxidos catalisados por enzimas. Os três últimos processos não cessam a ação das espécies reativas, porém previnem a formação de moléculas capazes de promover reação em cascata de radicais livres (THOMAS, 2000).

Para prevenir ou retardar o estresse oxidativo induzido por espécies reativas, quantidades suficientes de antioxidantes devem estar presentes em uma dieta rica em frutas e hortaliças (LIU, 2003). Muitos nutrientes presentes em frutas, tais como fibras, ácido fólico, potássio e vitaminas antioxidantes têm sido associados com a redução do risco de doenças crônicas degenerativas e outros fatores de risco. Por esse motivo, acredita-se que um maior consumo desses alimentos atue na proteção do organismo humano (HU, 2003). Os efeitos de proteção de frutas e hortaliças estão associados não apenas com a presença de antioxidantes como as vitaminas, mas também outras substâncias bioativas, tais como os carotenoides, as antocianinas e principalmente os compostos fenólicos (BARRETO; BENASSI; MERCADANTE, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010).

3.3.1 Métodos *in vitro* de determinação da capacidade antioxidante

Evidências do papel dos alimentos, em especial os vegetais, na prevenção de certas doenças, conduziram ao desenvolvimento de um grande número de métodos para determinação da capacidade antioxidante *in vitro* de uma grande variedade de compostos, tanto na sua forma pura como em misturas complexas (SÂNCHEZ-MORENO, 1998; ZULUETA et al., 2009).

Alguns dos métodos mais utilizados são o “Trolox equivalente antioxidant capacity” (TEAC), “total peroxy radical-trapping antioxidant parameter” (FRAP), “2,2-difenil-1-picril-hidrazil” (DPPH) e “Oxygen radical absorbance capacity” (ORAC) (HUANG et al., 2005); no entanto, ainda não existe nenhum método oficial padronizado. Por isso, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio isolado para determinação da capacidade antioxidante irá refletir com exatidão a “capacidade antioxidante total” dos extratos analisados avaliados de acordo com o mecanismo.

Os métodos colorimétricos que utilizam radicais não-biológicos como o “2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico” (ABTS^{•+}) e o “2,2-difenil-1-picril-hidrazil” (DPPH^{•+}) são os mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais. Estes métodos, por

sua vez, se baseiam na transferência de elétrons (ZOLUETA et al., 2009; MUSA et al., 2016). Outros métodos baseiam-se na reação de transferência de hidrogênio e incluem o “*total peroxy radical-trapping antioxidant parameter*” (TRAP) e o “*oxygen radical absorbance capacity*” (ORAC) (HUANG et al., 2005).

3.3.1.1 Método TEAC

O método “*Trolox equivalent antioxidant capacity*” TEAC ou ABTS, originalmente desenvolvido e otimizado por Rice-Evans e Miller (1994), baseia-se na habilidade dos compostos antioxidantes em sequestrarem o cátion $ABTS^{•+}$. Este radical é formado pela reação do ABTS com o persulfato de potássio, de coloração azul esverdeado, com medidas secundárias de leitura de absorvância no UV-vis, a 645 nm, 734 nm e 815 nm (RICE-EVANS; MILLER, 1994; RE et al., 1999).

Na presença de um composto antioxidante, o radical $ABTS^{•+}$ volta à sua forma estável original ABTS, que é incolor (Figura 9). A descoloração do meio de reação indica a decomposição das espécies reativas em solução, em razão da ação antioxidante dos compostos bioativos presentes no extrato (HUANG et al., 2005). Esta decomposição produz uma diminuição da absorvância, no comprimento de onda característico, o que corresponde quantitativamente à concentração de antioxidantes presentes no extrato (DURMAZ, 2012). Essa reação é amplamente utilizada para testar a habilidade de compostos em sequestrar radicais livres e, assim, avaliar a capacidade antioxidante de compostos de natureza tanto, hidrofílica quanto lipofílica, em extratos vegetais (RE et al., 1999; TAFULO et al., 2010).

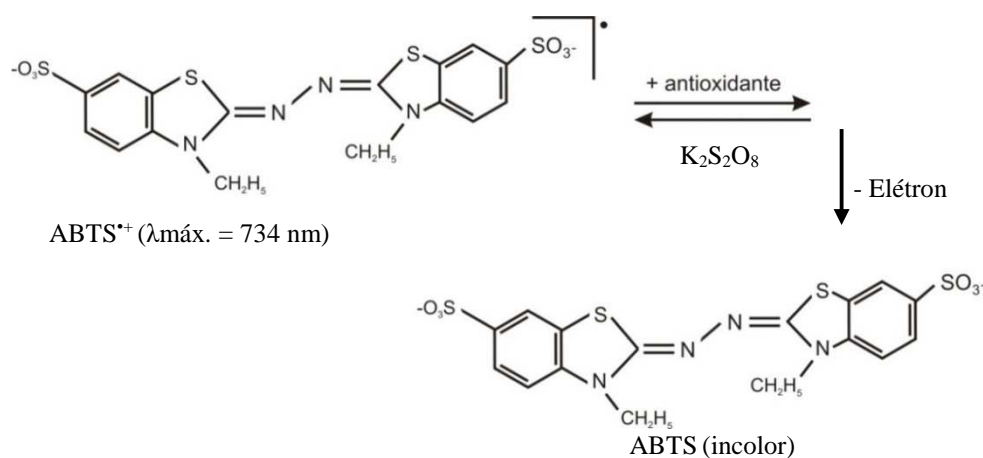


Figura 9: Estabilização do radical $ABTS^{•+}$ por adição de um composto antioxidante.

Fonte: Adaptado por Litescu et al. (2014).

3.4.1.2 Método DPPH

Entre os métodos químicos usados para determinar a capacidade antioxidante de extratos vegetais, o ensaio *in vitro* que utiliza o radical DPPH• é um dos mais utilizados, por se tratar de um método prático e estável (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O teste consiste na redução do radical não-biológico DPPH• pela ação antioxidante dos compostos presentes no extrato vegetal, por meio da doação de um elétron ao radical (*SET- Single Eletron Transfer*), estabilizando-o e alterando a cor do meio de reação (de violeta escuro para amarelo claro) (Figura 10).

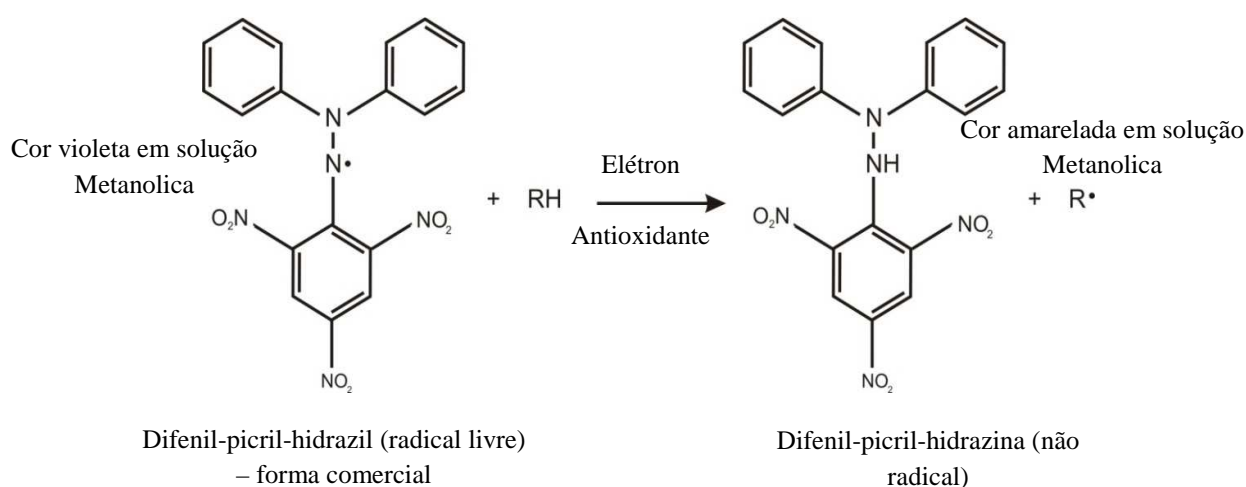


Figura 10: Estrutura da reação do radical DPPH• livre, com um antioxidante, onde a molécula doadora produz um radical estável A•.

Fonte: Musa; Abdullah; Al-haiqi (2016), com adaptações.

Na presença de um doador de elétron, a intensidade de absorção do radical DPPH• diminui e a solução perde coloração, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons transferidos ao radical DPPH. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação antioxidante, sendo o método DPPH uma ferramenta importante ao ensaio de capacidade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; ANTOLOVICH et al., 2002).

3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Apesar das técnicas colorimétricas serem importantes ferramentas na quantificação *in vitro* de constituintes biologicamente ativos (compostos fenólicos), é importante realizar a aplicação de técnicas cromatográficas com a intenção de separar, identificar e obter a descrição do perfil dos compostos individuais em matrizes alimentícias (LEE et al., 2000; BRAVO et al., 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*) é uma das técnicas mais empregadas para separação, identificação e quantificação de compostos fenólicos (KALILI; VILLIERS, 2011). O emprego do HPLC para análise de compostos fenólicos ainda é um desafio, em função do amplo número de substâncias com grande diversidade química e estrutural (TSAO; YANG, 2003). No entanto, com o avanço da tecnologia analítica, as análises de identificação de compostos bioativos evoluíram grandemente no ramo da cromatografia. Nesse contexto, o emprego do HPLC acoplado ao detector DAD (arranjo de diodo) é uma técnica das mais empregadas na identificação de compostos fenólicos, por realizar varredura em uma ampla faixa de comprimento de onda, compatível com a grande multiplicidade de substâncias fenólicas (MEZADRI et al., 2008).

O HPLC acoplado ao DAD é uma ferramenta útil para auxiliar na caracterização de compostos bioativos em matrizes alimentícias desconhecidas. Na literatura científica, grande parte dos autores aplica a caracterização por HPLC-DAD empregando uma coluna C₁₈, para a análise de compostos fenólicos. Este fato pode ser observado por se tratar de uma coluna facilmente utilizável para a separação de vários compostos e que suporta ampla variação de pH (entre 1 a 12), facilitando a utilização de vários solventes como fase móvel (ESCARPA et al., 2000).

Para a detecção de compostos fenólicos e seus derivados, o emprego de diferentes solventes como fase móvel são empregadas muitas vezes em um mesmo método de corrida cromatográfica. A concentração das fases móveis varia com o tempo, utilizando a eluição por gradiente. Os solventes de eluição, que podem ser o metanol, água, ácido fórmico e acetonitrila atuam aumentando ou diminuindo a polaridade do meio, através da interação com a fase estacionária. A eluição dos compostos fenólicos baseia-se na polaridade dos mesmos; sendo assim, compostos de menor polaridade, possuem tempo de retenção maior do que os de maior polaridade (CHEN; KORD, 2009; HAMINIUK et al., 2012).

Diversos procedimentos já foram otimizados para identificar e quantificar compostos fenólicos em alimentos, incluindo a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia

gasosa (CG), a eletroforese capilar (EC) e a eletrocromatografia capilar (CEC). Estas técnicas são de extrema importância na separação, identificação e quantificação dos polifenóis. Porém, os que envolve maior especificidade em seus resultados é o HPLC, que possibilita quantificação dos compostos presentes em extratos alimentícios de acordo com a sua estrutura química, peso molecular e polaridade, bem como determinar a concentração. Quanto à identificação dos compostos, é muito comum utilizar a detecção por espectrofotometria de absorção na região UV-Visível. O DAD é empregado para identificação de compostos fenólicos, em virtude da maior sensibilidade, além de permitir a leitura em ampla faixa, gerando maiores informações para misturas complexas. A identificação é realizada por comparação dos tempos de retenção e dos perfis de espectros de absorção obtidos de padrões externos isolados. A construção de curvas de calibração utilizando padrões adequados permite estimar as concentrações de compostos fenólicos (LEE, 2000; MOLNÁR-PERL: FUZFAI, 2005; HARNLY et al., 2007; HAMINIUK et al., 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

Frutos maduros de 32 acessos de *Oenocarpus distichus* Mart. foram coletados de plantas estabelecidas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de bacabeiras da Embrapa Amazônia Oriental, situado em Belém, PA, além de plantas ocorrendo naturalmente nos municípios de Marabá e São João do Araguaia, PA, em dezembro de 2015. Os frutos estudados receberam codificações em função da localidade da planta matriz, sendo treze de Belém (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12 e B3), oito de São João do Araguaia (SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-5, SJ-6, SJ-7 e SJ-8) e 11 acessos provenientes de Marabá (MB-1, MB-2, MB-3, MB-4, MB-5, MB-6, MB-7, MB-8, MB-9, MB-10 e MB-11).

