

**LOYZ SOUSA ASSIS**

**DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE GUAVIRA (*Campomanesia sp.*) POR DIFERENTES  
METODOLOGIAS**

**DOURADOS – MS**

**2022**

**DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE GUAVIRA (*Campomanesia* sp.) POR DIFERENTES  
METODOLOGIAS**

**LOYZ SOUSA ASSIS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito necessário para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos à Faculdade de Engenharia – FAEN da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña.

Coorientadora: Profa. Ma. Márcia Crestani Bin

**DOURADOS - MS  
2022**

## **DEDICATÓRIA**

Eu dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã por toda dedicação, trabalho e suor para que pudessem me oferecer bons estudos, por terem me ensinado a importância dos estudos, por sempre terem me apoiado em minhas escolhas, me incentivado a sonhar e me encorajado a acreditar em mim mesma.

Esta vitória é nossa e não minha. Mãe e Pai, Laura missão cumprida, vencemos!

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, a Deus, pela vida e oportunidade, por ter me ajudar e guiar para que meus objetivos fossem alcançados, durante os meus anos de estudos.

Aos meus pais, Geraldo e Terezinha, por ter me acompanhado, apoiado, orientado. Espero deixar vocês orgulhosos, meus eternos agradecimentos por tudo que se esforçaram e esforçam por mim.

À minha irmã Laura, por ter me suportado em todos os momentos, sendo companheira, amiga e quase sempre a irmã mais velha em tudo. Sem você eu não teria chegado nem na metade.

Aos meus colegas da XI turma de Engenharia de alimentos da UFGD, vocês tornaram os momentos mais especiais durante essa jornada.

À todos os meus professores, cada um da sua maneira foi capaz de me guiar e compartilhar emoções, saberes e conhecimento durante a graduação. Que o nosso caminho se cruze mais vezes.

Aos meus companheiros de todas as atividades que participei durante a graduação: empresa júnior, SISTEA, monitorias, estágios extra curricular e obrigatório e Iniciações científicas, todos vocês me enriqueceram com experiências que levarei comigo para sempre.

À minha co-orientadora de iniciação científica e TCC Márcia, que foi capaz de suportar todos meus humores, toda minha curiosidade e loucura. Nossa caminhada juntas ainda não acabou.

Aos meus colegas de pesquisa do laboratório GEPPAC, foi surpreendente os momentos com cada um de vocês.

À minha orientadora, professora Eliana Janet, por todos os momentos de aprendizado, puxões de orelha, orientação e apoio durante a graduação e execução do trabalho de conclusão de curso.

Meus sinceros agradecimentos a todos, são especiais para mim.

## **Determinação de Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de Guavira (*Campomanesia* sp.) por diferentes metodologias**

**Resumo:** O Brasil devido à sua ampla biodiversidade destaca-se como potencial de produtos naturais. O bioma cerrado ocupa 23% do território nacional, apresenta riqueza de gêneros, onde inclui 14 das 36 espécies do gênero *Campomanesia*. A guavira, como é conhecida, é consumida *in natura*, sendo descartadas sua casca e semente. Esses resíduos são fontes de nutrientes e compostos bioativos, dos quais é possível extrair o óleo essencial (OE), com atividade biológica comprovada, devido à presença de terpenos, destacando-se a atividade antioxidante. Os antioxidantes presentes nos óleos essenciais são de importância para a indústria alimentícia para prevenir a oxidação lipídica de diversos produtos, utilizando fontes naturais no lugar dos aditivos sintéticos. As metodologias usuais em artigos científicos são os métodos *in vitro*, sequestrador de radicais livres, por espectrofotometria e sendo comparadas a um antioxidante com atividade reconhecida. O presente estudo tem como objetivo caracterizar, pelas metodologias ABTS, DPPH e FRAP, a atividade antioxidante do óleo essencial extraído dos resíduos cascas e sementes de *Campomanesia* sp. e adaptar um protocolo para determinação da atividade antioxidante de óleos essenciais. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, composição química foi avaliada por análise cromatográfica utilizando um cromatógrafo de gás acoplado a um espectro de massas; a atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* por espectrofotometria e controles positivos butil-hidroxi-tolueno e ácido ascórbico, e Trolox e sulfato ferroso foram utilizados para curvas analíticas. O rendimento do óleo obtido por hidrodestilação foi de 0,35% v/m. Os componentes majoritários encontrados foram  $\alpha$ -pineno (16,93%), limoneno (16,70%),  $\beta$ -ocimento (10,58%) e  $\beta$ -cariofileno (9,17%). Os resultados de atividade antioxidante do OE pelo método ABTS foi 7,5291  $\mu\text{mol TE/g OE}$  e FRAP foi 393,2474  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ ; em  $\text{IC}_{50}$  os resultados foram 24,834 mg/mL pelo método ABTS, 0,5827 mg/mL pelo método FRAP e 41,1389 mg/mL para o método DPPH. Foram obtidos resultados de atividade antioxidante por todos os três métodos, sendo DPPH pouco indicado devido a pouca aplicabilidade para amostras lipofílicas. O protocolo elaborado para ABTS obteve bons resultados para óleo essencial.

**Palavras-chave:** Atividade biológica; Metabólitos secundários; Reaproveitamento, Resíduos.

## **Determination of the Antioxidant Activity of Guavira Essential Oil (*Campomanesia* sp.) by different methodologies**

**Abstract:** Brazil, due to its ample biodiversity, stands out as a potential for natural products. The cerrado biome occupies 23% of the national territory and is rich in genera, including 14 of the 36 species of the genus *Campomanesia*. The guavira, as it is known, is consumed raw, and its peels and seeds are discarded. These residues are sources of nutrients and bioactive compounds, from which it is possible to extract the essential oil (EO), with proven biological activity, due to the presence of terpenes, highlighting the antioxidant activity. The antioxidants present in essential oils are of importance to the food industry to prevent lipid oxidation of various products, using natural sources instead of synthetic additives. The usual methodologies in scientific articles are the in vitro methods, free radical scavenger, by spectrophotometry and being compared to an antioxidant with recognized activity. The present study aims to characterize, by the ABTS, DPPH and FRAP methodologies, the antioxidant activity of the essential oil extracted from the waste peels and seeds of *Campomanesia* sp. and to adapt a protocol for determining the antioxidant activity of essential oils. The essential oil was obtained by hydrodistillation, chemical composition was evaluated by chromatographic analysis using a gas chromatograph coupled to a mass spectrum; antioxidant activity was evaluated in vitro by spectrophotometry and positive controls butylhydroxytoluene and ascorbic acid, and Trolox and ferrous sulfate were used for analytical curves. The yield of oil obtained by hydrodistillation was 0.35% v/m. The majority components found were  $\alpha$ -pinene (16.93%), limonene (16.70%),  $\beta$ -ocimene (10.58%), and  $\beta$ -caryophyllene (9.17%). The antioxidant activity results of EO by ABTS method was 7.5291  $\mu\text{mol TE/g EO}$  and FRAP was 393.2474  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ ; in  $\text{IC}_{50}$  results were 24.834 mg/mL by ABTS method, 0.5827 mg/mL by FRAP method and 41.1389 mg/mL for DPPH method. Antioxidant activity results were obtained by all three methods, with DPPH being poorly indicated due to its poor applicability for lipophilic samples. The ABTS protocol obtained good results for essential oil.

**Keywords:** Biological activity; Secondary metabolites; Reuse, Waste.

## Sumário

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO              | 4  |
| 2. OBJETIVOS               | 5  |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO     | 6  |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS     | 12 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA     | 17 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 18 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS       | 23 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |
| APÊNDICE                   | 30 |

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como fonte potencial de produtos naturais por possuir uma das maiores biodiversidades do planeta (VALLI et al., 2018). O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro representando cerca de 23% do território nacional (REIS; SCHMIELE, 2019), com espécies vegetais das mais diversas. O gênero *Campomanesia* (família *Myrtaceae*) possui 36 espécies, das quais 26 são endêmicas, distribuindo-se nas cinco regiões do país. Destas espécies, 14 são encontradas na região do Cerrado: *C. adamantium*, *C. cavalcantina*, *C. costata*, *C. eugenoides*, *C. grandiflora*, *C. guaviroba*, *C. guazumifolia*, *C. lineatifolia*, *C. pabstiana*, *C. pubescens*, *C. rufa*, *C. sessiliflora*, *C. velutina*, *C. xanthocarpa* (FLORA DO BRASIL, 2020), as quais possuem características semelhantes, relacionadas aos seus constituintes, propriedades nutricionais e potencial biológico, destacando-se o alto teor de compostos fenólicos que podem apresentar potencial antioxidante (DUARTE et al., 2020).

O desconhecimento sobre o potencial nutricional e biológico do aproveitamento integral de frutas e outras fontes vegetais, como cascas e sementes contribui para o desuso dos resíduos. As partes não comestíveis, casca e semente, obtidas do despulpamento são habitualmente descartadas. Entretanto, podem ser fontes de nutrientes e compostos bioativos. A polpa da guavira (*Campomanesia adamantium*), além de ser consumida *in natura*, é bastante utilizada no preparo de sucos, sorvetes, geleias e licores caseiros (OLIVEIRA; ARGANDOÑA; OSHIRO, 2018). O interesse industrial na fruta consiste na polpa, portanto não há separação do resíduo do despulpamento na indústria. De acordo com Viscardi et al. (2017) é possível aproveitar a casca e a semente dos frutos extraíndo óleos voláteis ou essenciais que apresentam princípios ativos para uso medicinal, alimentício e cosmético. A literatura apresenta avaliações do óleo essencial de cascas e sementes separados, (VISCARDI et al., 2017), porém o presente estudo busca o reaproveitamento do resíduo do despulpamento integral, sem separar cascas de sementes.

Os óleos essenciais (OE) são compostos extraídos de material vegetal, como folhas, caules cascas, sementes, frutos, raízes e exsudados de plantas, por processos de destilação, extração supercrítica ou uso de solventes, definido pela norma ISO 9235:2013, da International Organization for Standardization (ISO/TC 54). Além da importância para a indústria química e alimentícia, pelo uso como aromatizante e antimicrobiano, os óleos essenciais podem ser empregados em fármacos ou suplementos para a saúde, devido aos efeitos biológicos promissores como: ação contra doenças neurodegenerativas e obesidade; atividade anti-inflamatória; contribuição para a formação óssea e proteção do fígado (AYSELI; AYSELI,



2016). Por outro lado, a crescente demanda dos consumidores por alimentos contendo ingredientes naturais e conservantes naturais em substituição aos aditivos químicos, estimula a realização de pesquisas, nas áreas alimentícias, de saúde e correlatas, com produtos vegetais e extratos com propriedades biológicas.

