



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DENISE JOSINO SOARES

EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DA POLPA DE PITANGA
ROXA (*Eugenia uniflora* L.) SOBRE CÉLULAS BUCAIS HUMANAS, APLICANDO
EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

FORTALEZA - CE

2014

DENISE JOSINO SOARES

EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DA POLPA DE PITANGA ROXA
(*Eugenia uniflora* L.) SOBRE CÉLULAS BUCAIS HUMANAS, APLICANDO
EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil

FORTALEZA - CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

S653e

Soares, Denise Josino.

Efeitos antioxidante e antiinflamatório da polpa de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.) experimentos in vitro e ex vivo / Denise Josino Soares. – 2014.

98 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Orientação: Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil.

1. Pitanga roxa. 2. Antioxidante - efeito. 3. Antiinflamatório – efeito. 4. Polpa de frutas. I. Título.

CDD 664

DENISE JOSINO SOARES

EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DA POLPA DE PITANGA ROXA
(*Eugenia uniflora* L.) SOBRE CÉLULAS BUCAIS HUMANAS, APLICANDO
EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Isabella Montenegro Brasil

Tese aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Isabella Montenegro Brasil (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Geraldo Arraes Maia
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ana Paula Dionísio
Embrapa Agroindústria Tropical

Aos meus pais, João Bosco e Josimeuba,
Aos meus irmãos Aline, João Luis e Ricardo,
Aos meus sobrinhos Gabriel, Levi e João Pedro,
Ao meu esposo Eduardo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da vida e por sempre me mostrar os caminhos que devo seguir.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial àqueles que fazem o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no exterior.

À minha orientadora, professora Dra. Isabella Montenegro Brasil pelo acompanhamento, ajuda com o doutorado sanduíche e conselhos.

À professora Dra. Veronika Somoza da *University of Vienna* por ter me aceitado em seu laboratório, pela paciência, disponibilidade e pelos ensinamentos.

Aos professores, Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo, Dr. Geraldo Arraes Maia, Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa, Dra. Ana Paula Dionísio, Dr. Ricardo Elesbão Alves, Dra. Socorro Vanesca Frota Gaban, Dra. Luciana de Siqueira Oliveira e Dra. Aurelice Barbosa Oliveira por aceitarem participar das bancas de pré-defesa e defesa e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

Aos professores Dr. Geraldo Arraes Maia, Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo, Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa e Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo pelos ensinamentos, amizade e conselhos tanto para a vida acadêmica como para vida pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos e convivência durante o curso de graduação, mestrado e doutorado.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação, Paulo Mendes, pela ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Frutos e Hortaliças Sra. Hilda, Sr. Omar e Luci pela amizade, companheirismo e carinho.

Aos amigos do laboratório de Frutos e Hortaliças Alessandra Carneiro, Alex Sandra, Aline Braga, Aline Gurgel, Ana Cristina Lima, Ana Valquíria, Claisa, Cinthia Rodrigues, Giovana Matias, Jéssica Carmo, Jorgiane Lima, Karine Holanda, Karoline Oliveira, Larissa Morais, Leônia Gonzaga, Luana Guabiraba, Luciana Oliveira, Marina Silveira, Mayla Rodrigues, Nágela Aguiar, Nara Vieira, Natália Sucupira, Natália Kellen, Patrícia Marques, Rafaela Lima, Samira, Virlane Kelly, Winne Carvalho, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração. Em especial aos bolsistas de iniciação científica Bruno, Jéssica, Jorgiane e Karine pela preciosa colaboração nas análises.

Aos membros do *Nutritional and Physiological Chemistry Laboratory* Andreas Hosiner, Annett Riedel, Ann Holik, Barbara Rohm, Claudia Habersack, Christiane Stoll, Christina Hochkogler Jessica Walker, Joel Walker, Julia Maria Imböck, Kathrin Liszt, Laura Esefelder, Lisa-Marie Schäfer, Marc Pignitter, Mathias Zaunschirm, Miriam Ehrnhöfer e Verena Stoeger pela amizade e disposição em me ajudar em todos os problemas de adaptação em Viena. Agradecimento especial aos pós-doutorandos Jessica Walker, Joel Walker e Marc Pignitter, aos doutorandos Miriam Ehrnhöfer e Laura Esefelder e mestrados Ann Holik, Julia Maria Imböck, Lisa-Marie Schäfer e Mathias Zaunschirm pela ajuda com as análises.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita de Frutas Tropicais da Embrapa Agroindústria Tropical, Adriana Guimarães, Adriano Almeida, Alaís Correia, Carol Pereira, Cristiane Morgado, Delane Rodrigues, Deuzenir Marques, Dijauma, Eliardo Cavalcante, Josefranci Farias, Jôze, Juliana Nascimento, Kellina Oliveira, Marcela Coelho, Sra. Maria, Maria Augusta, Melissa Matias, Nádia, Ovídio, Paloma Lira, Paula, Rafaela Vieira, Ravena Vidal, Robson Cavalcante, Suelane Medeiros, Tércio Azevedo, Thiago Cardoso, Vlayrton Maciel e Wedja Santana, por terem me acompanhado desde o início da minha graduação contribuindo para o meu crescimento acadêmico, em especial à Márcia Régia e aos pesquisadores Dr. Carlos Farley, Dr. Ebenézer, Dr. José Luís Mosca e Dr. Ricardo Elesbão Alves.

Aos meus amados pais, João Bosco e Josimeuba por todo amor, carinho, dedicação e esforço para que eu pudesse concluir meus estudos.

Aos meus irmãos, Aline, João Luis e Ricardo e minha cunhada, Sandra pelo companheirismo e amizade. Aos meus sobrinhos Gabriel, Levi e João Pedro pelos momentos de descontração e alegria que sempre me proporcionam.

Ao meu esposo, Eduardo, por todo amor, por sempre acreditar na minha capacidade, sempre me incentivando nos momentos difíceis.

Às minhas avós Francisca Meuba (*in memoriam*) e Maria por torcerem por mim em todos os momentos da minha vida. Aos meus tios (as), primos (as) e tias-avós por toda amizade.

Aos meus amigos Cynthia Kelsiane, Edna Cordeiro, Iara Lúcia, Luís Gomes, Rafael Domingos e Rafael Simões pela preciosa amizade.

Ao meu lindo cachorrinho Ted pela excelente companhia nos momentos de escrever a tese.

Enfim, a todos que participaram da minha vida contribuindo para o meu crescimento acadêmico.

“Eu que não me sento no trono de um apartamento com a boca escancarada cheia de dentes esperando a morte chegar.”

Raul Seixas

RESUMO

A pitanga (*Eugenia uniflora* L.) é uma fruta tropical encontrada na região que compreende a parte central do Brasil e o Nordeste da Argentina. Este fruto possui baixo conteúdo de lipídios, sendo rico em vitaminas e compostos bioativos, como os polifenóis e carotenóides. Devido ao uso da pitangueira na medicina popular e escassez de trabalhos científicos sobre as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias da pitanga roxa, o presente trabalho teve como objetivo investigar essas características na polpa e no suco tropical de pitanga roxa adoçado, usando experimentos *in vitro* e *ex vivo*. No presente estudo, a polpa de roxa foi separada em duas frações (volátil e não volátil), sendo o composto majoritário de cada fração identificado e quantificado. Células da gengiva humana (provenientes de seis voluntários) foram expostas ao suco tropical de pitanga e ao composto majoritário de cada fração e analisadas quanto a atividade da catalase, o dano do DNA e a liberação da interleucina 8 (IL-8). O experimento também foi realizado em células dos fibroblastos gengivais humanos (HGF-1), cujas células foram expostas aos compostos majoritários das duas frações da polpa de pitanga roxa e a liberação da IL-8 foi analisada. A polpa de pitanga roxa apresentou valores médios de sólidos solúveis ($8,33 \pm 0,06$ °Brix), pH ($3,12 \pm 0,01$), acidez titulável ($1,76 \pm 0,20$ g ácido cítrico/100 mL) e açúcares totais ($9,28 \pm 0,60$ g glicose/100 mL) dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira vigente. A referida polpa apresentou, ainda, níveis consideráveis dos compostos bioativos: antocianinas ($24,82 \pm 0,46$ mg/100 mL), flavonóides amarelos ($11,33 \pm 0,66$ mg/100 mL) e polifenóis extraíveis totais ($26,85 \pm 0,30$ mg GAE/100 mL), fazendo deste fruto uma boa fonte de antioxidantes naturais. Como composto majoritário das frações volátil e não volátil da polpa de pitanga observa-se a oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($85 \pm 4,01$ µg/mL) e a cianidina-3-glicosídeo ($340 \pm 4,19$ µg/mL), respectivamente. O baixo pH do suco tropical de pitanga roxa adoçado provocou uma redução da atividade da catalase, enquanto a oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e a cianidina-3-glicosídeo não interferiram e não foram capazes de inibir a atividade desta enzima. O suco tropical de pitanga roxa adoçado preveniu o dano do DNA em células da gengiva humana. Devido ao baixo número de voluntários no experimento com o suco tropical de pitanga roxa adoçado e os compostos majoritários das frações volátil e não volátil da polpa de pitanga roxa, os resultados referentes à liberação da IL-8 são inconclusivos. Cianidina-3-glicosídeo e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona apresentaram efeito antiinflamatório em células HGF-1.

Palavras-chave: oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, cianidina-3-glicosídeo, liberação de interleucina 8.

ABSTRACT

Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) is a tropical fruit found in the region that covers the central part of Brazil to Northern Argentina. This fruit has low lipid content, and is rich in bioactive compounds, such as polyphenols and carotenoids. In view of the use of pitanga tree in folk medicine and the shortage of scientific works about the antioxidative and anti-inflammatory effect of the purple pitanga, the present work aimed to investigate these characteristics in the pulp and in the sweetened tropical juice of purple pitanga, using *in vitro* and *ex vivo* experiments. In the present study, purple pitanga pulp was divided into two fractions (volatile and non-volatile), and the main compound of each fraction was identified and quantified. Human gingival cells (from six volunteers) were exposed to purple pitanga sweetened tropical juice and its main volatile and non-volatile compounds and analyzed by the catalase activity, DNA damage and interleukin 8 (IL-8) releases. The experiment was also performed with human gingival fibroblast (HGF-1), where cells were exposed to the individual main compounds from purple pitanga pulp and the IL-8 release was analyzed. Purple pitanga pulp presented mean values of soluble solids (8.33 ± 0.06 °Brix), pH (3.12 ± 0.01), titratable acidity (1.76 ± 0.20 g citric acid/100 mL) and total sugars (9.28 ± 0.60 g glucose/100 mL) within the standards required by current Brazilian law. This pulp also showed significant levels of the bioactive compounds: anthocyanins (24.82 ± 0.46 mg/100 mL), yellow flavonoids (11.33 ± 0.66 mg/100 mL) and total extractable polyphenols (26.85 ± 0.30 mg GAE/100 mL), making this product a good source of natural antioxidants. With regard to the main compound from volatile and non-volatile fractions of purple pitanga pulp, oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one (85 ± 4.01 µg/mL) was observed in the volatile fraction and cyanidin-3-glucoside (340 ± 4.19 µg/mL) was observed in the non-volatile fraction. The low pH of the purple pitanga sweetened tropical juice decreases catalase activity, while oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one and cyanidin-3-glucoside did not interfere and were not able to inhibit the activity of this enzyme. Purple pitanga sweetened tropical juice prevented DNA damage in human gingival cells. Due to the low number of volunteers in the experiment with purple pitanga sweetened tropical juice and the main compounds from volatile and non-volatile fractions of purple pitanga pulp, the results regarding the IL-8 release are inconclusive. Cyanidin-3-glucoside and oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one presented anti-inflammatory effects in HGF-1 cells.

Keywords: oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one, cyanidin-3-glucoside, interleukin 8 release.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Folhas, fruto e flor da pitangueira.....	22
Figura 2 - Equipamento do <i>Solvent Assisted Flavour Evaporation</i>	37
Figura 3 - Cromatograma de identificação dos compostos voláteis presentes na polpa de pitanga roxa.....	60
Figura 4 - Estrutura molecular da (A) oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da (B) selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.....	61
Figura 5 - Cromatograma de identificação dos flavonóides na polpa de pitanga roxa.....	63
Figura 6 - Fragmentação da cianidina-3-glicosídeo.....	63
Figura 7 - Estrutura molecular da cianidina-3-glicosídeo.....	64
Figura 8 - Estabilidade da cianidina-3-glicosídeo em diferentes soluções durante 60 minutos.....	65
Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade da fração volátil (V) (9A), não volátil (NV) (9B) e da combinação das frações (V + NV) (9C) extraídas da polpa de pitanga roxa.....	68
Figura 10 - Expressão do gene da IL-8 por células HGF-1 expostas por 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) (30 µg/mL) e cianidiana 3-glicosídeo (C3G) (119 µg/mL), adicionados de PG-LPS (10 ng/mL).....	69
Figura 11 - Liberação da IL-8 por células HGF-1 expostas à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) (30 µg/mL) e cianidiana 3-glicosídeo (C3G) (119 µg/mL), adicionados de PG-LPS (10 ng/mL).....	71
Figura 12 - Atividade da catalase em células bucais humana após à exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 µg/mL) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 µg/mL), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL)...	72
Figura 13 - Dano no DNA em células bucais humana provocado pela exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 µg/mL) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 µg/mL), adicionados ou não de PG-LPS	

	(10 ng/mL).....	74
Figura 14	Dano no DNA em células bucais humana provocado pela exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 µg/mL) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 µg/mL), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL), na presença da enzima fpg.....	75
Figura 15 -	Liberação da IL-8 por células bucais humana após exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritário isolados da fração volátil (oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 µg/mL) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 µg/mL), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL).....	77

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Padrão de identidade e qualidade da polpa de pitanga.....	23
Tabela 2 - Padrão de identidade e qualidade para suco tropical de pitanga.....	43
Tabela 3 - Componentes utilizados no preparo na solução de transcrição do RNA.....	49
Tabela 4 - Características químicas e físico-químicas da polpa de pitanga roxa e padrão de identidade e qualidade da polpa de pitanga.....	53
Tabela 5 - Compostos bioativos e atividade antioxidante da polpa de pitanga roxa.....	55
Tabela 6 - Formas de extração da cianidina-3-glicosídeo empregadas para obtenção de uma extração mais eficiente.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ^{**}	[2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)]
C3G	cianidina-3-glicosídeo
DFI	2,6 dicloro-fenol indofenol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
DPPH [*]	di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
FBS	Soro fetal bovino
FPG	Formamido pirimidina glicosilase
GAE	Ácido gálico equivalente
HGF-1	Fibroblastos gengivais humanos
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LMA	<i>Low-melting agarose</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NV	Fração não volátil
OxS	Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona
PG-LPS	Lipopolissacarídeo da bactéria <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	Tampão fosfato salino
SAFE	<i>Solvent Assisted Flavour Evaporation</i>
TNF- α	α -fator de necrose tumoral
Trolox	2-ácido carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
V	Fração volátil

APÊNDICES

	Página
Apêndice A Dados referentes à análise de confirmação de identidade da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona por ressonância nuclear magnética.....	98

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Pitangueira	20
2.2	Pitanga roxa	22
2.3	Compostos bioativos e atividade antioxidante	24
2.4	Compostos voláteis.....	27
2.5	Processos inflamatórios	28
2.6	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Material.....	32
3.2	Métodos	32
3.2.1	Caracterização química e físico-química.....	32
3.2.1.1	Sólidos Solúveis	32
3.2.1.2	pH	33
3.2.1.3	Acidez Titulável.....	33
3.2.1.4	Açúcares Totais	33
3.2.1.5	Açúcares Redutores	33
3.2.2	Compostos bioativos e atividade antioxidante	34
3.2.2.1	Ácido ascórbico	34
3.2.2.2	Carotenóides totais.....	34
3.2.2.3	Clorofila.....	35
3.2.2.4	Antocianinas totais.....	35
3.2.2.5	Flavonóides amarelos	35
3.2.2.6	Polifenóis extraíveis totais.....	35
3.2.2.7	Atividade antioxidante pelo ensaio com o radical ABTS* ⁺	36
3.2.3	Separação, identificação e quantificação dos compostos voláteis e não voláteis..	36
3.2.3.1	Separação	36
3.2.3.2	Identificação e quantificação	37
3.2.3.2.1	Compostos voláteis.....	37
3.2.3.2.2	Compostos não voláteis	39
3.2.4	Experimento com células HGF-1	40
3.2.4.1	Cultivo de células HGF-1	40

3.2.4.2	Avaliação da citotoxicidade das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa em células HGF-1	40
3.2.4.3	Quantificação da liberação da interleucina IL-8 por células HGF-1 após a exposição às frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa.....	42
3.2.5	Experimento com o suco tropical de pitanga roxa adoçado	43
3.2.5.1	Preparo do suco tropical de pitanga roxa adoçado	43
3.2.5.2	Exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado às células bucais humanas .	43
3.2.5.2.1	Atividade da catalase em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado	44
3.2.5.2.2	Dano do DNA em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado	45
3.2.5.2.3	Determinação da liberação da IL-8 em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado.....	46
3.2.5.3	Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células HGF-1 e células bucais humana	47
3.2.5.3.1	Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células HGF-1.....	47
3.2.5.3.1.1	Isolamento do RNA em células HGF-1 após a exposição à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e à cianidina-3-glicosídeo	48
3.2.5.3.1.2	Determinação da liberação da IL-8 em células HGF-1 após a exposição à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e à cianidina-3-glicosídeo	50
3.2.5.3.2	Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células bucais humana	51
3.2.5.3.3	Análise estatística	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Caracterização química e físico-química.....	53
4.2	Compostos bioativos e atividade antioxidante	55
4.3	Separação, identificação e quantificação dos compostos majoritários das frações voláteis e não voláteis.....	60
4.3.1	Compostos voláteis.....	60
4.3.2	Compostos não voláteis	62
4.4	Experimento com células HGF-1	67
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa em células HGF-1	67

4.4.2	Estudo da expressão do gene em diferentes tempos de incubação de células HGF-1 exposta aos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil	69
4.4.3	Quantificação da liberação da interleucina IL-8 por células HGF-1 após a exposição aos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil	70
4.5	Experimento com o suco tropical de pitanga roxa adoçado	72
4.5.1	Atividade da catalase em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil.....	72
4.5.2	Dano do DNA em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil	73
4.5.3	Determinação da liberação da IL-8 em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil	76
5.	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo. Em 2009, sua produção de frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado superou 41 bilhões de toneladas, representando 5% da produção mundial (IBRAF, 2009).

Dentre as frutas tropicais produzidas, a pitanga apresenta um grande apelo sensorial e uma excelente qualidade vitamínica devido ao seu elevado teor de carotenóides (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005). Seu cultivo vem crescendo devido a sua utilização para o preparo de polpa, elaboração de sorvetes, sucos, refrescos, geleias, licores e vinhos (PIO *et al.*, 2005).

O consumo de vegetais tem sido associado com a proteção do organismo contra doenças crônicas, inflamação e doenças cardiovasculares (PRIOR; GU, 2005). Assim, uma boa nutrição pode desempenhar um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias (CALDER *et al.*, 2009).

O processo inflamatório é uma resposta do organismo frente a uma infecção e está envolvido em diversas doenças inflamatórias (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009) tais como infecções respiratórias, doenças autoimunes e contusões (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Estudos têm demonstrado que a dieta rica em açúcar e ácidos graxos saturados e pobre em frutas e hortaliças está associada a uma maior tendência para a ocorrência de doenças inflamatórias e outras doenças relacionadas, tais como doenças cardiovasculares, artrite e diabetes (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006). Segundo Mueller, Hobiger e Jungbauer (2010), frutas, ervas e especiarias contribuem para a redução dos processos inflamatórios e previnem o surgimento de doenças relacionadas.