Cerca de 2 kg de frutos inteiros, coletados de cada acesso de *Oenocarpus distichus* Mart., nos três municípios citados, foram transportados para o Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, onde foram selecionados, fazendo-se o descarte daqueles que apresentavam sinais de deterioração ou que sofreram algum tipo de dano físico. Após a seleção, os mesmos foram lavados em água corrente e em seguida realizado o amolecimento dos frutos (forma tradicional de obtenção da polpa artesanal) em água a 60° C por 15 minutos. O despulpamento mecânico foi realizado em máquina de aço inoxidável tipo “batedeira” (Figura11) (METVISA® DG.10, Belém, Brasil), previamente sanitizada (solução aquosa de hipoclorito de sódio a 200 mg/L). O despulpamento foi realizado na proporção de 2:1 (fruto:água, m/v), sendo as sementes descartadas.



Figura 11: (A) Frutos maduros de *Oenocarpus distichus* Mart (bacaba-de-leque); (B) Despulpadeira vertical; (C) Obtenção da polpa; (D) Polpa liofilizada.

Foto: Sérgio Henrique Brabo de Sousa (2015).

As polpas obtidas foram embaladas em sacos de polietileno (PEAD) e imediatamente congeladas à temperatura de -18°C em câmara fria. Após o congelamento, o material foi submetido à liofilização, utilizando liofilizador de bancada (Liotop, L101, São Paulo, Brasil). As amostras liofilizadas foram acondicionadas ao abrigo da luz e mantidas em temperatura de 10°C até o momento das análises. O fluxograma de processamento para a obtenção das polpas está apresentado na Figura 12.

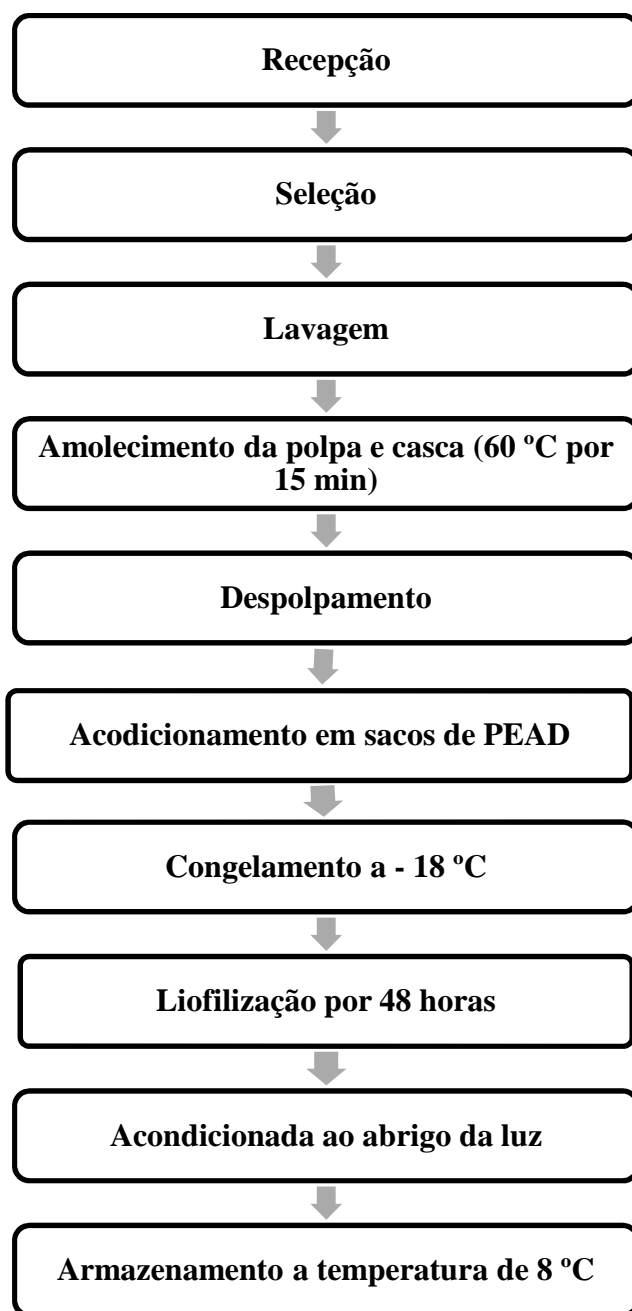


Figura 12: Fluxograma de processamento dos frutos de bacaba-de-leque para a obtenção da polpa.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos extratos

Para obtenção dos extratos, as amostras liofilizadas de cada acesso de *Oenocarpus distichus* foram submetidas à extração em triplicata, segundo o método proposto por Carvalho et al. (2016). As amostras foram pesadas (\cong 0,5g) em bécker, ao abrigo da luz, e solubilizadas em 15 mL de solução metanol/água (60:40, v/v). As misturas foram transferidas para tubos de centrífuga de fundo cônico (Falcon, 50 mL), em ambiente protegido da luz, e homogeneizadas em vortex (Fisiton, 77, São Paulo, Brasil) por 30 seg. Após esse procedimento, os tubos foram alocados em banho ultrasom (MaxiClean, 1450 Unique, São Paulo, Brasil) por 11 min. A seguir, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 min a 3000xg (Thermo Multifuge Scientific, Mod. X1R, EUA) por 15 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro de fibra de vidro GF-1, transferido para balão de evaporador rotativo (Tecnal, TE-211, São Paulo, Brasil) e concentrado. Após essa etapa, o extrato concentrado foi recolhido e o volume foi ajustado para 10 mL, com água destilada, e armazenado em frascos âmbar à temperatura de -18 °C, até o momento das análises.

4.2.2 Determinação de compostos fenólicos

4.2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método descrito por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005), que se fundamenta na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu. O método baseia-se na reação dos ácidos fosfomolibdênico ($H_3PMO_{12}O_{40}$) e fosfotungístico ($H_3PW_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, à óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (MO_8O_{23}), pelos compostos fenólicos presentes no extrato, em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul.

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, uma alíquota de 0,5 mL dos diferentes extratos, obtidos de acordo com o item 4.2.1, foi submetida à reação com 2,4 mL de Folin-Ciocalteu e, após 2 min de repouso em temperatura de 22 °C e ao abrigo da luz, foram adicionados ao meio de reação 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v). A mistura foi levada para banho-maria a 50 °C por 15 min e, em seguida, resfriada em

banho de gelo por 15 seg. Para o branco, a alíquota do extrato foi substituída por água destilada. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 300, San Jose, EUA) a 760 nm. Para a quantificação foi utilizado como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expressos em mg equivalente a ácido gálico por 100 g de material em base seca (b.s.) (mg AGE/100g).

4.2.2.2 Flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Meda et al. (2005), o qual se baseia no uso de cloreto de alumínio. O cloreto de alumínio (AlCl_3) forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol. Nessas condições, o complexo flavonoide- AlCl_3 absorve em comprimento de onda bem maior que o flavonoide sem o agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo aqueles que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimento de onda muito inferior, evitando dessa maneira interferentes nas medidas de absorvância (WOISKY; SALATINO, 1998).

Para a determinação de flavonoides totais, uma alíquota de 0,5 mL dos extratos obtidos no item 4.2.1 foi submetida à reação com 2mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (m/v). Após a incubação em tubos de ensaio a 22 °C, por 10 min, ao abrigo da luz, a absorvância da mistura foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 300, San Jose, EUA) a 415 nm. Para o branco, a quantidade de amostra foi substituída por água destilada. Para a quantificação foi utilizado como padrão a quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg/L, para a construção da curva analítica. A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides totais e os resultados foram expressos em mg equivalente a quercetina por 100g (b.s.) (mg QE/100g).

4.2.2.3 Flavanóis totais

Para a determinação de flavanóis totais foi empregada a metodologia proposta por Julkunen-Tiitto (1985). O método da vanilina-HCl é específico para flavan-3-óis, dihidrochalconas e proantocianidinas. Este baseia-se na formação do radical vanilina em meio ácido, que se liga a grupos funcionais do anel A do flavanol, formando um cromóforo vermelho capaz de absorver luz a 500 nm.

Para a quantificação dos teores de flavanóis totais, uma alíquota de 0,5 mL dos extratos obtidos no item 4.2.1 foi transferida para tubos de ensaio previamente revestidos com papel alumínio. Em seguida foram adicionados 3,0 mL de solução metanólica de vanilina a 4% (m/v) e a mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vortex (Fisiton, 771, São Paulo, Brasil). Após a homogeneização foi adicionado 1,5 mL de HCl (12 mols/L). Após esse procedimento, os tubos de ensaio foram mantidos em repouso por 20 min a temperatura de 22 °C. Transcorrido este tempo de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 500 nm. Para a obtenção da curva analítica foi utilizada uma solução estoque de catequina (C₁₅H₁₄O₆), nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L. Os resultados foram calculados e expressos em mg equivalente a catequina por 100g (b.s.) (mg CE/100g).

4.2.2.4 Antocianinas monoméricas totais

A quantificação de antocianinas monoméricas foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do pH diferencial, que utiliza solução tampão a pH 1,0 e 4,5, conforme descrito por Giusti e Wrolstad (2001). As amostras liofilizadas de cada acesso de *Oenocarpus distichus* Mart foram pesadas e transferidas para dois tubos de ensaio e solubilizadas com 10 mL de solução tampão a pH 1,0 (HCl/KCl) para o primeiro tubo e 10 mL de tampão a pH 4,5 (HCL/CH₃COONa) para o segundo tubo. As misturas foram homogeneizadas em agitador tipo vortex (Fisaton, 771, São Paulo, Brasil) e filtradas em papel filtro de fibra de vidro (MN85/220BF). As leituras das absorbâncias das soluções foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 300, San Jose, EUA), em comprimento de onda de 510 e 700 nm, sempre utilizando água destilada como branco. Os cálculos foram realizados de acordo com as Equações 1 e 2. Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-rutinosídeo equivalente por 100 g (b.s.) (mg Cianidina-3-rutinosídeo/100g).

$$\text{Abs} = [(\text{Abs}_{510\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (\text{Abs}_{510\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}] \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = \frac{(\text{Abs} \times 10^3 \times \text{PM} \times \text{FD})}{(\epsilon \times \text{L})} \quad \text{(Eq. 2)}$$

Onde: Abs é a absorbância calculada pela equação 1; PM é o peso molecular referente a cianidina-3-rutinosídeo (594 g/mol); FD é o fator de diluição dado pela razão entre o volume da diluição (em litros) e a massa de amostra (em gramas); ϵ é a absorvidade molar da cianidina-

3-rutinosídeo em solução tampão de pH 1,0 a 510 nm (28840 L/mol/cm) e L é o caminho óptico da cubeta (1cm).

4.2.3 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

4.2.3.1 Método TEAC

A capacidade antioxidante pelo método *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) foi determinada de acordo com o procedimento proposto por Rice-Evans e Miller (1994) no qual o radical ABTS^{•+} foi obtido a partir da reação da solução aquosa de ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-ácido sulfônico)) a 7 µM com uma solução de persulfato de potássio a 140 µM. A mistura foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente (\cong 22 °C), durante 16 h. Uma vez formado o radical ABTS^{•+} foi realizada a diluição em etanol (P.A.) até a obtenção de uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ para a solução, com leitura em comprimento de onda de 734 nm.

A partir do extrato obtido no item 4.2.1 preparou-se três diferentes concentrações do extrato. A partir de cada concentração foram pipetadas alíquotas de 30 µL de extrato para tubos de ensaio e adicionado 3,0 mL do radical ABTS^{•+}. Após 6 min de reação foi realizada a leitura da absorbância a 734 nm, em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 300, San Jose, EUA), utilizando etanol (P.A.) como branco. Como referência, foi elaborada uma curva analítica com trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), nas concentrações de 0,01 a 0,20 mg/mL e os resultados foram calculados e expressos em µM trolox/g (b.s.).

4.2.3.2 Método DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada de acordo com o procedimento proposto por Brand-Willian et al. (1995). No ensaio ocorre a captura do radical DPPH^{•+} pelos antioxidantes presentes na amostra, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Esse método foi primeiramente idealizado por Rice-Evans e Miller (1994), otimizado por Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998), que introduziram os parâmetros cinéticos: EC₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH^{•+}) e t_{EC50} (tempo que essa concentração necessita para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical).

A partir da solução inicial de DPPH a 60 μ M, com absorbância inicial em torno de 0,70 \pm 0,05, foram preparadas, em balões volumétricos de 10 mL, soluções com concentrações de 10 a 60 μ M, para a construção da curva analítica. As leituras para cada ponto da curva foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 300, San Jose, EUA) a 515 nm. Para as amostras, foi gerada uma cinética para determinar o tempo de estabilização da absorbância para os extratos de *Oenocarpus distichus* Mart. Nessa etapa foram preparadas, em tubos de ensaios, três concentrações de 10, 6 e 2 mg/mL do extrato obtido no item 4.2.1, adicionando-se, em seguida, 3,9 mL do radical (DPPH^{•+}). O decréscimo da absorbância foi monitorado a cada minuto, a 515 nm, até estabilização.