Assim, diferentes compostos presentes nos OEs com ação antioxidante apresentam-se como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e minimizar danos oxidativos ao organismo. Os compostos fenólicos, terpenos e outros compostos bioativos podem possuir atividade antioxidante, ou seja, são substâncias que retardam reações de degradação oxidativa, e por conseguinte, reduzem a velocidade da oxidação por meio de um ou mais mecanismos, como por exemplo, inibição de radicais livres e complexação de metais.

A determinação de atividade antioxidante em óleos essenciais é comumente realizada a partir de diferentes adaptações de técnicas conhecidas na literatura. As metodologias mais usuais citadas em artigos científicos são os métodos *in vitro*, sequestrador de radicais livres, como método de poder redutor do ferro - FRAP, método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), capacidade de absorção radical de oxigênio - ORAC, método de peroxidação do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (TIVERON, 2010). Também há diversas maneiras de expressar a atividade antioxidante (SILVA et al, 2018; SUGAUARA et al, 2020; XANTHIS et al, 2021; ROMEILAH et al, 2021).

Considerando o consumo popular da guavira e a ocorrência dessa espécie na região de Dourados, estado de Mato Grosso do Sul, o presente estudo objetivou estudar e comparar diferentes técnicas de determinação da atividade antioxidante para o óleo essencial dos resíduos cascas e sementes de guavira *Campomanesia* sp, para adaptar técnica e organizar um protocolo para determinação de atividade antioxidante de OEs.

## **2. OBJETIVOS**

### **• Objetivo Geral**

Estudar e comparar diferentes metodologias de determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de *Campomanesia* sp.

### **• Objetivos Específicos**

- Determinar a atividade antioxidante do óleo essencial pelas metodologias ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP;
- Adaptar protocolo para determinação da atividade antioxidante do óleo essencial pesquisado;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Campomanesia* sp.

*Campomanesia* sp. é um gênero da família *Myrtaceae*, comum na região do cerrado brasileiro e no Paraguai. É uma frutífera de destaque no ecossistema do cerrado, sendo que seus frutos apresentam aroma e sabor adocicados. O desenvolvimento de seus frutos, desde a abertura da flor até a presença dos frutos maduros, tem duração média de 63 dias (NUCCI; ALVES-JUNIOR, 2017). O pico de floração ocorre entre setembro e outubro, relacionado com o índice de precipitação pluviométrica e o pico de desenvolvimento e maturação dos frutos que ocorre em novembro. Em época de safra, a guavira apresenta amplo uso pela população tanto para consumo *in natura*, como na produção de alimentos, bebidas e usos terapêuticos (NUCCI; ALVES-JUNIOR, 2017; VIEIRA et al., 2018). A alta perecibilidade dos frutos impede que a produção seja totalmente comercializada, sendo indispensáveis outras maneiras de processamento para reduzir as perdas, gerar novos produtos e favorecer a exploração sustentável.

No estado de Mato Grosso do Sul, a *Campomanesia* sp foi caracterizada em três regiões específicas, Bonito, Dourados e Cerro Corá/ fronteira do Paraguai, como uma árvore ramificada, frequentemente encontrada na forma de arbustos de plantas da mesma espécie. Os frutos de guavira apresentam coloração amarelada, sabor característico quando maduros e gosto equilibrado entre doce e ácido. A biometria dos frutos mostra massa de 0,620 a 6,31 g do fruto inteiro (VIEIRA et al., 2018); diâmetro longitudinal, de 12,71 mm a 22,74 mm, e diâmetro transversal de 12,46 mm a 21,36 mm (SOUZA et al., 2019), fatores influenciados por fatores climáticos que interferem no rendimento de polpa do fruto, assim como no rendimento de cascas e sementes. O fruto da guavira (*C. adamantium*) é rico em vitamina C (BREDA; ARGANDOÑA; CORREIA, 2012; LEÃO et al., 2017), minerais (LIMA et al., 2017), compostos fenólicos (DUARTE et al., 2020) e fibras (ALVES et al., 2013).

Os resíduos do despulpamento da guavira podem ser fontes de nutrientes e compostos bioativos (ALVES et al. 2013). Viscardi et al. (2017) avaliou os óleos essenciais obtidos da casca e da semente da *C. adamantium*, as quais apresentaram respectivamente, 0,32% e 0,98%

(m/m) de rendimento em relação ao fruto, bem como, atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em roedores, com ausência de toxicidade, sugerindo o seu uso como nutracêutico ou agente farmacológico.

### 3.2 Potencial biológico do gênero

A utilização de plantas como fontes terapêuticas é uma antiga prática utilizada como recurso para tratamento e prevenção de doenças. Espécies de *Campomanesia* são utilizadas na medicina popular para fins de tratamento de hipercolesterolemia, anti-inflamatórios, anti-diabéticos, redução da obesidade, atividade antiplaquetária (KLAFKE et al., 2012), antidiarreico, antiséptica das vias urinárias, antirreumático e depurativo (VINAGRE et al. 2010; CAMPOS et al., 2012), antiulcerogênicos (MARKMAN et al., 2004), entre outros.

No estudo realizado pelos autores Catelan et al. (2019) observaram-se efeitos fotoprotetores em extratos de quatro espécies do gênero, *C. guazumifolia*, *C. sessiliflora*, *C. xanthocarpa* e *C. adamantium*. Cardozo et al. (2018) destacaram os efeitos antiplaquetário na espécie *C. xanthocarpa*, hipocolesterolêmico e antioxidante em *C. adamantium*, anti-inflamatório e antioxidante na *C. pubescens*, além de ausência de toxicidade reprodutiva ou clínica. Apesar da escassez de estudos comprobatórios em modelos específicos para o tratamento da obesidade, guavira apresenta efeitos em distúrbios cardiovasculares e estado hiperglicêmico que estão relacionados ao contexto dessa patologia. Assim, guavira apresenta potencial para abordagem terapêutica na síndrome metabólica induzida pela obesidade (CARDOZO et al., 2018).

Efeitos hepatoprotetores e sua relação com a atividade antioxidante foram observados em estudo *in vitro* com o uso de extrato etanólico de polpa ou casca/semente de *C. adamantium* utilizando células hepáticas humanas HepG<sub>2</sub><sup>1</sup> expostas a CCl<sub>4</sub><sup>2</sup>. Ambos os extratos demonstraram proteção para células hepáticas do efeito citotóxico, sendo o efeito mais expressivo atribuído ao extrato de casca/semente. Somado a isso, o extrato apresentou 60% a mais de compostos fenólicos, especialmente flavonóides em relação à polpa, os quais foram associados a atividade antioxidante (pelo método DPPH•), comprovando que a atividade antioxidante está parcialmente associada à proteção hepática e sua aplicação deveria ser considerada em produtos nutracêuticos (FERNANDES et al., 2015).

---

<sup>1</sup> HepG2 -células hepatocarcinoma humano, são células de câncer de fígado.

<sup>2</sup> CCl<sub>4</sub> - Tetracloreto de carbono, amplamente utilizado para induzir estresse oxidativo e lesão hepática.

### 3.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários presentes em diferentes partes das plantas como, por exemplo, folhas, flores, raízes, sementes, frutas e cascas, quimicamente caracterizados como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, altamente voláteis, lipofílicos, normalmente menos densos do que a água (BAKKALI et al., 2008). Além disso, os constituintes dos OEs são compostos orgânicos de baixo peso molecular (inferior a 300 Da) que evaporam facilmente à temperatura ambiente (KALUA et al., 2007). A síntese de compostos voláteis em frutas é atribuída geralmente à presença de terpenos, assim como a ação antioxidante. A produção de terpenos no metabolismo celular pode ocorrer por duas vias distintas: via acetato/mevalonato, que está localizada na via do citosol, e do metileritritol-4-fosfato (via de Rohmer), localizada no cloroplasto. Na primeira via, a acetil coenzima-A dará origem a sesquiterpenos, fitoesteróis e ubiquinona. Na via Rohmer, monoterpenos, giberelinas, ácido abscísico, carotenoides são sintetizados a partir do ácido pirúvico (FREITAS, 2017).

Muitos óleos essenciais exibem propriedades terapêuticas que vêm sendo utilizadas na prevenção ou até mesmo no tratamento de algumas disfunções sistêmicas (ASIF et al., 2019; BUCHBAUER; BOHUSCH, 2016). Além disso, há uma demanda crescente por alimentos seguros, de alta qualidade, que seguem uma tendência ao uso preferido de substâncias naturais. Essa tendência advém da maior preocupação dos consumidores finais em saúde, resignificando o ato de alimentação para além de saciedade.

A atividade antioxidante está relacionada aos efeitos biológicos relatados para frutas nativas do Cerrado, podendo ser atribuídos à presença de moléculas bioativas como compostos fenólicos, carotenóides e também aos compostos voláteis (DONADO-PESTANA et al., 2018). Estudos fitoquímicos com *C. adamantium* revelaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos em óleo essencial de frutos, folhas e flores (VALLILO et al. 2006; COUTINHO, 2008; COUTINHO et al. 2008).

Vallilo *et al.* (2006) analisaram os óleos essenciais do fruto inteiro da guavira *C. adamantium*, extraídos por hidrodestilação e identificaram mono e sesquiterpenos (cariofileno e isômeros). Viscardi *et al.* (2017) extraíram óleo essencial da casca e da semente de *C. adamantium*, pelo mesmo método, encontrando os componentes limoneno, tijopseno e  $\beta$ -pineno em maior concentração nesses materiais, os quais estariam relacionados com os efeitos farmacológicos relatados, anti-inflamatório e antinociceptivo (ação que anula ou reduz a percepção e transmissão de estímulos que causam dor).

### 3.4 Atividade antioxidante

Os antioxidantes naturais presentes em óleos essenciais têm potencial efeito na prevenção de doenças devido sua ação protetora contra espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Na área alimentícia, seu potencial antioxidante é importante alternativa para prevenir a oxidação lipídica de diversos alimentos utilizando uma fonte natural no lugar dos aditivos sintéticos (FREITAS; CATTELAN, 2018).