Além disso, uma dieta rica em compostos com atividade antioxidantes pode reduzir o risco do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e a doença de Parkinson (JOSEPH; SHUKITT-HALE; LAU, 2007). Os compostos com atividade antioxidante são associados com a atividade antiinflamatória das frutas (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009). Como exemplo, tem-se os flavonóides que além de possuírem atividade antioxidante, são potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Dentre as fontes naturais de compostos bioativos têm-se a pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.), que, em sua constituição são observadas elevadas quantidades de antocianinas e

carotenóides fazendo deste fruto uma fonte promissora de compostos antioxidantes (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002).

Apesar da elevada quantidade de compostos bioativos presentes em pitangas roxas, destacando-se os flavonóides e ácidos fenólicos, além de outros compostos voláteis ainda não identificados, não existe dados na literatura sobre as propriedades antiinflamatórias desse fruto.

Segundo Galhiane *et al.* (2006), dentre todas as espécies frutíferas existentes no Brasil, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica, porém, menos de 1% do total já foi estudada cientificamente.

Em estudo com alimentos é importante saber como os compostos presentes no alimento afetam as células bucais humanas. O estudo realizado com células bucais é um modelo atrativo e de potencial uso para investigação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* de compostos de alimentos (EREN; OZMERIC; SARDAS, 2002), visto que estas células são as primeiras que entram em contato com o alimento não digerido, sendo, portanto, expostas a todos os constituintes presentes no alimento (HELD; SCHIEBERLE; SOMOZA, 2007).

Devido ao uso da pitangueira na medicina popular e escassez de trabalhos científicos sobre as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias da pitanga roxa, o presente trabalho teve como objetivo investigar essas características na polpa e no suco tropical de pitanga roxa adoçado, usando experimentos *in vitro* e *ex vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pitangueira

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma planta originária do Brasil. Trata-se de uma Dicotyledoneae, pertencente à família das Mirtaceae que cresce em regiões de clima tropical e subtropical (SILVA, 2006) e produzem frutos carnosos com uma única semente e que são caracterizados pela presença de taninos, flavonóides e mono e sesquiterpenos (MALAMAN *et al.*, 2011) caracteristicamente derivados do floroglucinol (CRUZ; KAPLAN, 2005).

É uma fruteira encontrada na região que compreende a parte central do Brasil até o Norte da Argentina (DONADIO; MORO; SERVIDONE, 2002) também sendo encontrada em outros países da América do Sul como Uruguai e Paraguai (BAGETTI *et al.*, 2009). Devido a sua alta adaptabilidade em diferentes solos e condições climáticas, esta planta também tem sido encontrada em outras localidades como Califórnia, Flórida, Ilhas do Caribe, China e sul da França (SILVA, 2006). Esta espécie frutífera adaptou-se favoravelmente às condições climáticas e edáficas da região Nordeste Brasileira (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005), sendo a única região no país que explora comercialmente esta fruta (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

A pitangueira é uma planta de fácil cultivo e é resistente às condições urbanas e por isso é bastante encontrada em jardins e parques (PORCU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Segundo Scalon *et al.* (2001), o cultivo da pitangueira também é recomendado para reflorestamento de áreas degradadas tendo como objetivo proporcionar alimento para os animais.

Não há dados oficiais sobre a produção e comercialização da pitanga, porém, sabe-se que o Brasil é o maior produtor de pitangas do mundo e que os maiores plantios desta fruta estão localizados no Estado de Pernambuco (BEZERRA; SILVA JÚNIOR; LEDERMAN, 2000) que tem uma produção estimada de 1700 toneladas de pitanga por ano (CEPLAC, 2013).

A pitangueira mede em média de 6-12 m de altura e apresenta copa arredondada (PIO *et al.*, 2005). Suas folhas, quando jovens, apresentam cor rosada, que se transforma em um verde escuro brilhante à medida que envelhece (MELO *et al.*, 2007). Possui características típicas do Cerrado brasileiro, devido ter um curto período de floração no início da estação chuvosa e sua frutificação ocorre de outubro a dezembro (SANTOS *et al.*, 2011).

A família Mirtaceae possui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies de plantas (SOUZA; LORENZI, 2005). Uma característica de interesse das plantas pertencentes a esta família é que algumas possuem aplicações terapêuticas (OGUNWANDE *et al.*, 2005), como no caso do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) que é muito utilizado como antisséptico bucal (AMORIM *et al.*, 2009) e a pitanga que é usada na medicina popular para o tratamento de várias condições inflamatórias (REYNERSTON *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que a pitanga pode trazer benefícios sendo bastante eficiente na prevenção de doenças. As folhas da pitangueira são usadas para o preparo de chá que é utilizado no tratamento da febre, reumatismo, doenças de estômago, distúrbios do trato digestivo, hipertensão, febre amarela, também pode reduzir o peso, a pressão arterial e servir como diurético (ADEBAJO; OLOKI; ALADESANMI, 1989), e pode ser utilizada no tratamento de *influenza* e bronquite (RIVERA; OBON, 1995). Os extratos da folha da pitangueira apresentam ação antiinflamatória (SCHAPOVAL *et al.*, 1994) e atividade antimicrobiana (HOLETZ *et al.*, 2002). Uma outra característica foi observada por Santos *et al.* (2012), que estudando o extrato alcóolico das folhas da pitangueira observaram que este possui efeito anti-*Trypanosoma cruzi*. Amorim *et al.* (2009) relatam que a pitangueira possui ação diurética e hipoglicêmica. Consolini e Sarubbio (2002) observaram efeito positivo na atividade cardiovascular de ratos que ingeriram o extrato aquoso bruto das folhas de *Eugenia uniflora* L. Segundo Lee, Chiou e Yen (2000), os compostos fenólicos presentes nas folhas da pitangueira são os responsáveis por grande parte da atividade farmacológica por elas apresentada.

A ação antimicrobiana de extrato da folha de pitangueira foi relatada em estudos realizados por Pessini *et al.* (2003) que comprovaram que o extrato de *Eugenia uniflora* L. inibe o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e dos fungos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e por Auricchio *et al.* (2007) que observaram que a atividade antimicrobiana da folha da pitangueira é mais expressiva frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa*, também possuindo ação contra a *Candida albicans*. O óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia uniflora* L. possui atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas *Sarcina luteu* e *Mycobacterium phlei* e atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (EL-SHABRAWY, 1995).

As sementes da pitanga são reconhecidas fontes de compostos bioativos, agentes antibacterianos (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e de fibra alimentar (AL-FARSI; LI, 2008), que

após alguns estudos sobre a presença de compostos antinutricionais como glicosídeos cianogênicos podem vir a serem utilizadas como ingredientes para a indústria alimentar (BAGETTI *et al.*, 2009). Até o presente momento, não há estudos sobre a presença de glicosídeos cianogênicos e lecitinas nas sementes ou na polpa de pitanga.

Devido aos benefícios à saúde proporcionado pelo uso da pitangueira na medicina popular, o Ministério da Saúde autorizou o uso das folhas da pitangueira para preparar infusões, o que pode ser observado na Resolução 267 de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005).

2.2 Pitanga roxa

A pitanga é conhecida por vários nomes: “Brazilian cherry” (Brasil), “cereza de cayena” (Espanha), “pedanga” (Venezuela), “guinda” (El Salvador), “ñanga-piré” (Argentina), “cereza quadrada” (Venezuela) (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002), “Ibitanga” e “Pitangatuba” (WEYERSTAHL *et al.*, 1988).

Este fruto é uma baga globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro e é coroado com sépalas persistentes (FIGURA 1). Durante a sua maturação, o epicarpo muda de coloração de verde para amarelo, alaranjado, vermelho, vermelho escuro, podendo chegar até quase negro (BEZERRA; SILVA JÚNIOR; LEDERMAN, 2000). A cor roxa deste fruto é devido à presença de antocianinas (LIMA *et al.*, 2000). Sua composição é em média 77% de polpa e 23% de semente (SILVA, 2006).

Figura 1 - Folhas, fruto e flor da pitangueira.



Fonte: A Autora (2014).

A pitanga possui baixo conteúdo de lipídios e baixo valor calórico (SPADA *et al.*, 2008), é rica em vitaminas e compostos com atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2006) como polifenóis e carotenóides (SPADA *et al.*, 2008). Outros compostos de interesse neste fruto são os compostos voláteis que, em sua maioria, são formados por monoterpenos (75,3%) abrangendo o trans- β -ocimene (36,2%), o cis-ocimene (13,4%), o β -ocimene (15,4%) e o β -pinene (10,3%) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Devido às características sensoriais, como sabor ácido e adocicado e intenso aroma característico (MALAMAN *et al.*, 2011), a pitanga é um fruto bastante apreciado pela população (CRUZ; KAPLAN, 2005), desta forma, ela vem sendo bastante consumida *in natura* e também na forma processada como em sucos, doces, geleias, sorvete e liquor (OLIVEIRA; KAMIMURA; RABI, 2009).

A maior parte do volume de produção da pitanga é comercializada em feiras livres ou diretamente com as fábricas para o processamento. Como este fruto é altamente perecível, o consumo limitava-se aos centros próximos às regiões de plantio, porém, devido aos seus atributos de qualidade, a pitanga tem ganhado popularidade no mundo inteiro (MARIN *et al.*, 2008) e vem sendo exportada amplamente para o Mercado Europeu (SILVA, 2006).

Em razão de a pitanga ser um fruto de difícil conservação, a extração de sua polpa seguida de congelamento constitui uma alternativa para garantir o seu consumo nos mercados nacionais e internacionais mesmo quando a fruta não estiver no período de safra de produção (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa nº 1 (BRASIL, 2000), polpa de fruta é o produto obtido de frutos polposos através de processamento adequado ao tipo de fruto, não podendo ser fermentado, concentrado e diluído e deve conter um teor mínimo de sólidos totais provenientes do fruto. De acordo com esta Instrução Normativa a polpa de pitanga deve estar dentro dos limites descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Padrão de identidade e qualidade da polpa de pitanga.

	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis (°Brix a 20°C)	6,0	-
pH	2,5	3,4
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL)	0,92	-
Açúcares totais naturais da fruta (g/100 mL)	-	9,50
Sólidos totais (g/100 g)	7,0	-

Fonte: Brasil (2000).

Outra forma de utilização da pitanga é na indústria de cosméticos, que utiliza as propriedades adstringentes associadas ao aroma agradável dos óleos essenciais extraídos da polpa de pitanga para formulação de xampu, condicionadores de cabelo, sabonetes, óleos corporais e perfumes (AMORIM *et al.*, 2009).

2.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante

Os compostos com ação antioxidante possuem efeito benéfico no organismo humano. Estes compostos combatem a ação de radicais livres, evitando que eles afetem a molécula de DNA, oxidem aminoácidos ou ácidos graxos poliinsaturados nas lipomembranas, causando danos severos nas células (BEARA *et al.*, 2009).

Os radicais livres podem ser formados durante o metabolismo normal, como consequência de doenças e a partir da exposição dos organismos a condições adversas como o cigarro, a poluição ambiental e a luz solar (HONZEL *et al.*, 2008). Estes radicais atuam na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), porém, quando em excesso e caso não haja antioxidantes disponíveis *in vivo* eles podem apresentar efeitos prejudiciais ao organismo vivo podendo contribuir para o surgimento de doenças (HUANG; OU; PRIOR, 2005) como o enfisema pulmonar, aterosclerose, doenças inflamatórias, câncer e envelhecimento (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os compostos com atividade antioxidante podem ser sintetizados no organismo ou podem ser obtidos de fontes exógenas (através da alimentação) (OLIVEIRA *et al.*, 2009), sobretudo, de produtos de origem vegetal (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Estes compostos são conhecidos como compostos bioativos e incluem as vitaminas C e E, os carotenóides, os polifenóis, os furanoides e os tióis (OLIVEIRA *et al.*, 2009). As frutas são importantes fontes desses compostos bioativos.

O ácido ascórbico ou vitamina C é uma substância de extrema importância para a alimentação humana. Essa vitamina desempenha várias funções importantes no organismo, como na formação de colágeno, na absorção do mineral ferro, na inibição da formação de nitrosaminas (VANNUCCHI; JORDÃO JÚNIOR, 1998), possuindo atividade antioxidante (SILVA, 2006) e ação anti-câncer (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os polifenóis, além de possuírem atividade antioxidante, possuem ação antialérgica, antiviral, antibacteriana, antitumoral, antifúngica e anti hemorrágica (PIETTA,

2000). Estes compostos influenciam na qualidade nutricional e sensorial de vegetais (SCALZO *et al.*, 2005).

Dentre os compostos polifenólicos com propriedade antioxidante, destacam-se os flavonóides que quimicamente, englobam as antocianinas e os flavonóis (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002). Fazem parte do grupo dos flavonóides as antocianinas, flavonóis, flavonas, auronas, chalconas e isoflavonas (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, antiinflamatória (BEARA *et al.*, 2009; LEONG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009) e anticâncer (LIMA *et al.*, 2001) e são considerados os compostos com maior ação antioxidante dentre os compostos fenólicos (SOBRATTEE *et al.*, 2005).

O efeito antiinflamatório apresentado pelos flavonóides é devido eles serem capazes de inibir várias enzimas que são ativadas somente em determinadas condições inflamatórias (LEE *et al.*, 2007). A quercetina, que é um tipo de composto fenólico, é conhecida por possuir elevada capacidade antiinflamatória (WANG; ZHOU; LIN, 2010).

As antocianinas são corantes naturais pertencentes à classe dos flavonoides e que são responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de muitas frutas e vegetais (BAGETTI, 2009), podendo ser utilizadas como alternativa em substituição aos corantes sintéticos (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005). Estes compostos são encontrados em frutos como mirtilo, framboesa, morango, groselha, uvas e vinho tinto.

As antocianinas apresentam inúmeras propriedades benéficas à saúde (SHAHIDI; MARIAN, 2003). Estes compostos melhoram a circulação sanguínea, protegem o organismo contra o acúmulo de placas de depósitos de lipídios e diminuem os efeitos da doença de Alzheimer (VOLP *et al.*, 2008) e apresentam poder antioxidante.

Segundo Bagetti *et al.* (2011), comparado com outras frutas, a pitanga é uma rica fonte de antocianinas e dentre as diferentes colorações de pitanga, os maiores valores deste componente são observados em pitangas roxas.

Na polpa de pitanga são encontrados elevados teores de compostos fenólicos e carotenóides (SPADA *et al.*, 2008). As antocianinas presente na pitanga são as cianidina-3-O- β -glicopiranosídeo e a delphinidina-3-O- β -glicopiranosídeo ambas possuem ação antioxidante (EINBOND *et al.*, 2004).

Os carotenóides são encontrados em frutas, hortaliças, peixes, grãos, flores e raízes (BAGETTI, 2009) e são compostos que possuem diferentes funções biológicas. Alguns carotenóides podem possuir atividade antioxidante, atuar no controle de doenças cardiovasculares (KRINSKY; JOHNSON, 2005) e possuir atividade pró-vitamina A atuando

na prevenção da catarata (STAHL; SIES, 2005). Estudos relatam que os carotenóides possuem ação contra o desenvolvimento de câncer (MAOKA *et al.* 2001; NISHINO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011), Estes compostos contribuem para a atividade antioxidante da polpa da pitanga (SPADA *et al.*, 2008).

Os diferentes tipos de carotenoides atuam em diferentes funções, assim, o β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina são precursores da vitamina A, já a luteína e a zeaxantina são relacionados com a proteção macular e catarata (SNODDERLY, 1995).

A pitanga é um dos frutos que possui maiores teores de carotenóides totais (CAVALCANTE, 1991). Na sua polpa os carotenóides majoritários são: licopeno, a rubixantina e a β -criptoxantina (FILHO *et al.*, 2008). Outros carotenóides observados em pitanga são: cis-rubixantina, cis-licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina e β -caroteno-5,6-epóxido (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUES-AMAYA, 2004).

Bagetti *et al.* (2011) estudaram a composição de pitangas com diferentes colorações de polpa (roxa, vermelha e laranja) provenientes do Rio Grande do Sul e observaram que a pitanga de cor roxa é rica em compostos fenólicos e possui elevada atividade antioxidante, já as de cor vermelha e laranja são ricas em carotenóides. Segundo Matsumura *et al.* (2000), estes compostos naturais presentes na pitanga produzem efeitos benéficos ao organismo tais como a atividade antiinflamatória.

Diversas técnicas são empregadas para determinar a capacidade antioxidante de alimentos. Os testes *in vitro* diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os ensaios *in vitro* mais utilizados são os que utilizam os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] (LABRINEA; GEORGIU, 2004), o ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (JENSEN *et al.*, 2008) e o sistema que utiliza o β -caroteno/ácido linoléico.

Os ensaios *in vivo* envolvem a determinação da proteção antioxidante que pode ser determinada utilizando eritrócitos de células humanas (JENSEN *et al.*, 2008). Um dos mecanismos *in vivo* utilizados usa células epiteliais bucais, pois a mucosa oral é o primeiro tecido que entra em contato direto com o alimento não digerido e, portanto, são as células que são expostas a todos os constituintes voláteis e não voláteis do alimento (HELD; SCHIEBERLE; SOMOZA, 2007).

2.4 Compostos voláteis

O sabor de um alimento é a resposta ao somatório das características do gosto (doce, amargo, ácido, salgado e umami) com o aroma (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003), sendo o aroma obtido pela presença de compostos voláteis (WILLER; YUSSEFI-MENZLER; SORESEN, 2008).

A identificação e quantificação destes compostos são essenciais para a caracterização do alimento e, por ter influência direta no sabor do produto, pode influenciar na aceitação sensorial do mesmo (BICAS *et al.*, 2011). As técnicas empregadas para determinação dos compostos voláteis utilizam etapas de isolamento, separação e identificação, também podendo ser realizados estudos sensoriais com humanos (THOMAZINI; FRANCO, 2000).

Diversos compostos voláteis foram identificados na pitanga, porém em sua grande maioria estão presentes em quantidades traços. Segundo Oliveira *et al.* (2006), os componentes voláteis identificados na polpa de pitanga que aparecem em maiores quantidades pertencem à família ocimene. Outros compostos observados em elevadas quantidades na polpa da pitanga foram relatados por outros autores como o germacrone, o curzerene (furanoelemene) e a oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OGUNWANDE *et al.*, 2005), e o bergapteno (PINO *et al.*, 2003).

Marin *et al.* (2008) estudando a fração volátil da polpa de pitanga, observaram a presença de α -ocimeno (7,4%), β -selinene (7,2%), β -selinene (5,2%), germacrene B (7,2%) e ácido hexadecanóico (11,7%). Os valores percentuais de cada composto volátil relatado por estes autores são baseados na área do pico observada no cromatograma.

A selina-1, 3,7 (11)-trien-8-ona é um composto volátil de importância que foi observado por diversos autores, como Ogunwande *et al.* (2005) e Malaman *et al.* (2011), e que é reconhecida por conferir aroma e sabor ao alimento e possuir propriedades terapêuticas (KANAZAWA; PATIN; GREENE, 2000).

Weyerstahl *et al.* (1988), estudando os componentes voláteis das folhas da pitanga cultivada na Nigéria, observaram elevadas quantidades de furanodienos, furanoelemene, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1, 3,7 (11)-trien-8-ona.

A variação entre os compostos voláteis observados pelos autores pode ser devido às características do fruto, pois, segundo Willer, Yussefi-Menzler e Soresen (2008), os compostos voláteis presentes em frutas podem sofrer variação de acordo com o estágio de

maturação, a cultivar e as condições edafoclimáticas de cultivo do fruto. Outra fonte de variação é a metodologia empregada.