Determinado o tempo de estabilização, foram preparadas três diferentes concentrações do extrato obtido no item 4.2.1. Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição reagiu com 3,9 mL de solução metanólica do radical DPPH^{•+} a 60 μ M. Todas as determinações foram acompanhadas de um branco, substituindo o volume do extrato por igual volume (100 μ L) do solvente utilizado na extração. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH^{•+} (EC₅₀), pelos antioxidantes presentes no extrato, expressa em g fruta/g de DPPH (b.s.).

4.2.4 Determinação da composição fenólica por HPLC-DAD

A extração para identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método proposto por Carvalho et al. (2016). Posteriormente, os extratos foram recolhidos e diluídos em água ultrapura, para um volume de 10 mL. Para injeção no cromatógrafo, aproximadamente 1,5 mL do extrato obtido foi filtrado em filtro (Chromafil^R Xtra em celulose regenerada, com poro médio de 0,45 μ m) e armazenados ao abrigo da luz a -18°C, até o momento da análise.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Thermo Scientific, Finnigan Surveyor CA 95134, San Jose, EUA) acoplado a detector DAD-Plus (Diode Array Detector UV-Vis série 450176 SRVYR-PDA 5P), equipado com bomba quaternária (Surveyor LC Pump Plus, série 500201 SRVYR-LPMPP), injetor automático de amostra (Surveyor Autosampler Plus, série 300262 SRVYRS-ASP, San Jose, EUA) com volume de injeção de 20 μ L. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa (Phenomenex C₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 4 μ m de tamanho da partícula), mantida a 29° C, com fluxo de 0,9 mL/min. Empregou-se procedimento desenvolvido por Chisté e Mercadante (2012), onde a fase móvel utilizada foi água:ácido fórmico (99,5:0,05 v/v) (solvente A) e

acetonitrila:ácido fórmico (99,5:0,05 v/v) (solvente B), com gradiente linear de 99:1 (A:B) para 50:50 em 50 min; em seguida de 50:50 para 1:99 em 5 min. Esta última razão foi mantida por 5 min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 320 e 520 nm. A identificação dos compostos baseou-se nos espectros obtidos nos tempos de retenção, comparados com os padrões injetados diariamente, e co-eluição com os padrões externos (ácido 3,4 dihidroxibenzóico, ácido clorogênico, cianidina-3-*O*-rutinosídeo, ácido siríngico, rutina e ácido ferúlico), todos adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). As concentrações dos compostos fenólicos identificados foram calculadas a partir de curvas analíticas na ordem de concentração de 1,56 a 50 µg/mL.

4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média de três repetições independentes ($n=3$). Para verificar a existência de diferença significativa entre os acessos de bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart), as médias dos resultados foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa STATISTICA[®] versão 7.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, EUA). Adicionalmente foram realizadas análises de correlação de Pearson para avaliar a associação entre pares de variáveis, a 5% de probabilidade.

Para fins exploratórios, duas técnicas multivariadas foram aplicadas: a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA). Para o PCA, os parâmetros compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanois totais e antocianinas totais foram as variáveis ativas utilizadas na derivação dos componentes principais. As variáveis suplementares (resposta de duas metodologias de capacidade antioxidante: ABTS e DPPH) foram projetados sobre o espaço fatorial. Os valores de EC₅₀ obtidos por DPPH foram tratados de forma inversa (1/EC₅₀) na matriz de dados, a fim de facilitar a análise gráfica. O agrupamento por HCA foi realizado com base nas similaridades ou dissimilaridades entre os acessos com auxílio do Programa STATISTICA[®] versão 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Na Tabela 1 são apresentados os dados médios dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanóis totais, antocianinas monoméricas totais e a respectiva localidade de origem dos acessos de *O. distichus* avaliados no estudo.

Os resultados obtidos permitem constatar que os teores médios de compostos fenólicos totais, entre os acessos, apresentam diferenças significativas entre si, com valores variando de 81,86 a 363,01 mg AGE/100g (b.s.). A maior concentração fenólica foi observada para o acesso B7 (363,01 mg AGE/100 g) originário de Belém, a qual foi significativamente superior aos valores obtidos para os demais acessos avaliados. Destacaram-se, também, com relação ao teor de compostos fenólicos totais, os acessos B3 (267,63 mg AGE/100g) e B8 (319,98 mg AGE/100g), também oriundos do BAG em Belém, indicando tais acessos como potenciais para serem selecionados em programas de melhoramento genético, para obtenção de variedades com alto conteúdo em antioxidantes naturais. Além disso, a grande variação no teor de compostos fenólicos totais entre os acessos estudados sustenta a evidência de que a composição dos frutos de bacaba-de-leque é influenciada pelos fatores genéticos, bem como por condições de cultivo e condições edafoclimáticas que podem afetar a composição química dos frutos.

Os acessos de bacaba-de-leque estudados apresentaram valores de fenólicos totais próximos aos relatados na literatura para outras palmeiras nativas de consumo tradicional na Amazônia, tais como buriti (*Mauritia flexuosa*) (310 mg AGE/100g b.s.), inajá (*Attalea mapira* (Aubl) Mart) (109,75 mg AGE/100g b.s.) e tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) (127,27 mg AGE/100g b.s.) (SANTOS et al., 2015b). No entanto, os teores observados no presente estudo foram inferiores aos reportados para outras espécies da família Arecaceae, tais como bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart) (1622,41 mg AGE/100g b.s.) (SANTOS et al., 2015b), carnaúba (*Copernicia prunifera*) (830 mg AGE/100g b.s.) e açai (*Euterpea oleraceae*) (3268 mg AGE/100g b.s.) (RUFINO et al., 2010).

Em relação ao conteúdo de flavonoides totais, observou-se grande variação entre os acessos, com teores variando de 9,53 mg QE/100g a 38,19 mg QE/100g (b.s.) (Tabela 1). A maior média encontrada refere-se ao acesso SJ-4, oriundo de São João do Araguaia, o qual difere estatisticamente dos demais, à exceção dos acessos B7 (37,44 mg QE/100g), B9 (35,25 mg QE/100g), B6 (30,11 mg QE/100g), CB-2 (34,19 mg QE/100g), e SJ-1 (34,75 mg QE/100g)

Tabela 1 – Valores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanóis totais e antocianinas monoméricas referentes a frutos de 32 acessos de bacaba-de-leque, oriundos de três localidades no Estado do Pará ($n=3$).

Localidades	Acessos	Compostos Fenólicos totais (mg AGE/100g)	Flavonoides totais (mg QE/100g)	Flavanóis totais (mg CE/100g)	Antocianinas monoméricas totais (mg Cianidina-3-rutinosídeo/100g)
Belém	B1	90,90 ± 4,25 ^{lmn}	16,86 ± 1,60 ^{ijklmn}	82,55 ± 6,97 ^{ghijkl}	10,56 ± 0,58 ^{lmn}
	B2	167,38 ± 2,46 ^g	34,19 ± 2,84 ^{abcd}	162,64 ± 17,40 ^{cd}	11,40 ± 0,31 ^{klm}
	B3	267,63 ± 5,86 ^c	25,73 ± 3,06 ^{efg}	257,66 ± 18,81 ^a	67,76 ± 1,85 ^a
	B3	181,50 ± 22,70 ^{fg}	16,56 ± 2,22 ^{ijklmn}	178,48 ± 8,71 ^{bc}	12,97 ± 0,67 ^{jkl}
	B5	133,19 ± 2,18 ^{hi}	28,28 ± 1,97 ^{cde}	95,23 ± 5,44 ^{fghijkl}	5,80 ± 0,36 ^{pqr}
	B6	106,02 ± 1,58 ^{hijklmn}	30,11 ± 2,56 ^{abcde}	67,40 ± 9,03 ^l	10,23 ± 0,69 ^{lmno}
	B7	363,01 ± 24,40 ^a	37,44 ± 4,35 ^{ab}	194,55 ± 9,34 ^b	61,40 ± 1,36 ^b
	B8	319,98 ± 19,49 ^b	24,23 ± 2,67 ^{efghijk}	259,18 ± 10,58 ^a	38,54 ± 0,12 ^c
	B9	224,94 ± 2,46 ^d	35,25 ± 3,50 ^{abc}	208,99 ± 19,33 ^b	20,19 ± 1,27 ^{ef}
	B10	96,02 ± 4,85 ^{klmn}	17,91 ± 1,25 ^{ghijklm}	68,48 ± 5,53 ^{kl}	13,51 ± 0,50 ^{ijk}
	B11	118,67 ± 1,57 ^{hijkl}	26,60 ± 3,33 ^{def}	65,89 ± 6,95 ^l	36,58 ± 0,46 ^c
	B12	196,02 ± 53,90 ^{ef}	12,36 ± 1,07 ^{lmn}	153,88 ± 10,60 ^{cd}	25,38 ± 0,70 ^d
	B13	134,77 ± 3,72 ^h	28,97 ± 2,58 ^{cde}	112,65 ± 10,01 ^{efg}	18,05 ± 0,24 ^{fg}
São João do Araguaia	SJ-1	131,97 ± 4,60 ^{hij}	34,75 ± 3,51 ^{abcd}	105,02 ± 7,65 ^{fghi}	21,31 ± 1,27 ^e
	SJ-2	106,07 ± 1,20 ^{ijklmn}	14,81 ± 1,38 ^{lmn}	101,53 ± 2,90 ^{fghij}	14,65 ± 1,25 ^{hij}
	SJ-3	123,60 ± 0,98 ^{hijk}	25,07 ± 2,78 ^{efghi}	32,36 ± 2,82 ^m	7,46 ± 0,44 ^{opq}
	SJ-4	221,57 ± 14,37 ^{de}	38,19 ± 3,79 ^a	72,29 ± 9,31 ^{jkl}	25,58 ± 0,25 ^d
	SJ-5	117,64 ± 1,34 ^{hijklm}	19,52 ± 2,36 ^{fghijkl}	99,45 ± 8,21 ^{fghijk}	11,20 ± 0,53 ^{klmn}
	SJ-6	102,11 ± 9,14 ^{klmn}	15,92 ± 2,45 ^{klmn}	86,89 ± 5,53 ^{fghijkl}	13,51 ± 0,39 ^{ijk}
	SJ-7	81,86 ± 5,65 ⁿ	18,27 ± 1,95 ^{ghijklm}	78,50 ± 5,92 ^{hijkl}	16,13 ± 2,11 ^{ghi}
	SJ-8	104,58 ± 2,75 ^{ijklmn}	19,80 ± 2,26 ^{fghijkl}	100,08 ± 2,34 ^{fghij}	8,37 ± 0,35 ^{nop}
Marabá	MB-1	106,80 ± 2,33 ^{hijklmn}	25,18 ± 2,76 ^{efgh}	88,56 ± 2,85 ^{fghijkl}	17,16 ± 0,44 ^{gh}
	MB-2	96,67 ± 1,15 ^{klmn}	18,14 ± 2,54 ^{ghijklm}	76,70 ± 3,84 ^{ijkl}	6,27 ± 0,44 ^{pq}
	MB-3	115,80 ± 1,70 ^{hijklm}	24,58 ± 2,13 ^{efghij}	116,49 ± 12,34 ^{ef}	20,51 ± 1,28 ^{ef}
	MB-4	82,19 ± 0,11 ⁿ	16,67 ± 2,31 ^{ijklmn}	84,30 ± 7,71 ^{ghijkl}	12,04 ± 0,55 ^{ijklm}
	MB-5	195,06 ± 1,36 ^{efg}	29,25 ± 3,40 ^{bcde}	140,38 ± 11,23 ^{de}	5,00 ± 0,30 ^{qr}
	MB-6	102,30 ± 10,45 ^{klmn}	10,81 ± 1,41 ^{mn}	88,28 ± 4,85 ^{fghijkl}	3,05 ± 0,32 ^r
	MB-7	105,78 ± 6,48 ^{ijklmn}	14,30 ± 2,19 ^{lmn}	78,62 ± 2,01 ^{hijkl}	9,25 ± 0,86 ^{mno}
	MB-8	193,28 ± 5,82 ^{fg}	9,53 ± 1,65 ⁿ	109,23 ± 11,52 ^{efgh}	24,41 ± 1,23 ^d
	MB-9	89,78 ± 5,85 ^{mn}	14,05 ± 1,02 ^{lmn}	87,41 ± 4,70 ^{fghijkl}	18,24 ± 0,87 ^{fg}
	MB-10	107,96 ± 1,90 ^{hijklmn}	17,15 ± 2,41 ^{hijklmn}	99,39 ± 3,84 ^{fghijk}	7,48 ± 0,44 ^{opq}
MB-11	178,99 ± 4,50 ^{fg}	26,84 ± 2,31 ^{def}	68,74 ± 5,55 ^{kl}	4,70 ± 0,45 ^{qr}	

Dados representam a média ± desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

em que estes acessos não apresentam diferenças entre si ($p > 0,05$). Verificou-se ainda que os acessos com os maiores teores em compostos fenólicos totais, não necessariamente foram os que apresentaram as maiores concentrações em flavonoides totais. Isso se deve ao fato da análise para quantificação de flavonoides limitar outras classes de compostos, principalmente a dos ácidos fenólicos (WOISKY; SALATINO, 1998).