A capacidade antioxidante costuma ser associada a metabólitos secundários como os compostos fenólicos de plantas: fenoles simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. A atividade antioxidante desempenha um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (YANAGIMOTO et al., 2004).

O oxigênio durante o transporte de elétrons na mitocôndria pode ser parcialmente reduzido gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio grave entre as espécies reativas de oxigênio e o sistema oxidante, ou seja, produção e eliminação de EROs. A produção de EROs ocorre a partir de fontes endógenas ou fontes exógenas. As fontes endógenas incluem organelas intracelulares, bem como, fontes inflamatórias. Fontes exógenas incluem xenobióticos, produtos farmacêuticos e radiação. A inibição de defesas antioxidantes pode resultar no estresse oxidativo que pode gerar mutação em genes e ter como resultado efeitos à carcinogênese (SOSA et al., 2013).

Ahmad et al (2017) e Kupsco e Schlenk (2015), relacionaram a ocorrência de eventos degenerativos e patológicos, como diabetes, Alzheimer, doenças inflamatórias e câncer com o estresse oxidativo, devido à condição em que ocorre acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ocasionando danos ao DNA, proteínas e outras macromoléculas celulares (REUTER et al., 2010; MORRY et al., 2017). Os compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, tem a capacidade de eliminar os radicais livres e proteger o organismo dos danos ocasionados pelos mesmos, representando um importante papel na prevenção dessas patologias (REHMAN; CHAND; KHAN, 2017).

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e químicas, mas estudos toxicológicos demonstram efeitos colaterais do uso em excesso, sendo considerados agentes toxicológicos (SASAKI et al., 2002; VANDGHANOONI

et al., 2013) e carcinogênicos ((WILLIAMS; IATROPOULOS; WHYSNER, 1999). Diante dessas constatações, a procura por fontes alternativas para a substituição ou redução do uso de antioxidantes sintéticos se faz necessária. No que se refere à indústria alimentícia, além disso, é importante considerar a eficácia em baixas concentrações, com ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor e sabor, de fácil aplicação e que apresente estabilidade durante a produção e armazenamento (RAMALHO; JORGE, 2006).

De acordo com Santos-Sánchez (2019), os compostos antioxidantes podem agir por meio de diferentes mecanismos químicos, como, por exemplo, transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons simples e capacidade de quelar metais de transição. A atividade antioxidante pode ser determinada por diferentes parâmetros, os quais incluem a capacidade de redução de metal (FRAP), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS), peroxidação do radical (DPPH). Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos, porém alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos presentes no material a ser analisado. Deste modo, existem métodos para frutos ricos em compostos hidrofílicos e métodos para frutos ricos em compostos lipofílicos (SILVA, 2008).

#### **3.4.1 Método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup>**

O método ABTS foi descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2004). É um dos métodos mais utilizados tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (LIMA, 2008). O método consiste na captura do radical ABTS<sup>•+</sup>, que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. A formação do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) é gerada a partir da oxidação com persulfato de potássio que é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. A influência tanto da concentração dos antioxidantes quanto da duração da reação sobre a inibição do radical (cátion) é considerada na determinação da atividade antioxidante (RE et al. 1999).

O radical ABTS<sup>•+</sup> pode ser dissolvido em meio aquoso e solução alcoólica, nos quais a atividade antioxidante pode ser medida, devido à natureza hidrofílica e lipofílica dos compostos nas amostras. Romeilah et al. (2021), avaliou a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Artemisia monosperma* L. e *Tamarix aphylla* L por esse método. Sripahco et al. (2022) avaliou a atividade antioxidante do óleo essencial de *Elsholtzia beddomei* C. B. Clarke ex Hook. f. e Valarezo et al. (2022) avaliou por esse método a capacidade antioxidante do óleo essencial de folhas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.).

### 3.4.2 Método da peroxidação do radical DPPH•

O DPPH• é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo considerado um método rápido, prático e de boa estabilidade (SUCUPIRA et al., 2012). Foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a atividade antioxidante de várias substâncias utilizando um radical livre estável semelhante,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picril hidrazila. Foi posteriormente modificado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos e amostras biológicas, simplificando a interpretação dos resultados por Blois (1958) e usando o termo concentração efetiva que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) para interpretar os resultados do método. A atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH• pode ser expressa de duas formas, utilizando uma curva padrão com o antioxidante sintético ou através de equações para determinação da atividade antioxidante, porém o princípio da reação em ambas as análises é o mesmo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

O 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) é um radical de nitrogênio orgânico, estável de cor violeta que possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio, esse radical é reduzido e a intensidade de absorção diminui.

A determinação da atividade antioxidante por este método é relativamente fácil, altamente sensível, precisa, rápida, simples, econômica e o sistema de reação envolve somente o radical e o antioxidante (KEDARE; SINGH, 2011; MOON; SHIBAMOTO, 2009). Ouedrhiri et al. (2021) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas de *Origanum compactum*, *Mentha spicata*, *Thymus serpyllum*, *Origanum majorana*, *Myrtus communis*, *Artemisia herba-alba*. Shripahco et al. (2022) também avaliaram atividade antioxidante de óleo essencial de partes aéreas de *Elsholtzia beddomei* C. B. Clarke ex Hook. f., que sugere a aplicabilidade desse método para determinação de atividade antioxidante para óleos essenciais.

### 3.4.3 Método Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP

O método FRAP foi formulado por Benzie e Strain (1996), originalmente para medir a capacidade de redução do ferro de plasma sanguíneo. Baseia-se na capacidade do antioxidante em reduzir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Esta reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5- triazina (TPTZ) e em condições ácidas, que propiciam a formação de um complexo de cor azul intensa. Desta forma, este complexo ferro-tripiridil triazina (Fe(TPTZ)<sup>3+</sup>) é reduzido a complexo de ferro (Fe(TPTZ)<sup>+2</sup>) na presença de um antioxidante (PULIDO; BRAVA; SAURA-CALIXTO,

2000). Pulido et al. (2000) descrevem o método FRAP como alternativa para determinar a redução de ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Tedesco et al. (2020), avaliou a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de jabuticaba utilizando o método FRAP e obtiveram valores entre  $0.026 \pm 0.003$  e  $0.140 \pm 0.005$   $\mu\text{mol}$  de sulfato ferroso/mg, com equivalência entre 0,2 a 1,2% com o padrão utilizado, sugerindo boa aderência da metodologia à amostras lipofílicas.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

As análises foram realizadas no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Produtos e Processos Agroindustriais do Cerrado (GEPPAC), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), e em parceria com laboratório do Centro de Estudos em Recursos Naturais (CERNA), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), ambos na cidade de Dourados, em Mato Grosso do Sul.

##### **4.1 Matéria-prima**

Frutos de guavira (*Campomanesia* sp.) foram adquiridos em feira de frutas em Ponta Porã/MS. Os frutos foram higienizados e sanitizados, mantidos em embalagens plásticas sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) até o despulpamento. A polpa foi congelada e as cascas e sementes foram desidratadas em secador de bandeja, com circulação de ar a  $0,25$  m/s e à temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  durante 12h. As cascas foram mantidas em embalagens plásticas, temperatura ambiente, em local protegido de luz.

##### **4.2 Obtenção do Óleo Essencial**

O óleo essencial (OE) de guavira (*Campomanesia* sp.) foi obtido por hidrodestilação. As cascas e sementes de guavira previamente desidratadas, foram trituradas em aparelho multiprocessador comercial (Britânia). Uma alíquota do material (200g) e água destilada (1500 mL) foram incorporados em balão de destilação (2000 mL), e acopladas ao aparelho Clevenger (Tecnal), procedendo-se à extração do óleo essencial durante 150 min (OLIVEIRA et al., 2016). O OE obtido foi transferido para tubos eppendorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro (Dinâmica) para a remoção de água. Em seguida, o OE foi armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em vidro âmbar, até seu uso.



### 4.3 Composição Química

O OE foi preparado na concentração de 1 mg/mL usando hexano como solvente e diluídas para 0,2 mg/mL para a análise cromatográfica. A análise cromatográfica foi realizada usando um cromatógrafo de gás equipado com detector de massas (GCMS - QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada coluna DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme), com hélio (99,999% de pureza) como gás de arraste, a uma vazão de 1,0 mL/min e um volume de injeção de 1 µL (no modo *split*, 1:10). O índice de retenção foi calculado usando uma mistura de alcanos lineares (C7-C40) como referência externa. A identificação dos compostos foi obtida comparando-se os espectros de massas das amostras com os espectros disponíveis nas bibliotecas NIST21 e WILEY229, bem como com dados reportados na literatura (Adams, 2007).

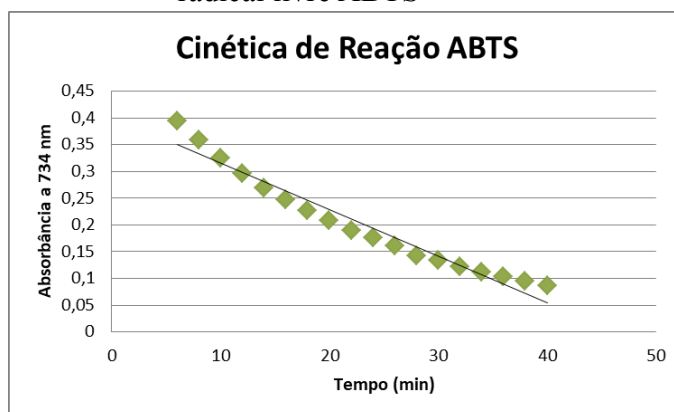
### 4.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do OE foi avaliada utilizando os métodos de sequestro do radical DPPH do ABTS e de redução do ferro (FRAP), obtendo-se também o potencial de inibição para cada método para cálculo de IC<sub>50</sub>. O IC<sub>50</sub> representa a concentração necessária para reduzir os radicais livres de ABTS e DPPH em 50% e no método FRAP, refere-se à concentração necessária para reduzir o complexo Fe<sup>2+</sup> em 50%. Foram realizadas análises para determinação da atividade antioxidante *in vitro* do OE de resíduo de guavira, utilizando-se dos métodos supramencionados, os quais os procedimentos estão descritos a seguir.

