



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

CAMILA DE AZEVEDO CHAVES CORREIA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS
ESSENCIAIS DA CASCA E SEMENTE DE *Campomanesia*
adamantium

CAMILA DE AZEVEDO CHAVES CORREIA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS
ESSENCIAIS DA CASCA E SEMENTE DE
Campomanesia adamantium

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito à obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Janet Sanjinez Argandona

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C824o Correia, Camila De Azevedo Chaves
Obtenção de extratos vegetais e óleos essenciais da casca e
semente de *Campomanesia adamantium* / Camila De Azevedo Chaves
Correia -- Dourados: UFGD, 2017.
81f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliana Janet Sanjinez Argandoña

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) -
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da
Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Guavira. 2. Hidrodestilação. 3. Extração supercrítica. 4. perfil
volátil. 5. atividade antimicrobiana. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Obtenção de extratos e óleos essenciais da casca e semente de *Campomanesia adamantium*", de autoria de Camila de Azevedo Chaves Correia, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof.ª Dr.ª Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Presidente da banca examinadora

Prof.ª Dr.ª Ayd Mary Oshiro
Membro Examinador (UNIGRAN)

Prof.ª Dr.ª Cristina Tostes Filgueiras
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de julho de 2016.

DEDICATÓRIA

A Deus e aos ensinamentos da Seicho-No-Ie

Aos meus pais, Irene e Sérgio

Pela oportunidade de nascer nesta vida e por todo o apoio me dado no decorrer dos meus 28 anos e para sempre. Amo vocês.

Aos meus irmãos Mateus, Isadora, Thaísa e Kauhê

Por toda paciência e encorajamento para que eu corresse atrás dos meus sonhos.

A minha tia Ana Suely

Que sempre esteve ao meu lado me amparando e me dando a força necessária para enfrentar meus medos.

Ao meu padrinho, Tio Deda

Que, com seu "jeito especial", sempre me estimulou a estudar muito.

AGRADECIMENTO

À minha mãe e irmão, Irene e Mateus, por terem ficado ao meu lado todos esses anos de mestrado. Amo vocês.

Ao mestre Masaharu Taniguchi por ter nos transmitido este sublime ensinamento - Seicho-No-Ie, que por muitas vezes foi o meu esteio para não desistir.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Eliana Janet Sanjinez Argandoña, pela oportunidade e por acreditar no meu potencial desde a graduação; pelo convívio e conselhos valiosos que foram mais que fundamentais para hoje eu ser a profissional que sou.

À Prof^a Dr^a Claudia Andréa Lima Cardoso (UEMS – Dourados) pelo auxílio com as análises de cromatografia.

À Dr^a Iriani Rodriguez Maldonado (Embrapa/Brasília) e a Prof^a Dr^a Eliana dos Santos Leandro (UnB/Brasília) pelo auxílio com as análises microbiológicas e pelo agradável convívio durante a minha passagem por Brasília.

À Crícia, Ester e Pedro pelas risada, cada música do “Chupacabra” e plaqueamento, pela amizade e por tudo que vivemos na UnB.

Aos meus queridos amigos da Seicho-No-Ie de Brasília, pelo acolhimento e amor dedicado a mim nesta cidade que se tornou especial em meu coração.

Aos meus queridos amigos da Seicho-No-Ie de Dourados que sempre ao meu lado estiveram e me ensinaram muito sobre a vida.

Aos meus amigos “geppaquianos” que sem vocês não teria sido nada fácil. Em especial a Priscilla, Fernando, Ariana, Vinícius, Carol Breda, Denise, Aline, Ana Fraire, Elaine, Nailene, Lucas, que faziam do meu dia no laboratório, o melhor e mais divertido do mundo. A pesquisa sem vocês perderá um pouco de graça. Podem contar comigo sempre que precisarem.

Aos técnicos administrativos Mari, Andressa, Ligia, Wagner e José que desde o começo me acolheram, me ajudaram e se tornaram grandes amigos.

À UFGD e ao GEPPAC pelo espaço concedido para o desenvolvimento da dissertação.

À CAPES pelo apoio financeiro

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHT: *Butil-hidroxi-tolueno*

B_m: Massa da amostra

Da: Daltons

DAD: Detector de arranjo de diodos

DNA: ácido desoxirribonucleico

EAC: Extrato aquoso da casca

EACC: Extrato acetona da casca

EACS: Extrato acetona da semente

EAEC: Extrato acetato de etila da casca

EAES: Extrato acetato de etila da semente

EAS: Extrato aquoso da semente

EEC: Extrato etanólico da casca

EES: Extrato etanólico da semente

EHC: Extrato hexânico da casca

EHS: Extrato hexânico da semente

EMC: Extrato metanólico da casca

EMS: Extrato metanólico da semente

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IRT: Índice de retenção

LDL: *Low density lipoprotein*

mgCAT: miligrama equivalente de catequina

mgGAE: miligrama equivalente de ácido gálico

mgQUE: miligrama equivalente de quercetina

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

O.E: Óleo essencial

P: Pressão

R: Rendimento

RNA: ácido ribonucleico

T: Temperatura

Ubs: Umidade base seca

UFC: Unidade Formadora de Colônias

v/v: Volume/volume

v_i : Volume inicial

V_o : Volume de óleo essencial extraído

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura dos extratos obtidos a partir da casca e da semente da <i>Campomanesia adamantium</i> com diferentes solventes.....	27
Tabela 2	Rendimento em extrato obtido de casca e semente de guavira em diferentes solventes.....	37
Tabela 3	Rendimento em óleo essencial da casca e de semente de guavira extraídos por hidrodestilação e extração supercrítica.....	38
Tabela 4	Componentes majoritários do óleo essencial extraído da casca de guavira por hidrodestilação (tempo de 3 h e 5 h) e por extração supercrítica (tempo de 3 h).....	43
Tabela 5	Componentes majoritários dos óleos essenciais extraídos da semente de guavira por hidrodestilação (tempo de 3 h e 5 h) e por extração supercrítica (tempo de 3 h e 5 h).....	45
Tabela 6	Teor de compostos fenólicos da casca e da semente de <i>Campomanesia adamantium</i> obtidos por diferentes sistemas extrativos.....	47
Tabela 7	Teores de flavonoides da casca e da semente de <i>Campomanesia adamantium</i> obtidos por diferentes sistemas extrativos.....	48
Tabela 8	Teores de taninos da casca e da semente de <i>Campomanesia adamantium</i> obtidos por diferentes sistemas extrativos.....	49
Tabela 9	Atividade antioxidante dos diferentes solventes extrativos na casca e semente de <i>C. adamantium</i> e BHT pelos métodos de sequestro de radicais DPPH (IC ₅₀) e ABTS (μM trolox.g ⁻¹ de amostra).....	52
Tabela 10	Atividade antioxidante do óleo essencial extraído por hidrodestilação pelo período de 3 h da casca e semente de <i>Campomanesia adamantium</i> e BHT pelos métodos de sequestro de radicais DPPH (IC ₅₀) e ABTS (μM trolox.g ⁻¹ de extrato).....	53
Tabela 11	Atividade antimicrobiana em meio líquido dos extratos e óleos essenciais (hidrodestilação) da casca e semente de guavira.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Campomanesia adamantium</i>	16
Figura 2	Exemplos de estruturas químicas de mono e sesquiterpenos presentes no óleo essencial da casca e/ou semente de <i>Campomanesia adamantium</i>	18
Figura 3	Aparelho tipo Clevenger modificado.....	28
Figura 4	Perfis cromatográficos dos extratos das cascas desidratadas de <i>C. adamantium</i> . Extrato aquoso-EAC (a); Extrato metanólico-EMC (b); Extrato metanol:acetona-EMAC (c); Extrato hexânico-EHC (d); Extrato etanólico-EEC (e); Extrato acetona 70%-EACC (f); Extrato acetato de etila-EAEC (g).....	40
Figura 5	Espectros da casca de guavira no comprimento de onda Ultra Violeta Visível (UV) correspondentes aos picos predominantes obtidos nos cromatogramas CG/MS dos extratos metanólicos, etanólicos e acetônicos.....	41
Figura 6	Perfis cromatográficos dos extratos das sementes desidratadas de <i>C. adamantium</i> . Extrato aquoso-EAS (a); Extrato metanólico-SEM (b); Extrato metanol:acetona-EMAS (c); Extrato hexânico-EHS (d); Extrato etanólico-EES (e); Extrato acetona-EACS (f); Extrato acetato de etila-EAES (g).....	42
Figura 7	Percentual de inibição do radical DPPH obtido nas análises da casca e semente de <i>C. adamantium</i> por diferentes sistemas extrativos com concentração de 500 µg.mL ⁻¹	51
Figura 8	Difusão em disco da <i>Streptococcus pyogenes</i> com o antibiótico cloranfenicol (30µg).....	57
Figura 9	Difusão em disco da <i>Pseudomonas</i> sp com antibiótico amicacina (30µg).....	57

RESUMO

A *Campomanesia adamantium* também conhecida como guavira, é uma espécie da família Myrtaceae, nativa do Cerrado brasileiro que cresce naturalmente em solos pobres. As partes raiz, caule e folhas da planta são empregadas no tratamento de diversas patologias, algumas com comprovação científica. Porém ainda são escassos os estudos com a casca e a semente do fruto que são descartados após o consumo da polpa. Neste contexto se estudou o extrato vegetal e o óleo essencial da casca e da semente do fruto de guavira em relação ao uso de solventes, métodos de extração, composição química, compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade biológica. A produção dos extratos vegetais foi realizada com sete solventes: água destilada, metanol 50%, etanol 70%, metanol 50%:acetona 70%, acetona 70%, n-hexano e acetato de etila. O etanol 70%, metanol 50% e o n-hexano foram os solventes mais eficientes no rendimento da extração. O extrato vegetal apresentou rendimento maior na semente (36 a 49%) com exceção da extração com água, seguido pela fração casca. Entre os métodos de extração, hidrodestilação e extração supercrítica, o processo supercrítico foi mais eficaz na obtenção do extrato global, porém a separação do óleo volátil foi maior na hidrodestilação. Observou-se predominância de componentes apolares na extração por solventes, com exceção do extrato aquoso. Os componentes majoritários identificados nos óleos essenciais da casca e da semente foram o Limoneno, Thujopseno e Bicyclogermacreno. O método e o tempo de extração foram fatores determinantes na composição química do óleo essencial. Os resultados mostraram que a variação entre os vários solventes para a obtenção dos extratos foi amplo, nomeadamente, para os polifenóis (156,25 a 3198 mg GAE.100g⁻¹ amostra), flavonoides (26,65 a 844 mg QUE. 100g⁻¹ amostra) e taninos condensados (184,70 a 4712,63 mg CAT. 100g⁻¹ amostra). A percentagem de inibição radicalar frente ao DPPH[•] variou de 20,04 a 86, 54%, e o efeito de captura radicalar de ABTS^{•+} foi de 15,16 a 178,43 μg trolox.g⁻¹ extrato. Para os óleos essenciais extraídos por hidrodestilação pelo período de 3 h, a atividade antioxidante frente ao DPPH foi de 3,13 \pm 0,78 mg amostra.mL⁻¹ de DPPH e 7,12 \pm 0,06 mg amostra.mL⁻¹ de DPPH para a casca e semente, respectivamente. Já para o ABTS obteve-se 2,75 \pm 0,78 μg trolox.g⁻¹ para a casca e 1,52 \pm 0,28 μg

trolox.g⁻¹ para a semente. Ensaio biológico pela técnica de microdiluição mostraram ação bacteriostática para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* dos extratos hexânico da casca e o acetato de etila da semente. Inibição de *Klebsiela* sp. foi observada no óleo essencial da casca extraído por hidrodestilação.

Palavras-chave: guavira; hidrodestilação; extração supercrítica; perfil volátil; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Campomanesia adamantium, also known as guavira, is a species of the family Myrtaceae, native to the Brazilian Cerrado that grows naturally in poor soils. The root, stem and leaf parts of the plant are used in the treatment of several pathologies, some with scientific proof. However, there are still few studies with the peel and the seed of the fruit that are discarded after the consumption of the pulp. In this context the vegetal extract and the essential oil of the bark and seed of the guavira fruit were studied in relation to the use of solvents, extraction methods, chemical composition, phenolic compounds, antioxidant activity and biological activity. The extracts were produced with seven solvents: distilled water, 50% methanol, 70% ethanol, 50% methanol: 70% acetone, 70% acetone, n-hexane and ethyl acetate. Ethanol 70%, methanol 50% and n-hexane were the most efficient solvents in extraction yield. The plant extract presented higher yield in the seed (36 to 49%), except for the extraction with water, followed by the bark fraction. Among the methods of extraction, hydrodistillation and supercritical extraction, the supercritical process was more efficient in obtaining the global extract, but the separation of the volatile oil was greater in hydrodistillation. Apolar components predominated in solvent extraction, with the exception of the aqueous extract. The major components identified in the essential oils of bark and seed were Limonene, Thujopsene and Bicyclogermacrene. The method and time of extraction were determinant factors in the chemical composition of the essential oil. The results showed that the variation among the various solvents to obtain the extracts was broad, namely, for polyphenols (156.25 to 3198 mg GAE.100g⁻¹ sample), flavonoids (26.65 to 844 mg QUE. 100g⁻¹ sample) and condensed tannins (184.70 to 4712.63 mg CAT.100g⁻¹ sample). The percentage of radical inhibition against DPPH• ranged from 20.04 to 86.54%, and the radical capture effect of ABTS•+ was 15.16 to 178.43 µg trolox.g⁻¹ extract. For the essential oils extracted by hydrodistillation for 3 h, the antioxidant activity against DPPH• was 3.13 ± 0.78 mg sample.mL⁻¹ of DPPH and 7.12 ± 0.06 mg sample.mL⁻¹ of DPPH for bark and seed, respectively. For ABTS, 2.75 ± 0.78 µg trolox.g⁻¹ was obtained for the bark and 1.52 ± 0.28 µg trolox.g⁻¹ for the seed. Biological assays by the microdilution technique showed bacteriostatic action for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* from the hexane extracts

of the bark and the ethyl acetate of the seed. Inhibition of *Klebsiela* sp. was observed in the essential oil of the bark extracted by hydrodistillation.

Keywords: guavira; Hydrodistillation; Supercritical extraction; Volatile profile; antimicrobial activity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE	15
3.2 GUAVIRA (<i>Campomanesia adamantium</i>)	15
3.3 EXTRATOS VEGETAIS	16
3.4 ÓLEO ESSENCIAL	17
3.4.1 EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	19
3.4.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	20
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	21
3.5.1. POLIFENÓIS	21
3.5.2. FLAVONOIDES	22
3.5.3. TANINOS	22
3.6 ANTIOXIDANTES	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATÉRIA-PRIMA	26
4.2 EXTRATO	26
4.2.1. PREPARO DOS EXTRATOS	26
4.2.2. COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS	27
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	28
4.3.1 HIDRODESTILAÇÃO	28
4.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	29
4.3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	29
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	30
4.4.1 POLIFENÓIS	30
4.4.2 FLAVONÓIDES	31
4.4.3 TANINOS	31
4.5 DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES	32
4.5.1 ABTS	32
4.5.2 DPPH	32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS	34

4.7.1. PREPARO DAS AMOSTRAS	34
4.7.2. MICRO-ORGANISMOS	34
4.7.3. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	35
4.7.4. TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO	35
4.7.5. TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. RENDIMENTO EM EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL	37
5.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS	39
5.2.1. CASCA	39
5.2.2. SEMENTE	41
5.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	42
5.4. ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	46
5.4.1. POLIFENÓIS	46
5.4.2. FLAVONOIDES	48
5.4.3. TANINOS	49
5.5. ANTIOXIDANTES	50
5.5.1. EXTRATOS	50
5.5.2. ÓLEO ESSENCIAL	53
5.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA	54
5.6.1. TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO	54
5.6.2. TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO	56
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	59
APÊNDICE A:	66
ESPECTROS ULTRA VIOLETAS DA CASCA E SEMENTE DE GUAVIRA	66
APÊNDICE B:	68
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE <i>C. adamantium</i>	68
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA SEMENTE DE <i>C. adamantium</i>	71
APÊNDICE C:	75
CURVAS DE CALIBRAÇÃO	75

1. INTRODUÇÃO

A *Campomanesia* sp (Myrtaceae) também conhecida como gabiroba, guabiroba, guavira ou guariroba é uma planta nativa do Brasil e abundante no Cerrado e na Mata Atlântica (RAMOS; CARDOSO; YAMAMOTO, 2007). Seus frutos são comestíveis com polpa de sabor e aroma agradáveis e normalmente consumida na forma de sucos, gelados comestíveis, entre outros. Porém, o resíduo do processamento da polpa atualmente não apresenta nenhuma aplicação industrial. Embora vários estudos mostrem o potencial das partes da planta para tratar inflamações e reumatismo (FERREIRA et al., 2013), úlceras (MARKMAM; BACCHI; KATO, 2004), hipercolesterolemia (BIAVATTI et al., 2004), diarreia, doenças renais (PIVA, 2002) e apresentarem atividade antibacteriana (PAVAN et al., 2009) e antiproliferativa (PASCOAL et al., 2014), são raras as pesquisas realizadas para o aproveitamento da casca e da semente dos frutos a fim de investigar o uso alimentar, atividades biológicas ou auxiliar na conservação de espécies e garantir a viabilidade de produção.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) no início da década de 1990, a utilização de plantas para fins medicinais, para tratamentos, cura e prevenção de doenças era consumida por 65-80% da população dos países em desenvolvimento. Ao longo dos tempos plantas medicinais vêm sendo estudadas para comprovar esta ação medicinal (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005)

As plantas apresentam uma variedade de metabólitos secundários como terpenoides, alcaloides e flavonoides que possuem propriedades funcionais. Assim, os extratos e óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais ganham cada vez mais espaço tanto do ponto de vista industrial quanto artesanal, favorecidos pelos aromas e princípios ativos que permitem a elaboração de novos produtos para uso medicinal, alimentício ou cosmético. Na indústria alimentícia atuam como antioxidantes e antibacterianos, além de reproduzir o sabor e odor da planta utilizada.

Os extratos e óleos voláteis podem ser extraídos a partir de caules, flores, frutos e raízes por diferentes métodos, tais como hidrodestilação, destilação a

vapor, extração por solventes orgânicos, extração com fluido supercrítico, entre outros (SANTOS et al., 2004; CASSEL et al., 2009).

O método de extração e a composição natural da planta são fatores determinantes na quantidade de compostos químicos extraídos. A hidrodestilação é a técnica de extração mais empregada em pequena escala, porém o aquecimento do material pode alterar a composição final do óleo extraído (SANTOS et al., 2004). O uso de solventes orgânicos também é empregado para extrair componentes químicos, principalmente aqueles que possuem características apolares. Atualmente fluidos supercríticos compõem o método mais eficiente na extração de aromas naturais e não somente do óleo volátil, além de ser considerada como tecnologia limpa por fornecer produtos totalmente livres de resíduos de qualquer natureza. Para a indústria de alimentos, o solvente mais empregado na extração supercrítica é o dióxido de carbono por ser atóxico, inerte, não ser inflamável, ter moderada pressão e baixa temperatura (MEIRELES, 2006).