De acordo com a literatura, frutos de algumas palmeiras da família Arecaceae apresentam elevados teores em flavonoides totais, superiores aos observados para os frutos de bacaba-de-leque, no presente estudo, tais como tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) (120,02 mg QE/ 100g b.s.) (ARAGÃO, 2013), buriti (*Mauritia flexuosa* L.f) (246,84 a 567 mg QE/100 g b.s.) (KOOLEN et al., 2013), bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart) (62,02 mgQE/100 g b.s.) e pupunha (*Bactris gasipaes*) (48,57 mgQE/100 g b.s.) (SANTOS et al., 2015); por sua vez, para o inajá (*Attalea maripa* Mart) (34,14 mgQE/100 g b.s) foi observado valor similar aos maiores teores verificados no presente estudo.

Em relação aos teores médios de flavanóis totais (Tabela 1), também foram encontradas diferenças significativas entre vários acessos estudados, com variações entre 32,36 a 259,18 mg CE/100g (b.s). Os acessos B8 (259,18 mg CE/100g) e B3 (257,66 mg CE/100g) situados em Belém-PA, apresentaram as maiores médias, sendo estatisticamente iguais entre si, porém diferentes dos demais acessos avaliados. Para fins de comparação, não há estudos publicados que relatem as variações no conteúdo de flavanóis totais em frutos de bacaba-de-leque, porém, os maiores valores obtidos no presente estudo são próximos aos menores teores relatados por Oliveira (2014), para frutos de diferentes genótipos de camu-camu (*Myrciaria dubia*), os quais apresentaram concentrações de flavanóis totais variando de 261,98 mgCE/100g a 506,06 mgCE/100g (b.s.). Sabe-se que os flavanóis são importantes antioxidantes naturais relacionados com a adstringência das catequinas e outros flavanóis presentes nos frutos (PIETTA, 2000).

Para a análise de antocianinas monoméricas totais verificou-se que os acessos de bacaba-de-leque apresentaram alta variação entre as amostras estudadas, com teores variando de 3,05 a 67,76 mg Cia-3-rut/100 g (b.s.) (Tabela 1). Os acessos B3 (67,76 mg Cia-3-rut/100 g), B7 (61,40 mg Cia-3-rut/100 g), B8 (38,54 mg Cia-3-rut/100 g) e B11 (36,58 mg Cia-3-rut/100g), estabelecidos no BAG em Belém, destacaram-se com as maiores médias, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) entre si, à exceção de B8 e B11 que apresentam médias estatisticamente iguais. Segundo Taiz e Zeiger (2006), fatores extrínsecos como a incidência de luminosidade na área de cultivo influenciam na síntese e concentração de pigmentos fenólicos, implicando nas variações na rota biossintética e na concentração desses pigmentos. Além disso,

percebe-se que o teor de antocianinas é grandemente influenciado por fatores intrínsecos associados a cada material genético (DIAMANTI et al., 2012).

Apesar da grande variação na concentração em pigmentos antocianinas, os acessos de bacaba-de-leque apresentaram alguns resultados próximos aos reportados por Abadio-Finco et al. (2012) para os frutos de bacaba (*Oenocarpus. Bacaba* Mart), de 60,96 mg Cia-3-gli/100g (b.s.) e por Carvalho et al. (2016) para frutos de bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart), de 10,5 a 25,8 mg Cia-3-gli/100g. Por outro lado, Santos et al. (2015) em estudo sobre os frutos de palmeiras nativas da Amazônia, como fontes de compostos bioativos, observaram teor de 139,65 mg Cia-3-gli/100g (b.s.) para os frutos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart), valor este bem superior aos reportados para os frutos de bacaba-de-leque aqui estudados.

Mesmo apresentando boas características em compostos antioxidantes e próximas as já relatadas na literatura, para outras espécies da família Arecaceae, consideradas fontes importantes de antioxidantes naturais, a espécie *Oenocarpus distichus* Mart ainda tem sido pouco estudada, principalmente com relação à sua composição em compostos bioativos. Assim, acredita-se que a composição química determinada neste estudo poderá colaborar com novas perspectivas para a exploração dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, com relação ao desenvolvimento de variedades e cultivares ricas em compostos fenólicos

5.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A capacidade antioxidante dos frutos de *Oenocarpus distichus*, pelo método TEAC, evidenciaram que todos os acessos se mostraram eficientes em sequestrar o radical $ABTS^{\cdot+}$; todavia, essa ação foi diferenciada entre as amostras analisadas e apresentam variação entre 18,77 μM Trolox/g a 77,99 μM Trolox/g. Tal variação pode estar relacionada com os teores de compostos fenólicos encontrados para os diferentes acessos. Esta relação se justifica na premissa de que tais compostos apresentam estrutura ideal para desativação de radicais livres, tendo relação direta com a capacidade antioxidante de extratos vegetais (PIETTA, 2000; KARABIN, et al., 2015).

Entre os acessos avaliados, B7 e B3, estabelecidos no BAG em Belém, apresentaram elevados teores em compostos fenólicos totais, bem como as maiores capacidades antioxidantes pelo método $ABTS^{\cdot+}$ (77,99 μM Trolox/g e 63,94 μM Trolox/g, respectivamente), em relação aos outros acessos, indício consistente da possível correlação entre os compostos fenólicos e capacidade antioxidante para os frutos de bacaba-de-leque. Além dos dois acessos citados, B8 (58,79 μM Trolox/g), B13 (56,60 μM Trolox/g) e SJ-17.5 (56,27 μM Trolox/g) também apresentaram elevada capacidade antioxidante pelo método TEAC, não diferindo estatisticamente entre si. Em comparação a outras palmeiras da Amazônia, a capacidade antioxidante dos frutos de bacaba-de-leque, são próximas ao estudado por Cândido et al. (2015) para frutos de buriti (*Mauritia flexuosa*) (92,8 μM Trolox/g (b.s.)) e ao reportado por Abadio-Finco et al. (2012) para frutos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart) (57,9 μM Trolox/g (b.s.)), além de próximo ao mencionado por Rufino et al. (2010) para os frutos de açai (*Euterpe oleraceae* Mart), 64,5 μM Trolox/g (b.s.) e para frutos de carnaúba (*Copernia prunifera*), 16,4 μM Trolox/g (b.s.).

Tabela 2. Capacidade antioxidante de frutos de 32 acessos de bacaba-de-leque oriundos de três localidades no estado do Pará.

Localidades	Acessos de <i>Oenocarpus distichus</i> Mart	TEAC (μM Trolox/g)	DPPH EC ₅₀ (g fruta/ g de DPPH)
Belém	B1	18,77 \pm 1,83 ⁿ	5311,33 \pm 72,75 ^{fg}
	B2	48,18 \pm 1,01 ^{de}	2586,34 \pm 75,24 ⁿ
	B3	63,94 \pm 0,51 ^b	1680,70 \pm 0,09 ^p
	B4	25,28 \pm 0,06 ^{kl}	6216,64 \pm 13,20 ^b
	B5	32,41 \pm 1,13 ^j	6504,11 \pm 21,28 ^a
	B6	47,94 \pm 1,11 ^{de}	4173,00 \pm 1,83 ^k
	B7	77,99 \pm 1,35 ^a	1510,48 \pm 2,58 ^p
	B8	58,79 \pm 0,86 ^c	2305,75 \pm 19,74 ^o
	B9	45,94 \pm 0,55 ^{efg}	2320,62 \pm 7,74 ^o
	B10	23,06 \pm 1,09 ^{klm}	5832,86 \pm 4,55 ^c
	B11	42,55 \pm 1,16 ^{ghi}	4141,64 \pm 47,82 ^{kl}
	B12	21,89 \pm 1,27 ^{lmn}	5556,56 \pm 25,71 ^{de}
	B13	56,60 \pm 1,13 ^c	2618,06 \pm 16,11 ⁿ
São João do Araguaia	SJ-1	49,80 \pm 2,10 ^d	2852,24 \pm 20,04 ^m
	SJ-2	35,15 \pm 0,85 ^j	5187,67 \pm 259,66 ^{fg}
	SJ-3	25,75 \pm 2,21 ^k	6518,43 \pm 114,21 ^a
	SJ-4	56,27 \pm 0,54 ^c	2239,49 \pm 7,77 ^o
	SJ-5	40,10 \pm 0,92 ⁱ	2708,89 \pm 31,32 ^{mn}
	SJ-6	48,17 \pm 1,38 ^{de}	4113,56 \pm 13,06 ^{kl}
	SJ-7	24,33 \pm 1,14 ^{kl}	4922,89 \pm 95,32 ^{hi}
	SJ-8	40,92 \pm 0,06 ^{hi}	4453,90 \pm 9,17 ^j
Marabá	MB-1	47,10 \pm 0,22 ^{def}	3933,19 \pm 57,16 ^l
	MB-2	43,81 \pm 0,53 ^{fgh}	6140,27 \pm 11,08 ^b
	MB-3	19,73 \pm 0,16 ^{mn}	5367,67 \pm 10,15 ^{ef}
	MB-4	42,00 \pm 0,46 ^{hi}	6502,26 \pm 181,66 ^a
	MB-5	42,30 \pm 0,57 ^{hi}	2215,94 \pm 54,83 ^o
	MB-6	19,19 \pm 1,01 ⁿ	6679,33 \pm 25,40 ^a
	MB-7	25,63 \pm 0,59 ^k	4766,55 \pm 53,48 ⁱ
	MB-8	24,16 \pm 1,16 ^{kl}	6721,47 \pm 73,96 ^a
	MB-9	25,26 \pm 0,95 ^{kl}	5726,20 \pm 18,16 ^{cd}
	MB-10	23,96 \pm 0,26 ^{kl}	5103,40 \pm 23,39 ^{gh}
	MB-11	39,79 \pm 1,31 ⁱ	4528,47 \pm 23,66 ^j

Dados representam a média \pm desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

O ensaio DPPH⁺ é outro ensaio químico aplicado para a determinação da capacidade antioxidante primária (PRIOR et al., 2005). Este teste se baseia na medida da capacidade de redução do radical livre estável DPPH⁺. Os resultados expressos em EC₅₀ indicam a quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), os acessos de *Oenocarpus distichus* Mart se mostraram eficientes em sequestrar o radical DPPH⁺, com valores variando de 1510,48 g fruta/g de DPPH a 6721,47

00g fruta/g de DPPH (b.s.). Entre os acessos avaliados, B7 (1510,48 g fruta/g de DPPH) e B3 (1680,70 g fruta/g de DPPH) demonstraram os menores valores de EC_{50} , sendo suas médias estatisticamente iguais entre si e diferentes das demais. Portanto, são os acessos que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes de sequestro do radical DPPH, uma vez que os menores valores de EC_{50} indicam menores quantidades de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH⁺. Além desses dois, os acessos B8 (2305,75 g fruta/g de DPPH), B9 (2320,62 g fruta/g de DPPH), SJ-4 (2239,49 g fruta/g de DPPH) e MB-5 (2215,94 g fruta/g de DPPH) também apresentaram elevada capacidade antioxidante, sendo suas médias estatisticamente iguais entre si. O inverso foi observado para os acessos MB-6, MB-8, B5, SJ-3 e MB-4, evidenciando menor capacidade antioxidante quando comparados aos demais.

Rezaire et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante de frutos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e patauí (*Oenocarpus pataua* Mart) pelo método DPPH e obtiveram para os frutos de açaí 2447 g fruta/g de DPPH (b.s.) e para os frutos de patauí 2292 g fruta/g de DPPH (b.s.), valores estes próximos aos observados para os acessos de bacaba-de-leque que se destacaram quando à capacidade antioxidante pelo método DPPH. Abadio-Finco et al. (2012) afirmaram que os extratos de frutos de bacaba são ricos em compostos fenólicos, os quais são os responsáveis pela elevada capacidade antioxidante dos frutos.

De maneira geral, para ambos os métodos utilizados, a avaliação da capacidade antioxidante apresentou valores elevados para os acessos B7, B8 e B3, estabelecidos em Belém, além dos acessos SJ-1 e SJ-4, provenientes de São João do Araguaia, que se mostraram também com altas concentrações em compostos fenólicos. Na literatura, vários autores têm relacionado os compostos fenólicos com a capacidade antioxidante de frutas, a qual pode ser atribuída às propriedades de oxi-redução dos mais variados polifenóis, que desempenham papel importante na absorção e neutralização de radicais livres (RUFINO et al., 2010; BORGES et al., 2011; KARABIN et al., 2015). Os resultados apontam que estes acessos são promissores, com elevados teores em compostos fenólicos e capacidade antioxidante *in vitro* e um possível efeito protetor frente às espécies reativas (radicais livres), devendo ser melhor explorados no programa de melhoramento genético da espécie, para obtenção de variedades e cultivares com alto potencial antioxidante.