#### 4.4.1 Atividade Antioxidante por ABTS•<sup>+</sup>

A atividade antioxidante por captação do radical ABTS•<sup>+</sup> foi realizada segundo Valarezo et al. (2022) e Rufino et al. (2007), com modificações. Foi necessário realizar a cinética de reação de captura do radical do OE. Para isso, a diluição de 2000 mg/mL previamente preparada foi incubada em escuro, conforme metodologia descrita a seguir. A captura do radical ABTS foi medida através de um monitoramento contínuo da absorbância a 734 nm até a leitura constante, a leitura foi realizada a cada 2 minutos, sendo iniciada em 6 minutos até 40 minutos.

Figura 1. Cinética do tempo de reação para estabilização da captura do radical livre  $\text{ABTS}^{\bullet+}$

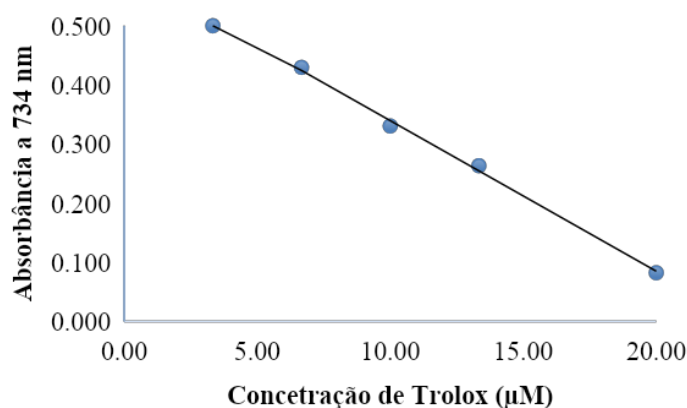


Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi preparado a partir de 5 mL da solução estoque de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e 88  $\mu\text{L}$  de solução persulfato de potássio e mantido no escuro por 16h em temperatura ambiente. Em seguida, foi diluído 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm. Foram preparadas diluições de óleo essencial nas concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 mg/mL. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição para tubos de ensaio com 2900  $\mu\text{L}$  do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e homogeneizado em agitador de tubos (NOVA NI1058). Trolox, Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT) e ácido ascórbico foram utilizados como controle positivo. A leitura das misturas (amostra diluída + solução radicalar) após 40 min de reação foi realizada a 734 nm, o branco teve a amostra diluída substituída por álcool etílico. Álcool etílico PA foi utilizado para zerar o espectrofotômetro (Biochrom Libra S60PC).

Os resultados de atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos em função da atividade antioxidante do Trolox, que é uma substância derivada do  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), solúvel em água e etanol, utilizado para reduzir o estresse oxidativo ou danos em aplicações biológicas e bioquímicas, portanto utilizado como equivalência devido à dificuldade em determinar atividade antioxidante de alimentos ou bebidas, uma vez que são misturas de diversos componentes e substâncias. Diante disso, foi obtida a curva analítica do Trolox (Figura 2).

Figura 2. Curva Analítica de Trolox



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Os resultados foram expressos em micromoles equivalentes ao Trolox por grama de óleo essencial ( $\mu\text{mol TE/g OE}$ ) e Concentração Inibitória de 50% do radical ABTS ( $\text{IC}_{50}$ ). Os cálculos foram realizados conforme o protocolo do Apêndice 1.

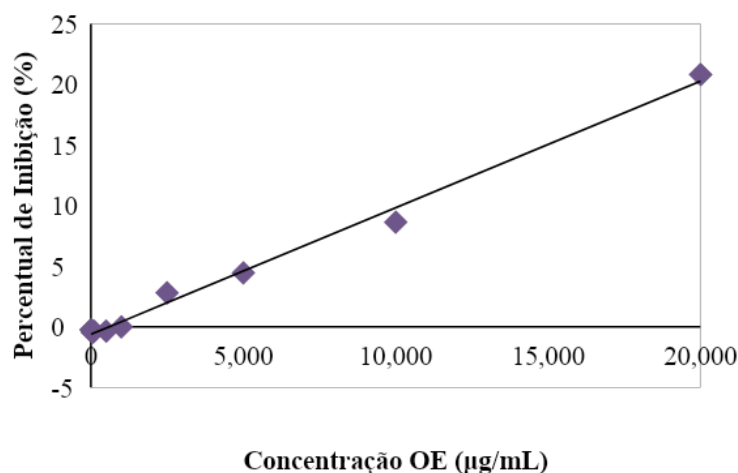
#### 4.4.2 Atividade Antioxidante por DPPH•

A determinação da atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio de varredura do radical DPPH• de acordo com Gupta et al. (2011), com modificações. Uma fração de 200  $\mu\text{L}$  de amostra foi adicionada a 1800  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH• (0,1 mmol/L). Os testes foram acompanhados por um controle negativo (meio reacional + metanol HPLC) e as soluções de BHT (1 mg/mL) e ácido ascórbico (1 mg/mL) como controle positivo. A redução do radical DPPH• foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Biochrom Libra S60PC) após 45 minutos de incubação a 37 °C em ambiente escuro. A redução nos valores de absorbância das amostras foi relacionada com a do controle negativo e foi estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH•, expresso pela Equação 1:

$$\% \text{ varredura DPPH} = \frac{(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Controle neg.})}{\text{Abs. controle neg.}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A partir dos valores de percentual de varredura do DPPH (Equação 1), foi plotado um gráfico entre o % varredura DPPH (y) em função da concentração da diluição (x) e obtido o gráfico da figura 3.

Figura 3: Percentual de Inibição do OE para cálculo do IC<sub>50</sub> por DPPH



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

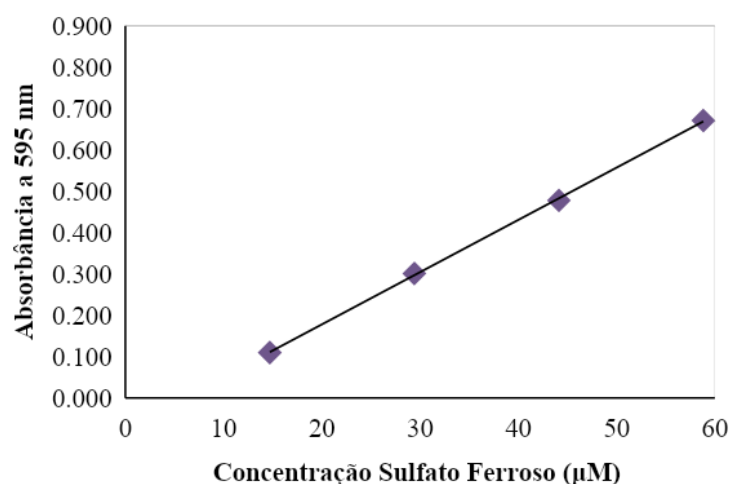
A partir da equação ( $y = 0,0019x - 10,17$ ,  $R^2 0,9915$ ) foi calculada a concentração inibitória IC<sub>50</sub> (x) conforme equação 2, expresso em mg/mL.

$$IC50 = \frac{50 + 10,17}{0,0019 \times 1000} \quad \text{Equação 2}$$

#### 4.4.3 Atividade Antioxidante por FRAP

Foi realizada de acordo com o método descrito por Rufino et al. (2006). Em tubo de ensaio, em local escuro, uma alíquota de 90 µL da amostra foi misturado com 270 µL de água destilada e 2700 µL do reagente FRAP, (25 mL tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL solução 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina 10 mM e 2,5 mL solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). Os tubos foram agitados e mantidos em banho-maria a 37°C por 30 minutos para reação. A leitura (595 nm) foi em espectrofotômetro UV-visível (Biochrom Libra S60PC) e o reagente FRAP empregado como branco para calibrar o equipamento. Uma curva analítica de sulfato ferroso (Figura 4) foi construída e os resultados expressos em µmol sulfato ferroso equivalente por grama de amostra.

Figura 4: Curva padrão do Sulfato ferroso para cálculo de redução do FRAP



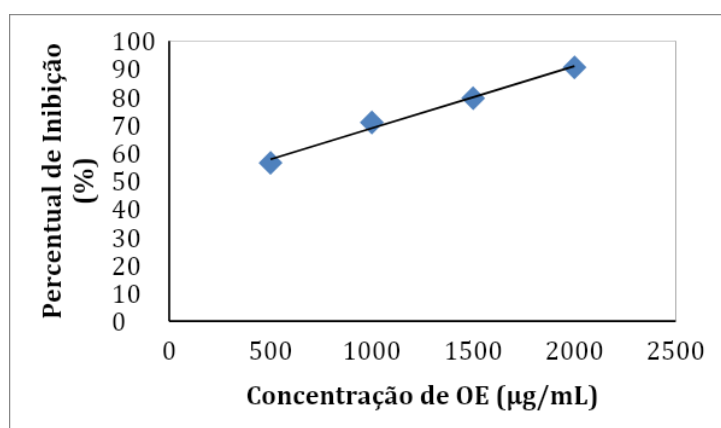
Fonte: Elaborada pela autora, 2022

Os resultados foram expressos em micromoles equivalentes ao sulfato ferroso por grama de óleo essencial ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g OE}$ ). Os cálculos foram realizados conforme técnica descrita por Rufino et al. (2006). Os cálculos de  $\text{IC}_{50}$  foram realizados a partir do percentual de inibição de íons de Ferro, obtidos pela Equação 3, descrita por Settharaksa, Songsangsirisak e Monton, (2018).

$$\%In. \text{ íons Ferro} = \frac{(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ controle neg.})}{Abs \text{ amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

A média dos percentuais de inibição obtidos para cada concentração foi linearizado (Figura 5) e obtido a equação 4, para o cálculo de  $\text{IC}_{50}$ , expresso em mg/mL.

Figura 5: Percentual de inibição do OE para cálculo  $\text{IC}_{50}$  FRAP



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

$$IC50 = \frac{50-46,644}{0,0221}$$

Equação 4

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram apresentados pela média das repetições e desvio padrão.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Rendimento

Os resíduos (casca e semente) do despulpamento do fruto fresco da guavira representam 64% do fruto inteiro, que depois de secos representam 16% do fruto fresco. Em relação ao resíduo úmido, o produto seco representa 25%. Assim, para 1000 g de fruto fresco, obtém-se 640 g de casca e semente úmida, que representa 160 g de casca e semente secas. Essas informações são importantes para determinar o rendimento do óleo essencial extraído.