2.5 Processos inflamatórios

A inflamação é um dos primeiros e o mais importante componente da resposta imune à infecção bacteriana (REIFE *et al.*, 1995). Durante o processo inflamatório agudo ou crônico, os compostos inflamatórios são liberados em elevadas concentrações, causando um desequilíbrio oxidativo (NARDI *et al.*, 2007), contribuindo assim, para a ocorrência de uma variedade de doenças inflamatórias tais como artrite, aterosclerose, câncer, diabetes, hepatite, neurodegeneração e envelhecimento precoce (ROOME *et al.*, 2008).

Alguns estágios dos processos inflamatórios podem levar o indivíduo a problemas mais sérios como o câncer. Alguns exemplos disto são: a doença inflamatória do intestino que predispõe o paciente ao câncer colorretal, a gastrite por *Helicobacter pylori* que induz ao câncer gástrico e a prostatite que pode levar ao câncer de próstata (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005).

A resposta do organismo contra os agentes infecciosos envolve a produção de elevada quantidade de moléculas citotóxicas (MENICHINI *et al.*, 2011) tais como fagócitos, linfócitos e células matadoras naturais, bem como uma subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e de interleucinas (VÍCTOR *et al.*, 1998) pró-inflamatórias como as interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 que são produzidas no local da inflamação (NARDI *et al.*, 2007).

O modo de ação das ROS nos processos inflamatórios ocorre através da ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e a proteína ativadora (AP) que atuam induzindo a produção de interleucinas inflamatórias (MENICHINI *et al.*, 2011). Outro componente de interesse é o óxido nítrico (NO) por atuar como mediador e regulador em reações patológicas, especialmente na resposta inflamatória aguda (TERAO, 2009).

Em circunstâncias normais as ROS e as RNS são descontaminadas pelo sistema antioxidante das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidases (ROOME *et al.*, 2008) ou por compostos com atividade antioxidante presentes na alimentação.

As interleucinas ou linfocinas são proteínas que estão envolvidas na comunicação entre os linfócitos e apresentam as seguintes atividades: reconhecimento de antígenos pelas células T, proliferação de células T, atração de macrófagos e promoção da eritropoiese (NAOUM, 2009). Tais compostos, também protegem o organismo humano contra o ataque de

bactérias, vírus e parasitas (HELD; CHIEBERLE; SOMOZA, 2007), porém, algumas podem ter ação pró-inflamatórias, como a IL-6 que induz a secreção de proteínas de resposta durante a inflamação e é um fator fisiopatológico que muitas vezes acompanha o câncer (BARTON, 2005) e a IL-8 que é produzida por macrófagos e ativada por produtos bacterianos, resultando em uma resposta inflamatória local, que pode induzir febre (KAISER *et al.*, 2004) e quando é liberada na circulação pode promover a angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) até o foco infeccioso (NAOUM, 2009).

A inibição das interleucinas pró-inflamatórias pode ser realizada utilizando substâncias antiinflamatórias que reduzem a ocorrência de reações inflamatórias associadas a infecções no organismo (HELD; CHIEBERLE; SOMOZA, 2007). Desta forma, as interleucinas antiinflamatórias combatem a ação de interleucinas pró-inflamatórias (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010), constituindo em uma forma de auto-regulação do organismo (CALDER *et al.*, 2009). Exemplo de interleucinas que atuam inibindo a produção de interleucinas pró-inflamatórias são as IL-4 e IL-10 (NMORSI *et al.*, 2010).

Alguns compostos presentes nos alimentos atuam inibindo os estágios inflamatórios através da inibição de componentes essenciais a ocorrência destes processos (YOON; BAEK, 2005) e por isso, desde a antiguidade, doenças inflamatórias têm sido tratadas com plantas e extratos de plantas (KRISHNASWAMY, 2008).

O modo de ação antiinflamatória dos componentes dos alimentos ocorre da seguinte maneira: os ácidos graxos, a vitamina E e os flavonóides diminuem a produção do mediador inflamatório através de efeitos na sinalização celular e expressão do gene; a vitamina E e os outros antioxidantes reduzem a produção de oxidantes prejudiciais e os prebióticos e probióticos promovem a função intestinal e servem de barreira antiinflamatória (CALDER *et al.*, 2009).

Segundo Menichinhi *et al.* (2011), os compostos fenólicos, tais como os flavonóides, atuam inibindo a produção dos mediadores inflamatórios através da degradação oxidativa de produtos fagócitos tais como o O₂ e o HOCl.

Outras substâncias também estão envolvidas no controle dos processos inflamatórios, como os corticosteróides que atuam na supressão de múltiplos genes inflamatórios que estão envolvidos na inflamação crônica (BARNES, 2006).

Diversos estudos relatam a ação antiinflamatória e o mecanismo de ação de alguns componentes presentes em alimentos. Reiter, Jiang e Christen (2007), estudando as propriedades do α e do γ -tocopherol observaram que estas duas principais formas de vitamina

E possuem propriedades antiinflamatórias. Mueller, Hobiger e Jungbauer (2010), estudando a atividade antiinflamatória de frutas, ervas e especiarias, observaram que os componentes de alguns vegetais como a apigenina, capsaicina, luteolina, naringenina, quercetina e resveratrol reduzem a secreção da interleucina pró-inflamatória IL-6, enquanto que o cortisol aumenta a secreção da interleucina antiinflamatória IL-10 e reduz a secreção da IL-6. Lin e Tang (2008), estudando o efeito dos extratos de morango, nêspera, amora e melão na inflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS) observaram que estes extratos reduziram a secreção de IL-6 e aumentou a secreção de IL-10.

Outros componentes dos alimentos que podem combater aos processos inflamatórios são os compostos antioxidantes, pois, segundo Rafael *et al.* (2011), esses compostos apresentam excelentes possibilidades para o tratamento e prevenção do estresse oxidativo mediado pelos processos inflamatórios.

2.6 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) são bactérias anaeróbicas (WINKELHOFF *et al.*, 2002), gram-negativas, frequentemente isoladas nas bolsas periodontais de pacientes com doença periodontal crônica (ARA *et al.*, 2009), sendo considerada um importante patógeno desta doença.

A doença periodontal ou gengivite é um problema que causa dor e desconforto nos tecidos bucais de pacientes. A principal causa da gengivite é a falta de higiene oral, o que resulta no aumento das bactérias orais, sendo, portanto, uma doença de origem bacteriana (WOLF; LAMSTER, 2011) que é acompanhada pela inflamação na gengiva e destruição dos tecidos periodontais (ARA *et al.*, 2009) e que eventualmente pode causar a perda do dente (MEALEY; RETHMAN, 2003). No Brasil, a prevalência de doenças periodontais em crianças e adolescentes tem sido relatada em vários estudos (GESSER; PERES; MARCENES, 2001; SUSIN; ALBANDAR, 2005), sugerindo um risco ainda maior de desenvolvimento da periodontite em adultos.

Os lipopolissacarídeos são moléculas de estrutura complexa encontrados exclusivamente na monocamada externa da membrana externa das bactérias gram negativas, como a *P. gingivalis*, e desempenha papel crítico na mediação da inflamação por induzir a produção de interleucinas pró-inflamatórias (PAIK *et al.*, 2003) como as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 e o α -fator de necrose tumoral (TNF- α) (HOLLA *et al.*, 2004). A liberação de interleucina-8 (IL-8), uma citocina pró-inflamatória, é activada por LPS bacteriano,

resultando em uma resposta no local da inflamação (KAISER *et al.*, 2004). Tal fato foi comprovado por diversos estudos, como o realizado por Chen *et al.* (2008), que ao estudar o efeito do LPS obtidos da *P. gingivalis*, confirmaram que estas substâncias promovem o aumento da secreção de interleucinas pró-inflamatórias. Zhang *et al.* (2008), estudaram o efeito do LPS obtido de *Porphyromonas gingivalis* e de *Escherichia coli* na linha celular monocítica humana THP-1 e concluíram que os dois LPS estudados possuem ação de induzir a produção de interleucinas em células THP-1.

Em estudos anteriores, a liberação de IL-8 por fibroblastos gengivais humanos (HGF-1) estimulados pelo LPS de *P. gingivalis* tem sido utilizada para determinar propriedades antiinflamatórias de vegetais, tais como o trabalho realizado por Walker *et al.* (2013) que utilizaram este modelo para determinar as propriedades antiinflamatórias de extratos de vegetais preparados com *Polygonum aviculare* L., *Sambucus nigra* L. e *Isodon japonicus* L. e o trabalho de Ehrnhöfer-Ressler *et al.* (2013) que avaliaram o efeito antiinflamatório do 1,8-cineol, borneol, cânfora, e α -/ β -thujone provenientes da *Salvia officinalis* em L.

Desta forma, em estudos para detecção de processos inflamatórios na gengiva humana, faz-se necessário avaliar o efeito do composto que se quer estudar levando em consideração a presença do LPS da bactéria *P. gingivalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O experimento foi realizado com pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.) proveniente de pitangueiras de oito anos de idade pertencentes à Fazenda Fortaleza, município de Gandu, Bahia (13° 44´S, 39° 28´W), Brasil.

Os frutos foram colhidos manualmente, armazenados em sacos de polietileno, congelados em freezer (-20°C) e transportados em isopor térmico via aérea até o Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará. Os frutos foram higienizados, removidos os caroços e a polpa foi processada em centrífuga doméstica até a obtenção de um líquido uniforme, que, em seguida, foi acondicionado em sacos de polietileno, selados e congelados até o momento das análises. Para as análises realizadas no *Nutritional and Physiological Chemistry Laboratory, University of Vienna*, a polpa foi congelada em nitrogênio líquido, mantida em caixa térmica com gelo seco e enviada via aéreo para a Universidade.

As análises de caracterização química e físico-química e a quantificação dos compostos bioativos e da atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

A separação da polpa de pitanga roxa em suas frações volátil e não volátil, a identificação e quantificação dos compostos principais de cada fração e as análises de determinação das propriedades antioxidantes e antiinflamatórias realizadas na polpa e no suco tropical de pitanga roxa foram realizadas no *Nutritional and Physiological Chemistry Laboratory, Department of Nutritional and Physiological Chemistry, University of Vienna*.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização química e físico-química

3.2.1.1 Sólidos Solúveis

Determinado através de leitura direta em refratômetro de marca ATAGO, modelo POCKET PAL-1. Os resultados foram expressos em °Brix.

3.2.1.2 pH

Determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca DIGIMED, modelo DMF, tipo NTC, calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a IAL (2008).

3.2.1.3 Acidez Titulável

Realizado através da titulação, de 0,1 mL de polpa de pitanga roxa diluída em 50 mL de água destilada, com solução de NaOH 0,1 N, usando solução de fenolftaleína (1%) diluída em etanol como indicador, conforme descrito nas normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.1.4 Açúcares Totais

Realizado conforme metodologia descrita por Yemn e Willis (1954). O extrato foi preparado através da pesagem de 0,5 mL de polpa de pitanga roxa e posterior diluição em 250 mL de água destilada. Em um tubo de ensaio, em banho de gelo, pipetou-se 0,2 mL do extrato, acrescentou-se 0,8 mL de água destilada e 2 mL de Antrona previamente diluída em ácido sulfúrico (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico). Realizou-se a homogeneização da amostra usando um agitador de tubo de ensaio. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 8 minutos e em seguida foram resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) a 620 nm. A curva padrão foi realizada com diferentes concentrações da solução de glicose. Os resultados foram expressos em g de glicose/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.1.5 Açúcares Redutores

Determinado conforme metodologia proposta por Miller (1959). Pesaram-se 3 mL de polpa de pitanga roxa e diluíram-se em 40 mL de água destilada. Esta solução foi levada ao aquecimento em banho-maria a 60°C durante 5 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo e posterior aferição com água destilada para um volume final de 100 mL e filtração utilizando papel de filtro. Uma alíquota de 0,4 mL desse extrato foi pipetada em um tubo de ensaio juntamente com 1,1 mL de água destilada e 1 mL da solução de DNS (ácido 3,5

dinitrosalicílico) preparada com 0,5 g de DNS, 15 g de tartarato de sódio e potássio e solução de NaOH 2N. Realizou-se a homogeneização das amostras usando um agitador de tubos de ensaio. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo, adicionados 7,5 mL de água destilada e homogeneizados novamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) a 540 nm. A curva padrão foi realizada com diferentes concentrações da solução de glicose. Os resultados foram expressos em g de glicose/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2 Compostos bioativos e atividade antioxidante

3.2.2.1 Ácido ascórbico

Determinado segundo metodologia proposta por Strohecker e Henning (1967). Utilizou-se 1 mL de polpa de pitanga roxa que foi diluída em 100 mL da solução de ácido oxálico 0,5%. Desta primeira diluição retirou-se uma alíquota de 2 mL, acrescentaram-se 50 mL de água destilada e realizou-se a titulação utilizando a solução de Tillman (DFI - 2,6 dicloro-fenol indofenol) 0,02% previamente padronizada com a solução de ácido ascórbico (50 mg de ácido ascórbico em 1000 mL de ácido oxálico 0,5%). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.2 Carotenóides totais

Quantificados segundo a metodologia proposta por Higby (1962). Pesou-se 1 mL de polpa de pitanga roxa, adicionaram-se 15 mL de álcool isopropílico e 10 mL de hexano. Esta mistura foi homogeneizada em um agitador magnético durante 1 minuto e em seguida foi transferida para um funil de separação de 125 mL. Completou-se o volume com água destilada e deixou-se descansar durante 30 minutos. A fase aquosa foi removida. Foi repetida a lavagem com água destilada e posterior descanso mais duas vezes. Após a terceira lavagem, a fase oleosa foi filtrada em algodão previamente pulverizado com sulfato de sódio anidro para um balão de 25 mL. Adicionaram-se 2,5 mL de acetona e aferiu-se o balão volumétrico com hexano. A leitura, em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800), foi realizada a 450 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.3 Clorofila

Determinada segundo metodologia descrita por Engel e Poggiani (1991), utilizando 0,5 mL de polpa de pitanga roxa. A polpa foi homogeneizada com acetona 80% até a completa descoloração e transferida quantitativamente para um balão de 25 mL, aferindo o volume com acetona 80%. Em seguida foi realizada a filtração e leitura em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) utilizando o comprimento de onda de 652 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.4 Antocianinas totais

Determinadas segundo a metodologia descrita por Francis (1982). Pesou-se 0,2 mL de polpa de pitanga roxa e realizou-se a extração com a solução etanol-HCl 1,5N (85:15, v/v), transferindo quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. O extrato permaneceu sob refrigeração durante 16 horas. Em seguida, foi filtrado e realizado a leitura da solução em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) a 535 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.5 Flavonóides amarelos

O extrato utilizado para determinação dos flavonóides amarelos foi o mesmo extrato descrito para determinação de antocianinas totais, conforme descrito por Francis (1982). Para a quantificação de flavonóides amarelos utilizou-se, para leitura em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800), o comprimento de onda de 374 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.6 Polifenóis extraíveis totais

O extrato para determinação dos polifenóis extraíveis totais e da atividade antioxidante foi preparado conforme metodologia descrita por Larrauri, Ruperez e Saura-Calixto (1997). Utilizaram-se 5 mL da polpa de pitanga roxa e diluíram-se em 20 mL de etanol 50%. Deixou-se extrair ao abrigo da luz por uma hora e em seguida realizou-se a centrifugação a 2700 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em um balão volumétrico de 50 mL e no resíduo foram adicionados 20 mL de acetona 70% deixando

extrair por uma hora, seguida de centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi filtrado no mesmo balão volumétrico que o sobrenadante da primeira centrifugação e o volume do balão volumétrico foi aferido com água destilada.

A leitura da concentração dos polifenóis extraíveis totais foi realizada conforme metodologia descrita por Obanda, Owuor e Taylor (1997). Pipetou-se uma alíquota do extrato, completou-se o volume para 0,5 mL, adicionaram-se 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteau (1:3, v/v), 1 mL de carbonato de sódio 20% e 1 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada em agitador de tubos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) a 700 nm, utilizando o ácido gálico como solução padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalente ácido gálico (GAE)/100 mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.2.7 Atividade antioxidante pelo ensaio com o radical ABTS^{•+}

Realizado segundo metodologia descrita por Re *et al.* (1999) que se baseia na habilidade dos antioxidantes, presentes no extrato da fruta, de capturar o radical livre ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)], o que irá provocar a descoloração da solução e, conseqüentemente, o decréscimo da absorbância. A partir do extrato preparado para determinação dos polifenóis extraíveis totais, foram preparadas quatro diferentes diluições (100000, 50000, 25000 e 12500 mg/L) para determinação da atividade antioxidante pelo ensaio ABTS^{•+}. Foram pipetados 30 µL de cada diluição em diferentes tubos de ensaio. Adicionaram-se 3 mL da solução de ABTS^{•+} com absorbância de $0,700 \pm 0,005$ e agitou-se. A leitura, em espectrofotômetro (SHIMADZU Modelo UV – 1800) a 734 nm, foi realizada após 6 minutos. O ensaio foi realizado utilizando a solução de Trolox (2-ácido carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) 2 mM como solução padrão. Os resultados foram expressos em µM Trolox/mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.3 Separação, identificação e quantificação dos compostos voláteis e não voláteis

3.2.3.1 Separação

Foi realizada segundo metodologia proposta por Engel, Bahr e Schieberle (1999) e consiste na utilização de uma unidade de destilação compacta ligada a uma bomba de vácuo (FIGURA 2) que juntas permitem uma separação com alto rendimento dos compostos de

frutas. Esta técnica é conhecida pela sigla *SAFE* do inglês *Solvent Assisted Flavour Evaporation*.

Figura 2 - Equipamento do *Solvent Assisted Flavour Evaporation*.



Fonte: A Autora (2014).

Inicialmente foi realizada a centrifugação de 100 mL de polpa de pitanga roxa a 1000 x g durante 5 minutos para remoção de partículas que poderiam interferir na realização do *SAFE*. A partir do sobrenadante obtido desta centrifugação foi realizado o *SAFE* e, como resultado final, foram obtidas duas frações, uma onde se encontram os compostos voláteis (água destilada, AD) e a outra contendo a fração não volátil (matéria seca, MS). O rendimento de cada fração foi determinado pelo peso.

3.2.3.2 Identificação e quantificação

3.2.3.2.1 Compostos voláteis

Na solução contendo a água destilada e a fração volátil foram adicionados 140 mL de dietil éter, transferindo-se quantitativamente para um funil de separação de 250 mL. Realizou-se a homogeneização da solução e em seguida foi colocado em descanso até que as duas fases se separassem. Recolheram-se cada uma das duas fases em Erlenmeyers distintos. Na fase inferior foi repetido o procedimento quatro vezes. As fases superiores obtidas das

cinco lavagens (fase orgânica) foram combinadas em um único Erlenmeyer, pulverizada com sulfato de sódio anidro e filtrada diretamente em um balão de fundo redondo para posterior remoção do solvente em rotaevaporador (450 mbar a 40°C). Todo procedimento foi realizado conforme descrito por Ehrnhöfer-Ressler *et al.* (2013).

Os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa. Utilizou-se o cromatógrafo gasoso (GC-MS) Agilent Technologies 6890N Network (Agilent Technologies, Vienna, Austria), acoplado ao espectrômetro de massa Agilent 5973 Network (Agilent Technologies, Vienna, Austria) que foi operado em modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV. O volume de 1 µL da amostra foi injetado a 250°C no modo *splitless* pulsado com temperatura da coluna de 50°C. A temperatura de injeção foi mantida durante 2 minutos seguida de aquecimento até 280°C em 15 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, o qual foi utilizado a uma taxa de fluxo constante de 1,1 mL/minuto. A coluna utilizada foi a DB-5MS, 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura.

Os compostos foram identificados com base em seus padrões de fragmentação em espectrofotometria de massa usando o banco de dados ChemStation G1707 (Agilent Technologies, Viena, Áustria) e com o estudo de Weyerstahl *et al.* (1988) que identificaram os compostos voláteis presente no óleo extraído das folhas da pitangueira.