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre as médias dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanóis totais, antocianinas monoméricas totais e capacidade antioxidante, avaliadas pelo método TEAC e DPPH, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos diferentes acessos de *Oenocarpus distichus*.

Variável	Compostos fenólicos totais	Flavonoides totais	Flavanóis totais	Antocianinas monoméricas totais
TEAC	0,89*	0,88*	0,72*	0,54*
DPPH	-0,76*	-0,71*	-0,78*	-0,54*

* Significativo a $p \leq 0,05$.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os compostos fenólicos totais contribuíram para a capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de *O. distichus*, uma vez que apresentaram correlação linear significativa ($p \leq 0,05$), sendo a correlação positiva pelo método TEAC e negativa pelo método DPPH. Essa correlação negativa pelo método DPPH é esperada, visto que esta associação negativa denota a relação inversa dos valores de EC_{50} (quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH) com a capacidade antioxidante, ou seja, os menores valores de EC_{50} representam maior capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH.

Os flavonoides totais também contribuíram de forma significativa para a capacidade antioxidante e apresentaram correlação positiva pelo método TEAC (0,88) e negativa pelo método DPPH (-0,71), como esperado. Sabe-se que os flavonoides são excelentes antioxidantes, uma vez que, segundo Roesch et al. (2003), as substituições de grupos hidroxílicos nas estruturas livres contribuem para o potencial redox. Comportamento similar também foi observado para a correlação entre os flavanóis totais e as capacidades antioxidantes pelos dois métodos usados.

Igualmente, as antocianinas monoméricas também contribuíram com a capacidade antioxidante pelo método TEAC e DPPH; no entanto, a correlação foi considerada moderada (0,54 e -0,54), indicando que a capacidade antioxidante dos acessos de babaca-de-leque não

está completamente associada à ação isolada do grupo das antocianinas, mas possivelmente aos efeitos sinérgicos e antagônicos entre os diferentes grupos de compostos fenólicos e outros compostos. Segundo Hassimoto et al. (2005) a atividade antioxidante não ocorre pela contribuição de um ou outro composto isolado, mas devido ao sinergismo entre eles, fato que pode justificar a correlação significativa da capacidade antioxidante com as classes de compostos fenólicos analisadas neste trabalho.

5.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

De acordo com os resultados obtidos da quantificação de compostos fenólicos (Tabela 1) e capacidade antioxidante (Tabela 2), selecionou-se cinco acessos para a avaliação do perfil de fenólicos por cromatografia líquida. Foram selecionados os acessos B7, B8, B3, SJ-4 e SJ-1 para esse estudo. Os picos identificados estão numerados de 1 a 6 e correspondem aos compostos apresentados na Tabela 4.

A Figura 13 mostra o cromatograma para os cinco acessos de *O. distichus*, monitorado a 320 nm. Quatro ácidos fenólicos foram identificados: ácido 3,4-dihidroxi-benzóico, ácido clorogênico, ácido sirínico e ácido ferúlico, além da rutina e um derivado glicosilado de antocianina, a cianidina-3-*O*-rutinosídeo, monitorado a 520 nm (Tabela 4). De acordo com o tempo de retenção e co-eluição do padrão externo com os dados da literatura (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; PISTÓN et al., 2014; BOEING et al., 2017), a combinação das informações obtidas permitiram identificar para o **pico 1**, o ácido 3,4-dihidroxi-benzóico em todos os acessos de *O. distichus*. Variações entre 0,55 µg/g (SJ-1) a 1,65 µg/g (B7) (b.s.) foram encontradas entre os acessos selecionados, inferiores aos reportados por Carvalho et al. (2016) para frutos de *O. distichus* entre 2,66 a 7,61 µg/g (em material liofilizado); contudo, para o acesso B7, o teor foi próximo ao reportado para os frutos de açaí (1,77 µg/g (b.s.)) (PACHECO-PALENCIA et al., 2008).

Em relação ao **pico 2**, todos os acessos de *O. distichus* apresentaram ácido clorogênico com relevante concentração. Os dados espectrais de absorção no UV-visível revelaram, para o ácido clorogênico, absorção no λ_{max} a 326 nm, de acordo com o esperado para este ácido fenólico (PISTÓN et al., 2014). Para este derivado do ácido caféico é atribuída elevada capacidade de sequestro de radicais livres, com ação retardatória, em várias etapas da autoxidação (XIANG; NING, 2008; MARINOVA et al., 2009). As concentrações para este composto nos frutos de bacaba-de-leque apresentaram variações entre 0,71 µg/g (SJ-1) a 64,56

$\mu\text{g/g}$ (B7) (b.s.), com destaque para o acesso B7, que apresentou notória concentração, diferindo ($p>0,05$) dos demais acessos selecionados. Por outro lado, Bicudo et al. (2014) ao estudarem a composição fenólica de frutos de jussara observaram um teor médio de $13,3\mu\text{g/g}$ (b.s.) e Whojdylo et al. (2008) quantificaram em frutos de açaí valores variando de $0,2\mu\text{g/g}$ a $16,4\mu\text{g/g}$ (b.s.), próximo aos teores observados para os frutos de bacaba-de-leque analisados no presente estudo.

Tabela 4. Tempo de retenção, absorção máxima e os compostos fenólicos detectados nos acessos de *Oenocarpus distichus* Mart.

Pico	*t _R (min)	λ _{max} (nm)	Compostos fenólicos	Acessos de <i>Oenocarpus distichus</i>				
				B3	B7	B8	SJ-1	SJ-4
1	14.1	298	Ácido 3,4- dihidroxibenzóico	0,98 ± 0,09 ^c	1,65 ± 0,16 ^a	1,19 ± 0,12 ^b	0,55 ± 0,03 ^d	0,90 ± 0,08 ^c
2	16.6	326	Ácido clorogênico	28,29 ± 1,51 ^b	64,56 ± 2,75 ^a	5,44 ± 0,77 ^d	0,71 ± 0,03 ^e	16,18 ± 0,16 ^c
3	18.3	280, 516	Cianidina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	76,39 ± 1,63 ^c	196,51 ± 2,73 ^a	90,95 ± 2,22 ^b	48,47 ± 1,55 ^e	62,59 ± 1,24 ^d
4	21.6	275	Ácido siríngico	7,52 ± 0,92 ^{ab}	8,43 ± 0,22 ^a	7,22 ± 0,29 ^{ab}	7,13 ± 0,27 ^b	8,42 ± 0,10 ^a
5	23.9	268, 350	Rutina	27,89 ± 1,03 ^b	56,76 ± 2,13 ^a	13,98 ± 0,54 ^d	23,85 ± 2,54 ^{bc}	21,01 ± 0,50 ^c
6	27.5	323	Ácido ferúlico	2,92 ± 0,12 ^b	12,57 ± 0,93 ^a	1,45 ± 0,08 ^c	0,98 ± 0,17 ^c	1,18 ± 0,16 ^c
			Total (µg/g)	143,99	340,48	120,23	81,69	110,28

*Tempo de retenção em coluna C18 Synergi Hydro (4µm). Dados representam a média ± desvio padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

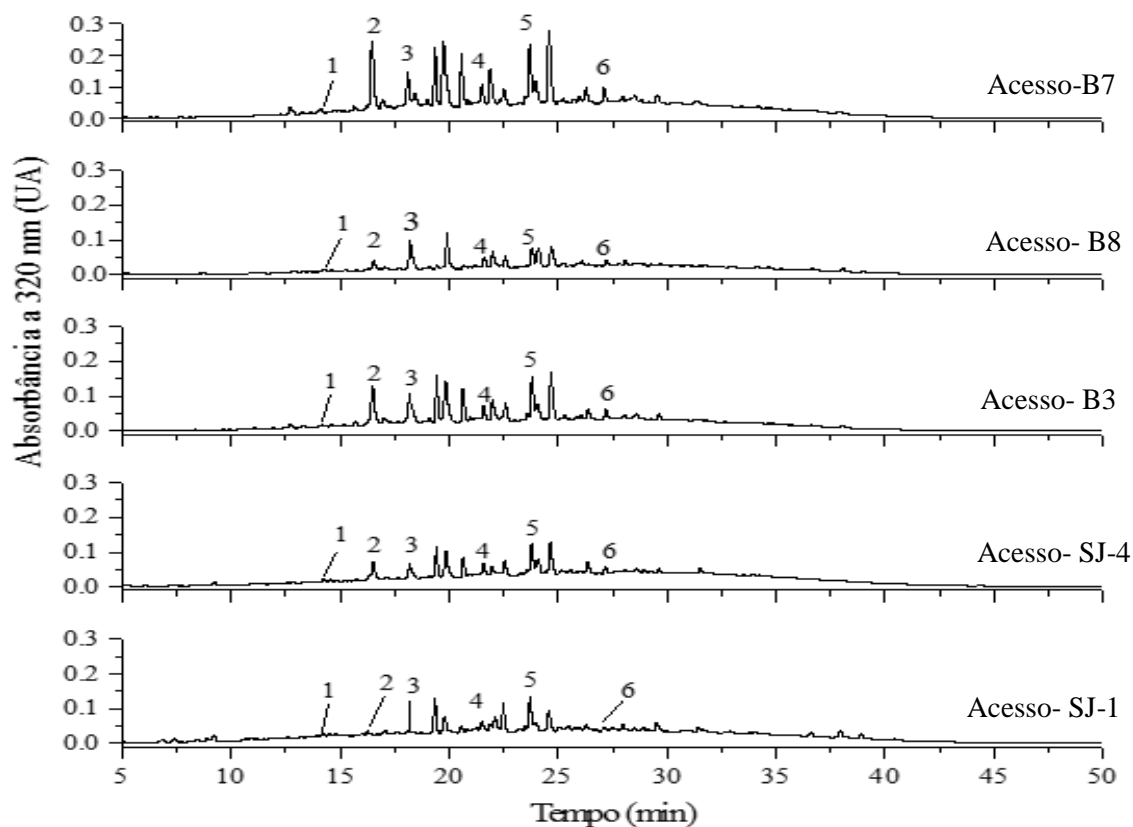


Figura 13: Cromatograma a 320 nm dos extratos de bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart). Pico 1; ácido 3,4-dihidroxibenzóico. Pico 2; ácido clorogênico. Pico 3; cianidina 3-*O*-rutinosídeo. Pico 4; ácido siríngico. Pico 5; rutina. Pico 6; ácido ferúlico.

A Figura 14 mostra o cromatograma completo em 520 nm, para os extratos de *Oenocarpus distichus*. Convém ressaltar que o tempo de retenção, parâmetro baseado na polaridade da molécula, é influenciado pelo grau de glicosilação e pela natureza dos açúcares presentes nas moléculas de antocianinas (BICUDO et al., 2014). Os dados espectrais UV-visível revelaram, para o **pico 3**, duas bandas de absorção em torno de λ_{max} 280 nm e 516 nm (Figura 15), o que indicou, por co-eluição com o padrão externo, a presença majoritária correspondente a cianidina-3-*O*-rutinosídeo, com variações médias para os acessos de bacaba-de-leque entre 48,47 $\mu\text{g/g}$ (SJ-1) a 196,51 $\mu\text{g/g}$ (B7) (b.s.). Essa antocianina também já foi detectada em frutos de açai (*Euterpe oleracea*) (GARZN et al., 2017), jussara (*Euterpe edulis*) (BICUDO et al., 2014), patauá (*Oenocarpus pataua*) (REZAIRE et al., 2014), bacaba (*Oenocarpus bacaba*) (ABADIO-FINCO, et al., 2012) e frutos do tipo bagas, tais como amora preta, framboesa e morango (WU et al., 2006). As variações observadas no presente estudo são consistentes com o fato de que as características ambientais sob as quais decorre o desenvolvimento e maturação dos frutos têm grande influência na síntese e concentração dos compostos responsáveis pela pigmentação dos frutos, mas a natureza e as concentrações

relativas dessas substâncias obedecem a um determinante genético relativo à própria planta (TAIZ & ZEIGER, 2006). Apesar das variações observadas, o interesse nos frutos de bacaba-de-leque é resultante da sua similaridade com os frutos do açaí (*Euterpe oleracea*), que já são bem conhecidos por conter elevados teores em compostos fenólicos, particularmente as antocianinas (GARZÓN et al., 2017).