O rendimento do óleo essencial (OE) obtido por hidrodestilação, a partir do resíduo seco de guavira, foi de 0,35% v/m. O OE obtido apresentou aspecto translúcido levemente amarelado, com aroma cítrico adocicado, característico do fruto. Viscardi et al. (2017), relatou rendimento de OE de 0,32% v/m a partir de cascas e de 0,98% v/m para sementes da mesma espécie. Como no estudo foi reaproveitado o resíduo objetivando o reaproveitamento pela indústria de polpa, cascas e sementes foram desidratadas em conjunto. Uma possível explicação para o rendimento mais baixo que o verificado por Viscardi et al. (2017) é o tempo de secagem necessário para a casca ser menor ao tempo de secagem para as sementes, como o OE é volátil, tem-se um rendimento menor para OE obtido de cascas e sementes secas juntas devido à essa volatilização de metabólitos, principalmente da casca, durante a secagem.

### 6.2. Composição química

O quadro 1 apresenta a composição química do OE extraído de cascas e sementes, resíduo do despulpamento da guavira. De acordo com Stefanello et al. (2010), compostos com quantidades relativas superiores a 8% foram considerados componentes principais.

Quadro 1: Composição química do óleo essencial extraído do resíduo do despulpamento do fruto de *Campomanesia* sp.

|    | <b>Compostos</b>     | <b>Concentração (%)</b> |
|----|----------------------|-------------------------|
| 1  | $\alpha$ -pineno     | 16,93 $\pm$ 0,13        |
| 2  | $\beta$ -pineno      | 3,53 $\pm$ 0,02         |
| 3  | Mirceno              | 2,31 $\pm$ 0,01         |
| 4  | $\alpha$ -felandreno | 2,31 $\pm$ 0,01         |
| 5  | Limoneno             | 16,70 $\pm$ 0,21        |
| 6  | 1,8-cineol           | 3,97 $\pm$ 0,14         |
| 7  | $\beta$ -felandreno  | 2,11 $\pm$ 0,01         |
| 8  | $\beta$ -ocimeno     | 10,58 $\pm$ 0,22        |
| 9  | Terpinoleno          | 3,23 $\pm$ 0,11         |
| 10 | $\gamma$ -Terpineno  | 1,21 $\pm$ 0,01         |
| 11 | $\alpha$ -terpineol  | 2,42 $\pm$ 0,03         |
| 12 | $\delta$ -elemeno    | 1,22 $\pm$ 0,03         |
| 13 | $\alpha$ -cubebeno   | 1,21 $\pm$ 0,01         |
| 14 | Longiciclono         | 1,40 $\pm$ 0,03         |
| 15 | $\alpha$ -Ylangeno   | 0,38 $\pm$ 0,03         |
| 16 | $\alpha$ -copano     | 2,51 $\pm$ 0,05         |
| 17 | $\beta$ -elemeno     | 2,23 $\pm$ 0,01         |
| 18 | Longifoleno          | 1,11 $\pm$ 0,01         |
| 19 | $\beta$ -cariofileno | 9,17 $\pm$ 0,01         |
| 20 | Aromadendreno        | 2,12 $\pm$ 0,01         |
| 21 | Germacreno D         | 2,34 $\pm$ 0,01         |
| 22 | Biciclogermacreno    | 1,18 $\pm$ 0,01         |
| 23 | $\beta$ -Bisaboleno  | 1,29 $\pm$ 0,01         |
| 24 | $\delta$ -cadineno   | 1,45 $\pm$ 0,01         |
| 25 | Germacreno B         | 1,13 $\pm$ 0,01         |
| 26 | Esfatulenol          | 2,70 $\pm$ 0,11         |
| 27 | $\beta$ -Acorenol    | 1,87 $\pm$ 0,05         |
| 28 | $\alpha$ -Murolol    | 1,39 $\pm$ 0,02         |
|    | Somatório            | 100,00 $\pm$ 1,32       |

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

No presente estudo, foram identificados 28 compostos químicos, dos quais o  $\alpha$ -pineno (16,93%), limoneno (16,70%),  $\beta$ -ocimeno (10,58%) e  $\beta$ -cariofileno (9,17%) foram os componentes majoritários. Pacheco et al (2021), identificou 31 componentes químicos no óleo essencial extraído das folhas de *Campomanesia aurea*, que apresentarem como principais componentes o  $\alpha$ -cadinol (10,72%), *p*-Cimeno (8,33%), epi- $\alpha$ -Murolol (7,92%),  $\alpha$ -Terpineol (7,38%) e  $\alpha$ -pineno (6,80%). Silva et al (2022) identificaram 28 componentes para folhas de *C.*

*adamantium*, os componentes limoneno (21,1%),  $\beta$ -pineno (9,7%) e  $\alpha$ -pineno (7,7%) e globulol (8,4%), destacaram-se em maior quantidade.

No OE dos resíduos do despolpamento da guavira, o  $\alpha$ -pineno (16,93%) destacou-se em relação aos demais componentes quando comparados com os componentes majoritários do OE extraído das folhas da mesma espécie. O  $\alpha$ -pineno é um monoterpene que possui atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*, conforme estudos realizados por Lima et al. (2005). O limoneno é outro terpenoide com atividade antimicrobiana, inclusive contra bactérias gram-positivas (HAN et al., 2021), o que mostra o potencial dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos.

### 6.3. Atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS foi necessário obter a cinética de reação de captura do radical a fim de determinar o tempo em que se atinge a estabilidade da reação, que foi estabelecido pelas autoras como 40 minutos.

A partir dessa equação obteve-se o valor da atividade antioxidante do OE que foi de  $7,53 \pm 0,44$   $\mu\text{mol}$  de TE/g de OE. Considerando-se que o valor da atividade antioxidante é equivalente à atividade antioxidante do Trolox, os resultados obtidos mostram que o OE de guavira apresenta baixa atividade antioxidante, pois quanto maior a equivalência com Trolox, maior a atividade antioxidante.

Os resultados de atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS $\cdot^+$  também foram expressos em IC<sub>50</sub>, os resultados foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> dos antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico, apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Atividade antioxidante e concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) do óleo essencial de guavira e de antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico obtido por ABTS

| Amostra         | $\mu\text{mol trolox Eq/g}$ | IC <sub>50</sub> (mg/mL) |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------|
| OE de guavira   | $7,5291 \pm 0,4471^c$       | $24,834 \pm 5,44^b$      |
| BHT             | $1804,78 \pm 0,0^b$         | $5,87 \pm 0,0^c$         |
| Ácido Ascórbico | $4735,921 \pm 0,0^a$        | $0,077 \pm 0,06^d$       |
| Trolox          | -                           | $86,43 \pm 0,0^a$        |

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Os resultados da atividade antioxidante para o OE da guavira equivalente ao Trolox ( $7,529$   $\mu\text{mol}$  de TE/g), não foram encontrados estudos na literatura que relatam a atividade



antioxidante do OE da guavira de resíduos do despulpamento do fruto, Silva et al (2018), relatou atividade antioxidante de  $32,85 \pm 0,86$   $\mu\text{mol}$  de TE/g para o óleo essencial de *Myrcia sylvatica*, valor maior ao encontrado no presente estudo para *Campomanesia sp.*

Quanto à  $\text{IC}_{50}$ , os valores obtidos mostraram que o ácido ascórbico e o BHT possuem maior atividade antioxidante que o OE de guavira (Tabela 1). Para o OE de guavira, a concentração necessária para reduzir 50% dos radicais livres do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi de  $24,834 \pm 5,437$  mg/mL. Sousa et al (2022) obteve valores de  $\text{IC}_{50}$  de 0,0176 mg/mL para o óleo essencial extraído de folhas e galhos de *Croton zehntneri*, pelo método do ABTS. Nie et al. (2022), relatou  $\text{IC}_{50}$  de 0,945 mg/mL para o óleo essencial das folhas de *Eleutherococcus Simoni*. Diante dos resultados da literatura referida, é possível afirmar que o OE apresentou uma baixa atividade antioxidante (24,83 mg/mL) quando comparados aos estudos analisados, uma vez que quanto menor a concentração  $\text{IC}_{50}$  maior a atividade antioxidante.

Quanto maior a presença de compostos com o poder de doar hidrogênio, maior é a perda de coloração, mudando a solução de coloração violeta à amarela (RUFINO et al., 2007). O radical livre DPPH• não requer nenhuma preparação especial, só pode precisa ser dissolvido em meio orgânico, especialmente em etanol, que é uma limitação do método em comparação com os demais, que são solúveis em água e solventes orgânicos, como o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , pois em meios aquosos a solubilidade é bem menor e pode interferir na avaliação da capacidade antioxidante, tornando o radical DPPH• pouco acessível para a reação com as amostras antioxidantes, afetando assim a transferência de elétron ou de hidrogênio (KARADAG et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2008).

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, o OE apresentou  $\text{IC}_{50}$  de 41,13890 mg/mL. Procedimento semelhante foi realizado para calcular o  $\text{IC}_{50}$  dos controles positivos BHT e ácido ascórbico, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) do OE de resíduo de guavira e de antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico AA obtidos pelo método DPPH

| Amostra | $\text{IC}_{50}$ (mg/mL) |
|---------|--------------------------|
| OE      | $41,1389 \pm 13,3971^a$  |
| BHT     | $0,0548 \pm 0,753^c$     |
| AA      | $1,5605 \pm 0,3108^b$    |

Fonte: Elaborada pela autora, 2022

Observa-se que os melhores resultados foram obtidos para o BHT seguido do ácido ascórbico. No caso do OE de guavira, para obter a concentração inibitória de 50% do radical DPPH a concentração necessária é de 41,14 mg/mL, o que representa um valor muito alto, quando comparado a outros OEs. Sousa et al (2022), relatou para o OE de *Croton zehntneri* IC<sub>50</sub> de 2,606 mg/mL, Nie et al (2022) obteve para o OE de *Eleutherococcus Simoni* IC<sub>50</sub> de 1,125 mg/mL, enquanto Silva et al (2018), para o OE de *Myrcia sylvatica* apresentou IC<sub>50</sub> de 1,94 ± 0,12 mg/mL. Considerando esses estudos, pode-se afirmar que a atividade antioxidante do OE de guavira obtido a partir do método DPPH foi menor aos relatados para OE extraído de espécies citadas.

Contudo, os resultados de erros pelo método do DPPH (13,3971), em relação ao erro obtido pelo método do ABTS (5,44), demonstram que o método do DPPH não foi o mais recomendado para OE de resíduo de guavira, demonstrando maior instabilidade de resultados. Em relação aos antioxidantes comerciais, o BHT apresentou o menor IC<sub>50</sub>, sendo necessária a concentração de 0,0548 mg/mL para reduzir a presença do radical em 50%.