Após a identificação dos picos, escolheu-se o composto presente em maior quantidade na fração volátil da polpa de pitanga roxa para realizar a sua quantificação. Este composto não foi encontrado disponível para compra e sua síntese é muito onerosa, fazendo-se necessário isolar este composto diretamente da polpa de pitanga roxa. Tomou-se 100 mL de polpa de pitanga roxa, adicionou-se 140 mL de dietil éter. A mistura foi transferida pra um funil de separação de 250 mL, e esperou-se a sua separação em duas fases que foram recolhidas em Elenmeyers distintos. Na fase inferior foi repetido o procedimento quatro vezes. As fases superiores foram combinadas, pulverizada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador a 450 mbar a 40°C até um volume final de 1 mL. A solução foi evaporada com nitrogênio gasoso, o resíduo foi diluído em 0,5 mL de acetonitrila e em seguida injetado em UHPLC (Dionex Ultimate 3000 series UHPLC system) conectado a um detector de arranjo de diodos (Dionex, Austria). A separação cromatográfica a 25°C foi realizada utilizando a coluna Luna[®] C18 LC (5 µm, 100 Å, 250 x 3 mm, Phenomenex) usando as seguintes condições: C (acetonitrila) e D (água destilada) com velocidade de fluxo de 0,5 mL/min. Um gradiente linear foi programado como descrito a seguir: 0-25 min – 40% C; 25-30 min – 40-100% C; 30-35 min – 40% C. Os picos foram coletados usando o Chromeleon 6.8 software (Dionex, Austria). A absorbância dos picos foi monitorada a 190 nm. Após a

coleta dos picos foi realizada a identificação dos mesmos em GC-MS usando as mesmas condições descritas na etapa de identificação dos picos.

O composto desejado foi concentrado utilizando o nitrogênio gasoso. Em seguida foi diluído com acetonitrila e a confirmação de sua identidade e pureza foi realizada utilizando a ressonância nuclear magnética (RNM) comparando o resultado com o trabalho de Weyerstahl *et al.* (1988). Após esta confirmação foi realizada a quantificação desse composto. A quantificação foi realizada em LC-MS 2020 (Shimadzu Corporation, Japan) usando o mesmo gradiente linear usado para isolar o composto em UHPLC. A coluna utilizada foi a Luna 5 u C-18(2) 100Å, 250 x 3,00 mm, 5 µm (Phenomenex). A quantificação foi realizada com o comprimento de onda de 190 nm e foi baseada na área do pico, usando uma curva padrão de cinco pontos preparada com o composto isolado. Os resultados foram expressos em µg/mL de polpa de pitanga roxa.

3.2.3.2.2 Compostos não voláteis

Sabendo que a pitanga roxa é rica em flavonoides (MALAMAN *et al.*, 2011; LIMA, MÉLO, LIMA, 2002), optou-se por fazer a identificação destes compostos neste fruto. A extração dos flavonóides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Celli, Pereira-Netto e Beta (2011). À fração não volátil obtida após o SAFE foi adicionado 40 mL da solução acetona/água/ácido acético (70:29:1, v/v/v), seguido de sonificação durante 1 hora à temperatura ambiente, centrifugação a 4500 x g, durante 25 minutos a 20°C e filtração em um filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 µm e diâmetro nominal de 13 mm (Rotilabo®, Germany). A amostra foi injetada em cromatógrafo líquido acoplado a um espectrofotômetro de massa (LC-MS 2020, Shimadzu Corporation, Japan) usando a coluna Luna 5 u C-18(2) 100 Å, 250 x 3,00 mm, 5 µm (Phenomenex). A amostra foi eluída pela coluna com um gradiente consistindo de A (0,3% de ácido fórmico em água, v/v) e B (0,3% de ácido fórmico em metanol, v/v) com uma taxa de fluxo constante de 0,5 mL/min. O gradiente linear foi programado como descrito a seguir: 0-1,5 min – 5% B; 1,5-4 min – 5-10% B; 4-10 min – 10-15% B; 10-15 min – 15-50% B; 15-20 min – 50-5% B, similar ao descrito por Celli, Pereira-Netto e Beta (2011). O LC-MS foi utilizado no modo positivo.

Os compostos foram identificados através da comparação com o espectro dos compostos em outros artigos e com trabalho de Celli, Pereira-Netto e Beta (2011). Após a identificação dos flavonóides, optou-se por realizar a quantificação do composto majoritário observado neste fruto. Este composto foi a cianidina-3-glicosídeo (C3G). Para construção da

curva padrão e posterior quantificação, obteve-se este produto na empresa *Polyphenols Laboratories AS* com pureza de 99,9%.

A quantificação foi realizada com comprimento de onda de 350 nm e foi baseada na área do pico usando uma curva padrão de cinco pontos preparada com a solução padrão de cianidina-3-glicosídeo clorídrica (*Polyphenols Laboratories AS*). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de polpa de pitanga roxa.

3.2.4 Experimento com células HGF-1

3.2.4.1 Cultivo de células HGF-1

As células HGF-1 (*Human Gingival Fibroblasts*) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma), suplementado com 20% de FBS (soro fetal bovino), 8 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. O meio de cultura foi mantido sob refrigeração e no momento de seu uso foi previamente aquecido durante 15 minutos em banho-maria a 37°C. As células HGF-1 foram cultivadas em frasco de cultura e incubadas a 37°C, 5% CO₂.

3.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa em células HGF-1

A citotoxicidade foi medida através da exposição das células HGF-1 em diferentes concentrações das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa, utilizando dietil éter e etanol como solventes da fração volátil e não volátil, respectivamente, com tempo de exposição de 6 horas.

A citotoxicidade foi medida utilizando o sal tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio) (MTT). O método baseia-se na capacidade apresentada pelas células ativas de reduzir o MTT a cristais de MTT-formazano de coloração roxa, cuja intensidade formada é proporcional ao número de células ativas (MOSSMAN, 1983).

A extração dos compostos voláteis, após a separação dos mesmos no *SAFE*, foi realizada conforme descrito no item 3.2.3.2.1 utilizando dietil éter como solvente. A concentração em rotaevaporador foi realizada para que ao final fosse obtido um volume que correspondesse a 10% e 1% do volume de polpa de pitanga roxa utilizada. Para a extração da

fração não volátil utilizou-se o método otimizado que utiliza a solução de acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v), homogeneização e centrifugação conforme descrito no item 3.2.3.2.2. O sobrenadante foi liofilizado e ressuspenso em etanol para se obter um volume que correspondesse a 10% e 1% do volume de polpa de pitanga roxa utilizada. O estudo foi realizado, também, com a combinação das frações volátil e não volátil nas concentrações correspondentes a 10% e 1% do volume da polpa de pitanga roxa.

Foram preparadas microplacas de 96 poços com uma concentração celular inicial de HGF-1 de 4000 células por poço em um volume final de 200 μ L de meio de cultura. As placas foram colocadas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ por uma semana. Após este tempo, foi removido o meio de cultura e novos meios de cultura contendo os compostos voláteis e não voláteis, nas concentrações de 10% e 1%, foram preparados e 100 μ L de cada meio de cultura foram adicionados. A exposição de cada fração às células HGF-1 foi estudada com e sem a adição de 10 μ g/mL do lipopolissacarídeo (LPS) extraídos da bactéria *P. gingivalis* (InvivoGen, Estados Unidos) (PG-LPS). O branco do experimento foi o próprio meio de cultura, que também foi analisado na presença e na ausência de 10 μ g/mL de PG-LPS. As soluções controles de dietil éter, etanol e a combinação dietil éter + etanol foram adicionadas ao meio de cultura até volume final de 1% de cada constituinte, correspondendo ao controle positivo dos compostos voláteis, não voláteis e a combinação das duas frações, respectivamente.

Após a adição do meio de cultura contendo as substâncias de interesse do estudo, as microplacas foram colocadas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ por 6 horas. Passado esse tempo de incubação, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com 200 μ L de tampão fosfato salino (PBS) que em seguida foi removido, adicionado 100 μ L de meio de cultura e 25 μ L do reagente MTT. As microplacas foram colocadas novamente na incubadora a 37°C, 5% CO₂ durante 4 horas. Em seguida, foi removido o meio de cultura com o MTT, os poços foram lavados duas vezes com 200 μ L de PBS que foi removido através da inversão cuidadosa da placa. Foram adicionados 100 μ L de sulfóxido de dimetilo (DMSO) seguido de agitação por 5 minutos e posterior adição de 12,5 μ L de glicina (50%, diluída em água destilada). O experimento foi realizado três vezes usando células em diferentes estágios de desenvolvimento. A avaliação da atividade citotóxica foi determinada por espectrofotometria (Tecan Infinite M200 Multi-Mode Microplate Reader) a 570 nm. Os resultados foram expressos em T/C% (quociente entre as células tratadas e as células controle) relativamente à absorbância determinada nas células controle (células incubadas somente com meio de cultura).

3.2.4.3 Quantificação da liberação da interleucina IL-8 por células HGF-1 após a exposição às frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa

A liberação da interleucina IL-8 em HGF-1 foi medida através da exposição das células HGF-1 às mesmas concentrações das frações voláteis, não voláteis e a combinação destas duas frações extraídas da polpa de pitanga roxa, com ou sem a suplementação de 10 µg/mL de PG-LPS após 6 horas de exposição.

Foram preparadas três microplacas de 24 poços com uma concentração celular de HGF-1 de 12000 células por poço em um volume final de meio de cultura (DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 8 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) de 1 mL. As placas foram colocadas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ por uma semana. Em seguida, foram preparadas diferentes diluições de cada componente a ser avaliado. O meio de cultura foi removido e foram adicionados 300 µL de cada diluição (utilizando o mesmo processo de preparo e diluição descritos no item anterior). As soluções controles de dietil éter, etanol e a combinação das duas foi adicionada ao meio de cultura para se ter um volume final de 1% de cada constituinte.

Após a adição do meio de cultura contendo as soluções de estudo, as placas foram colocadas novamente em incubadora a 37°C, 5% CO₂ durante 6 horas. Após esse tempo, as placas foram removidas da incubadora, o meio de cultura de cada poço foi coletado individualmente e centrifugado a 4500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente (25°C ± 2°C) para remoção das células. O sobrenadante foi congelado em ultrafreezer a -80°C até o momento da análise.

A liberação da IL-8 por células HGF-1 foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o kit não magnético *Human Basic Kit FlowCytomix* (eBioscience), seguindo o protocolo do fabricante para determinação em tubos de 1,5 mL. As amostras foram incubadas na ausência de luz por 2 horas e a leitura foi realizada no Guava EasyCyte Flow Cytometer (Merck-Millipore). Este experimento foi realizado em células em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando quatro repetições.

3.2.5 Experimento com o suco tropical de pitanga roxa adoçado

3.2.5.1 Preparo do suco tropical de pitanga roxa adoçado

Este experimento foi realizado com o intuito de observar o efeito da exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado em células bucais.

O suco foi preparado conforme a Instrução Normativa n.º. 12 (MAPA, 2003), utilizando os valores mínimos indicados para o suco de tropical de pitanga adoçado (TABELA 2).

Tabela 2. Padrão de identidade e qualidade para suco tropical de pitanga.

Componente	Não adoçado		Adoçado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Polpa de pitanga (g/100 g)	60,0	-	35,0	-
Sólidos solúveis (°Brix, 20°C)	5,0	-	10,0	-
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g)	0,5	-	0,3	-
Açúcares totais (g/100 g)	-	8,6	7,0	-

Fonte: MAPA (2003).

O suco tropical foi preparado com 35% de polpa de pitanga roxa. Os sólidos solúveis do suco tropical foram ajustados com sacarose comercial até um conteúdo final de 10°Brix. A solução controle foi preparada com água e sacarose comercial, nas mesmas concentrações observadas no suco tropical de pitanga roxa adoçado.

3.2.5.2 Exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado às células bucais humanas

O experimento foi realizado com seis voluntários. Antes do experimento foi solicitado que os voluntários permanecessem em jejum e não escovassem os dentes ou enxaguasse os mesmos com antisséptico bucal por pelo menos 12 horas. Todos os voluntários concordaram em participar do experimento, e assinaram um termo de consentimento.

Cada voluntário foi solicitado a bochechar o suco tropical de pitanga roxa adoçado por 10 minutos. Como o objetivo é que cada voluntário bochechasse 100 mL do suco tropical de pitanga roxa adoçado, realizou-se o fracionamento do mesmo. Assim, cada voluntário bochechou primeiramente 35 mL do suco tropical de pitanga roxa adoçado por 3 minutos, seguido de mais 35 mL por 3 minutos e por fim 30 mL por 4 minutos. Após o

bochechar, os voluntários expeliram o suco tropical de pitanga roxa adoçado em um copo plástico onde as três frações do suco tropical de cada voluntário foram combinadas e homogeneizadas. Esperou-se 5 minutos e em seguida foram coletadas as células da gengiva dos voluntários utilizando uma escova cito-brush e imediatamente colocadas em 5 mL de meio de cultura RPMI (suplementado com 10% de FBS, 8mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) previamente aquecido até a temperatura de 37°C. Após a contagem das células de cada voluntário, utilizando o azul de Trypan e a câmara de Neubauer, as mesmas foram divididas em dois tubos de 15 mL e foram centrifugadas (400 x g, 5 minutos, 25°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas para que cada tubo tivesse 150000 células por mL. As células de cada voluntário foram tratadas com e sem adição de PG-LPS (10 µg/mL), transferidas para placas de 6 poços e incubadas a 37°C, 95% umidade, 5% de CO₂ durante 6 horas. Após a incubação, as células juntamente com o meio de cultura foram coletadas e centrifugadas (400 x g, 5 minutos, 25°C) para coleta do meio de cultura que foi utilizado na determinação da liberação da IL-8 pelas células bucais humanas. As células foram ressuspensas para uma concentração celular de 500000 células para serem utilizadas na determinação da atividade da catalase e do dano de DNA.

O mesmo procedimento foi realizado com a solução controle (água + sacarose comercial na mesma concentração em que foi adicionada ao suco tropical de pitanga adoçado).

3.2.5.2.1 Atividade da catalase em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado

Para a determinação da atividade da catalase foram utilizadas 40000 células coletadas da gengiva de cada voluntário. As células juntamente com o meio de cultura foram colocadas em tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 400 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL da solução tampão (2,72 g KH₂PO₄, 5,3412 g Na₂HPO₄*2H₂O, 800 mL ddH₂O, pH 7 e volume final aferido em balão volumétrico de 1 litro com ddH₂O). A diluição foi pipetada em uma placa de 96 poços (140 µL por poço) onde para cada amostra foram pipetados 12 poços, sendo 6 analisados com solução de H₂O₂ (167 µL de H₂O₂ 30% diluídos em 50 mL da solução tampão) e 6 analisados somente com a solução tampão. O comprimento de onda utilizado para as leituras foi 240 nm usando o espectrofotômetro Tecan Infinite F200 Multi-Mode Microplate Reader.

Após a leitura foi adicionado 100 µL da solução de lise N-lauroilsarcosina em todos os poços analisados e, com o auxílio da pipeta, homogeneizou-se a solução. A mistura foi mantida em congelador doméstico (-20°C) por 12 horas. A concentração do cDNA foi determinada usando a placa de NanoQuant no Tecan Infinite M200 Multi-Mode Microplate Reader.

A atividade da catalase foi calculada através da seguinte fórmula:

$$AC = \frac{[(V * a * (\frac{E1}{E2}) * b)]}{(v * E * d * f * cDNA)] * 1000} \quad \text{Equação (I)}$$

Onde:

AC = Atividade da catalase em MU/g DNA

V = volume total por poço (210 µL)

a = 1000 µmol/mmol

E1 = absorbância, a 240 nm, logo após a adição de 70 µL de H₂O₂ pelo equipamento

E2 = absorbância, a 240 nm, 30 segundos após a adição de 70 µL de H₂O₂ pelo equipamento

b = 60 s/min/30 s = 2/min

v = volume da amostra por poço (140 µL)

E = coeficiente de extensão molecular do H₂O₂ (0,036 L/mmol*cm)

d = distância em cm (0,65625 cm)

f = 1000 U/KU

cDNA = Concentração de cDNA na presença de H₂O₂ - Concentração de cDNA na ausência de H₂O₂

3.2.5.2.2 Dano do DNA em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado

O dano do DNA em células bucais humanas após a exposição ao suco tropical de pitanga roxa adoçado foi realizado através do Ensaio Cometa. Esta técnica foi desenvolvida por Ostling e Johanson (1984) e modificada por Singh *et al.* (1988). Uma das modificações proposta foi a adição de enzimas de reparação específicas como a formamido pirimidina glicosilase (fpg) para determinação do dano no DNA causado por processos oxidativos (KAIN; KARLSSON, MÖLLER, 2012).

Para este ensaio foram utilizadas 150000 células coletadas da gengiva de cada voluntário. Estas células foram divididas em 6 tubos de 1,5 mL. Realizou-se a centrifugação a $2000 \times g$ por 10 minutos a 10°C . O sobrenadante foi descartado com o auxílio da pipeta e o resíduo foi ressuspensão em LMA (*low-melting agarose*) 0,8% diluída em PBS. A solução resuspensa foi então transferida para as lâminas e recoberta imediatamente com lamínulas. As lâminas foram mantidas em gelo a 4°C até a completa polimerização. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas dentro de um pote de vidro contendo a solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris, pH 10 ajustado com NaOH) por 24 horas.

Com o intuito de avaliar o dano oxidativo foi realizado o tratamento com a enzima fpg. Após a remoção da solução de lise, realizou-se a lavagem das lâminas com a solução tampão de enzimas (400 mM HEPES, 1 M KCl, 5 M EDTA, 2 mg/mL BSA, pH ajustado para 8 com KOH) três vezes durante 5 minutos a 4°C . Para cada amostra, uma das duas lamínulas foi tratada com a enzima fpg. Nas amostras tratadas com a enzima foram adicionadas 50 μL de fpg e em seguida cobertas com a lamínula, nas demais, adicionaram-se 50 μL da solução tampão de enzimas. Todas as lâminas foram colocadas em incubadoras por 30 minutos a 37°C , 95% umidade e 5% de CO_2 . Após a incubação foram removidas as lamínulas. As lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e recobertas com solução tampão de eletroforese (60 mL de 10 M NaOH, 10 mL 200 mM EDTA, volume aferido para 2 litros com de ddH_2O) por 20 minutos. Após esse tempo, ligou-se a voltagem constante de 25 V, utilizando corrente elétrica e potência nos valores máximos por 20 minutos.

A etapa de neutralização consistiu em colocar as lâminas no pote de vidro onde foram lavados com a solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,4 ajustado com HCl concentrado) três vezes durante 5 minutos a 4°C .

A etapa seguinte foi a de corar o DNA. Pipetou-se 40 μL de brometo de etídio (5 μL 10 mM brometo de etídio em 1 mL de H_2O destilada) e cobriu-se com as lamínulas. As lâminas foram armazenadas a 4°C . Para a visualização do dano no DNA foi realizada a medição da intensidade da cauda formada em 50 células por lâmina utilizando um microscópio de fluorescência.

3.2.5.2.3 Determinação da liberação da IL-8 em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado

Após as 6 horas de incubação das células bucais expostas ao suco tropical de pitanga roxa adoçado, o meio de cultura foi colocado em tubos de 15 mL e foi centrifugado

(800 x g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi colocado em um tubo de 1,5 mL e foi imediatamente armazenado em ultrafreezer (-80°C) para posterior determinação da liberação da IL-8 pelas células. A liberação da IL-8 foi quantificada utilizando o kit não magnético *Human Basic Kit FlowCytomix* (eBioscience), seguindo o protocolo do fabricante para determinação em tubos de 1,5 mL. A incubação das amostras foi realizada na ausência de luz por 2 horas. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Flow Cytometer (Merck-Millipore)).