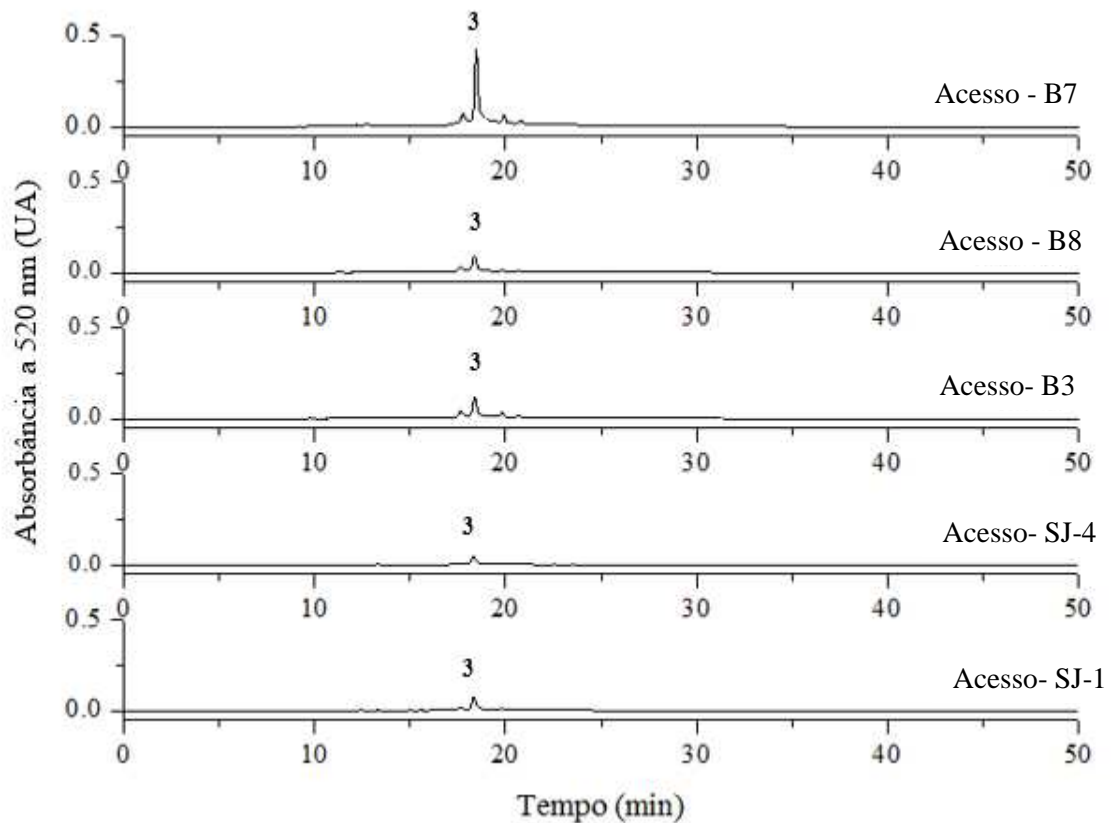


Figura 14: Perfil cromatográfico completo obtido por HPLC-DAD registrados a 520 nm para os extratos de *Oenocarpus distichus* Mart. Nota: espectro de absorção identificado para o **pico 3**, cianidina 3-*O*-rutinosídeo.

O perfil espectral referente ao **pico 4**, exibiu características de absorção detectada para o ácido sirínico, por ordem e tempo de co-eluição com padrão autêntico. O composto detectado apresentou banda máxima de absorção no UV-visível de 275 nm (Figura 15). Na Tabela 4, os resultados deste estudo mostraram que as concentrações de 7,13 μ g/g (SJ-1) a 8,43 μ g/g (B7) (b.s.) para os acessos de *O. distichus* não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) e são superiores às reportadas por Carvalho et al. (2016) (1,94 μ g/g a 3,53 μ g/g). Em contrapartida, um estudo da composição dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) foi reportado valor de 48 μ g/g (b.s.) (GARZÓN et al., 2017), e nos frutos de jussara (*Euterpe edulis*) (47 μ g/g 00(b.s.))

(BICUDO et al., 2014), superiores aos valores encontrados para os frutos de bacaba-de-leque no presente estudo.

Dentre os flavonoides, a rutina, **pico 5**, foi detectada por co-eluição com padrão externo. Os dados espectrais de absorção emitiram duas bandas de absorção, λ_{max} a 268 nm e 350 nm (Figura 15) característico a este flavonoide (BOING et al., 2017). Numerosos estudos têm revelado múltiplos benefícios no uso da rutina nos tratamentos de diversas doenças (MA et al., 2017). De acordo com os resultados, a concentração de rutina nos acessos de bacaba-de-leque avaliados variou de 13,98 $\mu\text{g/g}$ (B8) a 56,76 $\mu\text{g/g}$ (B7) (b.s.), retratando a grande variação na composição fenólica entre os acessos de *O. distichus*, com notória concentração para o acesso B7 que se destacou entre os demais. Um estudo anterior sobre a composição fenólica dos frutos de bacaba-de-leque demonstrou a presença majoritária da rutina como o flavonoide predominante neste fruto, com valores variando de 15,24 $\mu\text{g/g}$ a 56,84 $\mu\text{g/g}$ (CARVALHO et al., 2016); em contrapartida, em estudo com frutos de açai (*Euterpe oleracea*), observou-se teor de 34 $\mu\text{g/g}$ (b.s.) (GAZÓN et al., 2017).

Por fim, o **pico 6** foi identificado mediante o tempo de retenção e co-eluição do padrão externo e das amostras para o ácido ferúlico. Esse ácido fenólico apresentou banda de absorção com λ_{max} a 323 nm (Figura 15) característico a este ácido fenólico (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012). Além disso, o padrão e as amostras fortificadas com o padrão externo analisados nas mesmas condições cromatográficas, apresentaram características espectrais e tempo de retenção para o composto mencionado. Quanto à concentração do ácido ferúlico, os frutos de *O. distichus* apresentaram diferenças de 0,98 $\mu\text{g/g}$ a 12,57 $\mu\text{g/g}$ (b.s.), com notória concentração para o acesso B7, que apresentou a maior média (12,57 $\mu\text{g/g}$), superior ao valor reportado para o genótipo Black-05 de *O. distichus* (10,8 $\mu\text{g/g}$), relatado por Carvalho et al. (2016); no entanto, inferior ao já quantificado para os frutos de jussara (33 $\mu\text{g/g}$ (b.s.)) (INADA et al., 2015).

A soma dos ácidos fenólicos e dos flavonoides identificados, entre os acessos de bacaba-de-leque, permite dar destaque ao acesso B7, que exibiu a maior média 340,48 $\mu\text{g/g}$ (b.s.), entre os acessos escolhidos para o estudo, com evidente variação entres os demais acessos Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), existem vários fatores que podem interferir no conteúdo de metabólitos secundários nas plantas, dos quais os ácidos fenólicos, os flavonoides e os pigmentos fazem parte. Dentre estes estão a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e a disponibilidade de nutrientes. Llorach et al. (2008) também destacam que diferenças nas condições agrônômicas e ambientais pode afetar o conteúdo de fenólicos presentes nos vegetais, influenciando nas variações de composição.

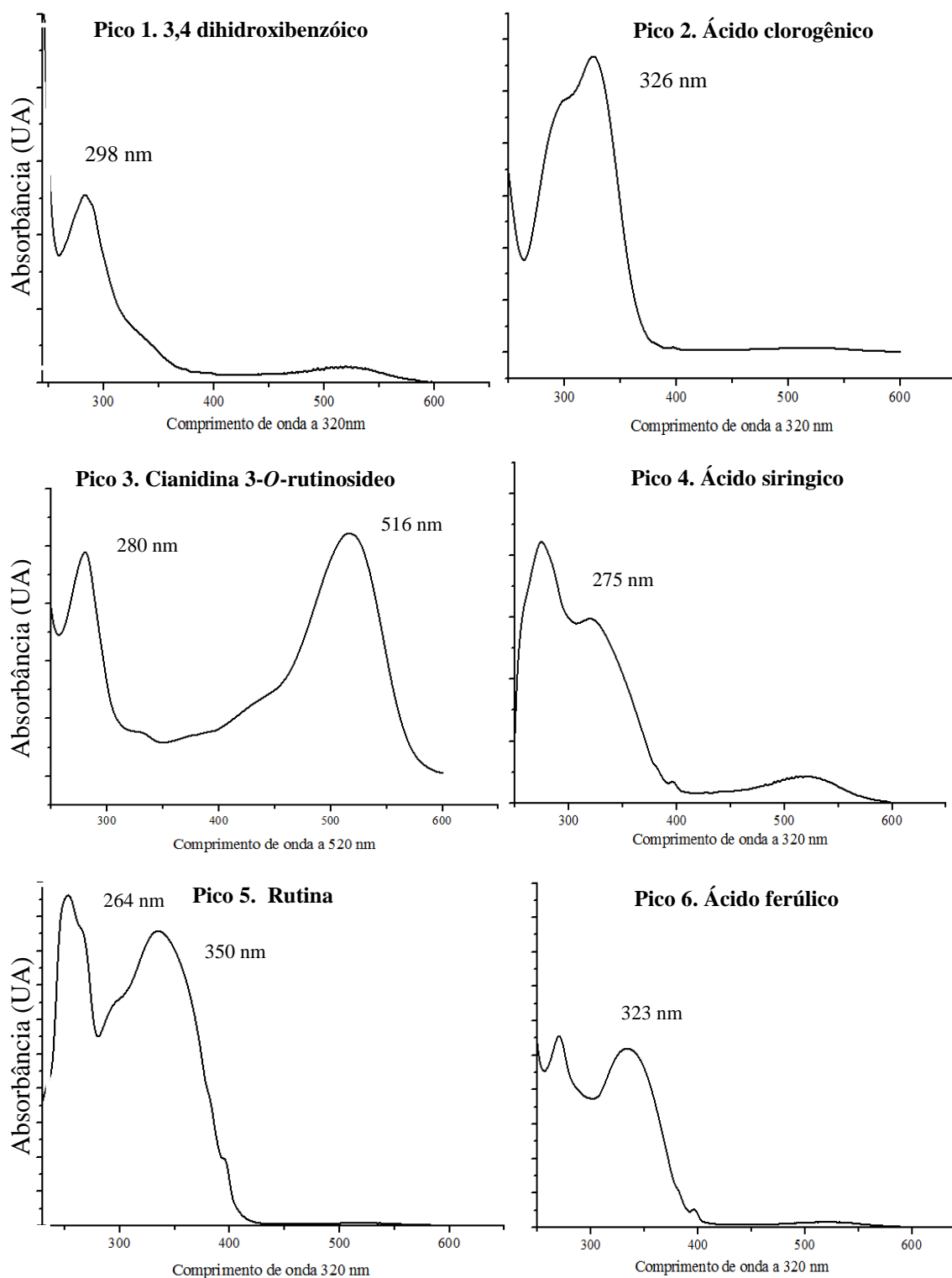


Figura 15: Espectros de absorção máxima dos compostos fenólicos identificados nos acessos de *Oenocarpus distichus* Mart.

5.5 CORRELAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS ACESSOS DE *Oenocarpus distichus* Mart POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada a fim de avaliar e classificar os dados dos teores fenólicos e capacidade antioxidante em acessos de *Oenocarpus distichus*, permitiu a condensação da maior parte das informações referentes aos dados originais. As duas componentes principais, PC1 e PC2, apresentaram porcentagem cumulativa de 86,9% da variância total explicada pelas duas componentes principais, sendo considerada alta o suficiente para representar todas as variações. A primeira componente principal (PC1) foi capaz de explicar 66,5% da variação e a segunda (PC2) explicou 20,4% da variação total (Figura 16 (a)).