Os fenóis são divididos em três grupos: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Por sua vez, os ácidos fenólicos se subdividem em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico e ácido vanílico) e hidroxinâmicos (ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cumarínico). Os flavonoides incluem compostos como flavonóis, flavonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas, e os taninos incluem os ésteres de ácido gálico (HAIDA et al., 2011).

Muitos estudos realizados com a *Campomanesia sp.* visam apenas a análise do potencial antioxidante das folhas, sendo raros os trabalhos publicados sobre a semente e a casca (COUTINHO et al., 2010; KATAOKA; CARDOSO, 2013; SILVA; CARSO; RA-POPPI, 2009; FERREIRA et al., 2013; COUTINHO et al., 2009). Recentemente Gida e Marcini Filho (2006) mostraram a presença de compostos fenólicos nos frutos da guavira e estes compostos tem recebido muita atenção nos últimos anos.

Portanto, as possibilidades de obtenção de extratos vegetais e óleo essencial (O.E.) a partir das partes não comestíveis do fruto podem favorecer ao aumento do valor agregado e ao uso das plantas de forma sustentável.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos vegetais e óleos essenciais da casca e da semente de *Campomanesia adamantium*, determinar a composição química e avaliar a atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos da casca e da semente de guavira com diferentes solventes;
- Extrair óleo essencial da casca e da semente do fruto da guavira por hidrodestilação e por extração supercrítica;
- Determinar os constituintes químicos dos extratos vegetais e dos óleos essenciais;
- Determinar compostos fenólicos, flavonoides, taninos e atividade radicalar dos extratos vegetais e dos óleos essenciais;
- Realizar ensaios biológicos para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais e dos óleos essenciais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

As Myrtaceae são frequentemente reconhecidas como plantas aromáticas, apresentando casca escamosa, folhas inteiras e puntiformes. Uma de suas principais características é a produção de óleos voláteis também chamados de óleos essenciais, constituídos por uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas, que possuem viscosidade semelhante à dos óleos fixos (SIMÕES; SPITZER, 2001).

Muitas espécies são exploradas economicamente devido as suas funções medicinais, outras são cultivadas com finalidade de produção de frutos comestíveis (*Eugenia uniflora* L.), fonte de madeira e lenha (*Eucalyptus*), extração de óleos essenciais (*Eugenia caryophyllata* Thumb) e, ornamental pela aparência de algumas espécies (SINGH; BAGHOTIA; GOEL, 2012).

3.2 GUAVIRA (*Campomanesia adamantium*)

A *Campomanesia* sp (Myrtaceae) também conhecida como gabirola, guabirola, guabirola-do-campo ou guariorla (Figura 1), nativa do Brasil é abundante no Cerrado e na Mata Atlântica (RAMOS; CARDOSO; YAMAMOTO, 2007). A *Campomanesia adamantium* cresce naturalmente em solos pobres de nutrientes (VALILLO et al., 2006a).

Trabalhos científicos mostram que partes da planta (caules, folhas e raízes) são utilizadas na medicina popular para tratar inflamações e reumatismo et al., 2013; RAMOS; CARDOSO; YAMAMOTO, 2007). O efeito das folhas foi verificado para o tratamento de diarreia e doenças renais (PIVA, 2002), atividade antiulcerogênica (MARKMAM; BACCHI; KATO, 2004), antiolesterolêmica (BIAVATTI et al., 2004), antibacteriana (PAVAN et al., 2009) e antiproliferativa (PASCOAL et al., 2014).



Figura 1 *Campomanesia adamantium*.

Fonte: O autor, 2014

O fruto é comestível e apresenta alto valor nutricional e terapêutico devido aos teores de ferro, potássio, fósforo, magnésio (VALLILO et al., 2006a), vitamina C (OLIVEIRA et al., 2014a; BREDA; SANJINEZ-ARGANDOÑA; CORREIA, 2012), componentes fenólicos (ALVES et al., 2013), fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -pineno, limoneno e β -(z) ocimeno), estes últimos presentes em maior quantidade no óleo essencial dos frutos sendo responsáveis pelo aroma cítrico (VALLILO et al., 2006a). Breda, Sanjinez-Argandoña e Correia (2012) estudaram o aproveitamento da polpa na forma de pó pelo processo *foam mat* e Oliveira et al. (2014a) por atomização, obtendo retenção de vitamina C, o que mostra potencial para uso industrial na forma de suco em pó. Diversos trabalhos científicos contemporâneos têm respaldado o uso popular da folha e do fruto da *Campomanesia sp.* (FERREIRA et al., 2013; PASCOAL et al., 2014; CARDOSO et al., 2010), por isso o estudo do óleo essencial e de extratos da casca e semente mostra-se promissor.

3.3 EXTRATOS VEGETAIS

Em extratos das folhas de *C. adamantium*, *C. xanthocarpa*, *C. pubescens* foram identificadas quercetina, miricetina e rutina (PAVAN et al., 2009), atribuindo-se a estas ação anti-inflamatória (FERREIRA et al., 2013).

Folha de *C. xanthocarpa*, quando encapsulada em pó, reduz o colesterol LDL (Low density lipoprotein) no sangue e diminui o estresse oxidativo em processos inflamatórios em indivíduos com hipercolesterolemia (VIECILI et al., 2014).

Em estudo realizado com flavonoide chalcona isolada do extrato etanólico da folha da *C. adamantium*, Pascoal et al. (2014) verificaram a ação de inibição da proliferação do câncer de próstata em células humanas cancerígenas PC-3. Outro estudo com *C. adamantium* (FERREIRA et al., 2013) mostrou que os extratos da folha obtidos com acetato de etila e água tiveram ação antinociceptiva e anti-inflamatória, comprovando a ação atribuída pelo seu uso popular.

3.4 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em várias partes das plantas que apresentam composição lipofílica quimicamente diferente da composição glicerídica dos óleos fixos e gorduras. Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores.

Os óleos essenciais normalmente são produzidos por estruturas secretoras especializadas que podem estar localizadas em diversas partes do vegetal. Assim, a composição do óleo pode variar em função da parte específica da planta de onde é extraído, dos fatores genéticos, ambientais e dos métodos de extração.

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas (folhas e ramos finos), cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas das plantas tem amplo emprego na perfumaria, uso medicinal, cosméticos e alimentos (SANTOS et al., 2004).

Quimicamente são misturas complexas de diversas moléculas orgânicas tais como hidrocarbonetos terpênicos, ácidos carboxílicos, acetatos, álcoois simples e terpênicos, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, furanos, lactonas, cumarinas, fenilpropanoides, mono e sesquiterpenos, entre outras (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; COUTINHO et al., 2009; SIANI et al., 2000; SANTOS et al., 2004). Os compostos mono e sesquiterpenos comumente encontrados em óleos essenciais são apresentados na Figura 2.

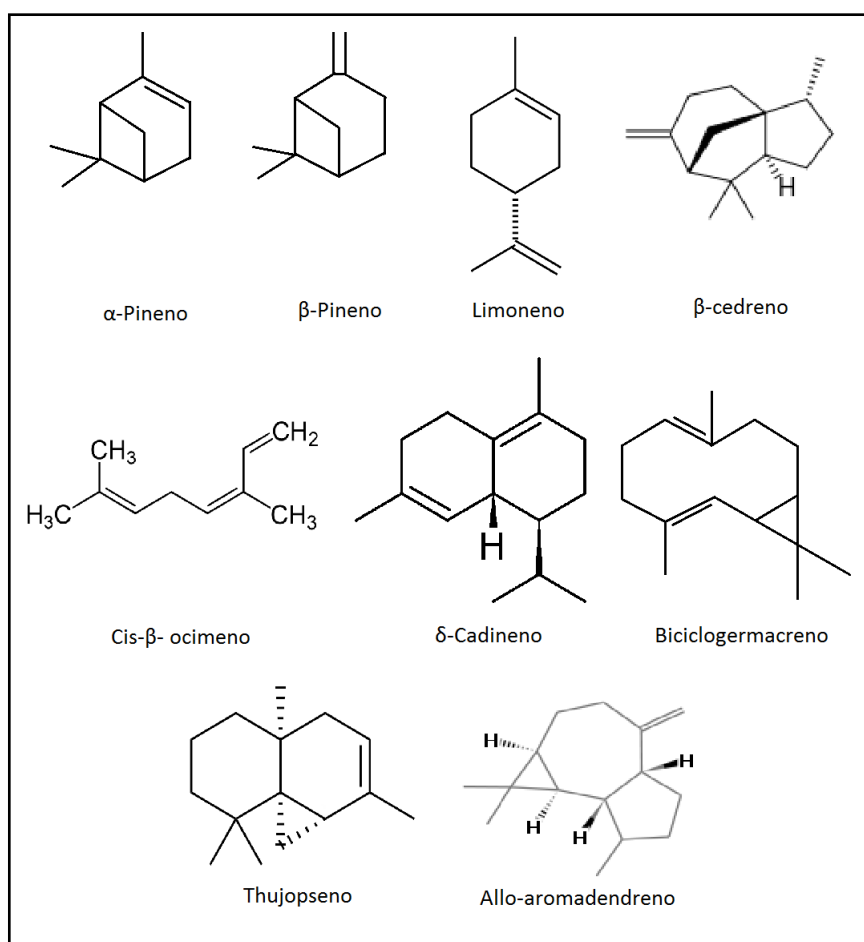


Figura 2 Exemplos de estruturas químicas de mono e sesquiterpenos presentes no óleo essencial da casca e/ou semente de *Campomanesia adamantium*

Os óleos essenciais são geralmente obtidos por hidrodestilação, prensagem, extração com solventes orgânicos ou por extração supercrítica (CASSEL et al., 2009; SANTOS et al., 2004).

O Brasil é um grande exportador de óleos essenciais, fornecendo principalmente para os Estados Unidos, Países Baixos, Alemanha, Índia e Reino Unido. No primeiro trimestre de 2016 o Brasil exportou no valor de U\$88.963.864,00 em óleos essenciais, incluídos os chamados extrato global; resínóides, oleorresinas de extração, soluções concentradas de óleo essencial em óleos fixos, ceras, gorduras ou outros (WORLD TRADE ORGANIZATION, 2016).

Viscardi, et al. (2015) observaram que o óleo essencial da casca e semente de guavira extraído por hidrodestilação possui ação anti-inflamatória e antinociceptiva. Em relação à composição do óleo essencial de casca e semente de *C. adamantium*, foram encontrados poucos estudos fito químicos que fundamentem sua ação em alimentos. O óleo essencial na área de alimentos tem sido eficazmente empregado na produção de queijos com óleo essencial de orégano e alho (MALLET, 2011), na substituição de compostos sintéticos como alternativa para inibição de micro-organismos em embalagens para pizza pronta (BOTRE et al., 2010), na prevenção da oxidação de carne moída com a utilização de filmes adicionados de óleo essencial (CARVALHO, 2016), entre outros.

3.4.1 EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

A extração de óleos essenciais em condições experimentais de bancada de laboratório é realizada por hidrodestilação no aparelho de Clevenger em função da praticidade e do baixo custo (SANTOS et al, 2004). Na hidrodestilação o material vegetal é imerso em água sob aquecimento, até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais após condensação separam-se da fase aquosa por decantação.

A obtenção de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais ganha cada vez mais espaço, tanto do ponto de vista artesanal quanto industrial, favorecida pelos aromas e princípios ativos que permitem a elaboração de novos produtos para uso medicinal, alimentício ou cosmético.

O tempo de extração pelo processo de hidrodestilação varia de acordo com a matéria-prima. Ehlert et al. (2006), determinou o tempo de extração necessário para obter o teor máximo de óleo essencial de diferentes plantas.

Para *Cymbopogon citratus* o tempo de extração foi de 130 min, para espécies de *Cymbopogon winterianus*, *Aristolochia sp*, *Hyptis pectinata* e *Hyptis fruticosa* foi de 150 min; para *Lippia aldooides* 160 min e para *Eucalyptus globulus* 230 min. Os diferentes tempos de extração demonstram a necessidade de realizar ensaios experimentais a fim de definir a melhor condição de extração para cada parte da planta e espécie vegetal.

3.4.2 EXTRAÇÃO SUPERCÁRÍTICA

A extração supercrítica (sólido-líquido) emprega como solvente um fluido supercrítico sendo o mais comumente utilizado o dióxido de carbono supercrítico (CO₂) por ser inerte, atóxico, gasoso em condições normais, de baixo custo, não ser inflamável, ter moderada pressão crítica (73,4 bar) e baixa temperatura crítica (31,2°C) facilmente separado do produto extraído e recuperado no final do processo. Essas características são consideradas ideais de solvente. A extração supercrítica de materiais vegetais é hoje muito utilizada na obtenção de produtos de alto valor agregado como, por exemplo, extratos de lúpulo, grãos de café descafeinado e por fornecer produtos totalmente livres de resíduos de qualquer natureza (MEIRELES, 2006).

O processo de extração com gases liquefeitos ou supercríticos emprega como solvente um fluido a temperatura e pressão próximas ou acima do ponto crítico do gás. Vários gases como o dióxido de carbono, etano, monóxido de nitrogênio e alguns líquidos como água, tolueno, e outros têm sido usados para diversas aplicações na área de pesquisa. (MEIRELES, 2006).

De acordo com Sovová (2012), o CO₂ favorece a dissolução de substâncias apolares sendo empregado na extração de óleo essencial e ceras que são compostos apolares e de baixa polaridade.

A extração supercrítica apresenta várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, como por exemplo utilização a baixas temperaturas, alta qualidade do produto e ausência de solventes no final da extração (MICHIELIN et al., 2005), considerando-se uma tecnologia limpa. Porém, também apresenta algumas desvantagens como o alto custo de

equipamentos, a periculosidade ao operar com altas pressões e a necessidade de adição de um co-solvente adequado para extrair compostos muito polares.

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

3.5.1. POLIFENÓIS

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Nas plantas formam-se em condições extremas como estresse, infecções, radiação ultravioleta, dentre outros e, atuam como agentes antipatogênicos (ANGELO; JORGE, 2007). Em alimentos influenciam na qualidade sensorial, na cor, textura, amargor e adstringência (ANGELO; JORGE, 2007; ROCHA et al., 2011).

Além disso, os polifenóis agem como antioxidantes, inibindo o risco de doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, relacionado com diversas patologias, como a diabetes, câncer e processos inflamatórios (ROCHA et al., 2011). A sua ação antioxidante está relacionada com sua habilidade de doar hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e ou reagindo com os radicais livres formando o complexo lipídio-antioxidante que impede a oxidação dos ácidos graxos (HAIDA et al., 2011). Entretanto, em concentrações muito elevadas ou em composição inadequada, os compostos fenólicos podem conferir características indesejáveis, como o escurecimento enzimático de frutas e a interação com proteínas, carboidratos e minerais.

Os compostos fenólicos são divididos em três grupos: ácidos fenólicos, os flavonoides e taninos. Por sua vez, os ácidos fenólicos se subdividem em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico e ácido vanílico) e hidroxinâmicos (ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cumarínico). Os flavonoides incluem compostos como flavonóis, flavonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas, e os taninos incluem os ésteres de ácido gálico (HAIDA et al., 2011).

Embora vários estudos indiquem a eficácia dos compostos fenólicos como antioxidantes e a possível relação entre estas substâncias e a redução de

oxidações envolvidas em determinadas doenças, os níveis fisiológicos efetivos encontram-se em torno de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, assim, nem todos os polifenóis ingeridos serão antioxidantes (ROSS; KASUM, 2002). Por outro lado, atuam também como quelantes de nutrientes no trato gastrointestinal, como por exemplo, o ferro, cálcio, aminoácidos e proteínas por isso, por muito tempo foram denominados compostos antinutricionais (DRESOSTI, 2000). Porém, não existem evidências de que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes ao longo da vida acarrete efeitos prejudiciais. Muito pelo contrário, há evidências epidemiológicas de que estão associados a um envelhecimento saudável e à longevidade (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

A extração de antioxidantes a partir de fontes naturais é uma alternativa para substituir antioxidantes sintéticos e tornar os alimentos mais estáveis e seguros para o consumo humano.

3.5.2. FLAVONOIDES

Os flavonoides são compostos presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São constituídos por flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas, flavanonóis e antocianinas (HAIDA et al., 2011), e no geral são compostos de baixo peso molecular, formado por 15 átomos de carbono.

Apesar de serem numerosas as atividades biológicas informadas na literatura, existem três atividades principais pelas quais os flavonoides são bem reconhecidos: (1) atividade antioxidante, (2) atividade anti-proliferativa, (3) atividade anti-inflamatória (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009). Devido a estas atividades é importante o incentivo do consumo de alimentos ricos em flavonoides (amoras, groselha-preta, mirtilo, uva, morangos, cerejas), para que a população possa se beneficiar dos seus efeitos terapêuticos (ARAÚJO et al., 2005).

3.5.3. TANINOS

No que se refere aos taninos, eles afetam a qualidade dos alimentos de

diversas formas, como por exemplo, formação de complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. São responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, percebida por uma sensação de secura e aspereza. (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Pesquisa sobre a atividade biológica sobre os taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos. A ingestão de chá verde e dietas ricas de frutas que contem taninos tem sido associada com atividade carcinogênica (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998). Também podem agir como anti-inflamatórios e cicatrizantes (MELLO; SANTOS, 2001).

Alguns estudos têm tratado do aspecto antinutricional de espécies vegetais com altos teores de taninos e sua resistência a pragas (PEREIRA; CARDOSO, 2012)

A presença dos taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições climáticas e localização. Os taninos são encontrados em diversos vegetais, sendo mais comuns em Leguminosae, Anacardiaceae, Combretácea, Myrtaceae, Pinaceae (CANNAS, 1999).

São subdivididos em dois grupos: Taninos hidrolisáveis (após hidrólise produzem carboidratos e ácidos fenólicos) e taninos condensáveis ou protocianidinas (resistem à hidrólise) (ROCHA et al., 2011; HAIDA et al., 2011). Os taninos hidrolisáveis são encontrados em abundância em folhas, frutas, vagens de dicotiledônias, e não são comumente detectados em monocotiledônias (LEWIS; YAMAMOTO, 1989). Os taninos condensados ou protocianidinas estão presentes em maior quantidade nos alimentos que comumente consumimos (DESHPANDE et al., 1986; SALUNKHE et al., 1990).

3.6 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (RODRIGUES, et al., 2003; SOARES, 2002).

Os radicais livres são produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no

metabolismo. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os principais antioxidantes dietéticos são algumas vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT. 2009).

De acordo com Melo et al. (2006), os radicais livres reagem com ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras.

Os antioxidantes podem ser divididos de acordo com suas classes e seu modo de ação. Quanto as classes, classificam-se por apresentar atividade enzimática e não enzimática, já no modo de ação podem ser antioxidantes primários e secundários (SOUSA, et al., 2007).

A atividade enzimática inclui compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação. A não enzimática são moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação, incluem-se os antioxidantes sintéticos e naturais como os compostos fenólicos. Já de acordo com sua ação, os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre (SOUSA, et al., 2007).