3.2.5.3 Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células HGF-1 e células bucais humana

Com o intuito de verificar a ação individual dos compostos majoritários das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa realizou-se o estudo de exposição desses compostos, nas mesmas concentrações observadas no suco tropical de pitanga roxa adoçado, em células HGF-1 e células bucais humana.

3.2.5.3.1 Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células HGF-1

As células HGF-1 foram cultivadas como descrito anteriormente, utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS, 8 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. O cultivo foi realizado em frasco de cultura e a incubação das células foi a 37°C, 5% CO₂.

Em microplacas de 24 poços, foram incubadas (37°C, 5% CO₂) 150000 células por poço. Esperou-se quatro dias de incubação para que as células estivessem presas na microplaca, em seguida, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se novos meios de cultura contendo oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e cianidina-3-glicosídeo nas mesmas concentrações encontradas no suco tropical de pitanga roxa adoçado. Adicionou-se, também, PG-LPS (10 µg/mL). Realizou-se a incubação por 0,5; 1; 3; 6 e 24 h.

3.2.5.3.1.1 Isolamento do RNA em células HGF-1 após a exposição à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e à cianidina-3-glicosídeo

O isolamento do RNA foi realizado utilizando o kit SV sistema total de isolamento de RNA (Promega, Estados Unidos) e as etapas de isolamento seguiram as recomendações do fabricante.

A expressão do gene de IL-8 foi determinada nos cinco diferentes tempos de incubação (0,5; 1; 3; 6 e 24 horas). Para cada experimento, 50000 células foram incubadas a 37°C apenas com o solvente (controle), com 10 µg/mL de PG-LPS + solvente, 10 µg/mL de PG-LPS + 119 µg/mL de cianidina-3-glicosídeo e 10 µg/mL de PG-LPS + 30 µg/mL de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (que são as mesmas concentrações desses compostos no suco tropical de pitanga roxa adoçado).

Após cada tempo de incubação estudado, o meio de cultura foi removido com o auxílio da bomba de sucção. As células foram incubadas com a solução tripisina:tampão fosfato salino (1:1, v/v) por 3 minutos a 37°C e 5% CO₂ para separação das mesmas da microplaca, foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 10 mL da solução tampão fosfato salino. Foi realizada a centrifugação a 300 x g por 5 minutos a 25°C, e em seguida foi removido o tampão fosfato salino utilizando a bomba de sucção.

O RNA destas células foi isolado (SV sistema de isolamento de RNA total - Promega), conforme descrito a seguir: as células foram resuspensas em tampão para lise do RNA e transferidas para um tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 350 µL do tampão de diluição do RNA. A mistura foi colocada em chapa aquecedora a 70°C por 3 minutos. Após o aquecimento foi realizada a centrifugação a 14000 x g por 1 minuto a 25°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionaram-se 200 µL de etanol em cada tubo, que em seguida foram homogeneizados utilizando a pipeta e o líquido foi transferido para um tubo *spin column* fixado dentro de um tubo de coleta. Foi realizada uma nova centrifugação a 14000 x g por 1 minuto a 25°C. A coluna do tubo *spin column* foi lavada com 600 µL da solução de lavagem do RNA e centrifugada a 14000 x g por 1 minuto a 25°C. Foram adicionadas 50 µL da solução contendo 40 µL do tampão de núcleo amarelo, 5 µL de MnCl₂ 0,09M MnCl₂ e 5 µL de DNase I enzima (recém preparada) em cada amostra e incubou-se a 20-25°C por 15 minutos. Em seguida foi adicionada a solução de paragem de DNase e realizada a centrifugação a 14000 x g por 1 minuto a 25°C. O líquido do tubo de coleta foi, então, descartado. Adicionaram-se 600 µL da solução de lavagem do RNA no tubo *spin*

column e centrifugou-se novamente a 14000 x *g* por 1 minuto a 25°C. Em seguida, adicionaram-se 250 µL da solução de lavagem do RNA no tubo *spin column* e centrifugou-se a 14000 x *g* por 2 minutos a 25°C. O tubo *spin column* foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Adicionaram-se 30 µL de água livre de nuclease e centrifugou-se a 14000 x *g* por 1 minuto a 25°C. Repetiu-se a operação duas vezes. O tubo *spin column* foi então descartado. No líquido remanescente foi realizada a quantificação do RNA em placa de NanoQuant no Tecan Infinite M200 Multi-Mode Microplate Reader (Tecan, Austria).

Após a quantificação, a solução foi congelada a -80°C. No RNA isolado foi realizada a transcrição do c-DNA utilizando o kit RNase Inibitor Kit (Applied Biosystems). Primeiramente fez-se o preparo da solução de transcrição do RNA conforme especificações do fabricante (TABELA 3).

Tabela 3 - Componentes utilizados no preparo na solução de transcrição do RNA.

Componente	Volume (µL)
10X tampão de transcrição reversa	2,0
25X mix da solução de desoxinucleotídeo (100 mM)	0,8
10X iniciadores aleatórios de transcrição reversa	2,0
MultiScribe™ transcriptase reversa	1,0
Inibidor de RNase	1,0
Água livre de nuclease	3,2

Para cada amostra de RNA isolada foram adicionados 10 µL da solução de transcrição do RNA. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente com o auxílio da pipeta e em seguida foi centrifugada por 10 segundos para sedimentar a solução e remover bolhas. O c-DNA foi então quantificado utilizando a placa de NanoQuant no Tecan Infinite M200 Multi-Mode Microplate Reader (Tecan, Austria). O c-DNA foi armazenado a -20°C até o momento da determinação da expressão do gene da IL-8 por PCR.

Para todas as amostras, a expressão do gene alvo por PCR foi comparada com a do gene de arrumação (PPIA). A análise de PCR utilizando 50 ng por amostra de reação e 200 nM de iniciadores foi realizado sob as seguintes condições: desnaturação 95°C/20 segundos; anelamento 45 ciclos de 95°C/3 segundos e 60°C/30 segundos e extensão 95°C/15 segundos, 60°C por 1 minuto com aumento de 0,5°C e finalizando com 95°C/15 segundos. A mistura utilizada para a reação foi preparada utilizando 132 µL de *Master mix*, 100,3 µL de água livre de nuclease, 5,3 µL de *forward primer* e 5,3 µL de *reverse primer*. Em tubos de 1,5 mL foram

pipetadas 28,6 μL das soluções de análise (solução de análise de PPIA ou de interleucina 8) e 3,2 μL do c-DNA isolado das células HGF-1 após os tempos de 0,5; 1; 3; 6 e 24 h de incubação. A solução foi homogeneizada com o auxílio da pipeta e centrifugada por alguns segundos para a remoção de bolhas. Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 10 μL de cada solução em triplicata.

A eficiência da PCR (1,8 a 2,0) foi determinada (LinRegPCR) e utilizada para calcular a quantidade de molde no início (N_0 -valor). Os N_0 -valores de IL-8 foram normalizados para os valores de N_0 -PPIA. Estes valores foram normalizados em relação ao respectivo controle de solvente (ajustado para 1,0) em cada ponto de tempo, resultando na mudança de dobragem do tratamento versus controle.

3.2.5.3.1.2 Determinação da liberação da IL-8 em células HGF-1 após a exposição à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e à cianidina-3-glicosídeo

De posse dos resultados da análise de PCR, escolheu-se o tempo de incubação onde foi possível observar a maior expressão do gene de IL-8.

Prepararam-se microplacas de 24 poços, contendo 12000 células de HGF-1 por poço. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂. Esperou-se quatro dias de incubação para que as células ficassem presas à placa. O meio de cultura foi removido e novos meios de cultura contendo 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e 119 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cianidina-3-glicosídeo foram adicionados. Adicionou-se, também, PG-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi coletado e transferido para tubos de 1,5 mL, foi centrifugado a 800 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um tubo de 1,5 mL e imediatamente foi armazenado em ultrafreezer (-80°C).

A liberação da IL-8 foi quantificada utilizando o kit não magnético *Human Basic Kit FlowCytomix* (eBioscience), seguindo o protocolo do fabricante para determinação em tubos de 1,5 mL, incubando as amostras na ausência de luz por 2 horas e com leitura realizada no Guava EasyCyte Flow Cytometer (Merck-Millipore). Este experimento foi realizado em células em três diferentes estágios de desenvolvimento, com quatro repetições.

3.2.5.3.2 Exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo às células bucais humana

Semelhante ao que foi realizado com o suco tropical de pitanga roxa adoçado, o experimento foi conduzido com 6 voluntários. No dia do experimento, os voluntários estavam em jejum, não haviam escovado os dentes e não poderiam ter usado antisséptico bucal por pelo menos 12 horas. Todos os voluntários concordaram em participar do experimento, e assinaram um termo de consentimento.

Os compostos individuais foram, primeiramente, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Em meio de cultura RPMI (suplementado com 10% de FBS, 8mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) foi adicionado a solução de 30 µg/mL de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e de 119 µg/mL de cianidina-3-glicosídeo. O controle desse experimento foi o meio de cultura RPMI (suplementado com 10% de FBS, 8 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) contendo 1% de DMSO.

Foram coletadas as células de cada voluntário utilizando a escova *cito-brush* e imediatamente foram colocadas em meio de cultura contendo as soluções de 30 µg/mL de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e de 119 µg/mL de cianidina-3-glicosídeo. O meio de cultura junto com as células foi colocado em *shake* à baixa velocidade, simulando o bochechamento, por 10 minutos. O número de células de cada provador foi contado utilizando o azul de Trypan e a câmara de Neubauer. O volume total de células foi dividido em dois para posterior incubação com ou sem adição de PG-LPS (10 µg/mL) e, em seguida, foram centrifugadas (400 x g, 5 minutos, 25°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas para que cada tubo tivesse 150000 células por mL. As células foram transferidas para placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Após a incubação, as células juntamente com o meio de cultura foram coletadas e centrifugadas (400 x g, 5 minutos, 25°C), o sobrenadante foi coletado para posterior determinação da liberação da IL-8 pelas células bucais humanas. As células foram ressuspensas para uma concentração celular de 500000 células para serem utilizadas na determinação da atividade da catalase e do dano de DNA.

A determinação da atividade da catalase, do dano do DNA e a liberação da IL-8 pelas células bucais humanas após a exposição das mesmas aos compostos majoritários presentes nas frações volátil e não volátil da polpa de pitanga roxa seguiram os mesmos

protocolos descritos no experimento de exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado às células bucais humanas.

3.2.5.3.3 Análise estatística

As análises de caracterização química e físico-química, de quantificação dos compostos bioativos e da atividade antioxidante, de rendimento das frações volátil e não volátil e de quantificação do composto majoritário presente em cada uma destas frações foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão.

Os experimentos realizados com células HGF-1 (avaliação da citotoxicidade, estudo da expressão do gene e quantificação da liberação/inibição da liberação de IL-8) foram realizados com células em três diferentes estágios de desenvolvimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Foi realizado o teste t de Student não emparelhado para comparar o efeito da substância com a estimulação de PG-LPS. Onde foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) foi realizado o teste de Tukey. No estudo da expressão do gene, o teste one-way ANOVA foi utilizado para determinar os efeitos do tempo de exposição e as diferenças entre os compostos.

No experimento com as células bucais humanas (atividade da catalase, dano do DNA e quantificação da liberação/inibição da liberação de IL-8) utilizaram-se seis voluntários e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student. Onde foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) foi realizado o teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química e físico-química

Os resultados da caracterização química e físico-química da polpa de pitanga roxa são apresentados na Tabela 4.

O valor médio de sólidos solúveis foi de $8,33 \pm 0,06$ °Brix (TABELA 4).

Tabela 4 – Características químicas e físico-químicas da polpa de pitanga roxa e padrão de identidade e qualidade da polpa de pitanga.

Pitanga roxa	Características químicas e físico-químicas*	Padrão de identidade e qualidade da polpa de pitanga**	
		Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis (°Brix)	$8,33 \pm 0,06$	6,0	-
pH	$3,12 \pm 0,01$	2,5	3,4
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL)	$1,76 \pm 0,20$	0,92	-
Açúcares totais (g glicose/100 mL)	$9,28 \pm 0,60$	-	9,50
Açúcares redutores (g glicose/100 mL)	$5,28 \pm 0,22$	-	-

* Valores médios \pm desvio padrão. (n = 3)

** Fonte: Brasil (2000).

O valor médio de sólidos solúveis observado, quando comparado com outros autores, pode ser considerado baixo, pois segundo Franzom (2004), os sólidos solúveis na polpa de pitanga roxa geralmente são elevados, podendo apresentar de 12 a 17 °Brix. Bagetti *et al.* (2011), estudando a composição da polpa de pitanga roxa, observaram valores médios de sólidos solúveis de 13,8 °Brix.

A diferença nos valores de sólidos solúveis entre diferentes autores pode ser devido a diferenças no cultivo e colheita dos frutos, já que, segundo Coccozza (2003), o conteúdo de sólidos solúveis em um fruto pode variar conforme o seu estágio de maturação, as condições climáticas e o manejo cultural.

Santos *et al.* (2002), estudando a polpa de pitanga roxa em diferentes estágios de maturação, observaram que a polpa de pitanga roxa no primeiro estágio de maturação (pitanga verde) possui 8,53 °Brix e a polpa de pitanga roxa madura (pitanga roxa escura) possui em média 13,04 °Brix. O valor observado por estes autores na polpa obtida de frutos verdes é

semelhante ao observado no presente estudo, porém o estágio de maturação é diferente, já que o presente trabalho foi realizado com pitangas no estágio maduro (pitanga roxa escura). Esta variação pode ter ocorrido devido a diferenças climáticas e de cultivo, já que as pitangas estudadas foram obtidas em cidades diferentes. Outro fator que pode causar variação é o local de colheita do fruto na planta. Pio *et al.* (2005) estudando a composição da polpa de pitanga colhida de diferentes partes da planta observaram variação de 12,96 a 14,97 °Brix dependendo do local de coleta e que os valores de sólidos solúveis eram crescentes na seguinte ordem: região apical > região mediana > região basal.

Apesar do valor de sólidos solúveis observado no presente trabalho ser baixo quando comparado com outros autores, este valor está dentro do limite permitido pela Instrução Normativa nº 01 (BRASIL, 2000) que afirma que a polpa de pitanga deve possuir o valor mínimo de sólidos solúveis de 6,0 °Brix.

No presente estudo, a média de pH foi de $3,12 \pm 0,01$ (TABELA 4) e é semelhante aos relatados por Bagetti *et al.* (2011) e Santos *et al.* (2002) que estudaram a polpa de pitanga roxa e observaram valores de pH de 3,38 e 3,55, respectivamente e superior ao relatado por Mélo, Lima e Nascimento (1999) que observaram valor de pH de 2,6. Lopes, Mattietto e Menezes (2005), estudando a polpa de pitanga vermelha, observaram valores de pH de 3,40. Os valores do presente estudo estão de acordo com a Instrução Normativa nº 01 (BRASIL, 2000), que afirma que a polpa de pitanga deve possuir valor de pH mínimo de 2,5 e máximo de 3,4.

A acidez titulável média da polpa de pitanga roxa foi $1,76 \pm 0,20$ g ácido cítrico/100 mL (TABELA 4). A Instrução Normativa nº 01 (BRASIL, 2000) afirma que a polpa de pitanga deve possuir um valor mínimo de acidez de 0,92 g ácido cítrico/100 mL, não existindo um valor máximo para esta variável.

Bagetti *et al.* (2011), Santos *et al.* (2002) e Melo, Lima e Nascimento (1999) estudaram a polpa de pitanga roxa e observaram valores de acidez de 1,87; 1,64 e 2,04 g ácido cítrico/100 mL. Na polpa de pitanga vermelha, Lopes, Mattietto e Menezes (2005) relataram valores médios de acidez de 1,25 g ácido cítrico/100 mL.

O teor de açúcares totais na polpa de pitanga roxa foi de $9,28 \pm 0,60$ g glicose/100 mL (TABELA 4). Este valor encontra-se próximo ao máximo permitido pela Instrução Normativa nº 01 (BRASIL, 2000) para polpa de pitanga que é de 9,50 g glicose/100 mL. Lopes, Mattietto e Menezes (2005) estudando a polpa de pitanga vermelha observam valores de açúcares totais de 7,90 g de glicose/100 mL.

A média de açúcares redutores foi de $5,28 \pm 0,22$ g glicose/100 mL (TABELA 4). Não há limites na legislação brasileira para esta variável. Lopes, Mattietto e Menezes (2005) observaram valores de açúcares redutores de 7,73 g glicose/100 mL na polpa de pitanga vermelha.

Dias (2010), estudando a polpa de pitanga vermelha, observaram teores de açúcares totais e redutores inferiores aos observados no presente estudo. Os referidos autores relataram valor médio de açúcares totais de 8,41 g glicose/100 mL e de açúcares redutores de 4,71 g glicose/100 mL. A diferença entre os resultados de Dias (2010) e os do presente estudo podem ser relacionada às diferenças nos genótipos, o estágio de maturação e as condições ambientais do local onde os frutos foram cultivados.

4.2 Compostos bioativos e atividade antioxidante

Os resultados da quantificação dos compostos bioativos e da atividade antioxidante são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Compostos bioativos e atividade antioxidante da polpa de pitanga roxa.

Pitanga roxa	Compostos bioativos e atividade antioxidante
Ácido ascórbico (mg/100 mL)	$1,57 \pm 0,60$
Carotenóides (mg/100 mL)	$1,96 \pm 0,01$
Clorofila (mg/100 mL)	$0,84 \pm 0,04$
Antocianinas totais (mg/100 mL)	$24,82 \pm 0,46$
Flavonóides amarelos (mg/100 mL)	$11,33 \pm 0,66$
Polifenóis extraíveis totais (mg GAE/100 mL)	$26,85 \pm 0,30$
Atividade antioxidante (μ M Trolox/g)	$9,78 \pm 0,26$

* Valores médios \pm desvio padrão. (n = 3)

O teor médio de ácido ascórbico foi de $1,57 \pm 0,60$ mg/100 mL (TABELA 5). Estes resultados são considerados baixos, quando comparados com outros frutos tropicais como a acerola e a goiaba que possuem teor médio de 1191,90 e 175,50 mg/100 mL, respectivamente, dependendo da variedade e das condições de plantio (GODOY *et al.*, 2008; ROJAS-BARQUERA; NARVÁEZ-CUENCA, 2009).

A quantidade de ácido ascórbico observada no presente trabalho encontra-se muito abaixo do que o relatado por Mélo, Lima e Nascimento (1999) e por Oliveira *et al.* (2006) que observaram valores de ácido ascórbico na polpa de pitanga de 95 mg/100 mL e 13,42 mg/100 mL, respectivamente. Santos *et al.* (2002), estudando a variação do teor de ácido ascórbico durante o amadurecimento de pitangas roxas observou o teor de vitamina C aumentava com o amadurecimento do fruto. Os referidos autores observaram valores de ácido ascórbico de 21,85 mg/100 mL na polpa de pitanga verde e 31,85 mg/100 mL na polpa madura (pitanga roxa escura). A elevada diferença observada no teor de ácido ascórbico do presente estudo comparada com os outros autores pode ser devido ao tipo de processamento realizado, às características de plantio e cultivo dos frutos e ao método titulométrico utilizado, que mascara o ponto de viragem devido a cor roxa da pitanga. Outro fator que pode provocar alteração no teor de ácido ascórbico é a ocorrência de sua destruição pela oxidação, o que pode ter ocorrido durante o transporte dos frutos da fazenda até o laboratório de análise, pois, segundo Giannakourou e Taoukis (2003), o ácido ascórbico pode ser facilmente destruído pela oxidação, quando é exposto ao calor, alcalinidade, catalisadores metálicos, danos físicos e baixa umidade relativa.