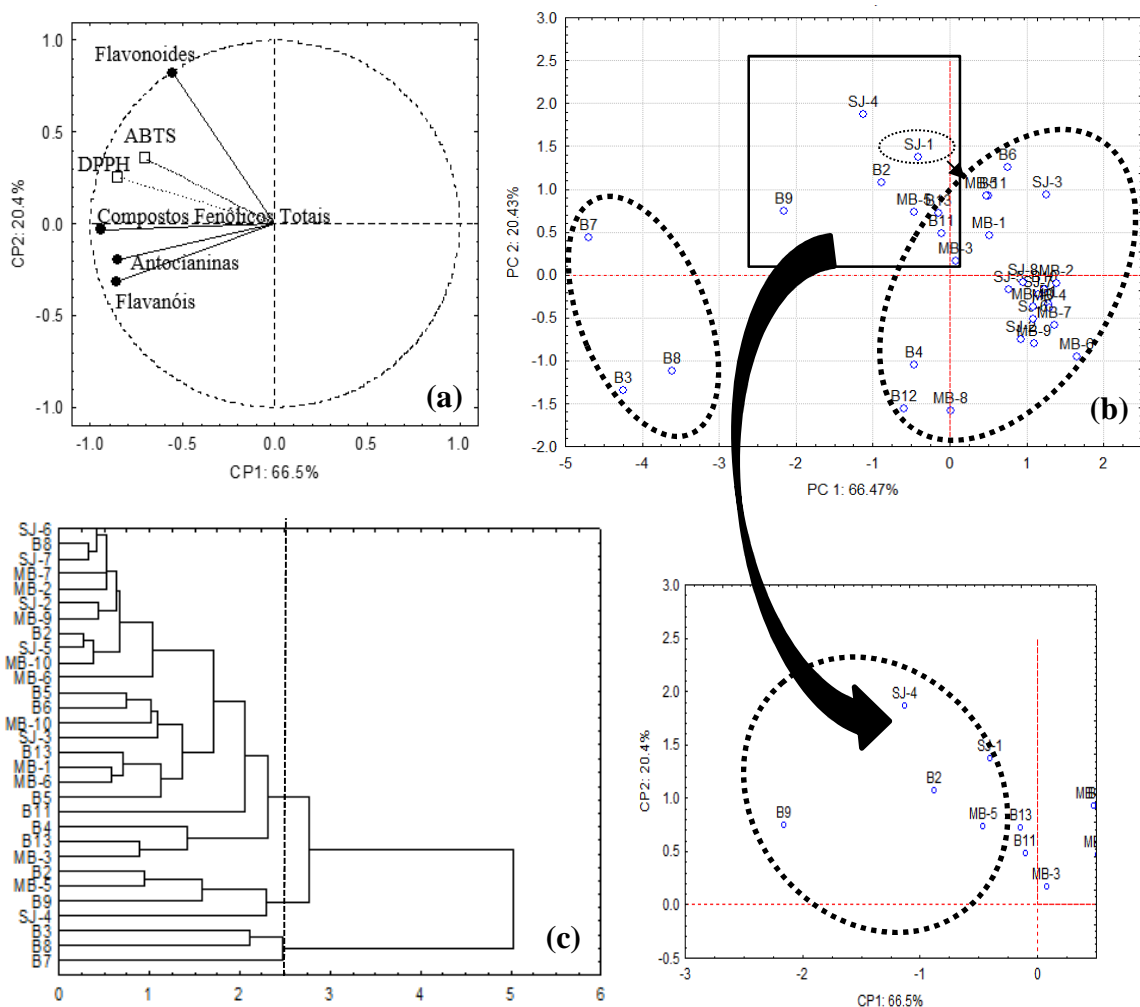


Figura 16: Classificação das variáveis respostas no plano formado pelas variáveis ativas e suplementares por análise estatística multivariada. (a) Projeção das variáveis pela análise de componentes principais (PCA); (b) Scatterplot para os diferentes acessos de *Oenocarpus distichus* Mart por PCA, com grupos sugeridos pelo HCA; (c) Dendrograma por HCA.

No gráfico de dispersão de escores dos acessos de bacaba-de-leque, para o primeiro e o segundo componente principal (PC1 e PC2) é possível notar que os acessos apresentaram uma tendência a formar grupamentos e alguns isolados. Pelos dados da Figura 16 (b), constata-se que a localização geográfica, ou seja, o município em que foi coletada a amostra, é um fator determinante nas características de composição dos frutos de bacaba-de-leque, visto que os acessos B3, B7 e B8, cultivados no município de Belém (Tabela 1), apresentaram tendência a se agrupar, por apresentarem similaridades de composição fitoquímica, e são os acessos que apresentaram os maiores teores fenólicos. Além disso, dos acessos citados anteriormente, B7 encontra-se mais afastado por apresentar a maior concentração fenólica entre os acessos avaliados, o que permite diferenciá-lo dos demais acessos estudados. Esse fato é relevante para que sejam estabelecidas estratégias de conservação genética que possibilitem sua utilização como objeto de estudo no melhoramento genético.

Os dados gráficos ainda permitem observar que os acessos que apresentaram teores intermediários em compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavanóis totais e antocianinas totais (B9, B2, SJ-4 e MB-5) exibem escores próximos uns dos outros (Figura 16 (b)), e se dispõem à formação de grupo o que pode ser observado, em parte, pelo dendrograma gerado (Figura 16 (c)). O acesso SJ-1, apesar de apresentar teor moderado para compostos fenólicos totais, destacou-se entre as maiores médias em flavonoides totais (Tabela 1), o que tende a essa aproximação de escores para os acessos que apresentaram valores intermediários. As informações gráficas ainda indicam que os acessos que apresentaram os maiores teores fenólicos, também se mostraram com maior capacidade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH e tenderam a se agrupar. De fato, correlações lineares e significativas entre os teores de compostos fenólicos totais e as capacidades antioxidantes pelos métodos ABTS⁺ e DPPH⁺ foram observadas pela correlação de Pearson ($r=0,89$ e $r=-0,76$, respectivamente) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram relatados na literatura para outras matrizes alimentícias que apresentaram correlação significativa entre compostos fenólicos e a capacidade antioxidante (RUFINO et al., 2010).

De acordo com a Figura 16 (b), é observada uma tendência à formação de um grupo de acessos de maioria coletados no município de Marabá. A disposição de isolamento apresentada por esses acessos que exibiram similaridade relativamente alta, indicam que seus teores fenólicos permitem diferenciá-los dos acessos cultivados em Belém e São João do Araguaia. Já os acessos provenientes de São João do Araguaia exibiram maiores diferenças entre si, expondo maior dispersão de resultados e a tendência a não se agruparem. A dispersão de escores referente ao maior grupamento formado, o qual se encontra relativamente mais afastado no

último quadrante, se caracteriza por apresentar os acessos de bacaba-de-leque com menores teores em compostos fenólicos totais, flavanoides totais, flavanóis totais e antocianinas totais, sendo distintos dos demais grupos formados. Para uma melhor seleção, estudos de caracterização e composição química dos frutos de bacaba-de-leque devem ser realizados com a intenção de selecionar os melhores acessos por localidade de cultivo.

6.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo acerca dos 32 acessos de bacaba-de-leque, nos permite concluir que:

A variabilidade genética e a localidade de cultivo influenciaram de forma significativa nas características de conteúdo e composição fenólica.

Os resultados desse estudo indicam que os frutos de bacaba-de-leque apresentam variações de composição em compostos fenólicos, principalmente flavonoides, com concentrações equivalentes às já mencionadas para outras frutas da família Arecaceae.

Destacaram-se, como promissores, com potencial para serem utilizados em programas de melhoramento genético, os acessos B3, B7 e B8, situados em Belém, além dos acessos SJ-4 e SJ-1 provenientes de São João do Araguaia, os quais apresentam elevados teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

Correlação entre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante foi observada para os frutos de bacaba-de-leque.

Por meio das análises de cromatografia líquida foi possível identificar como composto fenólico majoritário a rutina, sendo identificados e quantificados pela primeira vez a presença do ácido clorogênico e da cianidina 3-*O*-rutinosídeo, presentes na polpa liofilizada dos frutos de bacaba-de-leque. Esta informação é importante para a indústria alimentícia e farmacêutica, sabendo que os frutos de bacaba-de-leque são uma fonte ainda inexplorada de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIO-FINCO, F. D. B.; BOSER, S.; GRAEVE, L. Antiproliferative activity of bacaba (*Oenocarpus bacaba*) and Jenipapo (*Genipa americana*) phenolic extracts: a comparison of assays. **Nutrition & Food Science**, v. 43, n. 2, p. 98-106, 2013.
- ABADIO-FINCO, F. D. B.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; TSENG, W. H.; BOSER, S.; GRAEVE, L. Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds from Bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.) fruit by HPLC-DAD-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7665-7673, 2012.
- ADIL, I. H.; ETIN, H. I. C.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 1, p. 55-63, 2007.
- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, n. 1, p. 67-76, 2012.
- ANDERSON, A.B.; JARDIM, M.A.G. Cost and benefits of floodplain forest management by rural inhabitants in the Amazon Estuary: A case study of açai palm production. In: BROWDER, J.O. (Ed.) **Fragile lands of Latin America, strategies for sustainable development**. University of Tulane. p. 114-129. 1989.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- ARAGÃO, A. B. **Caracterização bioquímica e centesimal das espécies *Astrocaryum Vulgare* Mart. (tucumã) e *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (uxi) nativas da região Amazônica**. 2013. 97p. Dissertação (Dissertação de mestrado em biotecnologia). Instituto de Química – Campus de Araraquara. Universidade Estadual Paulista, 2013.
- AZEVEDO, J.; FERNANDES, I.; FARIA, A.; OLIVEIRA, J.; FERNANDEZ, A.; FREITAS, V. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. **Food Chemistry**, v. 119, p. 518-523, 2010.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BALICK, M. J. Amazonian oil palms of promise: A survey. **Economic Botany**, v. 33, p. 11-28. 1979.
- BHAT, R.; PALIYATH, G. Fruit of tropical climates: Biodiversity and dietary importance. **Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health**, v. 1, p. 138-143, 2016.
- BOING, J. S.; RIBEIRO, D.; CHISTÉ, R. C.; VISENTAINER, J. V.; COSTA, V. N.; FREITAS, M.; FERNANDES, E. Chemical characterization and protective effect of the *bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. **Food chemistry**, v. 220, p. 427-437, 2017.

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; FILHO, J. M.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, 563, p. 84 – 92, 2006.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1311-1323, 1983.

BRUM, H. D.; NASCIMENTO, H. E. M.; LAURENCE, N. F. L.; ANDRADE, A. C. S.; LUIZÃO, R. C. C. Rainforest fragmentation and the demography of the economically important palm *Oenocarpus bacaba* in central Amazonia. **Palm Ecology**. v. 199, p- 209-215. 2008.

BURTON, G. J.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R. F. H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 72, p. 125-130, 2015.

CAMARA, A. K.; LESNEFSKY, E. J.; STOWE, D. F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, p. 280-388. 2010.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa*) from the cerrado and amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 55, p. 313-319, 2015.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. de. T. Physical and chemical characterization of fruit pulps from Amazonia and their correlation to free radical scavengers activity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CARVALHO, A.V.; SILVEIRA, T. F; SOUSA. S. H. B; MORAES, M. R.; GODOY, H.T. Phenolic compounds and antioxidant activity of bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 54, p. 1-9, 2016.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 6º ed. Belém, PA; Museu Paraense Emilio Goeld: CNPQ, 2010. 279 p.

CHARANJIT, K.; NAGAL, S.; NISHAD, J.; KUMAR, R.; SARIKA. Evaluating eggplant (*Solanun melongena* L) genotypes for bioactive properties: A chemometric approach. **Food Research International**. v. 60, p. 205-211. 2014.

CHEN, S.; KORD, A. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performace liquid chromatography and high performace liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6204-6209, 2009.

CHISTÉ, R. C; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit Caryocar villosum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884-5892. 2012.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and role in the human diet. **Oxford: Blackwell Publishing Ltd**, v. 1, p. 1-24, 2006.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolic: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

D' ANDREA, G. Quercetin: A flavanol with multifaceted therapeutic applications. **Fitotepia**, v. 106, p. 256-271, 2015.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 347-352, 2007.

DESPHANDE, S. S.; CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin Analysis of dry beans. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 905-910, 1985.

DESPHANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K.; LUH, B. S. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in food Science and Nutrition**. v. 24, n. 4, p. 401-449. 1986.

DIAMANTI, J.; DENOYES, B.; PETIT, A.; CHARTIER, P.; FAEDI, W.; MALTONI, M. L.; BATTINO, M.; MEZZETTI, B. Standardized method for evaluation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) germplasm collections as a genetic resource for fruit nutritinal compounds. **Journal Food Composition Analysis**, v. 28, p. 170-178, 2012.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2004, 248p.

DURMAZ, G. Free-dried ABTS⁺ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidante capacity of vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1658-1663, 2012.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental: nutritional interaction. **Nutrition**, v. 17, p. 828-834, 2001.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. - Optimization strategy and validation of one chromatographic methods as approach to determine the phenolic compounds from different sources. **Journal of Chromatography A**, v 897, n (1), p. 161-170, 2000.

FINCO, F. D. B. A. **Health enhancing tradicional foods in Brasil: an inter disciplinary approach to food and nutritional security**. 2012. 204p. Thesis (Degree of doctor of philosophy in natural Science). Institut Fur Biologische Chemie und ,Ernahrungswissenschaft Lehrstuhl Biochemie der Ernährung. Faculty of Natural Sciences, University of Hohenheim. 2012.

FINCO, F. D. B.; SILVA, I. G. Antioxidant activity and native fruits from Brazilian savannah, free radicals, health and lifestyle. **Contributions from The Europe Meeting of The Society for Free Radical Research**. Rome. Italy. 2009.

FRAGA, C. G.; GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 435-445, 2010.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, Chicago. v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968.

GAO, M.; ZHAO, Z.; LU, P.; LI, Y.; ZHANG, M. Quantitative combination of natural antioxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. **Redox Biology**. v. 6, p. 2006-217, 2015.

GAO, X.; CASSIDY, A.; SCHWARZSCHILD, M. A.; RIMM, E. B.; ASCHERIO, A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology**. v. 78, p. 1138-1145, 2014.