Os antioxidantes secundários atuam retardando as etapas de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radiculares ou desativação de oxigênio singlete (SOUSA, et al., 2007)

São encontrados na sua maioria nos vegetais, porém nem todos os compostos que tem sido proposto para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis podem ser empregados para o consumo humano, sendo desejáveis que tenham eficácia em concentrações de 0,001% a 0,01%, que não sejam tóxicos, com ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento (Food Ingredients Brasil, 2009)

Entre os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos destacam-se vitaminas (vitamina C e E), compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e carotenoides (β -caroteno e licopeno) (OLIVEIRA, et al., 2009). Pesquisas realizadas com frutos do cerrado brasileiro como *Annona crassiflora* (araticum), *Solanum lycocarpum* (lobeira), *Eugenia dysenterica* (cagaita) e *Caryocar brasiliense* (pequi) evidenciaram a alta atividade antioxidante, decorrentes dos compostos fenólicos (ROESLER, et al., 2007).

Diferentes metodologias têm sido apresentadas para a quantificação e qualificação da atividade antioxidante, dentre as mais comuns encontramos a análise pela captura do radical livre ABTS^{•+} (2,2'-AZINO-BIS(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), do radical livre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) e oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (ALVES et al, 2013; ANDRADE et al, 2012; GUIMARÃES et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Os frutos foram adquiridos na cidade de Ponta Porã/MS (Latitude 22° 32' 09" e Longitude 55° 43' 33"). O material vegetal foi depositado no herbário da Faculdade de Ciências Biológicas da UFGD (DDMS 4602). A seleção dos frutos ocorreu de acordo com o estágio de maturação verificado pela maciez e a cor da casca. Posteriormente foram lavados e sanitizados em solução de dicloroisocianurato de sódio dihidratado 0,66% (marca Sumaveg, Diversey Lever), por 15 min. Depois foram imersos em água a 80°C por 15 min para evitar escurecimento enzimático e facilitar o despulpamento. A casca e a semente, separadamente, foram desidratadas a 40°C por 36 h em desidratador com vazão do ar de 0,5 m.s⁻¹ e armazenadas em embalagens de polietileno de baixa densidade (espessura 0,010 micras) a temperatura ambiente (25°C). Antes de proceder às análises e à extração de óleo essencial, a umidade do material desidratado foi determinada e expressa em base seca (U_{bs}).

4.2 EXTRATO

4.2.1. PREPARO DOS EXTRATOS

O extrato foi obtido em aparelho Soxhlet (Marconi), utilizando-se 20 g de amostra (casca ou semente) em 100 mL de solvente (proporção 1:5). Foram empregados seis solventes: etanol 70% (v/v), metanol 50% (v/v), acetona 70% (v/v), água destilada, n-hexano PA e acetato de etila PA, obtendo-se 12 extratos (Tabela 1). As extrações foram conduzidas a temperatura de 100°C por um período de 3 h, seguida de filtração a vácuo. Os extratos foram acondicionados em frascos de vidro recobertos com papel alumínio e armazenados a 7°C até a sua utilização.

Também foi incluído no presente estudo o método de extração descrito por Rufino et al. (2007a) com modificações. Os extratos foram obtidos a partir da mistura de 8 g do material vegetal (casca ou semente) com 40 mL de metanol

50%, seguida de agitação manual até total homogeneização, e repouso por 1 h. A mistura foi então centrifugada a 2000 rpm por 30 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e, ao resíduo remanescente da primeira extração foram adicionados 40 mL de acetona 70%, repetindo-se a operação. Os sobrenadantes das duas extrações foram misturadas em balão volumétrico de 100 mL e o volume ajustado com água destilada. Os extratos foram armazenados nas mesmas condições descritas anteriormente para os demais extratos.

Tabela 1 Nomenclatura dos extratos obtidos a partir da casca e da semente da *Campomanesia adamantium* com diferentes solventes

Extrato	Casca	Semente
Extrato aquoso	EAC	EAS
Extrato metanólico	EMC	EMS
Extrato metanol:acetona	EMAC	EMAS
Extrato hexânico	EHC	EHS
Extrato etanólico	EEC	EES
Extrato acetona	EACC	EACS
Extrato acetato de etila	EAEC	EAES

4.2.2. COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras foram analisadas utilizando um sistema de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (LC - 6AD, Shimadzu), utilizando detector de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm, coluna Hypersil ODS C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Thermo Fischer Scientific) e sistema binário de solventes. A separação dos constituintes dos extratos foi realizada por um sistema de eluição por gradiente, com 5% de metanol e 95% de água levando 40 min para atingir 95% de metanol e 5% de água e 45 min para voltar as condições iniciais. As injeções foram realizadas em triplicata com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 μ L. As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) no Centro de Estudos em Recursos Naturais.

4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial da casca e da semente da guavira foi realizada por hidrodestilação e por extração supercrítica cujas metodologias estão descritas a seguir.

4.3.1 HIDRODESTILAÇÃO

No processo de extração por hidrodestilação utilizou-se aparelho tipo Clevenger modificado (SANTOS et al., 2004). A amostra (200 g) foi submetida a extração de óleo essencial com 1000 mL de água destilada no aparelho Clevenger (Figura 3) por dois períodos: 3 h e 5 h a temperatura de 100°C. Iniciou-se a contagem do tempo de extração a partir da condensação da água destilada no Clevenger. O óleo essencial foi retirado com auxílio de pipeta de *Pasteur* e transferido para frascos de vidro âmbar. Em cada frasco foram adicionados aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro para a remoção da umidade presente no óleo essencial. Os frascos foram vedados com *Parafilm*[®] e armazenados a -18°C até o momento das análises.

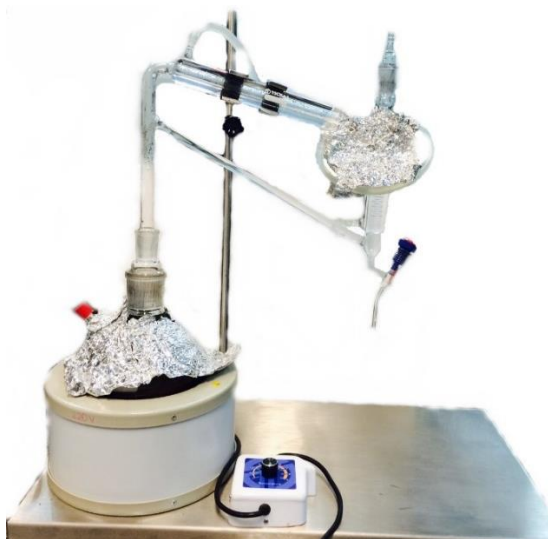


Figura 3 Aparelho tipo Clevenger modificado.

Fonte: O autor, 2016

O óleo extraído foi pesado em balança analítica e a partir da massa obtida

e da umidade do material vegetal, o rendimento do óleo essencial foi calculado pelo método de BLU (base livre de umidade) e expresso porcentagem de acordo com a Equação 1. (SANTOS et al., 2004)

$$R = \frac{V_o}{B_m - \left(\frac{B_m \times U_{bs}}{100}\right)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde **R** é o rendimento da extração de óleo essencial, **V_o** o volume de óleo essencial extraído, **B_m** a massa utilizada na extração e **U_{bs}** a umidade da amostra em base seca.

4.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

O processo de extração supercrítica consistiu no contato das cascas e sementes trituradas, as quais foram acondicionadas no extrator de leito fixo de 300 cm³ com o CO₂ supercrítico em condições pré-estabelecidas de pressão (250 bar) e temperatura (50°C) otimizadas previamente para a obtenção do extrato (OLIVEIRA et al., 2014b). O controle da pressão foi feito por uma bomba de líquido a alta pressão e um controlador de pressão (*back pressure*) acoplado ao sistema de extração TharSCF (Waters). A temperatura foi mantida por manta térmica no extrator e controlada por termostatos internos, o fluxo de CO₂ (Oxinitro Gases e Equipamentos Ltda) foi de 5 g.min⁻¹. O extrato foi coletado continuamente em um frasco coletor imerso em um banho de gelo. Ao final de todas as extrações os fracos foram pesados e estabeleceu-se a relação da massa do extrato com a massa dos grãos secos acondicionados no extrator para o cálculo de rendimento total.

4.3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

As amostras de óleo essencial foram caracterizadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de massas (CG-EM) em cromatógrafo (Shimadzu P2010) equipado com um auto-injector split/splitless. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com

fase ligada DB5 (0,25 mm de espessura de filme); He como gás de arraste com fluxo de 1 mL.min⁻¹, temperatura programada para manutenção de 50°C por 5 min, seguida de um aumento de 3°C.min⁻¹ até atingir 250°C e a temperatura do detector (ou interace) de 250°C. O volume da amostra injetada foi de 1 µL de injeção com uma taxa de partição do volume injetado de 1:20. As condições do espectrofotometro de massas incluíram a tensão de ionização de 70 V, intervalo de varredura de 0,5 s e fragmentos detectados na faixa de 50 a 550 Da. As amostras (1 mg de óleo essencial) foram diluídas em 1 mL de n-hexano antes da injeção.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para os índices de retenção foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz, 1963, em relação à série homóloga de n-alcenos (nC8-nC18) e fazendo extrapolações para C19 e C20. Também foi utilizada a biblioteca do equipamento (MS Wiley 6ª Edição) que permitem a comparação com os dados do espectro com aqueles existentes na biblioteca.

A porcentagem da área relativa para cada pico cromatográfico foi comparada e aproximada para avaliar cada área composta à área total e depois comparadas entre as amostras. A soma de todas as áreas de pico foi considerada como 100% e para cada pico foi atribuída uma porcentagem correspondente à sua área.

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.4.1 POLIFENÓIS

O teor de polifenóis foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico (SINGLETON; ROSSI, 1965; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOR, 1999) adaptado. Para isto, foram empregados 50 µL do extrato, 3 mL de água destilada, 250 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 750 µL de solução de carbonato de sódio a 7% (NaCO₃), os tubos foram então agitados e incubados ao abrigo de luz e a temperatura ambiente por 8 min. Após este período adicionou-se 950 µL de água destilada e deixou-se repousar no escuro

por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 765 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Biochrom, modelo Libra S60PC). O espectrofotômetro, entre as leituras, foi calibrado com água destilada. Uma curva padrão com diferentes concentrações de ácido gálico (220, 170, 150, 130, 110, 90, 70, 50, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi plotada e a partir da regressão linear e da equação da reta obtida, calculou-se a quantidade de polifenóis da amostra, expresso em mg equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra em base seca. As análises foram feitas em triplicata.

4.4.2 FLAVONÓIDES

A quantificação de flavonoides foi realizada segundo a metodologia descrita por Chang et al. (2002), empregando-se 500 μL do extrato sendo adicionado 1,50 mL de álcool etílico (95%), 100 μL de cloreto de alumínio (10%) ($\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 100 μL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 2,80 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 40 min. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Biochrom, modelo Libra S60PC). Para a calibração do espectrofotômetro adotou-se o branco (metanol HPLC), pois a amostra e a quercetina foram preparadas com metanol HPLC. Uma curva padrão com diferentes concentrações de quercetina (200, 140, 120, 100, 80, 60, 30, 20 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi plotada e, a partir da regressão linear e da equação da reta obtida, calculou-se a quantidade de flavonoides da amostra, expresso em mg de equivalente quercetina (QUE) por 100g de amostra em base seca.

4.4.3 TANINOS

A determinação de taninos seguiu a metodologia descrita por Maxson e Rooney (1972) com modificações. Uma alíquota de 1 mL da amostra foi misturada com 4 mL de solução de vanilina ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em banho termostático a 30°C por 20 min. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS

(Biochrom, modelo Libra S60PC). Para a calibração do espectrofotômetro utilizou-se como branco a solução de vanilina sem amostra. O teor de taninos condensados foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com diferentes concentrações de catequina (200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), onde uma alíquota de 1 mL de cada concentração reagiu com 4 mL de solução de vanilina e procedeu-se a leitura descrita anteriormente. Os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina (CAT) por 100 g de amostra em base seca. A solução de vanilina foi preparada com ácido clorídrico P.A

4.5 DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

4.5.1 ABTS

O método consiste em medir a atividade antioxidante através da captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) descrito por Rufino et al. (2007a) com pequenas modificações. O preparo do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ consiste na reação da solução estoque de ABTS 7 mM e solução de persulfato de potássio 140 mM mantidas ao abrigo de luz e a temperatura ambiente por 16 h. A curva padrão foi constituída por diferentes concentrações da solução padrão de trolox 2 mM (100 μM a 1500 μM), onde 30 μL da solução padrão de trolox com 3,0 mL de solução estoque do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A leitura da absorbância foi feita após 6 min de reação e plotada em gráfico. Utilizou-se o álcool etílico absoluto como branco para a calibração do espectrofotômetro. A análise dos extratos, do controle e do óleo essencial foi realizado com 30 μL da solução padrão de trolox com 3,0 mL de solução estoque do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A leitura da absorbância foi feita a 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Biochrom, modelo Libra S60PC) e as análises foram feitas em triplicata. A atividade antioxidante foi expressa em μM trolox .g⁻¹ de amostra.

4.5.2 DPPH

Inicialmente foi preparado 100 mL de solução estoque de DPPH[•] (2,2-

Diphenyl-1-picryl-hidrazil) a 60 μM em metanol HPLC. Para a curva padrão esta solução foi diluída nas concentrações 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM e 50 μM . A curva (Apêndice C) foi constituída das diluições em diferentes concentrações versus as absorvâncias medidas em triplicatas no comprimento de onda de 517 nm, tendo o metanol HPLC como branco.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura do radical livre DPPH \cdot seguindo o método descrito por Rufino et al. (2007b) com pequenas modificações. A partir do extrato e do óleo essencial foram preparadas em tubos de ensaio quatro diluições diferentes em triplicata. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição da amostra (extrato ou óleo essencial) foi transferida para um tubo de ensaio com 3,9 mL de radical DPPH \cdot 60 μM e homogeneizado em ultrassom (protegido da luz). O mesmo processo ocorreu com a solução controle positivo (ácido ascórbico, BHT e ácido gálico). Para a definição do tempo de reação, uma curva cinética foi feita com cada amostra e definido um tempo médio de reação, o tempo de 10 min foi definido para o extrato e 50 min para o óleo essencial. Em seguida a leitura da atividade antioxidante foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Biochrom, modelo Libra S60PC) em comprimento de onda de 515 nm. A calibração do equipamento foi feita com metanol HPLC. As leituras foram feitas em triplicata e o resultado expresso em IC₅₀ (Concentração inibitória mínima), o que representa a concentração necessária de amostra para sequestrar 50% do radical de DPPH \cdot e, percentual de sequestro do radical utilizando a equação 2.

$$AA(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde **AA** é a atividade antioxidante de sequestro de DPPH (%), **A₀** a absorvância do controle, **A** corresponde à absorvância da amostra.

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais foram submetidos à análise de regressão linear e expressos em concentração mínima inibitória. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio da curva exponencial de primeira ordem obtidas pela plotagem das diluições da amostra e sua absorvância.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados será utilizado o software Statistica versão 8.0 (StatSoft, 2007). Serão utilizadas a análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Higiene dos Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília (UnB). Empregaram-se os métodos de diluição em caldo e difusão em disco, conforme as recomendações do *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (NCCLS, 2003).

4.7.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de extrato foram desidratadas em Liofilizador (Thermo Scientific) por 48 hs. O extrato liofilizado (80 mg) foi diluído em 10 mL de água destilada estéril e adicionado de solução aquosa de Tween 20 (10%), quando necessário, para facilitar a homogeneização da amostra. Para o óleo essencial, a amostra (20 mg) foi misturada em 10 mL de água destilada estéril contendo solução de Tween 80 (10%). Ambas as diluições ocorreram em banho ultrassônico (Elmasonic) até a total diluição das amostras no meio aquoso.

4.7.2. MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas linhagens puras de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiela* sp. (ATCC 13833), *Salmonella* sp. (ATCC 14028), *Proteus* sp. (ATCC 25933), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas* sp. (ATCC 29347) e *Shigella* sp. (ATCC 12022), provenientes da *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA), cedidas pela Universidade Católica de Brasília.

4.7.3. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

A padronização dos inóculos foi realizada conforme as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). As linhagens foram previamente ativadas por meio de repique em caldo BHI (*Brain heart infusion*) e incubadas a 35°C por 24 h. Decorrido este período, suspensões bacterianas foram ajustadas com caldo BHI de modo a obter turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ de bactérias. Estas suspensões foram diluídas na proporção 1:100 obtendo-se assim, uma diluição de 10^6 UFC.mL^{-1} .

4.7.4. TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO

Em tubos de ensaio contendo 3 mL de BHI, foram acrescentados 30 μL da suspensão bacteriana contendo 10^6 UFC.mL^{-1} e as amostras previamente diluídas de modo a obter concentrações de $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para extrato e $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $450 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial obtido por hidrodestilação. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 h. O resultado foi verificado de acordo com o grau de turbidez das soluções em comparação com meio de cultura contendo apenas a suspensão bacteriana de 10^6 UFC.mL^{-1} . As soluções de Tween 20 e 80 a 10% foram incluídas nos testes visando investigar a existência ou não de atividade antimicrobiana.

4.7.5. TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

4.7.5.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

Extratos liofilizados e óleos essenciais foram pesados e diluídos em água destilada esterilizada com auxílio de ultrassom até a total homogeneização. Para que isto ocorresse completamente a adição de solução Tween 20 a 10% foi necessária nas amostras de óleo essencial e Tween 80 a 10% nas de extrato. Para a realização do teste foram feitas 6 diluições das amostras obtendo-se concentrações finais de 5000, 4000, 3000, 2500, 1500 e $850 \mu\text{.mL}^{-1}$ para os

extratos e 1650, 1400, 1100, 850, 550 e 275 μmL^{-1} para o óleo essencial obtido por hidrodestilação.

4.7.5.2. DIFUSÃO EM DISCO

O teste de difusão em disco seguiu a metodologia preconizada pela NCCLS (2003) com algumas adaptações. O teste permite a determinação do halo de inibição de crescimento para os extratos e óleo essencial em estudo.

Placas de Petri (dimensão 60x15 mm) contendo Ágar Mueller Hinton foram previamente inoculadas com 30 μL de micro-organismo (10^6 UFC. mL^{-1}) em suspensão em caldo BHI com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida discos de papel filtro estéreis de 6 mm de diâmetro embebidos com 20 μL de amostra (Conforme 4.6.5.1) foram dispostos sobre as placas com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram então incubadas a 35°C por 24 h. Considerou-se amostra com atividade inibitória os halos com diâmetros ≥ 6 mm (NCCLS, 2003).

Foram incluídos discos impregnados com os antibióticos Amicacina (30 μg , DME®) e Cloranfenicol (30 μg , Laborclin®) como controles positivos para bactérias Gram-Negativas e Gram-Positivas, respectivamente. Como controle negativo utilizaram-se discos estéreis de papel filtro embebidos em soluções de Tween 20 e 80 a 10%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTO EM EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento em extrato obtido da casca e da semente de guavira utilizando diferentes solventes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Rendimento em extrato obtido de casca e semente de guavira em diferentes solventes

Solvente	Rendimento (%)*	
	Casca	Semente
Água destilada	29,92	13,99
Metanol 50%	27,46	48,96
Metanol 50%:acetona 70%	N.d	N.d
n-Hexano	1,64	36,81
Etanol 70%	40,86	40,02
Acetato de etila	4,16	35,55

*, Calculado considerando-se a massa seca do material vegetal seco utilizado para o preparo dos extratos. N.d, Não determinado

Os resultados obtidos para o rendimento em extrato variaram em função do material vegetal e do solvente utilizado. Para a casca, os maiores rendimentos foram obtidos nos extratos etanol 70%, água destilada e metanol 50%. Para a semente foram metanol 50%, etanol 70% e n-hexano. Em função do material vegetal observou-se maior diferença entre os rendimentos obtidos para os extratos hexânico e acetato de etila, sendo maior na semente, provavelmente em função da polaridade dos componentes presentes na casca e na semente. Segundo Simões et al. (2007), o n-hexano é capaz de extrair componentes com natureza predominantemente apolar, tais como esteroides, ácidos graxos, terpenos e hidrocarbonetos. O acetato de etila, por sua vez, apresenta maior afinidade com outras classes de metabólitos secundários como flavonoides, taninos, saponinas e componentes fenólicos em geral.