O teor médio de carotenóides observado na polpa de pitanga roxa foi de $1,96 \pm 0,01$ mg/100 mL (TABELA 5). Este resultado é inferior aos relatos por Lima, Mélo e Lima (2002), que ao estudarem as polpas de pitanga vermelha e roxa, observaram que estas possuíam teor de carotenóides totais de 11,1 e de 10,4 mg/100 mL, respectivamente e por Jacques *et al.* (2009) que observaram teor de carotenoides na polpa de pitanga roxa de 9,06 mg/100 mL.

Alguns fatores podem contribuir para a variação quantitativa de compostos em frutas. Assim, a exposição à luz e às altas temperaturas (ZANATTA; MERCADANTE, 2007), a oxidação, a presença de enzimas, a disponibilidade de água, a presença de substâncias oxidantes e/ou pró-oxidantes (CAVALCANTE, 1991), e a forma de processamento e estocagem dos alimentos podem provocar alterações na composição dos carotenóides. Segundo Rodriguez-Amaya (1999), o tipo de congelamento e a temperatura de estocagem são cruciais para manutenção dos carotenóides, pois o congelamento rápido e a estocagem sob temperaturas de congelamentos propiciam a retenção deste composto. Lopes, Mattietto e Menezes (2005) estudando a estabilidade da polpa de pitanga congelada, observaram que o teor de carotenóides decresceu de 12,3 mg/100 mL a 10,6 mg/100 mL quando estocadas -18°C durante 90 dias de armazenamento.

De acordo Lima, Melo e Lima (2002), é possível observar diferenças no teor de carotenóides entre a película e a polpa de pitanga, e entre os diferentes estádios de maturação. Os referidos autores observaram que na película existe 75 mg/100 mL de carotenóides e na polpa de pitanga este valor é de apenas 11,1 mg/100 mL. Quanto ao estágio de maturação, os referidos autores afirmam que na polpa de pitanga madura há 11,1 mg/100 mL de carotenóides e na polpa semi-madura há 9,8 mg/100 mL.

Diversos estudos foram realizados sobre a identificação e quantificação dos carotenóides da polpa de pitanga. O trabalho de Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) citam o licopeno e a rubixantina como os principais carotenóides da polpa de pitanga proveniente do estado de São Paulo, já Cavalcante e Rodriguez-Amaya (1992) citam o licopeno e o γ -caroteno como os carotenóides majoritários na polpa de pitanga obtida do estado de Pernambuco. Bagetti *et al.* (2011), estudando a composição dos carotenóides das pitangas vermelha e laranja, observaram a presença de β -criptoxantina (16 e 34 $\mu\text{g/g}$), licopeno (166 e 151 $\mu\text{g/g}$) e β -caroteno (2,9 e 5,1 $\mu\text{g/g}$) nas polpas de pitanga vermelha e laranja, respectivamente.

O teor médio de clorofila do presente estudo foi de $0,84 \pm 0,04$ mg/100 mL (TABELA 5), evidenciando que os frutos foram colhidos no estágio maduro, já que a clorofila é o pigmento de coloração verde. De acordo Yamanishi *et al.* (2005), o teor de clorofila pode ser utilizado como indicativo do estágio de desenvolvimento do fruto. Dos Santos, Silva e Alves (2006) estudaram o teor de clorofila na polpa de pitanga nos estádios de maturação vermelho-alaranjado e vermelho predominante e relataram teores deste composto variando de 0,75 a 2,0 mg/100 mL.

A média de antocianinas totais foi de $24,82 \pm 0,46$ mg/100 mL (TABELA 5). Este resultado é semelhante aos relatados por Santos *et al.* (2002) e Lima, Mélo e Lima (2002) que observaram teores de antocianinas totais na polpa de pitanga roxa de 29,60 e 26 mg/100 mL, respectivamente. Resultados inferiores foram relatados por Lima *et al.* (2005), que estudaram a estabilidade das antocianinas da polpa de pitanga roxa e observaram valores no dia da colheita de 16,23 mg/100 mL e após 35 dias de colheita de 8,78 mg/100 mL, para extratos expostos à luz e de 10,01 mg/100 mL para extratos protegidos da luz. De acordo com Lima, Mélo e Lima (2002), o maior teor de antocianinas na pitanga roxa é encontrado na película que reveste o fruto. Os referidos autores observaram teores de 420 mg/100 mL de antocianinas na película da pitanga roxa.

O elevado teor de antocianinas no fruto pode contribuir para a preferência desse fruto pela população devido a cor atrativa proporcionada por este composto e, segundo Espín

et al. (2000) e Kalt *et al.* (2000) é indicativo de que o fruto possui elevada atividade antioxidante.

Kuskoski *et al.* (2006), trabalhando com a polpa de açaí (*Euterpe oleracea*), que é reconhecido por possuir elevado teor de antocianinas, observaram teores de antocianinas totais de 22,8 mg/100 g, o que é inferior ao observado no presente estudo, evidenciando a riqueza de antocianinas presentes na polpa de pitanga roxa. Teixeira, Stringheta e Oliveira (2008) quantificaram o teor de antocianinas de diferentes frutas e observaram valores de 21,63 mg/100 mL para o açaí e de 641,01 mg/100 mL para a jaboticaba. Outras fontes naturais de antocianinas foram relatadas por Mazza e Miniati (1993): mirtilo, framboesa, morango, groselha, uvas e vinho tinto.

O teor de flavonóides amarelos foi de $11,33 \pm 0,66$ mg/100 mL (TABELA 5). Lima, Mélo e Lima (2002) estudando a polpa de pitanga roxa observaram valores de flavonóides amarelos de 18 mg/100 mL. Segundo Malaman *et al.* (2011), a pitanga é rica em composto fenólicos e estes estão normalmente presentes na forma de ésteres, glicosídeos e muitos deles são flavonóides.

A presença dos pigmentos naturais (carotenóides, flavonóides, clorofila e antocianinas) na polpa de pitanga roxa faz deste fruto uma fonte promissora de compostos bioativos e consequentemente de atividade antioxidante (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002).

A média de polifenóis extraíveis totais foi de $26,85 \pm 0,30$ mg GAE/100 mL (TABELA 5). Bagetti *et al.* (2011) e Jacques *et al.* (2009), trabalhando com a polpa de pitanga roxa liofilizada observaram teor de polifenóis extraíveis totais de 463 mg GAE/100 mL e 420 mg GAE/100 mL (resultados expressos em matéria seca). Celli, Pereira-Netto e Beta (2011), estudando os compostos fenólicos da polpa de pitanga roxa observaram que a mesma possui 3090 mg de ácido ferrúlico/100 mL (resultados expressos em matéria seca).

Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008), avaliando os compostos fenólicos de diferentes tipos de frutos criaram uma classificação de acordo com o teor de polifenóis extraíveis totais observadas no fruto. Essa classificação separa os frutos em baixo (< 100 mg GAE/100 mL), mediano (200-500 mg GAE/100 mL) e elevado (> 1000 mg GAE/100 mL) conteúdo de compostos fenólicos quando os resultados são expressos em matéria seca. Comparando com os resultados observados por Bagetti *et al.* (2011), que observaram teores de polifenóis extraíveis totais na polpa de pitanga roxa de 463 mg GAE/100 mL, pode-se classificar a pitanga roxa como fruto com mediano conteúdo de compostos fenólicos.

A presença de elevados teores de compostos fenólicos na pitanga faz com que este fruto possua elevada atividade antioxidante. A caracterização e quantificação destes

compostos podem servir de incentivo para a utilização deste fruto como fonte de antioxidantes naturais (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011). Há trabalhos na literatura que demonstram a correlação positiva entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de frutas (ABIDILLE *et al.*, 2005; PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2007; GARMUS *et al.*, 2013). Segundo Wu *et al.* (2004), os compostos fenólicos são responsáveis por mais de 90% da capacidade antioxidante total de frutas.

A atividade antioxidante determinada pelo ensaio com o radical ABTS^{•+} apresentou valor médio de $9,78 \pm 0,26$ μM trolox/g (TABELA 5), tal resultado é superior ao observado em morango ($6,79$ μM trolox/g) e em amora preta ($8,03$ μM trolox/g) (SILVA; VENDRUSCOLO; TORALLES, 2011), porém, é considerado baixo quando comparado a outros frutos como goiaba ($44,8$ μM trolox/g) (CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2011), acerola ($96,6$ μM trolox/g) (RUFINO *et al.*, 2010) e mirtilo ($29,20$ μM trolox/g) (REQUE *et al.*, 2013).

A determinação da atividade antioxidante pelo método com o radical ABTS^{•+} foi descrita como sendo o melhor método para o óleo essencial de pitanga em comparação ao método com o ensaio DPPH[•] por Victoria *et al.* (2012), este fato é devido a atividade antioxidante deste fruto ser baseada principalmente na transferência de um elétron sendo melhor detectada pelo método ABTS^{•+}.

Na literatura, somente são observados trabalhos de determinação da polpa de pitanga pelo método com o radical DPPH[•], como o trabalho de Velásquez *et al.* (2003) que estudaram a atividade antioxidante de plantas utilizadas na medicina popular através do ensaio com o radical DPPH[•] e verificaram que as plantas *Cecropia pachystachya* Trec (umbaubeira), *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) e *Schinus terebinthifolia* Engler (pimenteira brasileira), dentre as seis estudadas, são as com maior atividade antioxidante e o trabalho de Celli, Pereira-Netto e Beta (2011) que estudou a atividade antioxidante da polpa de pitanga roxa em diferentes estádios de maturação e observaram que à medida que o fruto amadurece sua atividade antioxidante decrescia. Os referidos autores observaram valores de 74,9% na polpa de pitanga roxa colhida no estágio “verde” e de 43,5% na polpa de pitanga roxa madura.

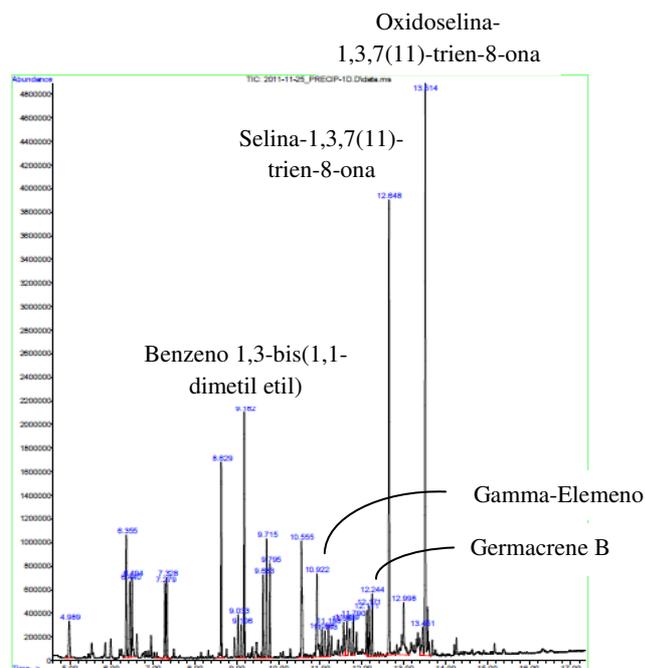
4.3 Separação, identificação e quantificação dos compostos majoritários das frações voláteis e não voláteis

Após o processo de separação da polpa de pitanga roxa em duas frações através do *SAFE*, foi observado que o rendimento de cada fração foi de $87,64 \pm 2,38$ g e $10,04 \pm 1,01$ g, para a fração onde se encontram os compostos voláteis e a fração contendo os compostos não voláteis, respectivamente, mostrando a elevada eficiência de separação da técnica empregada, visto que a soma das duas frações foi próxima a 100%. A eficiência deste tipo de processo de separação foi relatada por Ehrnhöfer-Ressler *et al.* (2013) e por Held, Schieberle e Somoza (2007), que, ao estudarem o chá de *Salvia officinalis L.* e o suco de laranja, observaram rendimento de 97,7 e 87 g na fração de compostos voláteis de 1,45 e 11 g na fração contendo os compostos não voláteis.

4.3.1 Compostos voláteis

O cromatograma de identificação dos compostos voláteis extraídos da polpa de pitanga roxa está apresentado na Figura 3.

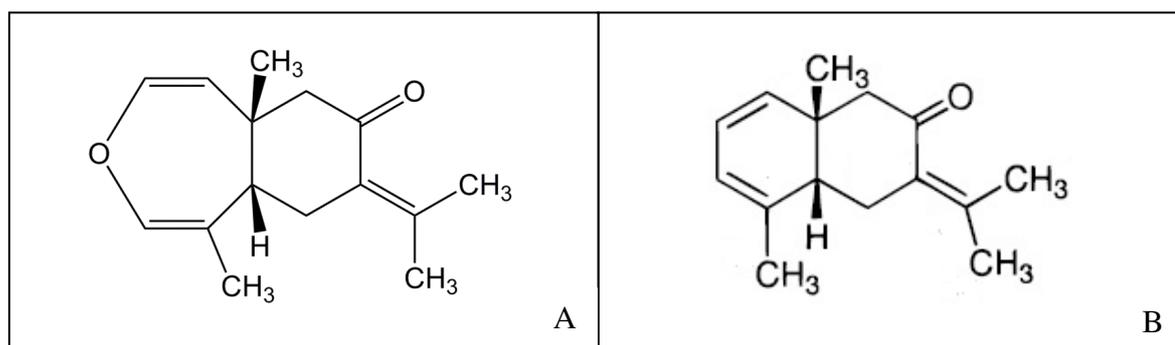
Figura 3 – Cromatograma de identificação dos compostos voláteis presentes na polpa de pitanga roxa.



Fonte: A Autora (2014).

Com essa pesquisa objetivou-se identificar os picos com maiores áreas. Através da comparação dos fragmentos de cada composto com os relatados em artigos científicos foi possível identificar que os picos majoritários são a oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (FIGURA 4A) e a selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (FIGURA 4B), com tempos de retenção de 13,5 e 12,6 minutos, respectivamente.

Figura 4 – Estrutura molecular da (A) oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da (B) selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.



Fonte: A Autora (2014).

Estes compostos já foram identificados na pitangueira. A oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona foi identificada no óleo essencial extraído das folhas da pitangueira por Ogunwande *et al.* (2005) e por Weyerstahl *et al.* (1988). A selina-1,3,7(11)-trien-8-ona foi identificada como maior componente na fração volátil do óleo essencial das folhas da pitangueira por Ogunwande *et al.* (2005), também sendo observada por Weyerstahl *et al.* (1988), Pino *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2006) nas folhas de pitangueira, na polpa de pitanga oriunda de Cuba e na polpa de pitanga oriunda do Brasil, respectivamente. Costa *et al.* (2010), estudando o óleo essencial extraído das folhas da pitangueira identificou esse composto e relatou que o mesmo possui atividade antifúngica.

A observação de compostos iguais em diferentes partes da pitangueira confirma a afirmação feita por Malaman *et al.* (2011) de que muitos dos compostos presentes nas folhas de *Eugenia uniflora* L. também estão presentes na polpa do fruto.

Outros compostos voláteis já foram identificados na polpa de pitanga, como o β -ocimeno, α -selinene, β -selinene e ácido hexadecanóico, relatados por Marin *et al.* (2008), cubebene, spatulenol, β -damascenone, 5,6,7,7 α -tetracyclo-4-4-7-trimetil-2 (4H)-benzofuranone, 2-benzotiazolinona e 10-(1-metiletênil)-(E,E)-3,7-cyclodecadien-1-ona, por Malaman *et al.* (2011) e germacreno e curzerene por Ogunwande *et al.* (2005) e no óleo

essencial extraído da folha da pitangueira, como o trans- β -ocimeno, cis-ocimeno e β -pineno, por Oliveira *et al.* (2006) e furanodieno e seu produto de rearranjo furanoelemeno (ou curzereno), β -elemeno e α -cadinol, por Melo *et al.* (2007).

A variação nos compostos voláteis identificados por diversos autores em um mesmo produto pode ser devido às diferenças no processamento, do método de extração e de identificação empregados (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003). Frutos de uma mesma espécie e cultivados na mesma região podem apresentar grandes variações em sua composição de voláteis. Outras fontes que afetam a composição dos voláteis são: fatores ambientais, variedade e grau de maturação do fruto e condições de armazenamento. Margis *et al.* (2002) afirmam que os compostos voláteis presentes em frutos pode variar, também, devido a quimiotipos, origem geográfica e sazonalidade.

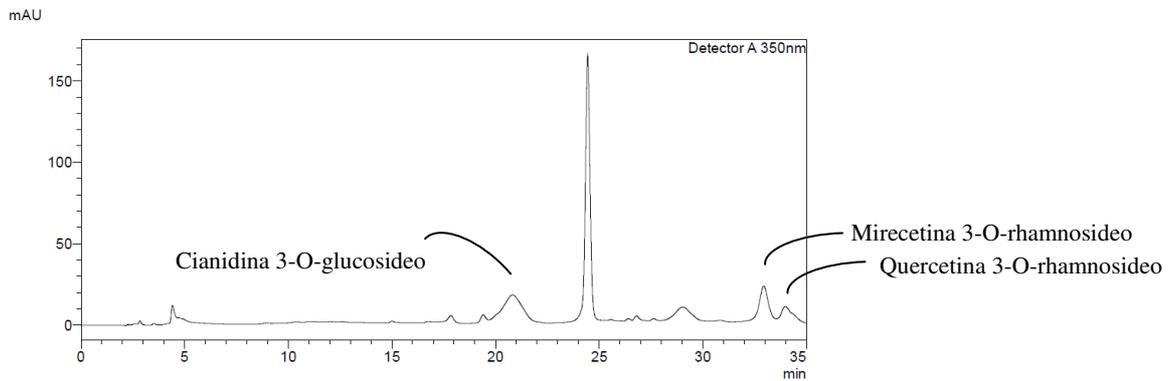
A quantificação do composto majoritário da fração volátil foi realizada após o isolamento deste composto por UHPLC conforme descrito anteriormente. Diversos picos foram coletados e em seguida, injetados no cromatógrafo gasoso para posterior identificação dos mesmos. A confirmação da identidade foi realizada por ressonância nuclear magnética e os dados obtidos são apresentados no Apêndice A.

O valor médio de oxidoselina-1,3,7(11)-trieno-8-ona na polpa de pitanga roxa foi de $85 \pm 4,01 \mu\text{g/mL}$ de pitanga roxa. Não foram observados trabalhos na literatura sobre a quantificação dos componentes da fração volátil da pitanga. Os resultados apresentados por outros autores somente identificam os compostos e observam o percentual da área do pico do composto no fruto. Até onde o autor conhece, esta pesquisa foi a primeira a quantificar a oxidoselina-1, 3,7 (11)-trieno-8-ona em pitanga.

4.3.2 Compostos não voláteis

O cromatograma de identificação dos compostos não voláteis da polpa de pitanga roxa está apresentado na Figura 5.

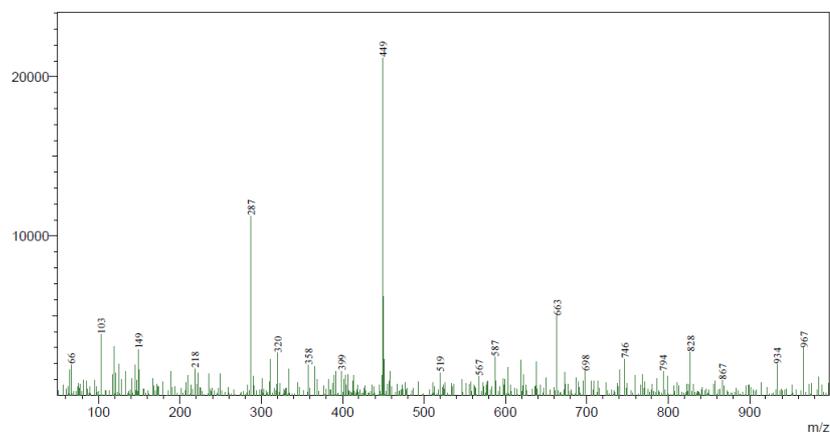
Figura 5 – Cromatograma de identificação dos flavonóides na polpa de pitanga roxa.