A terceira metodologia utilizada para determinar a atividade antioxidante do OE da guavira, baseia-se na capacidade do OE em reduzir o complexo férrico (Fe<sup>+3</sup>) em complexo ferroso (Fe<sup>+2</sup>). Em condições ácidas e na presença do TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) a redução é determinada pela intensidade da coloração azul, obtida pela medida da absorbância a 595 nm. Portanto o método FRAP é utilizado para avaliar o potencial redutor da amostra, quanto maior a intensidade da coloração da reação da mostra com o complexo ferrico, maior será a atividade antioxidante.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para o OE de resíduo guavira por FRAP.

Tabela 3. Capacidade de redução do Ferro e Concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) do óleo essencial de guavira e do ácido ascórbico obtido pelo método FRAP

| Amostra         | μmol sulfato ferroso | IC <sub>50</sub> (mg/mL) |
|-----------------|----------------------|--------------------------|
| OE              | 393,2474 ± 5,8406    | 0,5827 ± 0,43            |
| Ácido Ascórbico | 18902,2079           | -                        |

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

A capacidade de redução do complexo férrico do OE foi de 393,25 μmol FeSO<sub>4</sub>/g OE, quando comparado com o OE de *Myrcia sylvatica* (193,47 μmol sulfato ferroso/g), relatados por Silva et al (2018), os resultados encontrados no presente trabalho, utilizando o método

FRAP, indicam que o OE de *Campomanesia sp* tem maior potencial redutor do complexo  $\text{Fe}^{2+}$  quando comparado com outros óleos analisados na literatura.

No que se refere ao  $\text{IC}_{50}$  do OE (0,5827 mg/mL), o valor foi menor ao encontrado por Nie et al (2022), para o OE de *Myrcia sylvatica* ( 0,862 mg/mL). Esses resultados corroboram com a capacidade de redução do complexo férrico. Porém o valor do erro para o  $\text{IC}_{50}$  por FRAP demonstra baixa repetibilidade dos resultados de percentual de inibição, quando comparado à mesma repetibilidade para o cálculo em  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ .

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química do óleo essencial de *Campomanesia sp* apresentou componentes majoritários referenciados com atividade biológica microbiana, inferindo-se que o óleo obtido de resíduos do despulpamento da guavira pode apresentar diferentes potenciais de aplicação. O uso do óleo na indústria de alimentos pode ser inserido como aromatizante, melhorar o aporte da polpa e até mesmo como agente quelante, visto seu resultado em FRAP.

Dos três métodos avaliados, os métodos ABTS e FRAP foram os que apresentaram resultados de atividade antioxidante do óleo essencial de resíduos de *Campomanesia sp*. O óleo essencial de resíduos de guavira apresentou atividade antioxidante em todos os métodos utilizados, porém menores com a atividade antioxidante encontrada por outros óleos essenciais pelas mesmas metodologias. O método DPPH foi considerado o menos eficiente, indicando baixa eficiência para amostras lipofílicas.

A adaptação do protocolo foi bem executada para o método de ABTS com boa repetibilidade para determinação de atividade antioxidante do óleo essencial obtido de resíduos do despulpamento de *Campomanesia sp*. Para trabalhos futuros indica-se avaliar outras atividades biológicas do óleo essencial a partir da composição química obtida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. M.; ALVES, M. S. O.; FERNANDES, T. O.; NAVES, R. V.; NAVES, M. M.V. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabioba. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 35, n. 3, p. 837-844, 2013.
- ASIF, M.; YEHYA, A.H.S.; DAHHAM, S.S.; MOHAMED, S. K.; SHAF AEI, A.; EZZAT, M. O.; MAJID, A. S. A.; OON, C. E.; MAJID, A. M. S. A. Establishment of in vitro and in vivo anti-colon cancer efficacy of essential oils containing oleo-gum resin extract of *Mesua ferrea*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1620–1629, 2019.
- AYSELI, M. T.; İPEK AYSELI, Y. Flavors of the future: Health benefits of flavor precursors and volatile compounds in plant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 69–77, fev. 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, abr. 1958
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie**, v. 28, p.25-30, 1995.
- BREDA, C. A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CORREIA, C. A. C. Shelf life of powdered *Campomanesia adamantium* pulp in controlled environments. **Food Chemistry**, v. 135, p.2960 – 2964, 2012.
- BUCHBAUER, G.; BOHUSCH, R. **Biological activities of essential oils an update. In: Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.** Edit., Başer KHCaB, G., 281–307, CRC Press, Boca Raton, USA (2016).
- CARDOZO, C. et al. Therapeutic Potential of Brazilian Cerrado *Campomanesia* Species on Metabolic Dysfunctions. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2336, 13 set. 2018.
- CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, p. 111500, ago. 2019.
- COUTINHO, I.D. **Estudo químico e atividades biológicas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae).** Campo Grande, 2008. 159p. Dissertação (mestrado em Química), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

COUTINHO, I. D.; POPPI, N. R.; CARDOSO, C. L. Identification of the Volatile Compounds of Leaves and Flowers in Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 5, p. 405–407, set. 2008.

DONADO-PESTANA, C. M. et al. Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 69, p. 170–178, mar. 2015.

DUARTE, L. de S., PEREIRA, M. T. M., PASCOAL, v. D'Á. B., PASCOAL, A. C. R. F. *Campomanesia* genus – a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. **Eclética Química Journal**, v. 45, n.2, 2020.

FERNANDES, T. de O.; ÁVILA, R. I. de; MOURA, S. S.; RIBEIRO, G. de A.; NAVES, M. M. V.; VALADARES, M. C. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology reports**, v. 2, p. 184-193, 2015.

FLORA DO BRASIL. *Myrtaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. 2020b. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <[Flora e Funga do Brasil - Myrtaceae Juss.](#)>. Acesso em: 11 de abril de 2022.

FREITAS, THAÍS PÁDUA de. **Pós-colheita de uvaia: caracterização de acessos e estádios de maturação**. Universidade de São Paulo, 26 de outubro de 2017. <https://doi.org/10.11606/D.11.2017.tde-16102017-180336>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

FREITAS, I. R.; CATTELAN, M. G. Antimicrobial and antioxidant properties of essential oils in food systems – an overview. **Microbial Contamination and Food Degradation**, p. 443 – 470, 2018.

HAN, Y.; CHEN, W.; SUN, Z. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Safety**, 15 ago. 2021.

**ISO 9235:2013. ISO/TC 54 - Essential oils**. Disponível em: <<https://www.iso.org/committee/48956.html>>. Acesso em: 3 dez. 2022.

KALUA. C.M., ALLEN. M.S., BEDGOOD. D.R., BISHOP. A.G., PRENZLER. P.D., ROBARDS. K., Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review, **Food Chemistry**, volume 100, issue 1, 2007, pages 273-286, ISSN: 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>. Acesso em 13 de maio de 2022.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009. ISSN 1936-9751.

KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KUSKOSKI, E.M., VEGA, J.M., RIOS, J.J., FETT, R., TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agriculture and Food Chemical**, v.51, p.5450-5454, 2003.

- LEÃO, M. M et al. The Potencial of *Campomanesia phaea* O. Berg Landrum (Cambuci) as Natural Source of Vitamin C. **Athens Journal of Sciences**, v. 4, n. 1, p. 37–46, 28 fev. 2017
- LIMA A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.). **Tese**. [Doutorado em Bromatologia] - **Universidade de São Paulo**; 2008.
- LIMA, I. O. et al. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 199–203, jun. 2005.
- LIMA, N. de; ARAKAKI, D. G.; TSCHINKEL, P. F. S.; SILVA, A F. da.; GUIMARÃES, R. de C. A.; HIANE, P. A.; NASCIMENTO, v. A. do. Investigation of *Campomanesia* Components: A Fruit of Brazilian Cerrado. In: **Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants**; In: Tech: Houston, TX, USA, 2017.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.
- MORRY, J, NGAMCHERDTRAKUL. W, YANTASEE. W, Oxidative stress in cancer and fibrosis: opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles, **Redox Biology**, v. 11, p. 240-253, 2017. ISSN 2213-2317.
- NIE, X. et al. Identification of antioxidant ingredients by GC-MS from the essential oil of Purple *Eleutherococcus simonii* leaves. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.
- NUCCI, M.; ALVES-JUNIOR, V. V. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. - Myrtaceae em área de cerrado no sul do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 42, n. 2, p. 127 – 131, 2017.
- OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 502–510, jun. 2016.
- OLIVEIRA, V. S. de; ARGANDOÑA, E. J. S.; OSHIRO, A. M. Atomização e liofilização da polpa de *Campomanesia adamantium*: influência das variáveis de processo na retenção de vitamina C. **Novas Edições Acadêmicas**, 2018.
- PACHECO, L. A. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of *Campomanesia aurea* against three strains of *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, p. 69–76, fev. 2021.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- OUEDRHIRI, W., et al. Boosted Antioxidant Effect Using a Combinatory Approach with Essential Oils from *Origanum Compactum*, *Origanum Majorana*, *Thymus Serpyllum*, *Mentha Spicata*, *Myrtus Communis*, and *Artemisia Herba-Alba*: Mixture Design Optimization. **Plants**,

vol. 10, no. 12, 1 Dec. 2021, p. 2817, [www.mdpi.com/2223-7747/10/12/2817](http://www.mdpi.com/2223-7747/10/12/2817), 10.3390/plants10122817. Accessed 2 Nov. 2022.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, maio 1999.

REHMAN, Z. U.; CHAND, N.; KHAN, R. U. The effect of vitamin E, l-carnitine, and ginger on production traits, immune response, and antioxidant status in two broiler strains exposed to chronic heat stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 34, p. 26851–26857, 30 set. 2017.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 22, e 2017150, 2019.

REUTER, S. et al. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, pp. 1603–1616, 1 Dec. 2010.

ROMEILAH, R. M., et al. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Artemisia Monosperma* L. And *Tamarix Aphylla* L. Essential Oils. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 49, n. 1, p. 12233, 11 Feb. 2021.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006; 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125)

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M. DE; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007; 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128)

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M. DE; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH•**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127).

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. **ResearchGate**, p. 1 – 30, 2019.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, n. 1-2, p. 103–119, ago. 2002.