Breda et al. (2016) obtiveram rendimento de 16,96% e 64,16% em extrato de casca e semente da guavira, respectivamente, utilizando extração a frio e etanol absoluto P.A. como solvente. Estas variações possivelmente estão atribuídas ao solvente utilizado, tipo de extração e características do material vegetal.

Os resultados do rendimento em óleos essenciais extraídos por hidrodestilação e extração supercrítica são mostrados na Tabela 3. Na extração supercrítica foram obtidos dois rendimentos, pois este método resulta em uma única fração que compreende o extrato global e o óleo essencial, fazendo-se necessária uma extração secundária por hidrodestilação a fim de separar o óleo volátil.

Tabela 3 Rendimento em óleo essencial da casca e de semente de guavira extraídos por hidrodestilação e extração supercrítica

Amostra	Método	Tempo (h)	Extrato Global (%)	Óleo essencial (%)
Casca	Hidrodestilação	3	*	0,40
		5	*	0,56
	Extração Supercrítica	3	1,08	0,05
		5	N.d	N.d
Semente	Hidrodestilação	3	*	1,51
		5	*	1,32
	Extração Supercrítica	3	3,48	0,07
		5	6,36	0,26

N.d, não determinado. *, ausência.

O rendimento em óleo essencial foi maior no método extraído por hidrodestilação em relação ao da extração supercrítica com CO₂, para ambos os tempos de extração, sendo diferente ao relatado por Atti-Santos et al. (2005) que mostraram um rendimento de óleo essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) de 1,98% (v/v) na extração supercrítica e de 0,97% (v/v) na hidrodestilação. No presente trabalho os rendimento das extrações decorridas de 3 h foram de 0,4% e 0,05%, para a hidrodestilação e extração supercrítica, respectivamente.

Segundo a *World Trade Organization* (2016) o extrato global é incluído na categoria “Óleo Essencial” para fins de exportação e importação. Considerando

essa definição, de fato o rendimento da extração supercrítica é maior que o da hidrodestilação.

Contudo, esses resultados de rendimento obtidos neste trabalho pelo método de hidrodestilação foram maiores que os obtidos em um estudo conduzido por Coutinho et al. (2009), que apresentaram rendimento do óleo essencial das folhas de *C. adamantium* de 0,32%, 0,39% e 0,19% nos estádios de desenvolvimento e maturação. Vallilo et al. (2006a e 2006b) na extração do óleo essencial do fruto *in natura* por hidrodestilação obtiveram 0,06% de rendimento e Marin et al. (2008) para frutos da mesma espécie apresentaram 0,2%. Estes dados corroboram com Prins, Lemos e Freitas (2006) no rendimento da extração de óleo essencial de alecrim, os autores observaram que a extração com maior tempo e temperatura apresentou maior rendimento de óleo essencial

5.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS

Os resultados obtidos foram apresentados por picos que possuem similaridade entre os parâmetros monitorados para os extratos como tempo de retenção e espectro de absorção molecular, na região de 290 nm, obtidos através do detector de arranjo de diodos. Não foram atribuídos aos picos o composto relativo, pois em cada pico pode haver mais de uma substância. Os resultados da casca e da semente estão expostos, a seguir.

5.2.1. CASCA

Os perfis cromatográficos dos extratos de casca de guavira são apresentados qualitativamente e comparados com extratos de mesma polaridade através da Figura 4. Cada perfil apresenta quantidades e observou-se a intensidades de picos distintos. E observa-se também que a polaridade de cada solvente mostrou picos com diferentes tempos de retenção.

A amostra EAC (Figura 4.a) mostrou presença das substâncias 1-5 exclusivas neste solvente. As substâncias 2-3 foram detectadas nos extratos EMC, EMAC, EEC e EACC (Figuras 4.a; 4.b, 4.e e 4.f). Observa-se que a substância 4 está presente na amostra EACC (Figura 4.f) apresenta a mesma

intensidade (mAU) que a substância 2. Devido a estas características pode-se inferir que estas amostras apresentam as mesmas substâncias.

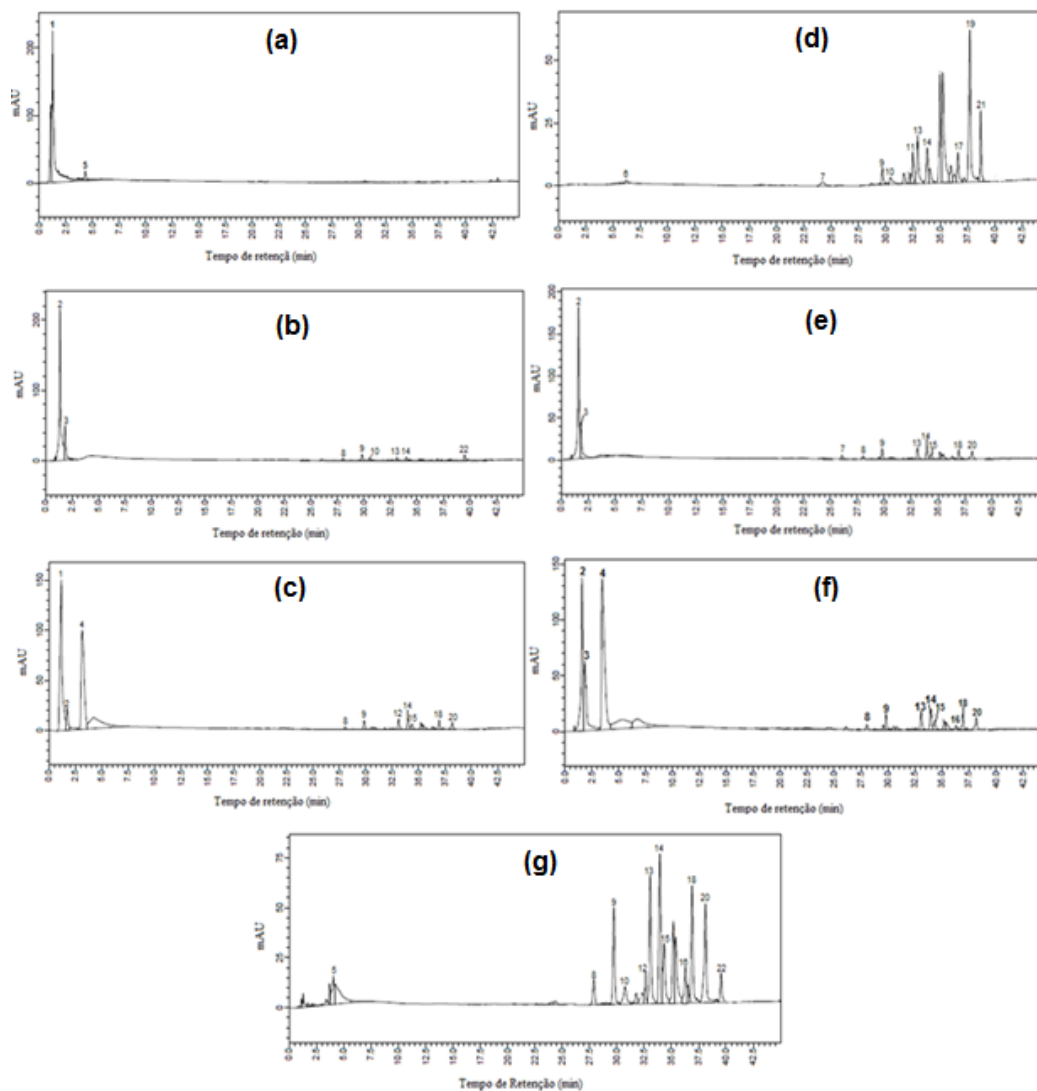


Figura 4 Perfis cromatográficos dos extratos das cascas desidratadas de *C. adamantium*. Extrato aquoso-EAC (a); Extrato metanólico-EMC (b); Extrato metanol:acetona-EMAC (c); Extrato hexânico-EHC (d); Extrato etanólico-EEC (e); Extrato acetona 70%-EACC (f); Extrato acetato de etila-EAEC (g)

Os picos mais intensos mostrados nos cromatogramas dos extratos EMC (Figura 4.b), EEC (Figura 4.e) e EACC (Figura 4.f) ocorreram no tempo de retenção (Tr) entre 2,0 e 4,8 min equivalentes aos picos 2, 3 e 4. E o pico 5, nos extratos EAC (Figura 4.a) e EAEC (Figura 4.g) apesar de ter sido o de menor intensidade mostrou-se em destaque. Justificam-se estes picos com análise

conjunta dos espectros de absorção no UV (290nm) (Apêndice A). A partir dos picos em destaques com seus Tr correspondentes pode-se inferir que se tratam de substâncias semelhantes por apresentarem picos máximos de absorção em torno de 290 nm com tempo de retenção próximos (Figura 5).

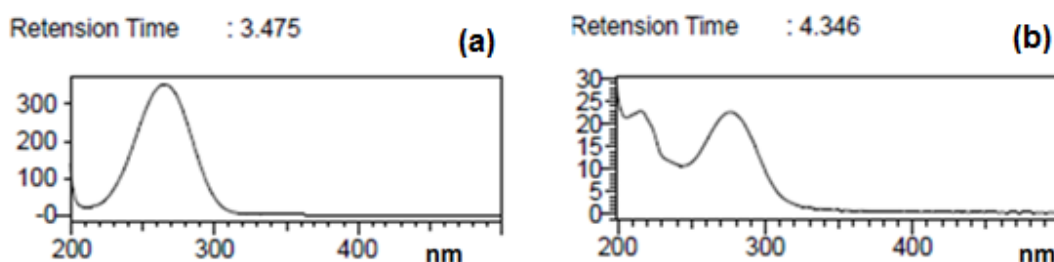


Figura 5 Espectros da casca de guavira no comprimento de onda Ultra Violeta Visível (UV) correspondentes aos picos predominantes obtidos nos cromatogramas CG/MS dos extratos metanólicos, etanólicos e acetônicos.

5.2.2. SEMENTE

Os perfis cromatográficos dos diferentes extratos da semente de guavira são apresentados qualitativamente através da Figura 6. Os picos 2, 5, 7, 8, 9 e 24 estão presentes apenas no EAS (Figura 6.a) e, o pico 13 apenas no EMS (Figura 6.b). No extrato aquoso notaram-se dois picos com características apolares, provavelmente em função da extração a quente, onde componentes voláteis com características apolares foram extraídos.

Os perfis cromatográficos dos extratos da semente desidratada em diferentes solventes mostraram a variação e melhor extração de cada solvente. O número de picos foi maior que os extratos da casca.

Pode-se constatar que o pico 10 está presente em todos os extratos da semente, delimitando os picos de natureza predominantemente polares dos apolares. As fases dos picos apolares foram semelhantes entre os EMS (Figura 6.b), EHS (Figura 6.d), EES (Figura 6.e), EACS (Figura 6.f) e EAES (Figura 6.g), variando na intensidade.

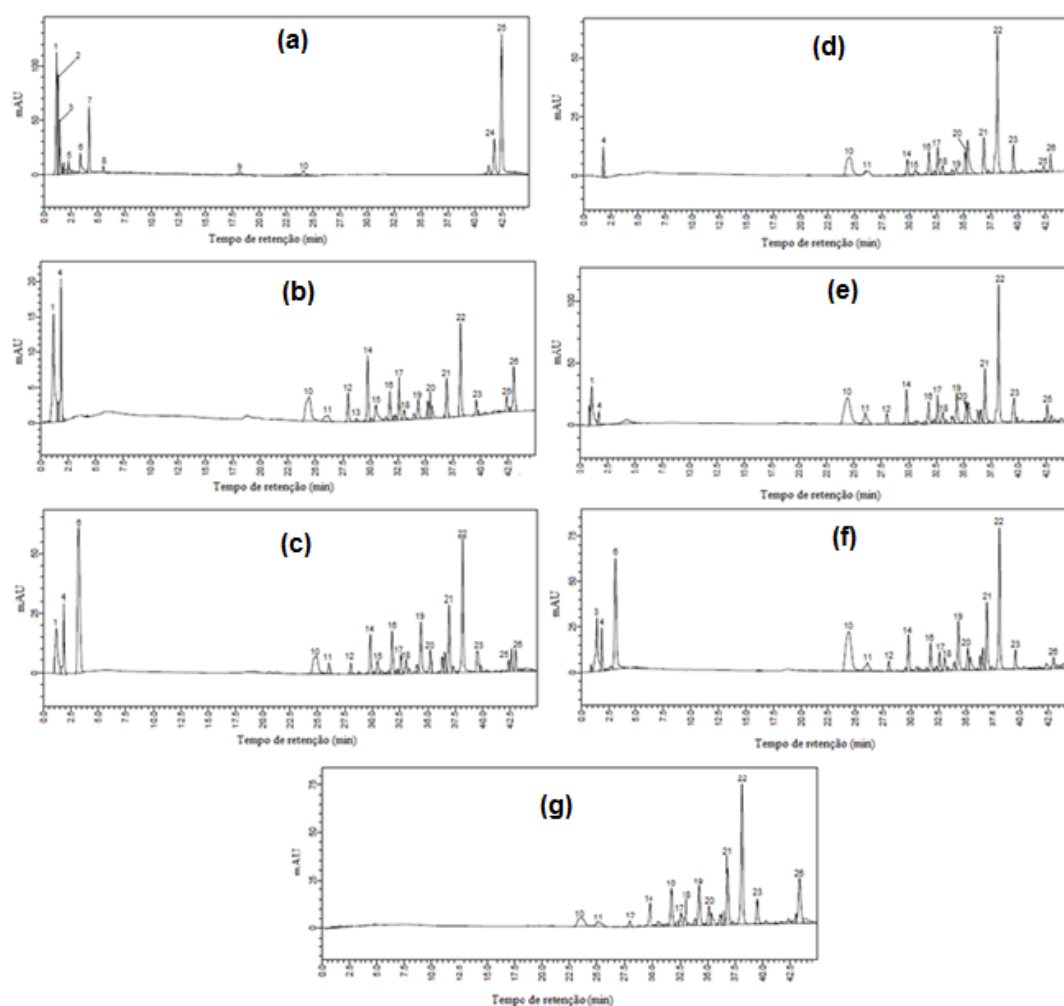


Figura 6 Perfis cromatográficos dos extratos das sementes desidratadas de *C. adamantium*. Extrato aquoso-EAS (a); Extrato metanólico-SEM (b); Extrato metanol:acetona-EMAS (c); Extrato hexânico-EHS (d); Extrato etanólico-EES (e); Extrato acetona-EACS (f); Extrato acetato de etila-EAES (g)

5.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Os componentes químicos majoritários presentes nos óleos essenciais da casca e da semente de guavira extraídos por hidrodestilação e extração supercrítica em diferentes períodos, seguidos pelos índices de retenção tabelados e os seus teores, expressos em porcentagem, encontram-se na Tabela 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 Componentes majoritários do óleo essencial extraído da casca de guavira por hidrodestilação (tempo de 3 h e 5 h) e por extração supercrítica (tempo de 3 h)

Nº	Compostos	IRT	Concentração (%)		
			Hidrodestilação		Supercrítica
			3 horas	5 horas	3 horas
1	α -Pineno	932	4,13 \pm 0,56	-	2,12
2	β -Pineno	974	3,94 \pm 0,84	2,78 \pm 0,19	2,43
3	Myrceno	988	-	3,04 \pm 1,83	-
4	Limoneno	1024	14,19 \pm 1,11	-	11,53
5	Z- β -Ocimeno	1032	-	20,48 \pm 0,87	-
6	E- β -Ocimeno	1044	3,48 \pm 0,28	2,54 \pm 0,03	-
7	Linalool	1095	3,02 \pm 0,17	4,77 \pm 0,05	-
8	α -Terpineol	1186	2,20 \pm 0,19	2,50 \pm 0,02	-
9	Isoledeno	1374	-	-	2,34
10	β -cedreno	1419	-	4,61 \pm 4,61	-
11	Thujopseno	1429	6,76 \pm 0,18	-	12,15
12	Aromadendreno	1439	2,88 \pm 0,14	-	3,04
13	Allo-Aromadendreno	1458	-	-	6,53
14	Germacreno D	1484	3,70 \pm 1,40	-	4,14
15	Bicyclogermacreno	1500	6,90 \pm 2,00	-	19,38
16	δ -Cadineno	1521	2,57 \pm 1,01	6,62 \pm 2,50	4,59
17	Trans-Cadina-1,4-dieno	1533	-	-	3,85
18	Spathulenol	1577	1,22 \pm 0,69	3,31 \pm 0,28	3,55
19	Globulol	1590	3,68 \pm 0,39	-	3,68
20	Cubeban-11-ol	1595	-	5,90 \pm 3,41	-
21	Junenol	1619	-	2,51 \pm 1,49	-
22	α -muurolol	1644	-	-	2,68

IRT, Índice de retenção tabelado. Tr, porcentagem \leq 0,1%

No óleo essencial da casca de guavira extraído por hidrodestilação durante 3 h foram identificados 104 componentes, dentre os quais os componentes majoritários Limoneno (14,19%), Thujopseno (6,76%) e Bicyclogermacreno (6,90%). Já em um período maior de extração (5 h) empregando o mesmo método foram identificados 68 componentes no óleo

essencial tendo como constituintes majoritários o Z- β -Ocimeno (20,48%) e δ -Cadineno (6,62%). A menor disponibilidade de componentes apresentada na extração de período prolongado (5 h) pode ser atribuída em função do tempo e temperatura, promovendo a degradação de alguns componentes. Por outro lado, maiores períodos de extração podem colaborar com o rompimento da parede celular tornando alguns componentes mais disponíveis. Em estudo semelhante, Prins, Lemos e Freitas (2006) verificaram que extrações de 90 e 120 min favoreceram significativamente a concentração de componentes α -pineno e β -mirceno, em óleo essencial de alecrim.

A extração supercrítica realizada durante 3 h para a casca resultou em um óleo essencial composto por 97 constituintes químicos, cujos componentes majoritários foram Bicyclogermacreno (19,38%), Thujopseno (12,15%) e Limoneno (11,53%). Notou-se que houve semelhança nos componentes majoritários identificados em ambas as extrações realizadas por 3 h na hidrodestilação, variando apenas a concentração. Esses resultados sugerem que a escolha do método e do tempo de extração são fatores determinantes na extração e composição química do óleo essencial da casca de *C. adamantium*.

O limoneno, presente nos óleos essenciais em grande quantidade já vem sendo amplamente estudado aliando o interesse da inserção na indústria de alimentos como aroma natural substituindo os sintéticos (JÚNIOR; PASTORE, 2007). A extração supercrítica da casca por 5 h não foi realizada devido à indisponibilidade do material vegetal e bem como do equipamento.