Fonte: A Autora (2014).

Baseado nos fragmentos observados e comparando com os dados de m/z de Celli, Pereira-Netto e Beta (2011) foi possível identificar a cianidina-3-glicosídeo como composto majoritário presente na fração não volátil da polpa de pitanga roxa (FIGURA 6).

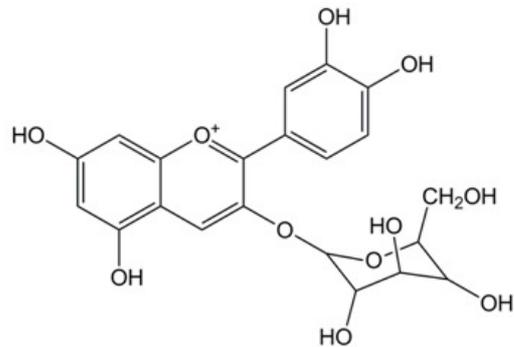
Figura 6 – Fragmentação da cianidina-3-glicosídeo.



Fonte: A Autora (2014).

A cianidina-3-glicosídeo (FIGURA 7) pertence à classe das antocianinas que são pigmentos responsáveis pela maioria das colorações azul, violeta e vermelho, sendo largamente distribuídos na natureza em flores, frutos e algumas folhas, caules e raízes de plantas (VINSON *et al.*, 1999). As antocianinas são reconhecidas por sua capacidade de captar radicais livres (atividade antioxidante) e efeito protetor contra doenças cardiovasculares, circulatórias (STOCLET *et al.*, 2004), diabetes, mal de Alzheimer (ABDILLE *et al.*, 2005) e possui efeito anti-câncer (KATSUBE *et al.*, 2003).

Figura 7 – Estrutura molecular da cianidina-3-glicosídeo.



Fonte: A Autora (2014).

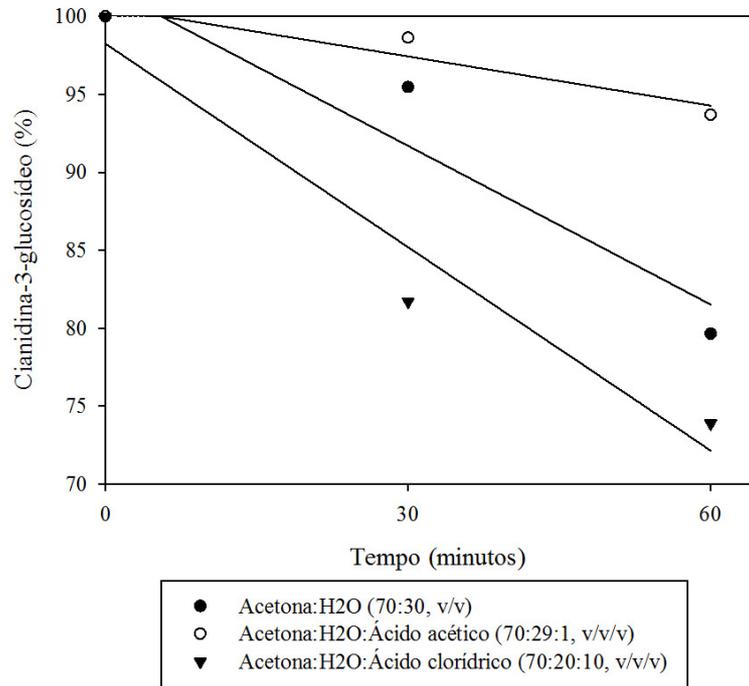
A presença de cianidina-3-glicosídeo já foi relatada em diferentes tipos de frutos como groselha (SÓJKA *et al.*, 2009), morango (AABY; EKEBERG; SKREDE, 2007), mirtilo (blueberry) (PRIOR *et al.* 2001) e acerola (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Para a quantificação da cianidina-3-glicosídeo foram realizados uma série de testes, visando obter uma extração eficiente deste composto, utilizando diferentes concentrações de solventes e métodos de extração.

Os solventes foram testados nas seguintes concentrações: acetona:água (70:30, v/v), acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v) e acetona:água:ácido clorídrico (70:20:10, v/v/v). Adicionou-se cianidina-3-glicosídeo pura na concentração de 0,04 mg/mL, diluiu-se em cada um dos três solventes separadamente e em seguida foi realizada a filtração (filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 μm e diâmetro nominal de 13 mm, Rotilabo®, Germany) e a injeção destas amostras foi realizada no LC-MS nas mesmas condições descritas anteriormente. Levando em consideração o possível tempo de espera entre preparação da amostra e injeção da mesma no cromatógrafo, as amostras foram injetadas com 0, 30 e 60 minutos após a diluição em cada uma das três soluções. O tempo de 0 minuto correspondeu a 100% de cianidina-3-glicosídeo e com base neste valor, observou-se a ocorrência de perda da cianidina-3-glicosídeo após 30 e 60 minutos da diluição nos diferentes solventes.

Aos 30 e 60 minutos após a diluição da cianidina-3-glicosídeo em acetona:água:ácido clorídrico (70:20:10, v/v/v), aproximadamente 18 e 26%, respectivamente, da cianidina-3-glicosídeo já havia sido degradada, enquanto que com solução acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v) apenas 2 e 6% de degradação foi observada, respectivamente (FIGURA 8).

Figura 8 – Estabilidade da cianidina-3-glicosídeo em diferentes soluções durante 60 minutos.



Fonte: A Autora (2014).

De posse destes resultados, optou-se por realizar a extração da cianidina-3-glicosídeo usando a solução de acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v).

Os testes seguintes foram realizados para determinar a ocorrência de perdas da cianidina-3-glicosídeo em diferentes métodos de extração utilizando como solvente acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v). Os métodos de extração empregados são descritos na Tabela 6. O solvente e as condições de sonificação e centrifugação foram às mesmas descritas por Celli, Pereira-Netto e Beta (2011).

As quatro amostras, após o processo de extração, foram filtradas (filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 μm e diâmetro nominal de 13 mm, Rotilabo®, Germany) e injetadas no LC-MS nas mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados da injeção das quatro amostras foram comparados com a cianidina-3-glicosídeo diluída em acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v), na mesma concentração (0,04 mg/mL) das três amostras analisadas, porém sem passar pelas etapas de sonificação, centrifugação ou refrigeração.

Tabela 6 – Formas de extração da cianidina-3-glicosídeo empregadas para obtenção de uma extração mais eficiente.

Preparação da C3G	Solvente	Extração
<i>SAFE</i>	acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v)	Sonificação (1 h/ 25°C) seguida de centrifugação (25 minutos/ 20°C/ 4500 x g)
Liofilização	acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v)	Sonificação (1 h/ 25°C) seguida de centrifugação (25 minutos/ 20°C/ 4500 x g)
-	acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v)	Sonificação (1 h/ 25°C) seguida de centrifugação (25 minutos/ 20°C/ 4500 x g)
-	acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v)	Refrigeração (8°C) por uma hora

Após a injeção, foi possível observar que nas amostras de cianidina-3-glicosídeo que passaram pelo *SAFE* e pela liofilização, e na cianidina-3-glicosídeo que foi extraída utilizando a sonificação e centrifugação, as perdas deste composto foram de 36, 38 e 22%, respectivamente, podendo estas perdas ser atribuídas principalmente às etapas de sonificação e centrifugação, o que pode ter ocorrido devido aos elevados tempos utilizados nas duas etapas. Já na amostra da cianidina-3-glicosídeo submetida à 1 hora de refrigeração (8°C) a perda deste composto foi de 8%.

O teste realizado diretamente na polpa de pitanga roxa, utilizando acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v), homogeneização por 2 minutos e centrifugação (4500 x g/4°C/1 min) mostrou-se o mais eficiente. Na primeira extração foi possível detectar 92% do conteúdo total da cianidina-3-glicosídeo e na segunda extração 7%. Nas outras 3 extrações realizadas no precipitado obtido da primeira extração foi observado o 1% restante. De posse desses resultados, optou-se por realizar duas extrações utilizando as mesmas condições descritas neste último teste para a quantificação da cianidina-3-glicosídeo na polpa de pitanga roxa.

Após os testes descritos acima foi realizado o teste com a própria polpa da pitanga roxa. Utilizaram-se 5 g da polpa de pitanga roxa, adicionaram-se 10 mL da solução acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v), homogeneizou-se em agitador de tubos por 2 minutos e centrifugou-se (4500 x g/4°C/1 min). O sobrenadante foi filtrado (filtro de seringa

PVDF com poro de 0,45 μm e diâmetro nominal de 13 mm, Rotilabo®, Germany) e injetado no cromatógrafo líquido. No precipitado foi repetida a extração mais quatro vezes. Como resultado, observou-se que a cianidina-3-glicosídeo somente pode ser observada até a segunda extração.

Ao final dos testes, optou-se por realizar a extração com acetona:água:ácido acético (70:29:1, v/v/v), homogeneização em agitador de tubos por 2 minutos, seguido de centrifugação por 1 minuto ($4500 \times g/4^\circ\text{C}$), filtração (filtro de seringa PVDF com poro de 0,45 μm e diâmetro nominal de 13 mm, Rotilabo®, Germany) e injeção.

A determinação do conteúdo de cianidina-3-glicosídeo na polpa de pitanga roxa mostrou um teor de $340 \pm 4,19 \mu\text{g/mL}$ de polpa. Celli, Pereira-Netto e Beta (2011), estudando os flavonóides presentes na polpa de pitanga roxa observaram que a mesma contém 1689,67 $\mu\text{g/g}$ (resultados expressos em matéria seca). Se utilizarmos o valor médio de umidade em polpa de pitanga roxa (81,2%) relatado por Bagueti (2009), e aplicarmos nos dados de Celli, Pereira-Netto e Beta (2011), pode-se estimar que a polpa de pitanga roxa em questão tem aproximadamente 318 μg cianidina-3-glicosídeo/mL de polpa.

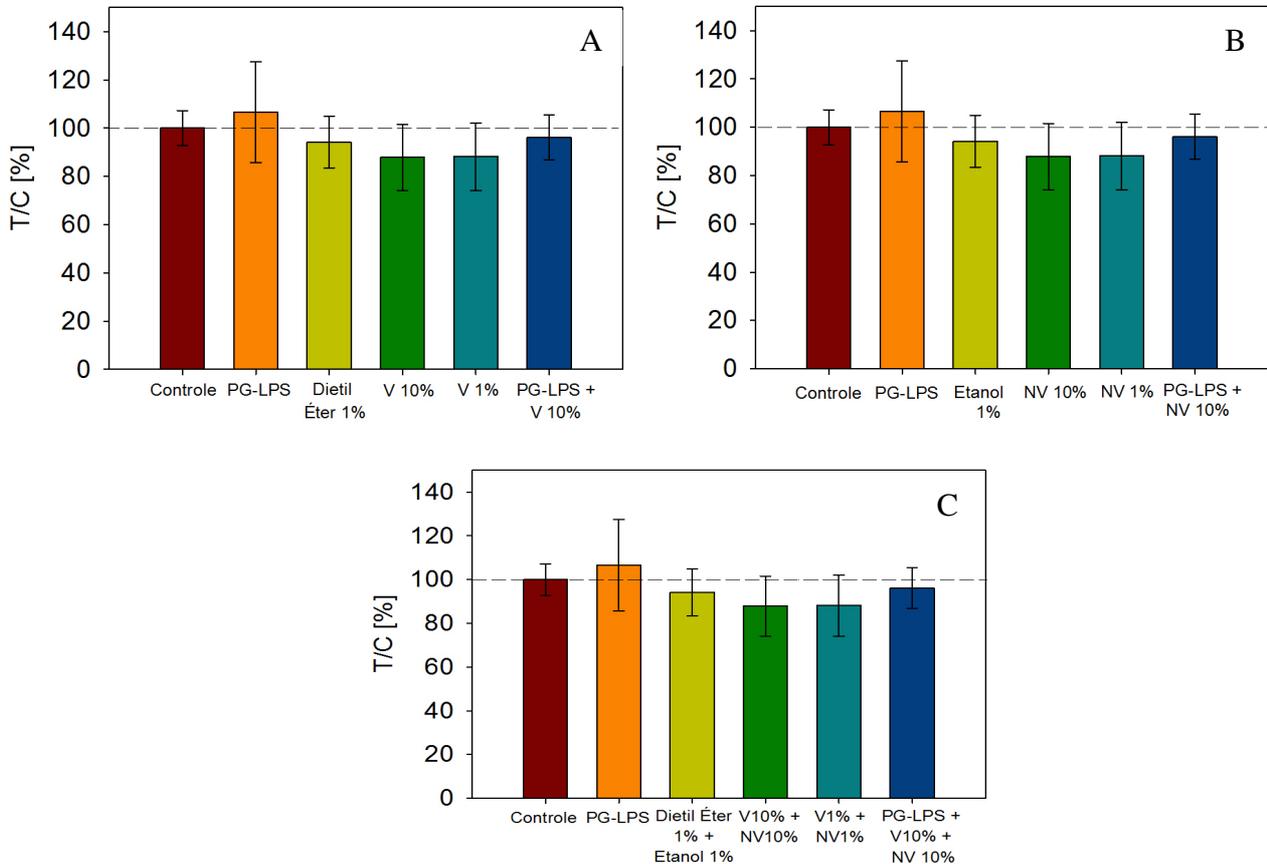
Jacques *et al.* (2009) determinaram o teor de antocianinas por método espectrofotométrico na polpa de pitanga e observaram teor de 1387 μg cianidina-3-glicosídeo/mL, resultados expressos em matéria fresca. A diferença observada pode ser devido à metodologia empregada na extração e quantificação e nas diferenças inerentes do próprio fruto.

4.4 Experimento com células HGF-1

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade das frações voláteis e não voláteis da polpa de pitanga roxa em células HGF-1

A exposição das diferentes frações extraídas da polpa de pitanga roxa em células HGF-1 por 6 horas não apresentou efeito tóxico a essas células nas concentrações estudadas, mostrando que a polpa de pitanga roxa não apresenta compostos nocivos às células. O mesmo foi observado na exposição do dietil éter 1%, etanol 1% e lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* quando comparadas com a solução controle (FIGURA 9).

Figura 9 – Avaliação da citotoxicidade da fração volátil (V) (9A), não volátil (NV) (9B) e da combinação das frações (V + NV) (9C) extraídas da polpa de pitanga roxa.



* Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 3.

E dessa forma, os demais experimentos podem ser continuados, pois estes resultados asseguram que se adicionarmos a polpa de pitanga em suas diferentes frações ou qualquer composto nela presente neste tipo de célula não irá haver morte celular.

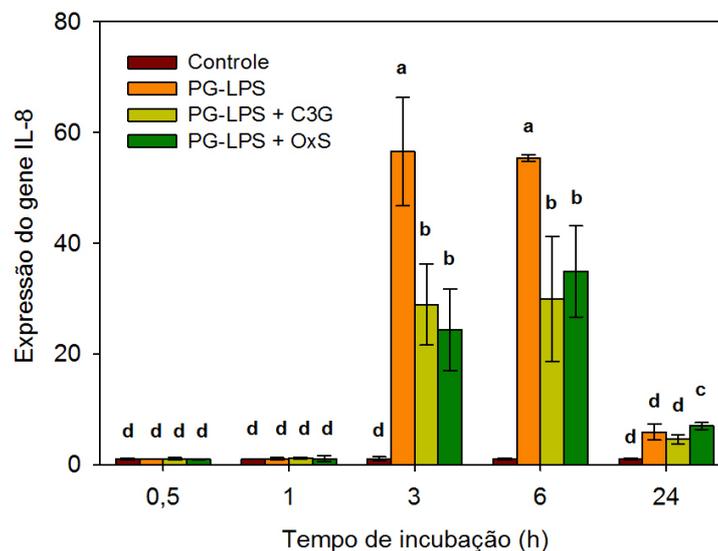
O efeito citotóxico de extratos preparados com as folhas da pitangueira em diferentes tipos celulares é observado na literatura. Ogunwande *et al.* (2005), relatam que o óleo essencial extraído das folhas e da polpa de pitanga apresentam excelente efeito citotóxico para as linhas celulares de tumores humanos de PC-3 e Hep G2 e inibe completamente o crescimento de HS 578T (células do câncer de mama). Holetz *et al.* (2002), observaram que o extrato etanólico das folhas da pitangueira possuem ação tóxica moderada em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em estudo com camundongos, Schmeda-Hirschmann *et al.* (1987), trabalhando com folhas de pitangueira, não verificaram toxicidade em doses de até 4,2 g do extrato hidroalcoólico por kg de peso administrado por via oral. A dose letal (DL50), por via

intraperitoneal, obtida pelos autores, foi de 220 mg/kg. Níveis mais elevados foram estudados por Auricchio *et al.* (2007) aplicando o extrato hidroalcoólico da pitanga na concentração de 3,0 g/kg e 3,6 g/kg em camundongos. Os referidos autores observaram que, nessas doses, os animais se mantiveram ativos, normais no comportamento e reação a estímulos indicando ausência de sinais de toxicidade nas doses testadas. Não há relatos na literatura sobre o efeito citotóxico polpa de pitanga em células HGF-1.

4.4.2 Estudo da expressão do gene em diferentes tempos de incubação de células HGF-1 exposta aos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil

Os resultados do estudo da expressão do gene após a exposição aos compostos majoritários presentes na polpa de pitanga roxa em diferentes tempos de incubação são apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Expressão do gene da IL-8 por células HGF-1 expostas por 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) (30 $\mu\text{g/mL}$) e cianidiana 3-glicosídeo (C3G) (119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados de PG-LPS (10 ng/mL).



* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Incubação a 37°C e CO₂ a 5%; n = 3.

A presença da PG-LPS não provocou influência na expressão do mRNA de IL-8 após a incubação de 0,5 e 1 hora. Já na incubação por 3, 6 e 24 horas a presença de PG-LPS

(10 ng/mL) estimulou a expressão de mRNA do gene quando comparação com o controle, o que já era esperado, visto que, de acordo com o estudo sobre a resposta pró-inflamatória das células HGF-1 por lipopolissacarídeos, a expressão do mRNA é aumentada depois de 3 e 6 horas de estimulação PG-LPS, o que sugere que a liberação de IL-8 deverá ser medido após estimulação durante mais de 3 horas (TAKADA *et al.*, 1991). Os resultados da expressão genética também suportam os resultados anteriores que mostram que a liberação de IL-8 na presença de PG-LPS (10 µg/mL) aumenta ao longo do tempo e que, depois de 6 horas a máxima estimulação de HGF-1 é atingida (WALKER *et al.*, 2013). Além disso, neste mesmo estudo, demonstrou-se que tanto a liberação de IL-6 e de IL-8 por HGF-1 é estimulada pela PG-LPS, com uma estimulação mais pronunciada da liberação de IL-8. Assim, no estudo aqui apresentado, centrou-se na liberação de IL-8, que foi aumentada após 6 horas de estimulação com 10 ng/mL de PG-LPS (FIGURA 10).

Ambos os compostos testados inibiram a expressão do gene estimulada por PG-LPS após 3 e 6 horas, exibindo um efeito antiinflamatório nas células HGF-1. Não houve diferença entre a eficiência da cianidina-3-glicosídeo e da oxidoselina-1,3,7(11)-trieno-8-ona em inibir a expressão do gene da IL-8 nas concentrações observadas no suco tropical de pitanga roxa adoçado (FIGURA 10).