SETTHARAKSA, S.; SONGSANGSIRISAK, C.; MONTON, C. Computer-based estimation of antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* L. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 2018

SILVA WS. Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira. **Dissertação** [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - **Universidade Federal do Ceará**; 2008.

SILVA, L. A. DA et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, 2018.

SILVA, R. L. et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, p. 114568, abr. 2022.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, jan. 2013.

SOUSA, A. et al. Antioxidant Properties of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. Essential Oil and Its Inclusion Complex with  $\beta$ -Cyclodextrin Prepared by Spray Drying. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022.

SOUZA, J. L. da C.; BORGES E SILVA, L.; REGES, N. P. R.; MOTA, E. E. S.; LEONÍDIO, R. L. Caracterização física e química de gabioba e murici. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p.792 – 800, 2019.

SRIPAHCO, TEERAPONG, et al. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity of *Elsholtzia beddomei* C. B. Clarke Ex Hook. F. essential oil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, Feb. 2022.

STEFANELLO, M.E.A. et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. obtecta, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TEDESCO, L.; BORTOLUCCI, W. de C.; SILVA, E. S.; GONÇALVES, J. E.; COLAUTO, N. B.; GAZIM, Z. C.; LINDE, G. A. Phenological stage of jaboticaba tree (*Plinia cauliflora*) in the chemical composition of the essential oil of the leaves and antioxidant activity: **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e396997305, 2020.

VALAREZO, E.; LUDENÑA, J.; ECHEVERRIA-CORONEL, E.; CARTUCHE, L.; MENESES, MA; CALVA, J.; MOROCHO, v. Composição enantiomérica, capacidade antioxidante e atividade anticolinesterase de óleo essencial de folhas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Plantas**, v. 11, n. 3, p.367, 2022.

VALLI, M.; RUSSO, H.M.; BOLZANI, v. S. The potential contribution of the natural products from brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n.1, p. 793-778, 2018.

VALLILO, M.I. ET AL. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg - Myrtaceae. **Revista Do Instituto Florestal**, v. 18, n. único, p.15-22, 2006.



VALLILO, MARIA ISABEL ET AL. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg - Myrtaceae. **Food Science and Technology** [online], v. 28, p. 231-237, 2008.

VANDGHANOONI, S. et al. Cytotoxicity and DNA Fragmentation Properties of Butylated Hydroxyanisole. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 98–103, mar. 2013.

VIEIRA, M. DO C. et al. Diversidade fenotípica em caracteres de frutos e germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* Camb. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 117, n. 2, p. 223–230, 2018.

VISCARDI, D. Z.; ARRIGO, J. DA S.; CORREIA, C. DE A. C.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; MALDONADE, I. R.; ARGANDOÑA, E. J. S. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. **Plos One**, v. 12, n.2, 2017

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidant activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemical**, v.52, p.592-596, 2004;

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WHYSNER, J. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 1027–1038, set. 1999.

## **APÊNDICE**

Apêndice 1 - Protocolo de determinação de atividade antioxidante por ABTS para óleo essencial.

# DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEO

## ESSENCIAL POR CAPTURA DO RADICAL ABTS<sup>•+</sup>

Loyz Sousa Assis; Márcia Crestani Bin; Eliana Janet Sanjinez-Argandoña

### 1. INTRODUÇÃO

O método mais comum para determinar a atividade antioxidante total em compostos lipofílicos e hidrofílicos, incluindo flavonoides, carotenoides e antioxidantes plasmáticos é a captura do radical 2,2-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). A formação do radical ABTS<sup>•+</sup> ocorre com a oxidação com persulfato de potássio, e a atividade antioxidante de um determinado produto é medida com a redução dos radicais livres de ABTS<sup>•+</sup>, na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio.

Ao determinar a atividade antioxidante, o efeito da concentração do óleo essencial dito antioxidante e da duração da reação na inibição do radical (cátion) deve ser considerado, uma vez que dependendo dos componentes químicos presentes no óleo essencial antioxidante, estes poderão influenciar no tempo de reação, o que pode ser verificado por meio de cinéticas de reação induzida em diferentes tempos e em condições de ambiente controlado (RE et al., 1999). A fim de verificar a efetividade do método, frequentemente é empregado o antioxidante padrão Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacroman-2-carboxílico)

### 2. REAGENTES E SOLUÇÕES

- Água destilada;
- Etanol PA;
- Persulfato de Potássio - PM: 270,39 g/mol;
- ABTS [2,2 azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)];
- Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) - PM: 250,29 g/mol;
- Butil Hidroxi Tolueno - BHT;
- Ácido ascórbico PA - AA;
- Óleo essencial

### 3. EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS NECESSÁRIAS

- Agitador de tubos Vortex;
- Balança analítica;
- Balões volumétricos 10 mL e 50 mL;

- Béquer 250 mL;
- Cronômetro digital;
- Cubetas de quartzo;
- Espectrofotômetro UV Visível;
- Grades para tubos de ensaio;
- Pipetas automáticas (10 µL - 200 µL; 10 - 1000 µL; 1000 µL - 5000 µL);
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL).

#### 4. PREPARO DE SOLUÇÕES

##### A) Solução Estoque de ABTS (7 mmol/L)

Pesar 192 mg de ABTS e dissolver em água destilada, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada.

Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar.

Armazenar em geladeira (7 a 10 °C) por até 30 dias.

##### B) Solução de Persulfato de Potássio (140 mmol/L)

Pesar 378,4 mg de persulfato de potássio e dissolver em água destilada;

Transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com água destilada;

Homogeneizar e transferir para frasco de vidro âmbar;

Armazenar em temperatura ambiente (20 a 25 °C) por até 30 dias.

##### C) Preparo do Radical ABTS<sup>•+</sup>

Misturar 5 mL da solução estoque ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio, homogeneizar e transferir para frasco de vidro âmbar;

Manter a solução no escuro, em temperatura ambiente por 16 horas.

Após 16 horas, transferir uma alíquota de 1 mL da solução, em um bequer de 250 mL, e diluir com 100 mL de álcool etílico PA, e ir adicionando aos poucos mais álcool etílico até obter uma absorbância de  $0,7 \pm 0,05$ , a 734 nm, em espectrofotômetro. O espectrofotômetro deverá ter sido previamente zerado com álcool etílico PA.

Preparar e usar no dia da análise.

Verificar a absorbância da solução a cada 3 horas (sempre manter a solução com absorbância de  $0,7 \pm 0,05$ ).

##### D) Solução Padrão de Trolox (2 mmol/L ou 0,5 mg/mL)

Pesar 25 mg de Trolox e dissolver em álcool etílico PA;

Transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com álcool etílico PA.

Homogeneizar e transferir para frasco de vidro âmbar.

Preparar e usar somente no dia da análise.

**E) Solução mãe de Butil Hidroxi Tolueno – BHT (0,5 mol/L)**

Pesar 150 mg de BHT e dissolver em álcool etílico PA;

Transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com álcool etílico PA.

Homogeneizar e manter em local protegido de luz.

Preparar e usar somente no dia da análise.

**F) Solução mãe de ácido ascórbico (1 mg/mL)**

Pesar 50 mg de ácido ascórbico e dissolver em água destilada;

Transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada.

Homogeneizar e manter em local protegido de luz.

Preparar e usar somente no dia da análise.

**G) Solução mãe de óleo essencial – OE (2 mg/mL)**

Pesar 20 mg de OE e dissolver em álcool etílico PA;

Transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com álcool etílico PA.

Homogeneizar e transferir para frasco de vidro âmbar.

Manter sob congelamento a -4 °C por até 30 dias.

## **5. DILUIÇÕES E CURVAS ANALÍTICA**

Os pontos de diluição devem conter fator de diluição, que deve ser calculado a partir da equação 1.

$$FD = \frac{\text{Volume final no tubo de ensaio}}{\text{Volume de amostra}} \quad \text{Equação 1}$$

Exemplo:

$$FD = 3000 \mu\text{L} (2900 \mu\text{L ABTS} + 100 \mu\text{L amostra}) / 100 \mu\text{L}$$

$$FD = 30$$

### **CURVA ANALÍTICA DE TROLOX**

A partir da solução padrão de Trolox (2 mmol/L) preparar seis diluições com álcool etílico PA, em tubo de ensaio de 8 mL, com auxílio de pipetadores automáticos de 100 µL – 1000 µL e 1000 µL – 5000 µL, de acordo com a Tabela 1, em diluição seriada.

Tabela 1. Preparo das diluições para a curva-padrão de Trolox (2 mmol/L)

| Nº | Padrão de Trolox (µL) | Álcool etílico (µL) | Concetração na diluição (µmol/L) | Concentração final c/ FD 30 (µmol/L) |
|----|-----------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1  | 900                   | 2100                | 20                               | 600                                  |
| 2  | 2250                  | 750                 | 15                               | 450                                  |
| 3  | 1500                  | 1500                | 7,5                              | 225                                  |
| 4  | 1500                  | 1500                | 3,75                             | 112,5                                |
| 5  | 1500                  | 1500                | 1,875                            | 56,25                                |
| 6  | 2400                  | 600                 | 1,5                              | 45                                   |

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022.

## DETERMINAÇÃO DA CURVA

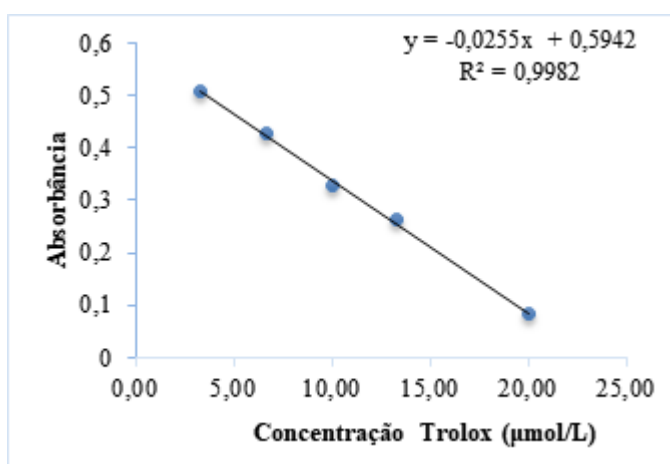
Fazer em triplicata e em protegido de luz.