No óleo essencial da semente extraído por hidrodestilação durante 3 h (Tabela 5), identificaram-se 103 componentes, sendo majoritários o Limoneno (17,76%), o β -Pineno (10,32%) e o α -Pineno (9,93%). No extraído durante 5 h foram identificados 52 componentes químicos tendo como majoritários o Z- β -ocimeno (25,25%), α -Pineno (10,67%) e β -Pineno (8,51%). Os componentes químicos identificados como majoritários no óleo essencial da casca e da semente, foram semelhantes.

Coutinho et al. (2009) relataram a identificação de 95 componentes nos diferentes estádios de coleta das folhas da *C. adamantium*, sendo que na

floração os componentes majoritários foram limoneno (22,24%), α -pineno (13,23%) e β -pineno (8,99%).

Tabela 5 Componentes majoritários dos óleos essenciais extraídos da semente de guavira por hidrodestilação (tempo de 3 h e 5 h) e por extração supercrítica (tempo de 3 h e 5 h)

Nº	Componentes	IRT	Concentração (%)			
			Hidrodestilação		Supercrítica	
			3 horas	5 horas	3 horas	5 horas
1	α -Pineno	932	9,93 \pm 1,18	10,67 \pm 0,58	3,59	2,43
2	β -Pineno	974	10,32 \pm 0,92	8,51 \pm 0,38	5,59	4,41
3	α -Phellandreno	1002	2,89 \pm 1,08	3,15 \pm 0,04	-	-
4	Limoneno	1024	17,76 \pm 3,03	-	10,90	13,40
5	Z- β -Ocimeno	1032	-	25,25 \pm 0,32	-	-
6	E- β -Ocimeno	1044	3,24 \pm 0,77	6,37 \pm 0,18	-	-
7	Linalool	1095	2,37 \pm 0,06	3,30 \pm 0,05	-	-
8	α -Terpineol	1186	2,42 \pm 0,19	2,39 \pm 0,03	-	-
9	Isoledeno	1374	-	-	3,02	2,11
10	β -cedreno	1419	-	6,45 \pm 0,07	-	-
11	Thujopseno	1429	6,13 \pm 0,65	-	11,55	12,01
12	Nerono	1438	-	2,01 \pm 0,02	-	-
13	Aromadendreno	1439	2,41 \pm 0,30	-	5,54	3,41
14	Trans-muurola-3,5-dieno	1451	-	2,52 \pm 0,04	-	-
15	Allo-Aromadendreno	1458	-	-	5,09	5,23
16	Germacreno D	1484	2,27 \pm 0,82	-	4,24	2,33
17	Capilleno	1493	-	5,61 \pm 0,03	-	-
18	Biciclogermacreno	1500	3,72 \pm 0,13	-	7,02	8,10
19	δ -Cadineno	1521	3,17 \pm 0,68	2,92 \pm 0,17	4,49	3,19
20	Spathulenol	1577	-	2,30 \pm 0,02	-	-
21	Globulol	1590	-	-	3,91	2,10
22	α -muurolol	1644	-	-	2,78	-

IRT, Índice de retenção tabelado. Tr, porcentagem \leq 0,1%

O óleo essencial obtido por extração supercrítica no período de 3 h

apresentou 101 componentes químicos sendo majoritários o Thujopseno (11,55%), o Limoneno (10,90%) e o Biciclogermacreno (7,02%). O óleo essencial extraído após 5 h pelo mesmo método identificou 107 componentes químicos e seus componentes majoritários foram semelhantes ao da extração por 3 h variando apenas a concentração (Tabela 5).

Leão (2012) relatou que no óleo essencial das folhas de *C. phaea* extraído por hidrodestilação foram identificados 29 componentes químicos que representam 92,61% do total dos quais 7 são da classe de monoterpenos e 22 de sesquiterpenos. Vallilo et al. (2006a), identificaram 40 componentes químicos no óleo essencial do fruto de *C. adamantium* onde destacaram-se como componentes majoritários o α -pinene (10,6%), limoneno (10,1%) e o β -(z)-ocimeno (9,2%). No mesmo ano, Vallilo et al (2006b) identificaram apenas 30 componentes no óleo essencial do fruto de *C. adamantium* entre monoterpenos e sesquiterpenos. Os referidos trabalhos extraíram o óleo essencial pelo método de hidrodestilação. A quantidade de componentes químicos identificados no presente trabalho foi superior à encontrada nos óleos essenciais extraídos do fruto inteiro e das folhas de guavira

A composição química do óleo essencial extraído pelo método de extração supercrítica da *C. xanthocarpa* apresentou como componentes majoritários os constituintes α -eudesmol e β -eudesmol (24,81%), E-cariofileno (10,61%) e γ -eudesmol (9,70%) (CZAIKOSKI et al. 2015).

5.4. ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

5.4.1. POLIFENÓIS

A acetona 70% favoreceu a maior extração de compostos fenólicos da casca e semente (Tabela 6), seguido pela mistura metanol 50%:acetona 70%. Os solventes menos eficientes foram o acetato de etila e o n-hexano. Esses resultados mostram a influência da polaridade dos solventes na extração. De acordo com Simões et al. (2007), o n-hexano extrai compostos predominantemente apolares, tais como, ácidos graxos, terpenos e hidrocarbonetos, como os compostos fenólicos são predominantemente hidrossolúveis, é esperado que o n-hexano seja menos eficaz.

Tabela 6 Teor de compostos fenólicos da casca e da semente de *Campomanesia adamantium* obtidos por diferentes sistemas extrativos

Solvente	Fenólicos totais *	
	Casca	Semente
Água	1081,92 ± 8,02 ^e	865,88 ± 22,55 ^d
Metanol 50%	1575,69 ± 37,16 ^c	1827,80 ± 7,50 ^b
Metanol 50%:acetona 70%	1939,93 ± 25,41 ^b	2773,22 ± 76,66 ^a
n-hexano	N.d	228,95 ± 11,86 ^{e,f}
Etanol 70%	1533,36 ± 56,04 ^{c,d}	1675,90 ± 27,95 ^{b,c}
Acetona 70%	3197,91 ± 176,76 ^a	2840,28 ± 51,44 ^a
Acetato de etila	156,25 ± 20,75 ^f	297,28 ± 6,67 ^e

N.d., Não determinado; *, (mg GAE.100g⁻¹ amostra ms); ms, massa seca; Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente 0,05 ou 5%;

Campos et al. (2012), na extração de compostos fenólicos da polpa de *Campomanesia* sp com metanol P.A. obtiveram 249,49 mg GAE.100 g⁻¹ de polpa. Entretanto, Alves et al. (2013), na extração com metanol 70%, para a mesma espécie, obtiveram 1.222,59 mg GAE.100 g⁻¹ de polpa. Já Rocha et al. (2011), utilizando acetona 70% na extração, apresentaram valores de 270 mg de GAE.100 g⁻¹ de polpa. Outro estudo avaliou os compostos fenólicos de extratos metanólicos da folha de *C. adamantium* de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul e obtiveram valores de 720 a 2120 mg GAE.100 g⁻¹ de amostra (COUTINHO et al., 2008).

No presente estudo o teor de fenólicos totais foi superior aos relatados na literatura considerando solventes acetona 70% e metanol (Tabela 6). Contudo deve-se ressaltar que os estudos referenciados (CAMPOS et al., 2012; ALVES et al., 2013; ROCHA et al., 2011 realizaram a extração de polifenóis a partir da polpa e, neste estudo foi da casca e da semente. A casca protege a polpa de ataques de patógenos, injúrias, entre outros, e quando a planta é submetida a condições ambientais extremas ativam-se as rotas de síntese dos metabólitos secundários, resultando em maior produção de compostos fenólicos o que pode justificar os maiores valores obtidos.

De acordo com Rufino et al. (2010), os compostos fenólicos em amostra em massa seca podem ser classificados em compostos de teor baixo (< 1000 mg GAE.100 g⁻¹), médio (1000 - 5000 mg GAE.100 g⁻¹) e teor elevado (> 5000

mg GAE.100 g⁻¹). Dessa forma, neste estudo a casca apresentou valores classificados como teor médio de fenólicos independente dos solventes empregados na extração, com exceção do acetato de etila. Já a semente apresentou teor médio de compostos fenólicos para os solventes metanol 50%, metanol 50%:acetona 70%, etanol 70% e acetona 70%.

5.4.2. FLAVONOIDES

Na Tabela 7 são apresentados os resultados dos teores de flavonoides da casca e semente de guavira por diferentes sistemas extrativos. As extrações com acetona 70% e etanol 70% foram mais eficientes para a casca, porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre esses solventes. Para a semente os resultados da análise de variância mostraram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) nas extrações com n-hexano, etanol 70%, acetona 70% e acetato de etila, concluindo-se que estes solventes foram os mais eficientes na extração dos flavonoides.

Tabela 7 Teores de flavonoides da casca e da semente de *C. adamantium* obtidos por diferentes sistemas extrativos

Solvente	Flavonoides (mg QUE.100 g ⁻¹ amostra ms)	
	Casca	Semente
Água	26,65 ± 5,21 ^c	223,61 ± 22,93 ^b
Metanol 50%	55,01 ± 0,03 ^c	263,32 ± 18,18 ^b
Metanol 50%:acetona 70%	144,15 ± 4,06 ^b	311,67 ± 3,29 ^b
n-hexano	N.d	678,67 ± 109,35 ^a
Etanol 70%	198,98 ± 1,19 ^{a,b}	655,61 ± 17,80 ^a
Acetona 70%	203,03 ± 24,29 ^a	808,98 ± 37,81 ^a
Acetato de etila	55,70 ± 3,50 ^c	844,19 ± 39,55 ^a

N.d., Não determinado; ms, amostra em massa seca; Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey

Kataoka e Cardoso (2013), analisando os extratos hidroetanólicos das folhas de *C. xanthocarpa* e *C. sessiliflora* obtiveram 22,81±0 e 35,60±0,69 µg de QUE.100 g⁻¹ fruto, e Malta et al. (2013), quantificaram no extrato do fruto inteiro de *C. cambessedean* extraído com acetona 80%:metanol 70% obtendo 171,0 ± 40,7 mg de CAT.100 g⁻¹ de fruto. Esses valores foram próximos aos encontrados para a casca (Tabela 7).

Não é tarefa fácil encontrar um método único que seja adequado para a análise de um grupo diverso de fenólicos devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração (ANTOLOVICH et al., 2000)

Como os flavonoides são substâncias polares, geralmente são empregados para sua extração solvente polares (água) e intermediários (metanol, etanol, acetona e acetato de etila) (SIMÕES et al., 2007). Contudo a extração empregando um solvente apolar (n-hexano) apresentou teores consideráveis de flavonoides (Tabela 7). Godoy et al. (s.d), relatam que os flavonoides possuem polaridades variadas, apresentando substâncias iônicas, como as antocianinas, substâncias polares como os flavonoides glicosilados e substâncias apolares como os flavonoides estereificados. Essas bases teóricas justificam os resultados obtidos no presente estudo.

5.4.3. TANINOS

O conteúdo de taninos dos diferentes sistemas extrativos da casca e da semente encontram-se na Tabela 8. O teor de taninos na casca foi menor que na semente provavelmente devido à dificuldade de extração dos taninos presentes nos tecidos vegetais da casca por estarem ligados a carboidratos, proteínas, parede celular ou por serem insolúveis nos solventes utilizados (Salunkhe et al., 1990).

Tabela 8 Teores de taninos da casca e da semente de *Campomanesia adamantium* obtidos por diferentes sistemas extrativos

Solvente	Taninos (mg CAT.100 g ⁻¹ amostra ms)	
	Casca	Semente
Água	316,07 ± 19,41 ^c	1205,37 ± 92,67 ^d
Metanol 50%	322,84 ± 2,94 ^c	1705,56 ± 67,91 ^c
Metanol 50%:acetona 70%	265,93 ± 2,05 ^c	527,11 ± 10,87 ^e
n-hexano	N.d	N.d
Etanol 70%	453,14 ± 18,77 ^b	899,01 ± 63,06 ^d
Acetona 70%	642,32 ± 18,77 ^a	4712,63 ± 119,51 ^a
Acetato de etila	184,70 ± 16,66 ^d	2689,91 ^b

N.d., Não determinado; ms. Massa seca; Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey

A acetona 70% foi o solvente com maior eficiência na extração de taninos para a casca e semente (Tabela 8), diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais sistemas extrativos. Rocha et al. (2011), na extração de taninos condensados do fruto de *Campomanesia* sp (casca+polpa) empregando acetona 70%, etanol 95% e metanol 99,8%, obtiveram de 93 ± 10 mg CAT.100g⁻¹ a 159 ± 13 mg CAT.100g⁻¹ de fruto, sendo mais eficiente a acetona 70%, o que corrobora com o presente trabalho.

5.5. ANTIOXIDANTES

5.5.1. EXTRATOS

A atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo sequestro radicalar do DPPH[•] e ABTS^{•+} são apresentados na Tabela 9. O extrato aquoso da casca foi menos eficiente no sequestro radicalar do DPPH em relação aos outros solventes. No sequestro do radical ABTS^{•+} os solventes metanol 50%, etanol 70% e acetona 70% apresentaram maior atividade antioxidante.

No que se refere à semente os menores resultados obtidos para o IC₅₀ foram para as amostras extraídas com o n-hexano e acetato de etila. As menores atividades antioxidantes frente ao ABTS^{•+} foram observadas na água e no acetato de etila. A polaridade e o solvente escolhido podem afetar a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio, influenciando na atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001). A atividade antioxidante frente ao DPPH^{•+} apresenta correlação ao teor de compostos fenólicos (Tabela 6) nos extratos obtidos com acetona 70%.

Na Figura 7 são apresentados os valores do percentual de inibição do radical DPPH[•] dos extratos de casca e semente obtidos em diferentes solventes. O extrato que apresentou maior porcentagem de inibição foi o metanol 50% ($86,54 \pm 0,40$) seguido do etanol 70% ($75,63 \pm 1,09$) ambos na semente. Já para a casca foi o acetona 70% ($66,29 \pm 0,00$) seguido do metanol 50%:acetona 70% ($72,51 \pm 1,61$). Não foram encontrados estudos da atividade antioxidante da casca e semente de *C. adamantium*, porém Kataoka e Cardoso et al. (2013)

analisaram extratos aquosos e etanólicos das folhas de *C. xanthocarpa* e *C. sessiliflora* e obtiveram um percentual de inibição de $81,37 \pm 3,93$ a $91,23 \pm 0,07$.

Os extratos da casca obtidos com o n-hexano e acetato de etila e os extratos da semente com a mistura metanol 50%:acetona 70% para a semente não apresentaram inibição de DPPH na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O controle positivo (BHT) na concentração de $34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou uma inibição de 77%. Na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a maioria dos extratos apresentaram percentagem de inibição próxima ao do BHT, sendo muito menor nos extratos aquoso da casca e, n-hexano e acetato de etila da semente.

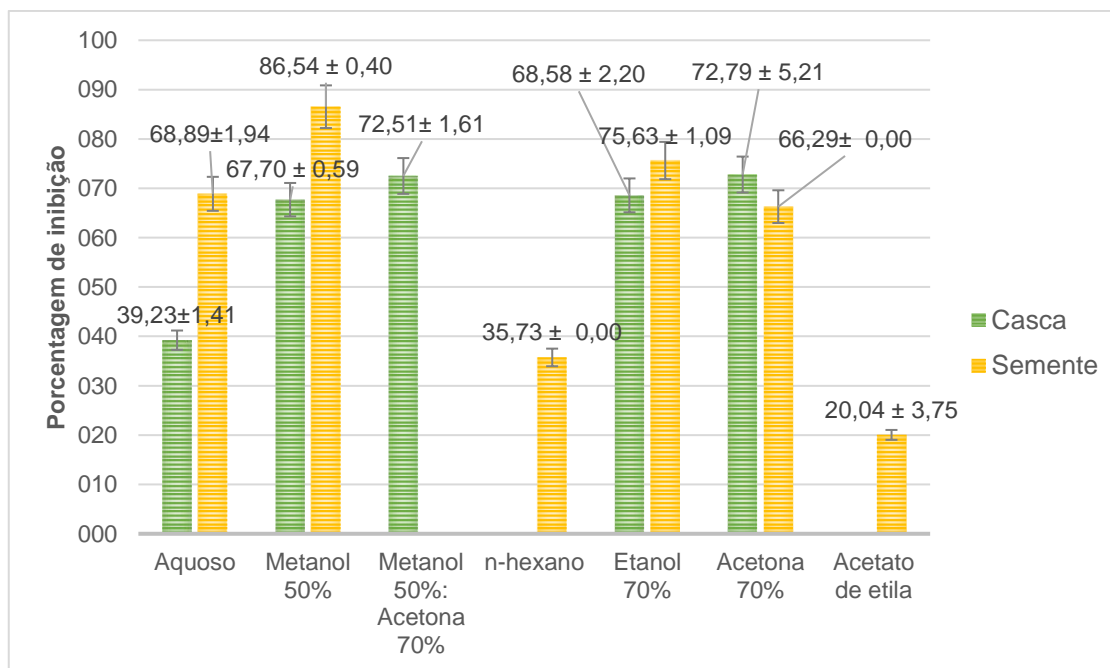


Figura 7 Percentual de inibição do radical DPPH obtido nas análises da casca e semente de *C. adamantium* por diferentes sistemas extrativos com concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 9 Atividade antioxidante dos diferentes solventes extrativos na casca e semente de *Campomanesia adamantium* e BHT pelos métodos de sequestro de radicais DPPH (IC₅₀) e ABTS ($\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ de amostra)

Solvente	DPPH		ABTS	
	IC ₅₀ (mg amostra.mL ⁻¹ DPPH)		$\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ de amostra	
	Casca	Semente	Casca	Semente
Água	0,723 ± 0,006 ^c	0,362 ± 0,025 ^b	39,60 ± 9,31 ^{b,c}	62,61 ± 5,86 ^c
Metanol 50%	0,340 ± 0,004 ^b	0,168 ± 0,008 ^b	134,09 ± 12,51 ^{a,b}	126,31 ± 4,36 ^b
Metanol 50%:acetona 70%	0,285 ± 0,021 ^b	0,144 ± 0,001 ^b	94,74 ± 18,83 ^b	136,12 ± 10,64 ^{a,b}
n-hexano	N.d.	0,837 ± 0,000 ^c	3,35 ± 0,05 ^c	173,62 ± 13,96 ^{a,b}
Etanol 70%	0,310 ± 0,081 ^b	0,222 ± 0,002 ^b	163,70 ± 14,27 ^a	155,52 ± 6,48 ^{a,b}
Acetona 70%	0,249 ± 0,085 ^b	0,326 ± 0,000 ^b	212,88 ^a	178,43 ± 9,88 ^a
Acetato de etila	N.d.	1,179 ± 0,149 ^d	15,16 ± 3,56 ^c	18,25 ± 2,69 ^c
BHT	0,020 ± 0,000 ^a	0,020 ± 0,000 ^a	N.d.	N.d.