GARDI, C.; STRINGA, B.; KUNCIROVA, V.; SLOVAK, L.; PONIST, S.; DRAFI, F.; BEZAKOVA, L.; TEDESCO, I.; ACQUAVIVA, A.; BILOTTO, S.; RUSSO, G. L. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150-157, 2015.

GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ-CUENCA, C-E. N.; VINCKEN, J-P.; GRUPPEN, H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p. 364-372, 2017.

GAWLIK-DZIKI, U. Changes in the antioxidant activity of vegetables as a consequence of interaction between active compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 872-882, 2012.

GHADEMZADEH, A.; GHADEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPEZ, N. P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GORDON, A.; CRUZ, A. P.; CABRAL, L. M. C.; DE FREITAS, S. C.; DIB TAXI, C. M. A.; DONANGELO, C. M. et al. Chemical characterisation and evaluation of antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p. 256-263, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine, 3th ed., New York: claredon press: Oxford University press. (**Oxford Science Publication**), p. 285-625, 1999.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALDA, R. M. Phenolic compounds in fruits- an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 2023-2044, 2012.

HANDERSON, A. The Palms of the Amazon. **Oxford University Press**, New York. 362 pp. 1995.

HARNLY, J. M.; BHAGWAT, S.; LIN, L. Z. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements, **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n (1), p. 47–61, 2007.

HASSIMOTO, N. M. A.; GENOVASE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of agricultural ad food chemistry**. v. 53, n. 8, p. 2928-2935. 2005.

HO, C.T.; RAFI, M. N.; GHAI, G. Substâncias bioativas nutracêuticas e tóxicas. Fennema, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 585-609, 2010.

HO, P.; HOGG, T.A.; SILVA, M.C.M. - Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in forfied wines. **Food Chemistry**, v 64, p 115-122, 1999.

HONG, S.; LIU, S. Targeted acylation for all the hydroxyls of (+) – catechin and evaluation of their individual contribution to radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 197, p. 415-421. 2016.

HOSBINO, A. A.; PALARIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, G. R. GIMENES, M. A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 146-150, 2002.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUSSEIN, M. A.; ALMAGRIBI, W.; AL-RASHIDI, M. N. Antiradical and reductant activity of anthocyanidins and anthocyanins, structure-activity relationships and synthesis. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1275-1282. 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods of characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidant in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Food**, v. 17, p. 422-433. 2015.

JACOPO, D. et al. Physico-chemical characteristics of thermally processed purée from different strawberry genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 106-118, 2015.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

KAHN, F. Species richness and density of palms in terra firm forest of Amazonian. **Biotropica**, v. 20. n.4, p.266-269. 1988.

KANG, J., LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; CHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoids compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.

KARABIN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELINEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 15, p. 734-750, 2015.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables. The millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 703-725, 2001.

KOOLLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L. Antioxidant antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.F) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473, 2013.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, p. 4290-4293. 2000.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. *Arecaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15713>).

LI, H. J.; DEINZER, M. L. Structural identification and distribution of proanthocyanidins in 13 different hops. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 54, n. 40, p. 86- 93, 2009.

LITESCU, S. C.; EREMIA, S. A. V.; TACHE, A.; VASILESCIU, I.; RADU, G-L. The use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (Orac) and Trolox Equivalente Antioxidant Capacity (TEAC) Assys in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties, Romania/. **Processing and Impacto n Antioxidant in Beverages**, v. 1, p. 245-251, 2014.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 175-205, 2003.

LLORACH, R.; MARTINEZ-SANCHEZ, A.; TOMAS-BARBERAM, F. A.; GIL, M. I.; FERREIRA, F. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008.

LORENZI, H. et al. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2010, 368p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. Palmeiras no Brasil: Nova e Exóticas. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 303. 1996.

MA, T.; HU, N.; DING, C.; ZHANG, Q.; LI, W.; SUO, Y.; WANG, H.; BAI, B. *In vitro* and *in vivo* biological activity of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. **Food Chemistry**, v. 194, p. 296-303. 2016.

MA, Y.; YANG, L.; MA, J.; LU, L.; WANG, X.; REN, J.; YANG, J. Rutin attenuates dexorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptoses, **Molecular Basis of Disease**, v. 1, p. 1-22, 2017.

MALTA, L. G.; TERRASO, E. P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. M.; LIU, R. H. Assessment of antioxidante and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417-425. 2013.

MARCIA, M. J.; ARMESILLA, P. J.; CÁMARA-LERET, R.; PANIAGUA-ZAMBRAMA, N.; VOLLALBA, S.; BALSLEV, H.; PARDO-DE-SANTAYNA, M. Palm uses in noryhucestern south America: A quantitative Review. **The Botanical Review**, v. 77, p. 562-570. 2011.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acid. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1498-1502, 2009.

MARTEL, F.; MONTEIRO, R.; CALHAU, C. Effect pf polyphenols on the intestinal and placental transporto f some bioactive compounds. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 1, p. 47-64, 2010.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MEZADRI, T.; VILLAÑO ,D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN,M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282– 290, 2008.

MIRANDA, I. P. A. et al. Frutas de Palmeiras da Amazônia. **Manaus: MCT/INPA**, 120p. 2001.

MOLNÁR-PERL, I.; FUZFAI, Z. Chromatografic, Capillary electrophoretic and Capillary electrochromatography techniques in the amalysis of flavonoids. **Journal Chomatography A**. v. 1073, p. 201-227. 2003.

MOSCOSO, V.; ALBERNAZ, A. L.; SALOMÃO, R. P. Niche modelling for twelve plant species (six timber species and six palm trees) in the Amazon region, using collection and field survey data. **Forest Ecology and Management**, nº. 310, p. 652-662. 2010.

MOUKETTE, B. M.; ANATOLE, P. C.; BIAPA, C. P. N.; NJMOU, J. R.; NGOGANG, J. Y. Free radical quenching potential, protective properties against oxidative mediated ion toxicity and HPLC phenolic profile of a cameroonian spice: piper guineenses. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 792-805, 2015.

MUSA, K. H.; ALBULLAH, A.; AL-HAIQI, A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2016.

NACTIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Underexploited Tropical Plants With Promising Economic Value. **Natiocional Academy of Sciences**, Washington, D. C. 1975.

NICHOLS, M.; ZHANG, J.; POLSTER, B. M.; ELUSTONDO, P. A.; THIRUMARAN, A.; PAVLOV, E. V.; ROBERTON, G. S. Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetina: Activation of convergente mitochondrial signaling pathways. **Neuroscience**. B, v. 38, p. 75-94, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M. GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n.2, p. 469-475, 2009.

OLIVEIRA, M. do. S. P. *Oenocarpus distichus* Martius. In: Coradin, L. (ed). Plantas para o futuro: região norte. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2012.

OLIVEIRA, M. do. S. P.; RIOS, S. de. A. Potencial econômico de algumas palmeiras nativas da amazônia. **Atuação das Ciências Agrárias nos sistemas de produção e nas alterações ambientais**. Belém:UFRA, v.1, p. 1-19, 2012.

OLIVEIRA, T. C. S. **Principais compostos bioativos e capacidade antioxidante na polpa do camu-camu (*Myrciaria dubia*) em diferentes estádios de maturação**. 2014. 111pág. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará. 2014.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S.T.; SAFE, S.; TALCOTT, S. M. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart) pulp and oil *in vitro*. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 56, p. 3593-3600. 2008.

PADAYACHEE, A.; NETZEL, G.; NETZEL, M.; DAY, L.; ZABARAS, D.; MIKKELSEN, D.; GIDLEY, M. J. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues-Part 1: Anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 155-161, 2012.

PASCUAL-TERESA, S.; MORENA, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; Flavanols and Anthocyanins in cardiovascular health: A Review of current evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1679-1703, 2010.

PEREIRA, S. A.; ALVES, H. P.; SOUSA, C. M.; COSTA, G. L. S. Exploration on the knowledge amazonian species-Inajá (*Maximiliana maripa* Aublt) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Geintec**, v. 3, n. 2, p. 110-122. 2013.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. 2 ed., ver. e atual./Celestino Pesce: Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, p. 47-66, 2009.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PISTÓN, M.; MACHADO, I.; BRANCO, S. J.; CESIO, V.; HEINZEN, H.; RIBEIRO, D.; FERNANDES, E.; CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. **Food Research International**, v. 64, p. 150-156, 2014.

PRANCE, G.T.; BALEE, W.; BOOM, M.B.; CARNEIRO, R.L. Quantitative Ethnobotany and Case for Conservation in Amazon. **Conservation Biology**, v.1, n. 4, p. 296-310. 1987.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

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, p. 1231-1237. 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods Enzymology**, v. 234, p. 279-293, 1994.

ROCHA, A. E. S. e SILVA, M. F. F. Aspectos fitossociológicos, florísticos e etnobotânicos das palmeiras (Arecaceae) de floresta secundária no município de Bragança, Pará, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.19, p.657-667, 2005.

ROESCH, D.; BERGMANN, M.; KNORR, D.; KROH, L. W. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4233-4239, 2003.

ROGEZ, H.; POMPEU, D. R.; AKWIE, S. N. T.; LARONDELLE, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 276-300, 2011.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; 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, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2072-2075, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANTOS, B. L.; OLIVEIRA, M. N.; COELHO, P. C.; PITANGA, B. P. S.; SILVA, A. B.; ADELITA, T.; SILVA, V. D. A. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 123-138. 2015a.

SANTOS, M. F. G.; MAMEDE, R. V. S.; RUFINO, M. do. S. M.; BRITO, E. S. B.; ALVES, R. E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidant**, v. 4, p. 591-602, 2015b.

SARIBURUM, E.; SAHIN, S.; DEMIR, C.; TURBEN, C.; UYLASER, V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberries. **Journal Food Science**, v. 74, n. 4, p. 328-335, 2010.

SAXENA, M.; SAXENA, J.; PRADHAN, A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 16, p. 130-134, 2012.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SCHROTH, G.; ELIAS, M. E. A.; UGUEN, K.; SEIXAS, R.; ZECH, W. Nutrient fluxes in rainfall, throughfall and stemflow in tree-based land use systems and spontaneous tree vegetation of central Amazonia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 87, p. 37-49, 2001.

SILVA, C. J.; SOUSA, K. N. S.; IKEDA-CASTRILLON, S. K.; LOPES, C. R. A. S.; NUNES, J. R. S.; CARNILLO, M. A.; MARIOTTI, P. R. et al. Biodiversity and its drivers and pressures of change in the wetlands of the upper-Paraguay-Guaporé ecotone Mato Grosso (Brasil). **Land Use Policy**, v. 47, p. 163, p. 163-178. 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SPRANGER, I.; SUN, B. S.; MATEUS, A. M.; FREITAS, V.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidina fraction from grape seeds. **Food Chemistry**, v. 108, p. 519-532, 2008.

SUN, L. Q.; DING, X. P.; YU, J.; HE, H. A.; JHANG, L. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum effect relationship and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in china. **Food Chemistry**, v. 132, p. 759-765, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 709p.

TAO, M. A.; NA, H.; DING, C.; ZHANG, Q.; LI, W.; SUO, Y.; WNAG, H. *In vitro* and *in vivo* biological activities of anthocyanins from *Nitraria tang* bobs frits. **Food Chemistry**, v. 16, n. 194, p. 296-303. 2016.

THOMAS, M. J. The Role of Free Radicals and Antioxidants. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 716-718, 2000.

THOMAS-BARBERAN, F. A.; ANDRES-LACUEVA, C. Polyphenols and health: Current state and progress. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 8773-8775, 2012.

TUDOR, V.; MANOLE, C. G.; TEODORESCU, R.; ASANICA, A.; BARBULESCU, L. D. Analysis of some phenolic compounds and free radical scavenging activity of strawberry fruits during storage period. **Agroculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 157-164, 2015.

UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. Genero Palmarom: A classification of palms based on the work of Harold. 1987.

VALOIS, A. C. C. **Recursos genéticos de palmeiras**. 1ª ed. Brasília-DF: Procitropicos, 2010, v. 1. 8 p.

VIDAL, S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 6, p. 564-573, 2003.

WALTON, M. F.; HASKINS, F. A.; GORZ, H. J. False positive results in the vanillin-HCL assay of tannins in sorghum forage. **Scrop Science**, v. 23, p. 197. 1983.

WANG, S.; MELNYK, J. P.; TSAO, R.; MARCONE, M. F. How natural dietary antioxidante in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. **Food Research Internatinal**, v. 44, n. 1, p. 14-22. 2011.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: same parameters and procedures for chemical quality control, **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105. 1998.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHART, S. E.; PRIOR, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4069-4075, 2006.

XIANG, X.; NING, Z. Scavenging and antioxidant properties of compounds derived from chlorogenic acid in South-china honeysuckle. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1189-1203, 2008.

ZAMBRANA, N. Y. P.; BYG, A.; SVENNING, J. C. Diversity of palm uses in the western Amazon. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 2771-2787, 2007.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FROGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidante capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.