Transferir 100 µL de cada solução diluída de Trolox, conforme a Tabela 1, para tubos de ensaio com tampa rosqueada. Adicionar 2900 µL da solução radical ABTS<sup>•+</sup>. Homogeneizar em *Vórtex* por 30 segundos.

Deixar reagir por 6 minutos, incubado em ambiente protegido de luz e à temperatura ambiente. Realizar a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 734 nm, previamente calibrado álcool etílico PA.

Plotar o gráfico absorbância vs concentração de Trolox a partir dos valores médios das leituras de absorbância para cada solução diluída. Linearizar os pontos e obter a equação da reta, como por exemplo mostrado na Figura 1.

Figura 1. Curva padrão de Trolox



Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022

### **CURVA DO CONTROLE POSITIVO BHT**

A partir da solução mãe de BHT (0,5 mol/L) preparar, em tubos de ensaio (8 mL), conforme Tabela 2, uma diluição seriada, com auxílio de pipetas automáticas de 10 µL a 1000 µL. Concentração final considerando fator de diluição (FD) 30.

Tabela 2. Preparo das diluições para a curva do antioxidante comercial BHT (0,5 mol/L)

| Nº | Padrão de BHT (µL) | Álcool etílico (µL) | Concetração na diluição (µmol/L) | Concentração final c/ FD 30 (µmol/L) |
|----|--------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1  | 3000               | 0                   | 500                              | 15000                                |
| 2  | 300                | 2700                | 50                               | 1500                                 |
| 3  | 1500               | 1500                | 25                               | 750                                  |
| 4  | 1200               | 1800                | 10                               | 300                                  |
| 5  | 2250               | 750                 | 7,5                              | 225                                  |
| 6  | 2000               | 1000                | 5                                | 150                                  |

Fonte: Elaborada pelas autoras, 2022.

### **CURVA CONTROLE POSITIVO ÁCIDO ASCÓRBICO**

A partir da solução mãe de ácido ascórbico (1 mg/mL), preparar, em tubos de ensaio (8 mL), conforme Tabela 3 uma diluição seriada, com auxílio de pipetas automáticas de 10 µL a 1000 µL. e 1000 µL - 5000 µL. Concentração final considerando fator de diluição (FD) 30.

Tabela 3. Preparo das diluições para a do antioxidante Ácido ascórbico - AA (1 mg/mL).

| Nº | Padrão de AA (µL) | Álcool etílico (µL) | Concetraçã o na diluição (µg/mL) | Concentraçã o final c/ FD 30 (µg/mL) |
|----|-------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1  | 1800              | 1200                | 20                               | 600                                  |
| 2  | 720               | 2280                | 8                                | 240                                  |
| 3  | 450               | 2550                | 5                                | 150                                  |
| 4  | 180               | 2820                | 2                                | 60                                   |
| 5  | 45                | 2955                | 0,5                              | 15                                   |
| 6  | 18                | 2982                | 0,2                              | 6                                    |

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022.

## CURVA DE DILUIÇÃO DO OLEO ESSENCIAL (OE)

A partir da solução mãe de OE (2 mg/mL) preparar, em tubos de ensaio (8 mL), uma diluição seriada conforme Tabela 4, com auxílio de pipetas automáticas de 10 µL a 1000 µL. e 1000 µL - 5000 µL.

Tabela 4. Preparo das diluições da amostra óleo essencial (OE) a partir da solução mãe da amostra OE (2 mg/mL).

| Nº | Padrão de OE (µL) | Álcool etílico (µL) | Concetação na diluição (µg/mL) | Concentração final c/ FD 30 (µg/mL) |
|----|-------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1  | 3000              | 0                   | 500                            | 15000                               |
| 2  | 300               | 2700                | 50                             | 1500                                |
| 3  | 1500              | 1500                | 25                             | 750                                 |
| 4  | 1200              | 1800                | 10                             | 300                                 |
| 5  | 2250              | 750                 | 7,5                            | 225                                 |
| 6  | 2000              | 1000                | 5                              | 150                                 |

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022.

## 6. ENSAIO

### FAZER TODO O PROCEDIMENTO NO ESCURO

Uma vez realizadas as curvas padrão, realizar o ensaio experimental com a amostra, para isto, em tubos de ensaio pipetar a solução do OE e a solução do radical ABTS da seguinte maneira:

**100 µL da diluições OE + 2900 µL Solução ABTS<sup>•+</sup>**

Fazer triplicata da leitura no espectrofotômetro do branco (100 µL etanol + 2900 µL Solução ABTS<sup>•+</sup>)

Agitar a mistura em *Vortex* por 30 segundos,

Deixar reagir por 40 minutos (com cronômetro) em local escuro, à temperatura ambiente).

Fazer para cada diluição três repetições (triplicata).

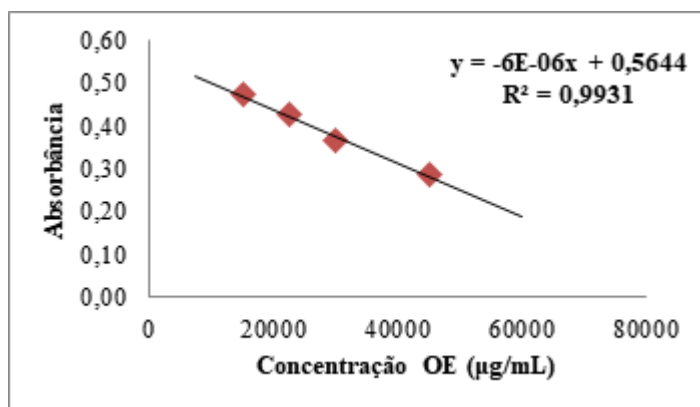
Transferir a mistura para cubetas de vidro 4 mL;

Realizar a leitura da absorbância da mistura, a 734 nm, em espectrofotômetro, previamente zerado com etanol;

Plotar o gráfico absorbância em função concentração de OE a partir dos valores médios das leituras de absorbância para cada solução diluída do OE. Linearizar os pontos, como por exemplo, mostrado na Figura 2.



Figura 2. Curva de Absorbância de OE



Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022.

## 7. CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM µM TE/g

A partir da equação da reta obtida na curva-padrão Trolox (Figura 1), encontrar a absorbância (y) correspondente a concentração de 1000 µM de trolox (x).

Exemplo:

$$y = -0,0255x + 0,5942$$

$$y = -0,0255 \times 1000 + 0,5942$$

$$y = -24,9058 \text{ µmol/L de Trolox.}$$

Com o valor de y calculado (-24,9058), substituí-lo na equação da reta obtida no gráfico da leitura da amostra do OE (Figura 2) para encontrar o valor de x que será a diluição equivalente à 1000 µmol de trolox, em mg/L. (x)

Exemplo:

$$y = -0,000006x + 0,5644$$

Como y encontrado na curva analítica de Trolox é -24,9058, temos que x é:

$$-24,9058 = -0,000006x + 0,5644$$

$$x = 4245033,334 \text{ mg/L} - \text{essa é a concentração de OE equivalente a } 1000 \text{ µmol de Trolox}$$

Para encontrar a diluição em gramas fazer a conversão:

$$X(g) = \frac{x(mg/L)}{1000} \quad \text{Equação 2}$$

Exemplo:

$$X(g) = 4245033,334/1000$$

$$X(g) = 4254,034 \text{ g/L}$$

E para obter o resultado final em  $\mu\text{M}$  de trolox equivalente fazer a seguinte conversão:

$$Z = \frac{1000\mu\text{mol/L de Trolox equivalente}}{X(\text{g/L})}$$

Exemplo:

$$Z = \frac{1000\mu\text{mol/L Trolox equivalente}}{4245,034\text{g}}$$

$$Z = 0,2356\mu\text{mol de TE/g}$$

## 8. CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA $\text{IC}_{50}$

Realizar o cálculo do percentual de inibição das absorbâncias de cada diluição do OE através da equação 3:

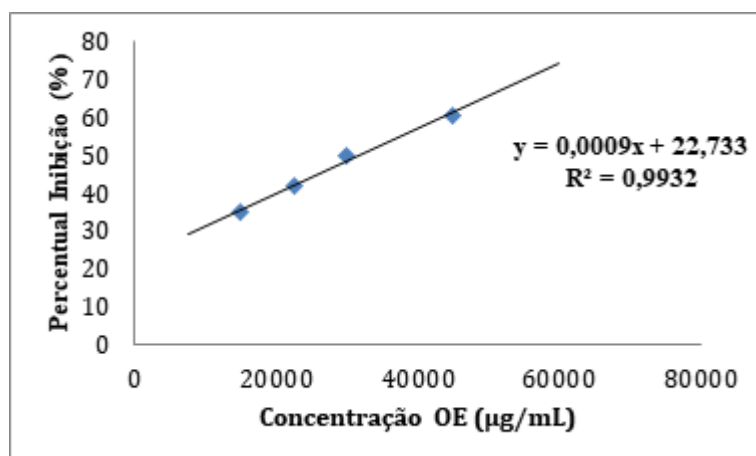
$$\text{Perc. Inib. (\%)} = \frac{(\text{Abs. Controle neg.} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. Controle neg.}} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Obter a média dos percentuais de inibição para cada diluição do óleo, do BHT e do AA.

Plotar o gráfico percentual de inibição vs concentração de OE ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Linearizar os pontos do gráfico e obter a equação da reta, como por exemplo, mostrado na Figura 3.

Figura 3. Percentual de inibição do OE



Fonte: Elaborado pelas autoras, 2022.

Na equação da reta obtida o valor de  $y$  é a captura do radical livre em 50% e  $x$  é a concentração da amostra (mg/mL) capaz de reduzir/capturar o radical  $ABTS^{\cdot+}$  em 50%, de acordo com a equação 4.

$$x = IC50 = \frac{50-b}{a \times 1000} \quad \text{Equação 4}$$

Exemplo:

$$y = 0,0009x + 22,733$$

$$y = 50$$

$$x = (50 - 22,733) / 0,0009 \times 1000$$

$$x = 30,297 \text{ mg/mL}$$

### Referência bibliográfica

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVAN, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ - JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup>**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006; 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

VALAREZO, E.; LUDEÑA, J.; ECHEVERRIA-CORONEL, E.; CARTUCHE, L.; MENESES, MA; CALVA, J.; MOROCHO, v. Composição enantiomérica, capacidade antioxidante e atividade anticolinesterase de óleo essencial de folhas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Plantas**, v. 11, n. 3, p.367, 2022. Método adaptado em 31/10/2022.