N.d., Não determinado; Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente 0,05 ou 5%

5.5.2. ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais da casca e da semente de guavira apresentaram um baixo potencial antioxidante pelos métodos de ABTS e DPPH (Tabela 10), esses resultados podem ser relacionados aos constituintes majoritários, pois o Limoneno, α e β -pineno, Z- β -ocimeno, biciclogermacreno e δ -cadineno possuem baixo potencial antioxidante. Ruberto e Baratta (2000) relatam que os constituintes monoterpenos não-oxigenados e os sesquiterpenos dos óleos essenciais, representados por compostos acíclicos, mono e bicíclicos possuem escasso potencial antioxidante.

Coutinho et al. (2009) em análise do óleo essencial da folha de *C. adamantium* extraído por hidrodestilação apresentaram percentagem de inibição dos radicais DPPH* de 9,91% ($2,270 \mu\text{g.mL}^{-1}$) no estágio de florescimento, 7,47% ($2,390 \mu\text{g.mL}^{-1}$) no estágio reprodutivo e 6,89% ($2,320 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na fase vegetativa.

Tabela 10 Atividade antioxidante do óleo essencial extraído por hidrodestilação pelo período de 3 h da casca e semente de *Campomanesia adamantium* e BHT pelos métodos de sequestro de radicais DPPH (IC_{50}) e ABTS ($\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ de extrato)

Óleo essencial	DPPH	ABTS
	IC_{50} (mg.mL^{-1})	$\mu\text{M trolox.g}^{-1}$
Casca	$3,131 \pm 0,05^b$	$2,75 \pm 0,78^a$
Semente	$7,122 \pm 0,06^c$	$1,52 \pm 0,28^a$
BHT	$0,020 \pm 0,000^a$	N.d

N.d., Não determinado; Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente 0,05 ou 5%

No presente estudo o óleo essencial da casca e semente de *C. adamantium* extraídos por hidrodestilação no período reprodutivo, o percentual de inibição foi de 32% ($2210 \mu\text{g.mL}^{-1}$) da casca e 16,59% ($2153 \mu\text{g.mL}^{-1}$) da semente, sendo superior aos encontrados no óleo essencial da folha relatado por Coutinho et al. (2009).

5.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.6.1. TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO

A Tabela 11 mostra as concentrações inibitórias dos extratos e óleos essenciais (hidrodestilação) avaliados frente a bactérias no teste de microdiluição.

A atividade antimicrobiana foi observada no extrato hexânico da casca e do acetato de etila da semente com concentração de inibição de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O EHC inibiu as bactérias *S. aureus* e *S. pyogenes* e, o EAES inibiu o *S. pyogenes*. O óleo essencial da casca extraído por hidrodestilação durante 3 h apresentou inibição microbiana, a concentração de 450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibindo a bactéria *Klebsiella sp.*

A ação antimicrobiana desses extratos pode ser justificada pela presença de um número maior de componentes apolares, o que favorece a ruptura da parede da membrana celular das bactérias *S. aureus* e *S. pyogenes*, ambas Gram-Positivas.

Segundo Bajpai et al. (2007) alguns óleos essenciais possuem maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, pois as Gram-negativas possuem uma bicamada fosfolipídica na parede celular, tornando-a mais resistente. Porém no trabalho apresentado o óleo essencial inibiu uma bactéria Gram-negativa (*Klebsiella sp*) e, apresentou ação bacteriostática em Gram-positivas (*S. pyogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativa (*Pseudomonas sp*)

Os micro-organismos *Salmonella sp*, *Proteus sp* e *Shigella sp.*, não apresentaram sensibilidade frente aos extratos e óleos essenciais estudados.

Tabela 11 Atividade antimicrobiana em meio líquido dos extratos e óleos essenciais (hidrodestilação) da casca e semente de guavira

Amostra	Extrato	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
		<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
Casca	EEC	*	*	#	#	*
	EMC	*	*	#	#	*
	EAEC	*	*	*	*	*
	EAC	*	*	*	*	#
	EHC	*	*	2000	2000	#
	O.E. 3h	*	450	#	#	*
	O.E. 5h	*	*	#	*	#
Semente	EES	*	*	#	*	*
	EMS	*	*	*	*	*
	EAES	*	*	#	2000	#
	EAS	*	*	*	#	*
	EHS	#	*	#	#	#
	O.E. 3h	*	*	*	*	#
	O.E. 5h	*	*	*	*	#

* Extratos que não apresentaram atividade nas concentrações avaliadas. # Extratos que apresentaram atividade bacteriostática na concentração de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.6.2. TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

Foram testadas 6 diluições do extrato vegetal e do óleo essencial, porém nenhuma apresentou formação de halo de inibição (≥ 6 mm). Este resultado pode ser atribuído à dificuldade de amostras oleosas se difundirem em meio sólido. Bona et al. (2014), em estudo comparativo da atividade antimicrobiana com diferentes métodos de avaliação, observaram que o método de microdiluição em caldo foi a melhor opção, apresentando resultado quantitativo mais confiável que a difusão em disco e é mais econômica que a difusão em disco e em poço.

Utilizando a mesma metodologia de difusão em disco, Coutinho et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* extraídos em diferentes estádios de maturação. Os autores verificaram alta atividade contra *C. albicans* (ATCC 10231), *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e atividade moderada contra *E. Coli* (ATCC 25922). Em outro estudo com frutos, Cardoso et al. (2010) verificaram a existência de atividade antimicrobiana de extratos e frações hexânicas de *C. adamantium* e *C. pubescens* frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), Gram-negativas (*E. coli* e *S. setubal*) e leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) utilizando o método de microdiluição com concentração mínima inibitório (MIC) variando de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Kataoka et al., (2008) observaram que o extrato etanólico (1:50) da casca de *C. adamantium* inibiu *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* e *C. albicans*.



Figura 8 Difusão em disco da *Streptococcus pyogenes* com o antibiótico cloranfenicol (30 μ g)
Fonte: O autor, 2015

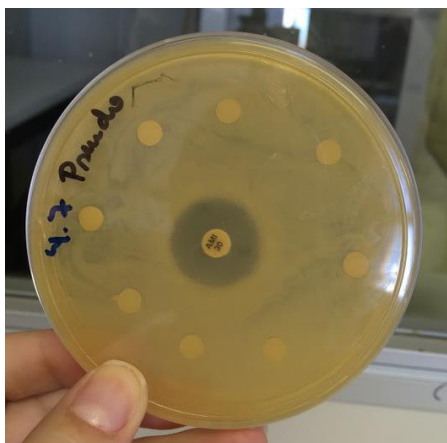


Figura 9 Difusão em disco da *Pseudomonas* com antibiótico amicacina (30 μ g)
Fonte: O autor, 2015

Estes resultados mostram que há necessidade de realizar novos estudos sobre a difusão em ágar dos extratos vegetais e óleos essenciais e principalmente aumentar as concentrações testadas.

6. CONCLUSÕES

- O rendimento do extrato de guavira foi influenciado pela escolha do material vegetal e do solvente sendo maior na semente. Os solventes etanol 70% e metanol 50% foram os mais eficientes na extração.
- A composição química do óleo variou com o método e tempo de extração. O processo supercrítico foi mais eficaz na obtenção do extrato global, porém a separação do óleo volátil foi maior na hidrodestilação.
- O α -pineno e β -pineno, Limoneno e Cis- β -Ocimeno foram os componentes majoritários dos óleos essenciais da casca e da semente de guavira extraídos por hidrodestilação. O Limoneno, Thujopseno e Biciclogermacreno foram os majoritários na extração supercrítica.
- A acetona 70% foi o solvente mais eficaz na extração de polifenóis, flavonoides e taninos em ambas as amostras (casca e semente).
- A semente apresentou maior teor de flavonoides, taninos condensados e atividade antioxidante frente ao sequestro radicalar de DPPH[•] e ABTS^{•+}. A casca apresentou maior teor de polifenóis.
- O solvente acetato de etila foi o menos eficaz na extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, portanto o menos viável.
- O extrato hexânico da casca de guavira apresentou inibição microbiana para *S. aureus* e *S. pyogenes*. O extrato de acetato de etila da semente inibiu *S. pyogenes*. O óleo essencial da casca de guavira obtido por hidrodestilação apresentou inibição para *Klebsiella* sp.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, R.P. (2007) Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. 4.ed. Illinois: **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, 804p
- ALVES, A. L. et al. (2013). 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.
- ANDRADE, M, A. et al. (2012). Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408.
- ANGELO, P. M; Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 1-9.
- ANTOLOVICH, M. et al. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, p. 989-1009.
- ARAÚJO, P. W. B. et al. (2005). Flavonoides e hipertensão. **Revista Bras. Hipertens**. v. 12, n. 3, p. 188-189.
- ATTI-SANTOS, A. C. et al. (2005). Extraction of essential oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Brazilian Archives of biology and technology**. v. 28, n. 1, p. 155-260.
- BAJPAI, V. K. et al. (2007). Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. **Food Chemistry**. v. 105, n.3, p. 1061-1066.
- BIAVATTI, M. W. et al. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick. v. 93, n. 2/3, p; 385-389
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 588-594.
- BONA, E. A. M. et al. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225.
- BOTRE, D. A. et al. (2010) Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, Viçosa. v. 57, n. 3, p. 283-291.
- BREDA, C. A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CORREIA, C. A. C. (2012) Shelf life of powered *Campomanesia adamantium* pulp in controlled environments. **Food Chemistry**. v. 135, p. 2960-2964.

- BREDA, C. A. et al. (2016). Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruits residues of brazilian savanna plants aiming its use as safe fungicides. **Natural products and bioprospecting**. Doi: 10.1007/s13659-016-0101-y
- CAMPOS, R. P. et al. (2012). Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP. v. 34, n. 1, p. 41-49.
- CANNAS, A. (1999). **Tannins**: fascination but sometimes dangerous molecules. Itaka, disponível em: <http://ansci.comell.edu/plants/toxicagents/tannin/tannin.htm>
- CARDOSO, C. A. L. et al. (2010). Antimicrobial activity of extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**. v. 13, n. 5, p.1273-1276
- CARVALHO, R. A. (2016). Desenvolvimento de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite e nanofibra de celulose incorporados com óleo essencial de tomilho. 140 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- CASSEL, E. et al. (2009). Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176.
- CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J Food Drug Anal** 10, p.178-182
- CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. (1998). Are tannis a double-edged sword in biology and health?. **Trends Food Sci. Technol.** v.9, n.4, p. 168-175.
- COUTINHO, I. D. et al (2008). Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidante capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**. v. 33, n. 4, p. 53-60.
- COUTINHO, I. D. et al. (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evolution of antioxidante and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, oct./dec.
- COUTINHO, I. D. et al (2010). Influência sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognesia**, v. 20, n. 3, p. 322-327.
- CZAIKOSKI, K. et al. (2015). Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. **The jornal of Supercritical Fluids**. v. 98, p. 79-85.

- DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. (1986) Tannins analysis of food products. **CRC Critical reviews in food Science and nutrition**, v. 24, p.401-449.
- DREOSTI, I. E. (2000) Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. **Nutrition**. v.16, p. 692-694.
- EHLERT P. A. D. et al. (2006). Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu. v.8, n.2, p.79-80.
- FERREIRA, L. C. et al. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p.100-108
- FOOD INGREDIENTES BRASIL. (2009). **Os antioxidantes**. n. 6, p. 16-30.
- GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. (2006). Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. Publicatio UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.4, n.12, p.7-15.
- GUIMARÃES, L G. L. et al. (2011) Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472.
- GODOY, R. L. O. et al. (S.D.). Separação e identificação de flavonoides por UPLC-ESI-QTOF-MSMS. Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO XIV.
- HAIDA, K. S. et al. (2011). Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. Ano 9, n. 28.
- JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. (2007). Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382-387.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, N. 3, p. 519-528.
- KATAOKA, V. M. F. et al. (2008). Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cascas dos frutos e das folhas de *Campomanesia adamantium*. In: IX Simpósio Nacional Cerrado. **Anais de Resumo**, Brasília.
- KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. (2013). Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.1, p.121-129.
- LEÃO, M. M. (2012). Características do óleo essencial extraído das folhas de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum (Cambuci) obtido em duas microrregiões da Mata Atlântica. **TESE** (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- LEWIS, M.A.; YAMAMOTO, E. (1989). Tannins: their place in plant metabolism. In: Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. (Ed) **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum Press. p. 23-46.
- MALLET, A. C. T. (2011). Utilização de óleos essenciais de condimentos na conservação de queijos tipo quark. 135p. **Tese** (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- MALTA, L. G. et al. (2013). Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**. v.53, p. 417-425.
- MARIN, R. et al. (2008). Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 2, p. 172 – 177.
- MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. (2004). Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 94, n. 1, p. 55-57.
- MAXSON, E. D.; ROONEY, L. W. (1972). Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chemistry**. v.49, p.719-729.
- MEIRELES, M. A. A. (2006). Extração supercrítica: aspectos técnicos e económicos. **Revista Fitos**. v. 2, n. 1, p. 65-72.
- MELO, E. et al. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 639-644.
- MELO, J. P. C.; SANTOS, S. C. (2001). **Em farmacognesia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. O., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre. 3ª ed.
- MENSOR, L. L. et al. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoter Res**, v. 15, n.2, p. 117-120.
- MICHIELIN, E. M. Z. et al. (2005). Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.33, p. 131-138.
- MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. (2009). Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognesia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. p.189-218
- NCCLS (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M7-A6, v.23, n.2.
- OLIVEIRA, A. C. et al. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. v.32, n.3, p.689-702.
- OLIVEIRA, V. S. et al. (2014a) Retention of vitamin C in microencapsulated guava pulp by Spray Drying. **Revista Faculdade Nacional de Agronomia**, Medellín. v. 67, n. 2. P. 202-204 (Suplemente II)

OLIVEIRA, A. L. et al (2014b). Isolation by pressurized fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**. v. 145, p.522-529

PASCOAL, A. C. R. F. et al. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**. v.19, n.2, p. 1843-1855. Doi: 10.3390/molecules19021843

PAVAN, F. R. et al. (2009). Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1222-1226.

PEREIRA, A. L.F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. (2009). Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: ver. Soc. Bras. Alim. Nutr.** = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, v. 34, n. 3, p. 231-247.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152.

PIVA, M. G. (2002). O Caminho das Plantas Medicinais: **Estudo Etnobotânico**. Rio de Janeiro: Mondrian.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. (2006) Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu. v. 8, n. 4, p. 92-95.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L.; YAMAMOTO, N. T. (2007) Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5 n. 2, p. 774-776.

ROCHA, W. S. et al. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP. v. 33, n. 4, p. 1215-1221.

RODRIGUES, H. G. et al. (2003). Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol – HDL. **Revista de Nutrição**. v.16, n.3, p. 315-320.

ROESLER, R. et al. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. (2002). Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Revista de Nutrição**. v.22, p.19-34.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**. v. 69, n. 2, p. 167-174.

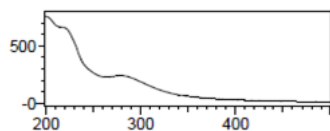
- RUFINO, M. S. M. et al. (2007a). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 127, p. 1-4.
- RUFINO, M. S. M. et al. (2007b). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 128, p. 1-4.
- RUFINO, M. S. M. et al. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002.
- SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. **Boca Raton : CRC Press**. 200p. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=_E9yNLJNW0kC&oi=fnd&pg=PA1&ots=pnt-UUA-Mj&sig=0lxH5_9Lv3fM9nbndyZFpE_w2qQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- SANTOS, A. S. et al. (2004). Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico 99**. Belém, PA.
- SIANI, A. C. et al. (2000). Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p. 38-43.
- SILVA, J. R. M.; CARDOSO, C. A. L.; RE-POPPI, N. (2009). Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 4, p. 478-479.
- SIMÕES, C.M.O. et al. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto alegre: UFSC/UFRGS. 1104p.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. (2001). Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, orgs. **Farmacognesia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC. V. 3, Cap 18, p.397-420
- SINGH, J.; Baghotia, A.; GOEL, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. v. 3, n. 4.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult**. v.16, p. 144-158.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178.
- SOARES, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Ver. Nutr**. v.15, n.1, p.71-81.
- SOUSA, C. M. M. et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, n.2, p. 351-355.

- SOVOVÁ, H. (2012). Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. **The journal of Supercritical Fluids**. v. 66, p 73-79
- StatSoft.Inc. (2007). **STATISTICA**.(data analysis software system), version 8.0. Disponível em: <www.statsoft.com>
- VALLILO, M. I. et al. (2006a). Chemical composition of *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg' fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.4, n.26, p.805-810.
- VALLILO, M. I. et al. (2006b). Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista Instituto Florestal**. São Paulo. v.18, n, único. 15-22
- VIECILI, P. R. N. et al. (2014) Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endotelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. v.234, p. 85-92.
- VISCARDI, D. Z. et al. (2015) Antinociceptive activity of the essential oil from *Campomanesia adamantium* fruit in rats. In: 3º Simpósio Internacional de Neurociência da Grande Dourados, Anais, Dourados, SINGraD.
- WORLD TRADE ORGANIZATION. (2016). Disponível em: <<http://trade.nosis.com/pt/Comex/Importacao-Exportacao/Brasil/oleos-essenciais-oleos-essenciais-desterpenados-ou-nao-incluidos-os-chamados-concretos-ou-absolutos/BR/3301#>>. Acesso em: 09 de junho de 2016.

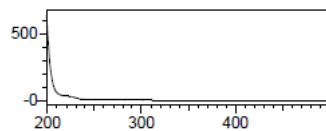
APÊNDICE A:

ESPECTROS ULTRA VIOLETAS DA CASCA E SEMENTE DE GUAVIRA

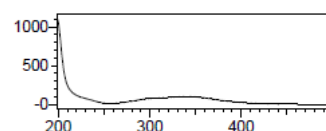
Retention Time : 1.288



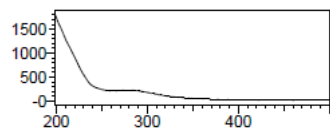
Retention Time : 30.529



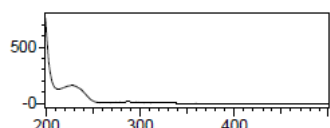
Retention Time : 37.709



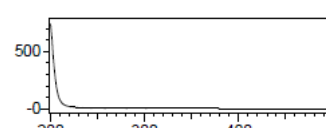
Retention Time : 1.362



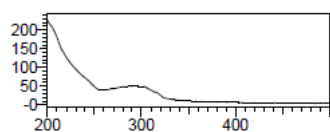
Retention Time : 32.477



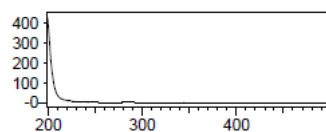
Retention Time : 39.140



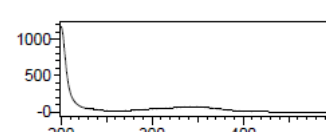
Retention Time : 1.840



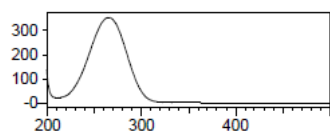
Retention Time : 32.643



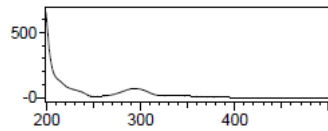
Retention Time : 38.699



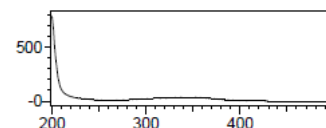
Retention Time : 3.475



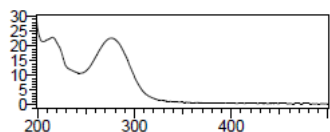
Retention Time : 33.057



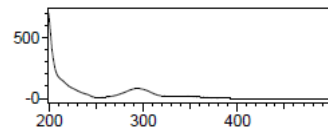
Retention Time : 39.554



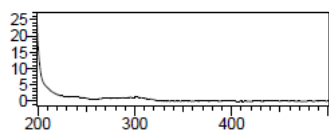
Retention Time : 4.346



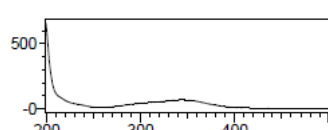
Retention Time : 33.946



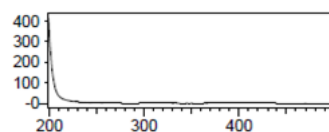
Retention Time : 5.835



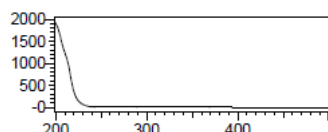
Retention Time : 34.328



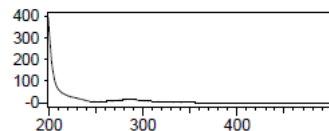
Retention Time : 24.227



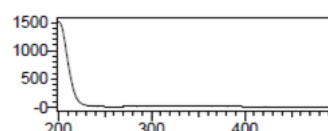
Retention Time : 35.965



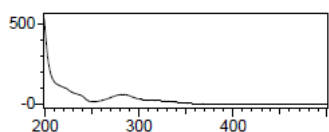
Retention Time : 27.902



Retention Time : 36.618



Retention Time : 29.736



Retention Time : 36.893

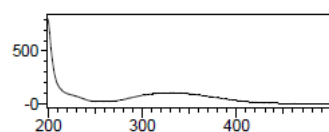


Figura 10 Espectro ultra violeta da casca de guavira a 290 nm

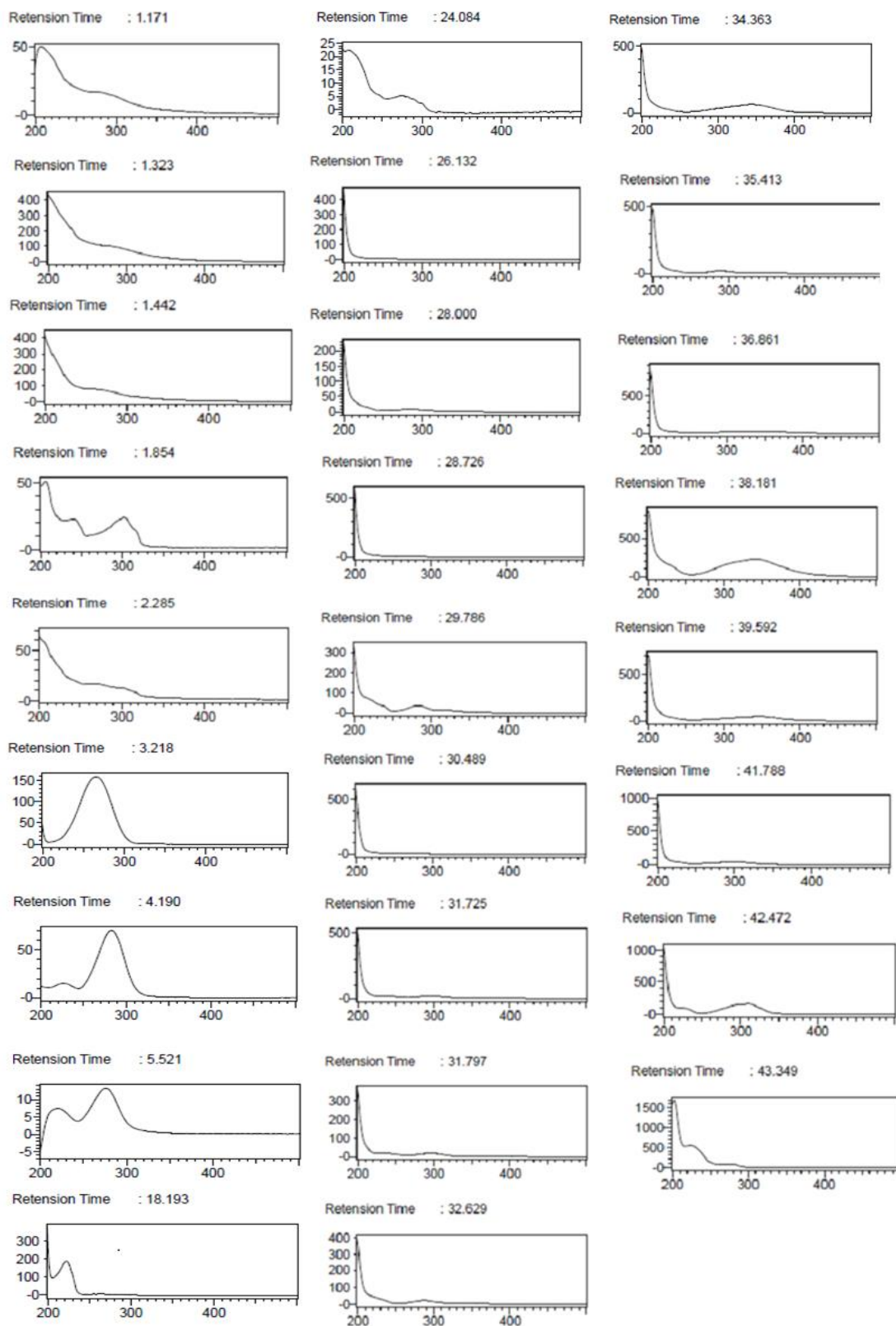


Figura 11 Espectros UV da semente de guavira a 290 nm

APÊNDICE B:

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *C. adamantium*

Tabela 12 Composição química de óleo essencial da casca da *Campomanesia adamantium* extraído por 3 e 5 h pelos métodos de hidrodestilação e extração supercrítica

N	Componentes	IRT	Hidrodestilação		Extração supercrítica
			3 horas	5 horas	3 horas
1	Salvene	858	0,11 ± 0,01	0,28 ± 0,05	0,32
2	methyl tiglate	863	0,21 ± 0,29	-	0,37
3	Santene	884	Tr	Tr	0,27
4	Cumene	924	0,45 ± 0,08	0,21 ± 0,00	0,31
5	α-Pinene	932	4,13 ± 0,78	3,56 ± 0,16	2,12
6	Camphene	946	0,12 ± 0,00	-	0,20
7	verbenene	961	Tr	-	Tr
8	β-Pinene	974	3,94 ± 1,19	2,78 ± 0,19	2,43
9	Myrcene	988	1,36 ± 0,35	3,04 ± 1,83	0,34
10	α-Phellandrene	1002	2,01 ± 0,16	0,94 ± 0,02	0,78
11	δ-Carene	1008	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,31
12	α-Terpinene	1014	0,36 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,26
13	o-Cymene	1022	0,74 ± 1,05	Tr	0,88
14	Limonene	1024	14,19 ± 1,57	-	11,53
15	1,8-Cineole	1026	1,78 ± 2,52	-	-
16	Z-β-Ocimene	1032	0,11 ± 0,01	20,48 ± 0,87	0,14
17	Heptyl acetate	1038	Tr	-	0,11
18	E-β-Ocimene	1044	3,48 ± 0,39	2,54 ± 0,03	0,34
19	γ-Terpinene	1054	0,83 ± 0,30	0,42 ± 0,02	0,29
20	Terpinolene	1086	1,55 ± 0,38	1,10 ± 0,01	0,83
21	Linalool	1095	3,02 ± 0,23	4,77 ± 0,05	0,52
22	endo-Fenchol	1114	0,11 ± 0,01	Tr	0,12
23	Stemone	1124	Tr	-	0,12
24	trans pinocarveol	1134	Tr	-	0,13
25	Geijerene	1138	-	-	-
26	isopulegol	1145	-	-	-
27	Menthone	1148	-	-	-
28	Borneol	1165	0,26 ± 0,11	0,11 ± 0,06	0,15
29	Menthol	1167	-	-	-
30	Santolinyl acetate	1171	Tr	0,73 ± 0,01	-
31	Terpinen-4-ol	1174	0,71 ± 0,15	-	Tr
32	α-Terpineol	1186	2,20 ± 0,26	2,50 ± 0,02	0,19
33	Myrtenal	1195	Tr	-	-
34	verbenone	1204	Tr	0,38 ± 0,09	0,12
35	trans-Piperitol	1207	0,13 ± 0,01	-	Tr
36	trans-Carveol	1215	Tr	-	-

N	Componentes	IRT	Hidrodestilação		Extração supercrítica
			3 horas	5 horas	3 horas
37	Nerol	1227	0,12 ± 0,02	-	Tr
38	Carvone	1239	0,12 ± 0,01	-	Tr
39	Geraniol	1249	0,13 ± 0,02	-	0,12
40	Carvenone	1255	Tr	-	Tr
41	Perilla aldehyde	1269	0,17 ± 0,06	0,22 ± 0,01	Tr
42	Bornyl acetate	1287	-	-	-
43	Carvacrol	1298	0,15 ± 0,04	0,36 ± 0,08	0,11
44	Methyl geranate	1322	0,13 ± 0,01	-	0,11
45	δ-Elemene	1335	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,04	Tr
46	o-Cubebene	1345	0,11 ± 0,00	0,16 ± 0,03	0,12
47	Dihydro eugenol	1366	-	0,28 ± 0,07	-
48	α-Ylangene	1373	0,14 ± 0,04	1,38 ± 0,25	0,18
49	Isoledene	1374	0,61 ± 0,71	-	2,34
50	α-Copaene	1374	0,98 ± 0,02	-	0,33
51	β-Damascenone	1383	Tr	Tr	-
52	β-Cubebene	1387	0,12 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,11
53	β-Elemene	1389	0,33 ± 0,27	-	Tr
54	Sibirene	1400	0,11 ± 0,00	-	0,13
55	α-Gurjunene	1409	0,46 ± 0,15	-	0,34
56	β-cedrene	1419	-	4,61 ± 4,61	-
57	Thujopsene	1429	6,76 ± 0,25	0,60 ± 0,03	12,15
58	β-Copaene	1430	0,51 ± 0,16	0,16 ± 0,02	0,56
59	Nerone	1438	Tr	3,19 ± 0,60	-
60	Aromadendrene	1439	2,88 ± 0,20	-	3,04
61	Cedrane	1441	0,27 ± 0,06	0,16 ± 0,08	0,17
62	Epi cedrane	1447	0,15 ± 0,21	-	0,18
63	trans-muurolo-3,5-diene	1451	Tr	-	-
64	α-Humulene	1452	1,35 ± 1,91	3,46 ± 1,73	-
65	allo-Aromadendrene	1458	1,99 ± 1,61	1,22 ± 0,61	6,53
66	α-Acoradiene	1464	0,82 ± 1,16	-	1,01
67	trans-Cadina-1(6),4-diene	1475	0,32 ± 0,02	0,99 ± 0,14	0,32
68	γ-Muurolole	1478	0,78 ± 1,10	-	-
69	Widdra-2,4(14)-diene	1481	0,36 ± 0,50	2,11 ± 1,06	0,34
70	α-Amorphene	1483	0,12 ± 0,17	0,34 ± 0,17	0,14
71	Germacrene D	1484	3,70 ± 1,97	-	4,14
72	β-Guaiene	1492	0,23 ± 0,18	-	Tr
73	Capillene	1493	0,57 ± 0,80	-	1,70
74	Bicyclogermacrene	1500	6,90 ± 2,82	9,32 ± 2,66	19,38
75	α-Muurolole	1500	Tr	0,46 ± 0,08	0,13
76	Farenal	1508	0,62 ± 0,87	-	0,17
77	δ-Amorphene	1511	0,60 ± 0,14	1,94 ± 0,97	0,22
78	γ-Cadinene	1513	1,16 ± 0,21	-	1,28
79	δ-Cadinene	1521	2,57 ± 1,43	6,62 ± 2,50	4,59
80	Lilial	1527	-	0,34 ± 0,21	-
81	Trans-Cadina-1,4-diene	1533	0,85 ± 0,89	0,28 ± 0,10	3,85

N	Componentes	IRT	Hidrodestilação		Extração supercrítica
			3 horas	5 horas	3 horas
82	α -Cadinene	1537	0,26 \pm 0,11	3,11 \pm 0,49	0,22
83	δ -Cuprenene	1542	0,51 \pm 0,18	0,13 \pm 0,07	0,23
84	Selina-3,7(11)-diene	1545	0,29 \pm 0,10	0,22 \pm 0,10	0,25
85	Elemicin	1555	0,14 \pm 0,02	3,27 \pm 1,36	0,11
86	Germacrene B	1559	0,69 \pm 0,29	1,18 \pm 0,09	0,49
87	Nerolidol	1561	0,20 \pm 0,14	-	Tr
88	Davanone B	1564	0,86 \pm 0,09	1,58 \pm 0,07	1,03
89	Maaliol	1566	-	-	Tr
90	Palustrol	1567	0,55 \pm 0,11	-	0,47
91	Spathulenol	1577	1,22 \pm 0,97	3,31 \pm 0,28	3,55
92	Globulol	1590	3,68 \pm 0,54	2,42 \pm 1,21	3,68
93	Cubeban-11-ol	1595	0,75 \pm 0,60	5,90 \pm 3,41	0,39
94	Cedrol	1600	1,65 \pm 1,05	0,87 \pm 0,31	0,55
95	Guaiol	1600	0,45 \pm 0,23	-	0,29
96	α -Atlantol	1608	0,68 \pm 0,52	1,11 \pm 0,76	0,45
97	Isomyristicin	1616	0,32 \pm 0,11	0,12 \pm 0,03	Tr
98	10-di-epi-Cubenol	1618	0,21 \pm 0,15	-	0,26
99	junenol	1619	0,22 \pm 0,03	2,51 \pm 1,49	0,18
100	1-epi-Cubenol	1627	1,14 \pm 0,19	0,18 \pm 0,07	1,22
101	γ -Eudesmol	1630	-	0,27 \pm 0,12	0,41
102	α -acorenol	1632	0,54 \pm 0,16	0,41 \pm 0,20	0,54
103	epi- α -Cadinol	1638	0,61 \pm 0,12	0,29 \pm 0,18	1,22
104	α -muurolol	1644	0,50 \pm 0,56	0,27 \pm 0,09	2,68
105	β -Eudesmol	1649	0,68 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02	0,44
106	α -Cadinol	1652	0,36 \pm 0,06	1,00 \pm 0,42	0,21
107	Valerianol	1656	0,40 \pm 0,16	-	0,29
108	Allohimachalol	1661	0,39 \pm 0,55	-	1,51
109	7-epi- α -Eudesmol	1662	0,97 \pm 1,16	1,53 \pm 0,22	0,12
110	Lyrar	1665	0,24 \pm 0,08	0,20 \pm 0,10	Tr
111	Bulnesol	1670	0,22 \pm 0,01	-	0,19
112	Apioli	1677	0,32 \pm 0,01	3,55 \pm 0,08	0,19
113	Eudesm-7(11)-em-4-ol	1700	0,21 \pm 0,11	Tr	0,22
114	Nuciferal	1727	Tr	0,55 \pm 0,05	0,18
Total			99,33%	99,70%	99,94%

As concentrações com desvio padrão foram feitas em triplicata, as demais devido a pequena quantidade de amostra, foram feitas apenas uma vez. IRT, Índice de retenção tabelado; Tr, porcentagem \leq 0,1%

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA SEMENTE DE *C. adamantium*

Tabela 13 Composição química de óleo essencial da semente da *Campomanesia adamantium* extraído por 3 e 5 h pelos métodos de hidrodestilação e extração supercrítica

N	Componentes	IRT	Concentração (%)			
			Hidrodestilação		Extração supercrítica	
			3 horas	5 horas	3 horas	5 horas
1	Salvene	858	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,14	0,29	0,19
2	methyl tiglate	863	0,17 ± 0,24	-	1,34	0,29
3	Santene	884	0,22 ± 0,07	-	0,32	0,33
4	Cumene	924	0,60 ± 0,37	0,32 ± 0,01	0,31	0,29
5	α-Pinene	932	9,93 ± 1,66	10,67 ± 0,58	3,59	2,43
6	Camphene	946	0,30 ± 0,01	-	0,28	0,16
7	verbenene	961	Tr	-	Tr	0,11
8	β-Pinene	974	10,32 ± 1,29	8,51 ± 0,38	5,59	4,41
9	Myrcene	988	1,69 ± 0,21	1,56 ± 0,06	0,21	0,43
10	α-Phellandrene	1002	2,89 ± 1,53	3,15 ± 0,04	0,9	0,82
11	δ-Carene	1008	0,22 ± 0,16	0,11 ± 0,01	0,32	0,33
12	α-Terpinene	1014	0,58 ± 0,33	0,23 ± 0,23	0,29	0,27
13	o-Cymene	1022	1,67 ± 0,89	-	0,9	0,85
14	Limonene	1024	17,76 ± 4,28	-	10,9	13,4
15	1,8-Cineole	1026	1,64 ± 2,06	-	Nd	Nd
16	Z-β-Ocimene	1032	Tr	25,25 ± 0,32	0,11	0,13
17	Heptyl acetate	1038	Tr	-	Tr	0,11
18	E-β-Ocimene	1044	3,24 ± 1,09	6,37 ± 0,18	0,58	1,63
19	γ-Terpinene	1054	1,36 ± 0,42	1,31 ± 0,04	0,45	0,97
20	Terpinolene	1086	1,77 ± 0,48	1,88 ± 0,01	0,79	1,12
21	Linalool	1095	2,37 ± 0,08	3,30 ± 0,05	0,43	1,59
22	endo-Fenchol	1114	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,00	0,11	0,15
23	Stemone	1124	0,12 ± 0,02	-	0,11	0,12
24	trans pinocarveol	1134	Tr	-	0,11	Tr
25	Geijerene	1138	-	-	-	Tr
26	isopulegol	1145	-	-	-	0,23
27	Menthone	1148	-	-	-	0,25
28	Borneol	1165	0,37 ± 0,05	Tr	0,21	0,23
29	Menthol	1167	-	-	-	0,32
30	Santolinyl acetate	1171	-	0,83 ± 0,01	Tr	Tr
31	Terpinen-4-ol	1174	0,45 ± 0,64	-	0,13	0,12
32	α-Terpineol	1186	2,42 ± 0,26	2,39 ± 0,03	0,53	0,23
33	Myrtenal	1195	Tr	-	-	0,21

N	Componentes	IRT	Concentração (%)			
			Hidrodestilação		Extração supercrítica	
			3 horas	5 horas	3 horas	5 horas
34	verbenone	1204	Tr	-	0,14	0,14
35	trans-Piperitol	1207	0,14 ± 0,01	-	0,11	0,13
36	trans-Carveol	1215	Tr	-	-	-
37	Nerol	1227	Tr	-	0,11	0,12
38	Carvone	1239	Tr	-	0,11	0,14
39	Geraniol	1249	Tr	-	Tr	Tr
40	Carvenone	1255	Tr	-	0,11	Tr
41	Perilla aldehyde	1269	Tr	-	Tr	0,14
42	Bornyl acetate	1287	-	-	-	0,21
43	Carvacrol	1298	Tr	-	Tr	0,12
44	Methyl geranate	1322	0,14 ± 0,01	-	Tr	0,11
45	δ-Elemene	1335	0,12 ± 0,00	-	0,13	0,14
46	o-Cubebene	1345	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,14	0,13
47	Dihydro eugenol	1366	-	0,17 ± 0,07	-	0,21
48	α-Ylangene	1373	0,16 ± 0,01	0,76 ± 0,01	1,3	0,19
49	Isoledene	1374	0,62 ± 0,87	-	3,02	2,11
50	α-Copaene	1374	0,80 ± 0,18	-	0,34	0,38
51	β-Damascenone	1383	-	-	Tr	-
52	β-Cubebene	1387	0,05 ± 0,07	0,14 ± 0,00	0,11	0,12
53	β-Elemene	1389	0,11 ± 0,01	-	Tr	0,12
54	Sibirene	1400	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,01	Tr	0,15
55	α-Gurjunene	1409	0,39 ± 0,09	-	0,39	0,35
56	β-cedrene	1419	-	6,45 ± 0,07	0,23	-
57	Thujopsene	1429	6,13 ± 0,92	0,35 ± 0,01	11,55	12,01
58	β-Copaene	1430	0,49 ± 0,10	-	0,91	0,67
59	Nerone	1438	-	2,01 ± 0,02	-	0,34
60	Aromadendrene	1439	2,41 ± 0,42	-	5,54	3,41
61	Cedrane	1441	0,25 ± 0,11	-	0,22	0,22
62	Epi cedrane	1447	Tr	-	0,11	0,11
63	trans-muurola-3,5-diene	1451	Tr	2,52 ± 0,04	-	-
64	α-Humulene	1452	1,19 ± 1,68	-	-	-
65	allo-Aromadendrene	1458	1,64 ± 1,58	0,70 ± 0,02	5,09	5,23
66	α-Acoradiene	1464	0,56 ± 0,79	-	1,23	1,04
67	trans-Cadina-1(6),4-diene	1475	0,29 ± 0,07	0,86 ± 0,02	0,26	0,12
68	γ-Muurolene	1478	0,67 ± 0,94	1,58 ± 0,01	-	-
69	Widdra-2,4(14)-diene	1481	0,52 ± 0,06	0,21 ± 0,21	0,48	0,21
70	α-Amorphene	1483	0,13 ± 0,04	0,22 ± 0,22	0,11	Tr

N	Componentes	IRT	Concentração (%)			
			Hidrodestilação		Extração supercrítica	
			3 horas	5 horas	3 horas	5 horas
71	Germacrene D	1484	2,27 ± 1,16	-	4,24	2,33
72	β-Guaiene	1492	0,14 ± 0,02	-	Tr	0,11
73	Capillene	1493	Tr	5,61 ± 0,03	0,23	1,14
74	Bicyclogermacrene	1500	3,72 ± 0,18	-	7,02	8,1
75	α-Muurolene	1500	0,25 ± 0,21	0,42 ± 0,01	0,11	0,15
76	Farenal	1508	Tr	-	0,13	Tr
77	δ-Amorphene	1511	0,22 ± 0,11	1,40 ± 0,02	0,3	Tr
78	γ-Cadinene	1513	1,52 ± 0,42	-	1,23	1,03
79	δ-Cadinene	1521	3,17 ± 0,95	2,92 ± 0,17	4,49	3,19
80	Lilial	1527	0,17 ± 0,23	0,19 ± 0,01	-	-
81	Trans-Cadina-1,4-diene	1533	0,31 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,39	6,09
82	α-Cadinene	1537	0,28 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,31	0,13
83	δ-Cuprenene	1542	0,33 ± 0,07	-	0,4	0,11
84	Selina-3,7(11)-diene	1545	0,19 ± 0,03	-	0,22	1,43
85	Elemicin	1555	Tr	0,25 ± 0,00	0,12	0,11
86	Germacrene B	1559	0,30 ± 0,22	0,38 ± 0,00	0,56	0,38
87	Nerolidol	1561	Tr	0,17 ± 0,01	0,11	Tr
88	Davanone B	1564	0,69 ± 0,16	-	0,39	1,66
89	Maaliol	1566	-	-	0,12	Tr
90	Palustrol	1567	0,30 ± 0,26	-	0,58	0,23
91	Spathulenol	1577	0,52 ± 0,53	2,30 ± 0,02	1,58	1,21
92	Globulol	1590	1,00 ± 1,41	0,56 ± 0,26	3,91	2,1
93	Cubeban-11-ol	1595	0,21 ± 0,16	0,21 ± 0,02	0,33	0,23
94	Cedrol	1600	0,39 ± 0,40	0,35 ± 0,02	0,58	0,42
95	Guaiol	1600	0,27 ± 0,01	-	0,38	0,16
96	α-Atlantol	1608	0,22 ± 0,16	-	0,45	0,12
97	Isomyristicin	1616	Tr	-	0,15	Tr
98	10-di-epi-Cubenol	1618	0,21 ± 0,16	0,20 ± 0,20	0,32	0,13
99	junenol	1619	0,11 ± 0,16	0,15 ± 0,00	0,21	0,12
100	1-epi-Cubenol	1627	0,28 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,94	1,29
101	γ-Eudesmol	1630	0,15 ± 0,21	-	0,32	0,39
102	α-acorenol	1632	0,25 ± 0,17	-	0,45	0,57
103	epi-α-Cadinol	1638	0,33 ± 0,22	0,87 ± 0,01	1,04	0,89
104	α-muurolol	1644	0,49 ± 0,69	0,11 ± 0,01	2,78	1,29
105	β-Eudesmol	1649	0,40 ± 0,24	Tr	0,45	0,45
106	α-Cadinol	1652	0,14 ± 0,06	0,60 ± 0,05	0,21	0,18
107	Valerianol	1656	0,24 ± 0,11	-	0,33	0,31
108	Allohimachalol	1661	0,46 ± 0,09	-	0,38	0,77

N	Componentes	IRT	Concentração (%)			
			Hidrodestilação		Extração supercrítica	
			3 horas	5 horas	3 horas	5 horas
109	7-epi- α -Eudesmol	1662	Tr	-	0,11	0,11
110	Lyrál	1665	Tr	-	0,11	0,12
111	Bulnesol	1670	0,19 \pm 0,10	-	0,23	0,25
112	Apioli	1677	0,15 \pm 0,21	-	0,23	0,22
113	Eudesm-7(11)-em-4-ol	1700	0,14 \pm 0,19	-	0,29	0,27
114	Nuciferal	1727	0,13 \pm 0,04	-	0,57	Tr
Total		98,75%	99,80%	98,94%	99,08%	

As concentrações com desvio padrão foram feitas em triplicata, as demais devido a pequena quantidade de amostra, foram feitas apenas uma vez. IRT, Índice de retenção tabelado; Tr, porcentagem \leq 0,1%

APÊNDICE C:

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

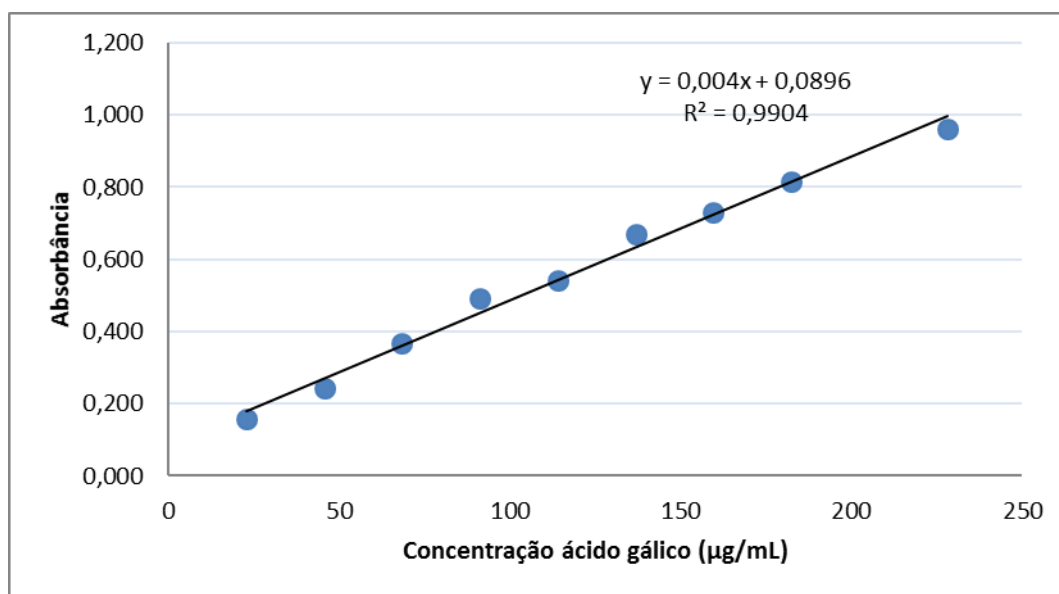


Figura 12 Curva de calibração ácido gálico

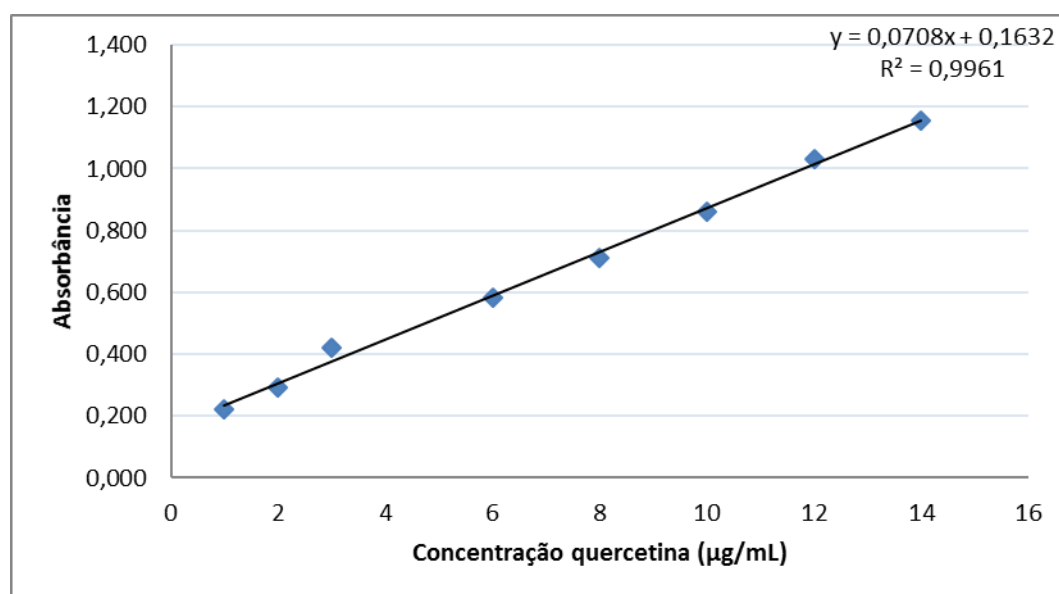


Figura 13 Curva de calibração quercetina

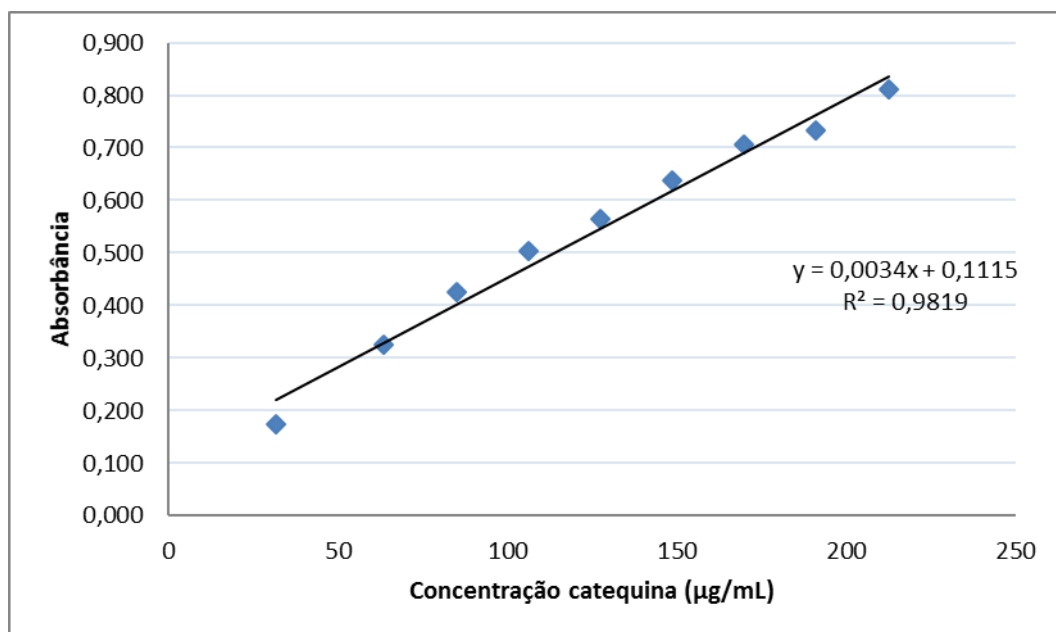


Figura 14 Curva de calibração catequina

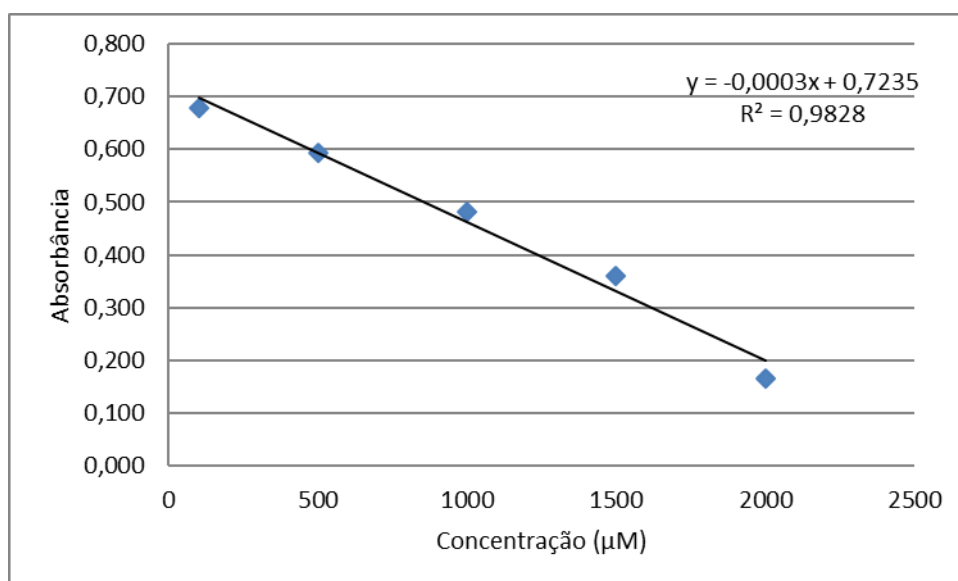


Figura 15 Curva de calibração do Trolox

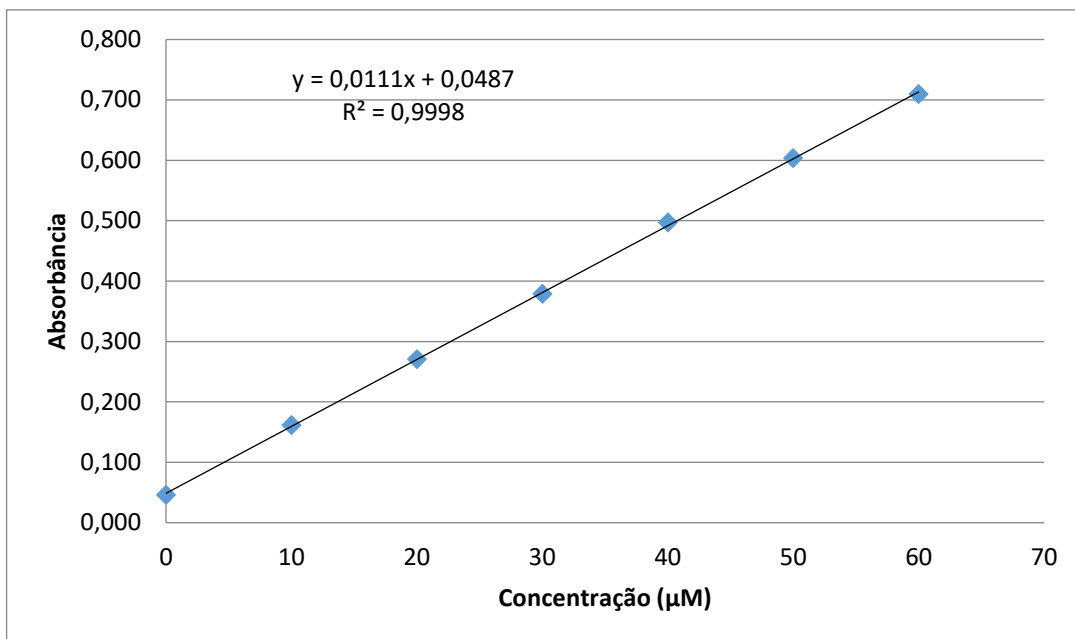


Figura 16 Curva de calibração DPPH

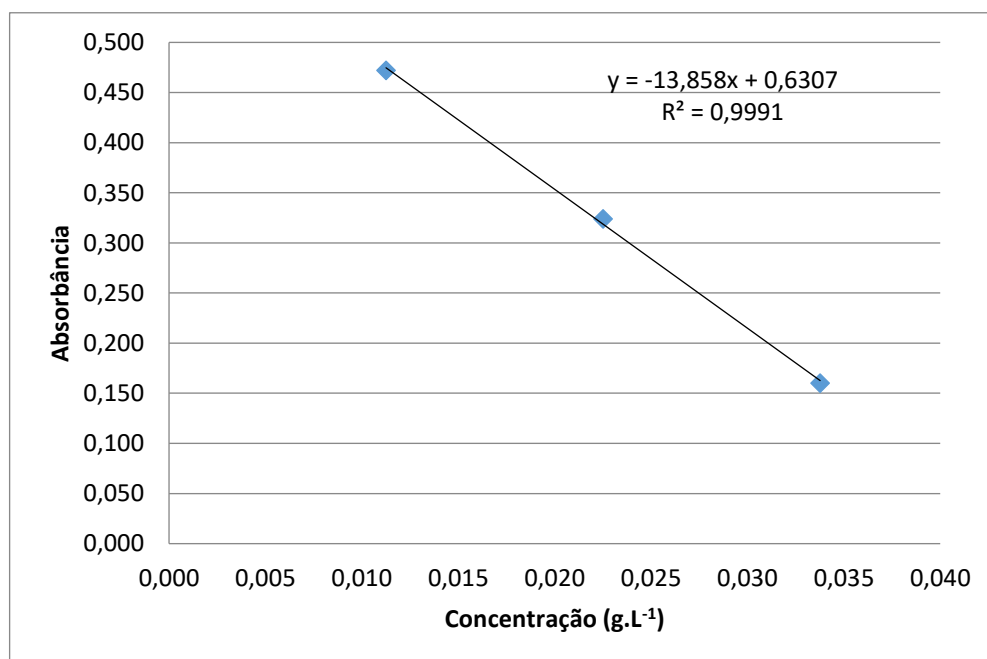


Figura 17 Curva do controle positivo BHT