4.4.3 Quantificação da liberação da interleucina IL-8 por células HGF-1 após a exposição aos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil

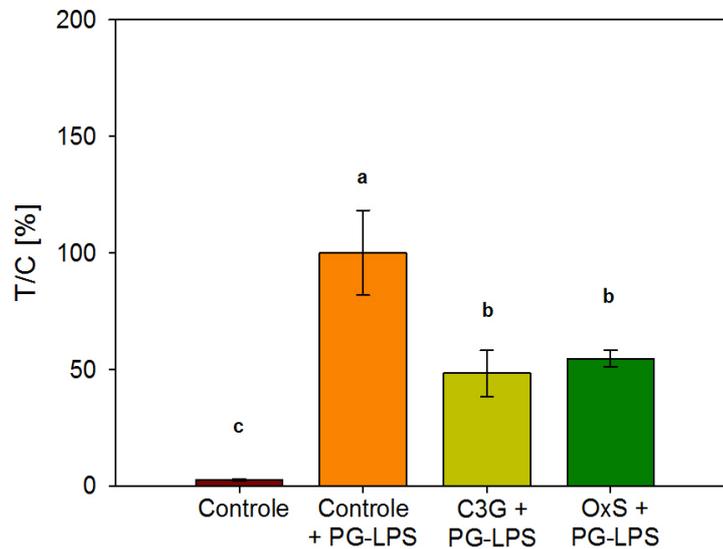
Com a exposição da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e da cianidina-3-glicosídeo, ambas na presença de PG-LPS (10 ng/mL), em células HGF-1 foi possível observar que estes dois compostos provocaram um decréscimo no valor T/C [%] (células tratadas/controle) quando comparado ao resultado das células tratadas com Controle + PG-LPS (FIGURA 11), provando o que já tinha sido observado na expressão do gene da IL-8 por células HGF-1, onde observou-se que a adição desses compostos causa um decréscimo na expressão de IL-8 quando comparação com o controle.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que a oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e a cianidina-3-glicosídeo possuem ação antiinflamatória.

A cianidina, além de ser um potente antioxidante possui atividade antiinflamatória *in vivo* (TSUDA *et al.*, 1999). Sua atividade antiinflamatória foi comprovada pelo estudo de Tsuda, Horio e Osawa (2002), que observaram que a administração da cianidina-3-glicosídeo suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias no processo de inflamação aguda em ratos.

Em macrófagos humanos, um pré-tratamento de 2 horas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de cianidina-3-glicosídeo inibiu a liberação de IL-6 após 24 horas de incubação (DESJARDINS *et al.*, 2012). Além disso, cianidina-3-glicosídeo administrada a rato exibe um efeito antiinflamatório *in vivo*, reduzindo a atividade induzida pela carragenina de ciclooxigenase-2 e a liberação de prostaglandina E2 (HASSIMOTTO *et al.*, 2013). Até onde o autor conhece, não há trabalhos na literatura sobre o efeito anti ou pró-inflamatório da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

Figura 11 – Liberação da IL-8 por células HGF-1 expostas à oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) (30 $\mu\text{g/mL}$) e cianidiana 3-glicosídeo (C3G) (119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados de PG-LPS (10 ng/mL).



* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 3.

Estudos avaliando a liberação de interleucinas pró-inflamatórias são observados na literatura. Ehrnhöfer-Ressler *et al.* (2013), em seu estudo sobre o efeito antiinflamatório dos compostos voláteis presentes no chá de *Salvia officinalis* L. (1,8-cineol, borneol, cânfora, e α -/ β -thujone) em células HGF-1, observaram que estes compostos provocam uma redução da interleucina pró-inflamatória IL-6, possuindo, então, atividade antiinflamatória. Yee *et al.* (2012), estudando o efeito de *Porphyromonas gingivalis* em células THP-1, observaram que esta bactéria estimula a liberação da forma ativa de IL-18, contribuindo para progressão da periodontite. Held, Schieberle e Somoza (2007), estudando a exposição do suco de laranja e de suas frações volátil e não volátil em células do carcinoma bucal (KB), observaram que

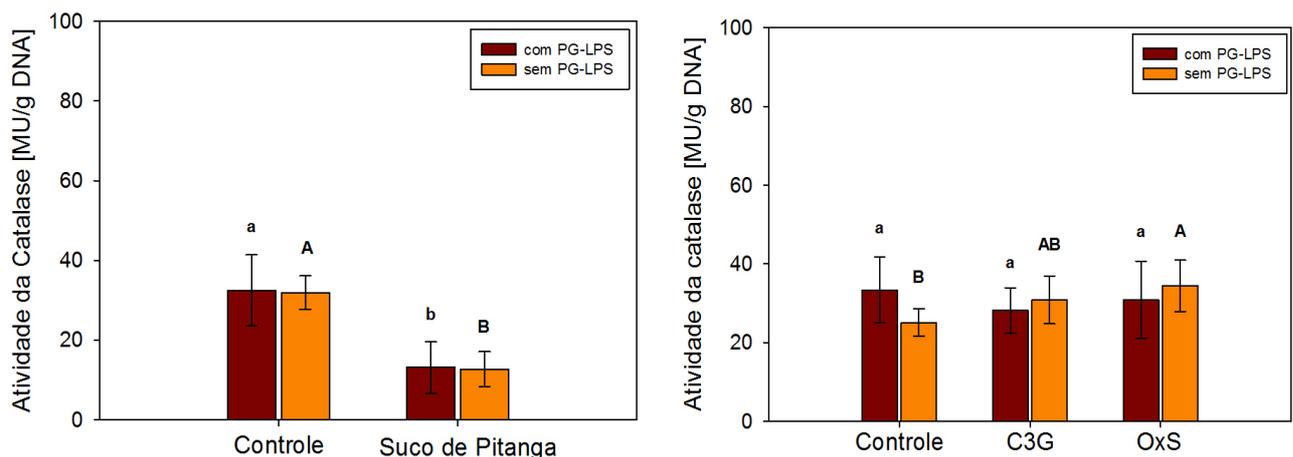
tanto a exposição do suco de laranja, como das frações isoladas deste suco, provocam um aumento da liberação da interleucina pró-inflamatória IL-6.

4.5 Experimento com o suco tropical de pitanga roxa adoçado

4.5.1 Atividade da catalase em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil

No presente estudo foi possível observar que o suco tropical de pitanga roxa adoçado provocou um decréscimo na atividade da catalase apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) da amostra controle (FIGURA 12). O decréscimo na atividade desta enzima pode ser explicado pelo baixo pH do suco tropical de pitanga roxa adoçado, pois, segundo Guwy *et al.* (1999), a atividade desta enzima decresce em pH inferior a 3,5.

Figura 12 – Atividade da catalase em células bucais humana após à exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 $\mu\text{g/mL}$) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL).



* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Letras minúsculas – análise estatística do experimento realizado na presença de PG-LPS;

Letras maiúsculas - análise estatística do experimento realizado na ausência de PG-LPS.

*** Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 6 voluntários.

A oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona provocou um ligeiro aumento na atividade da catalase quando incubada na ausência de PG-LPS, já a cianidina-3-glicosídeo não provocou efeito na atividade da catalase. O aumento ou a manutenção da atividade desta enzima é importante, visto que se trata de uma enzima antioxidante essencial (PIRES *et al.*, 2012) que é responsável pela remoção do excesso de espécies reativas de oxigênio (MITTLER, 2002). As espécies reativas de oxigênio podem ser tóxicas para as células e podem provocar danos celulares, desencadeando uma série de doenças (STEPNIEWSKA; WOLINKA; ZIOMEK, 2009).

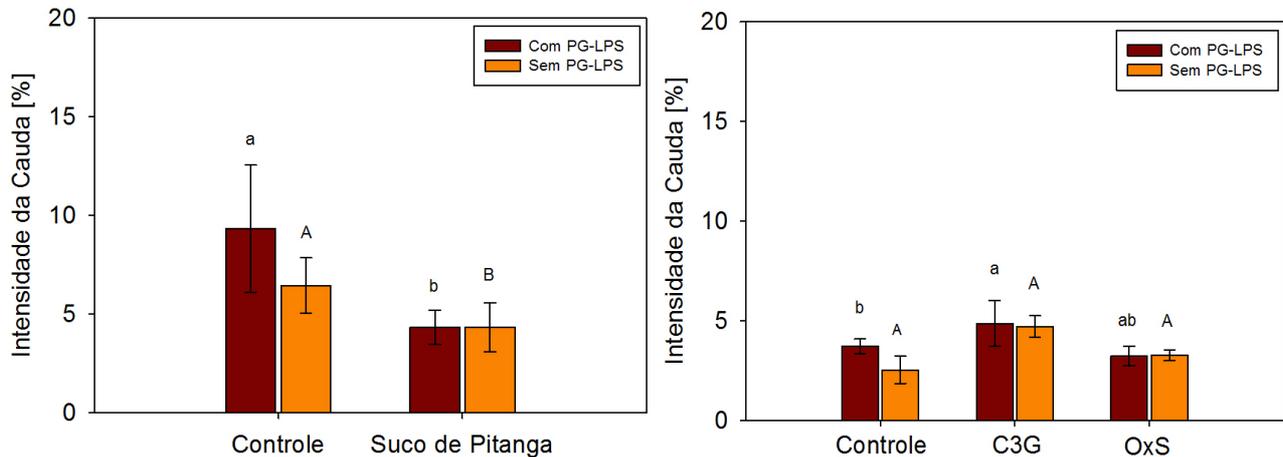
De uma maneira geral, oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e cianidina-3-glicosídeo não interferiram na atividade da catalase. Tedesco *et al.* (2001), estudando o efeito das antocianinas presentes do vinho (malvidina 3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, peonidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo) na atividade da catalase, observaram que estes compostos não interferem na atividade desta enzima.

4.5.2 Dano do DNA em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil

Baseado nos conhecimentos de que a intensidade da cauda no ensaio do cometa reflete na quantidade de danos no DNA, é possível concluir que o suco tropical de pitanga roxa adoçado provoca uma redução no dano no DNA (FIGURA 13).

Semelhante ao que foi observado no suco tropical de pitanga roxa adoçado, Szeto *et al.* (2005) relatam que a exposição de células bucais humanas ao chá verde rico em antioxidantes leva à uma diminuição aguda do dano do DNA. Os referidos autores também estudaram o efeito da ingestão de alimentos ricos em carotenoides nas células bucais por 28 dias e observaram uma redução no dano do DNA. Desta forma, pode-se concluir que alimentos que apresentam compostos antioxidantes em sua constituição possuem o efeito de reduzir o dano do DNA.

Figura 13 – Dano no DNA em células bucais humana provocado pela exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidoseлина-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 $\mu\text{g/mL}$) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL).



* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Letras minúsculas – análise estatística do experimento realizado na presença de PG-LPS; Letras maiúsculas - análise estatística do experimento realizado na ausência de PG-LPS.

*** Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 6 voluntários.

Jensen *et al.* (2008) avaliando o dano oxidativo *in vitro* provocado pela exposição de um suco misto preparado com açaí, uva, pêra, acerola, aronia, uva roxa, cramberry, ameixa, kiwi, maracujá, mirtilo, romã, lichia, camu camu, banana e mirtilo observaram que este suco diminui o dano oxidativo intracelular. Os referidos autores associaram este efeito aos antioxidantes presentes no suco.

O mesmo não foi observado após a exposição das células à cianidina-3-glicosídeo na concentração estudada, já que um pequeno aumento na intensidade da cauda foi observado, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas somente com o controle. Devido a este comportamento observado, é possível afirmar que a cianidina-3-glicosídeo na concentração de 119 $\mu\text{g/mL}$ provoca um aumento não possui a capacidade de reduzir o dano do DNA, não apresentando, assim, atividade antioxidante *ex vivo*.

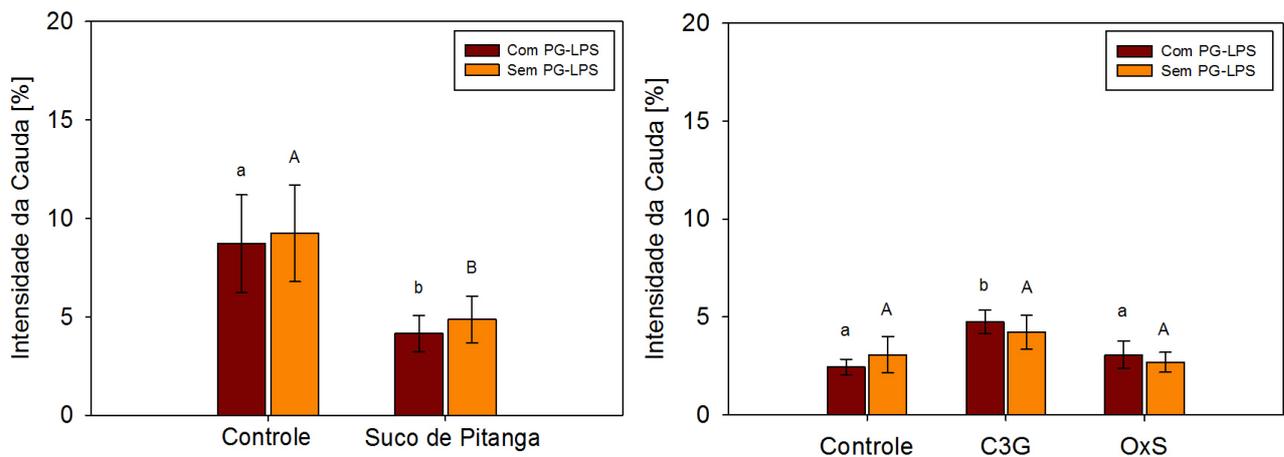
A oxidoseлина-1,3,7(11)-trien-8-ona não provocou efeito na intensidade da cauda na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Devido o aumento da intensidade da cauda causada pela exposição à cianidina-3-glicosídeo e o não efeito observado após a exposição das células à oxidoseлина-1,3,7(11)-

trien-8-ona, é possível concluir que estes dois compostos, nas concentrações estudadas, não são os responsáveis pela redução no dano do DNA provocado pela exposição das células bucais ao suco tropical de pitanga roxa adoçado. Tais compostos podem atuar em sinergia com outros compostos possuindo efeito antioxidante, porém quando avaliados individualmente não apresentam tal efeito.

A Figura 14 mostra os resultados do dano do DNA em células bucais humanas expostas ao suco de pitanga, nas amostras onde foi realizada a adição da enzima formamido pirimidina glicosilase (fpg) que reconhece purinas oxidadas no DNA.

Figura 14 – Dano no DNA em células bucais humana provocado pela exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados da fração volátil (oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 $\mu\text{g/mL}$) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL), na presença da enzima fpg.



* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Letras minúsculas – análise estatística do experimento realizado na presença de PG-LPS; Letras maiúsculas - análise estatística do experimento realizado na ausência de PG-LPS.

*** Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 6 voluntários.

Comparando os resultados do dano do DNA sem a adição de fpg (FIGURA 13) com os resultados onde foi adicionada esta enzima (FIGURA 14), observa-se que esta enzima não provocou alteração no dano do DNA, sugerindo que não há a ocorrência de processos oxidativos durante exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos

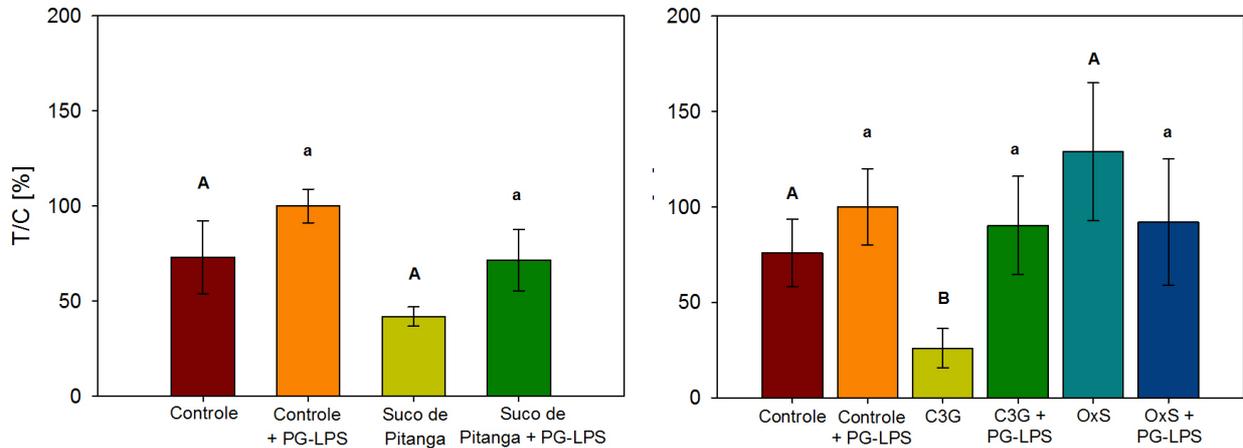
majoritários isolados da fração volátil e não volátil da polpa de pitanga roxa em células bucais humanas.

4.5.3 Determinação da liberação da IL-8 em células bucais humanas após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritários isolados das frações volátil e não volátil

Analisando a liberação da IL-8 após a exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado em células bucais humanas não foi possível observar diferença significativa ($p > 0,05$) entre as células expostas ao suco tropical de pitanga roxa adoçado e as células expostas ao controle (água + açúcar) (FIGURA 15). A semelhança entre os resultados dessas amostras pode ser devido ao baixo número de voluntários e a elevada diferença entre as células de cada voluntário, o que gerou um elevado desvio padrão. Tal afirmação já foi reportada por Szeto *et al.* (2005), que, ao estudarem o efeito da ingestão de alimentos ricos em carotenoides nas células bucais em sete voluntários por 28 dias, observaram elevadas variações nas células intra-individuais e nos diferentes dias de coleta.

Assim, com o estudo *ex vivo* realizado com seis voluntários não foi possível confirmar os resultados do estudo *in vitro* (estudo com células do HGF-1). Isto pode ser devido a diferenças nos métodos, onde na experiência *ex vivo*, as células foram expostas aos compostos durante 10 minutos, seguido por incubação durante 6 horas, e no ensaio *in vitro*, o tempo de exposição da célula para o compostos foi de 6 horas. Outros estudos têm demonstrado que um pré-tratamento dos fibroblastos gengivais humanos e com células bucais humanos com cianidina-3-glicosídeo inibe a liberação de marcadores pró-inflamatórias (ZDARILOVÁ *et al.*, 2010; DESJARDINS *et al.*, 2012). No presente estudo, a escolha do estimulante e a possibilidade de uma coerente estimulação repetida com o PG-LPS, ou o curto tempo de pré-tratamento podem ser os responsáveis pela falta de eficácia da cianidina-3-glicosídeo.

Figura 15 – Liberação da IL-8 por células bucais humana após exposição do suco tropical de pitanga roxa adoçado e dos compostos majoritário isolados da fração volátil (oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OxS) - 30 $\mu\text{g/mL}$) e não volátil (cianidiana 3-glicosídeo (C3G) - 119 $\mu\text{g/mL}$), adicionados ou não de PG-LPS (10 ng/mL).



* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Letras minúsculas – análise estatística do experimento realizado na presença de PG-LPS;

Letras maiúsculas - análise estatística do experimento realizado na ausência de PG-LPS.

** Incubação a 37°C e CO₂ a 5% por 6 horas; n = 6 voluntários.

Schapoval *et al.* (1994), estudando diferentes extratos preparados com a folha de pitangueira, relataram o efeito antiinflamatório destas folhas em ratos.

No presente estudo, resultado semelhante ao observado para o suco tropical de pitanga roxa adoçado foi observado no experimento com os compostos individuais da polpa de pitanga roxa.

Cianidina-3-glicosídeo, na ausência de PG-LPS, apresentou efeito antiinflamatório. Esse resultado já era esperado, porém, como na presença de PG-LPS este composto não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle, e conclui-se que tais resultados, em células bucais humanas, são inconclusivos devido ao elevado desvio padrão que foi causado pelo baixo número de voluntários. Este composto já foi descrito na literatura por ter efeito antiinflamatório (SUNG-WON; SU-NOH; DONG-HYUN, 2010).

Diversos estudos avaliam o efeito da exposição de compostos, utilizando experimentos *in vivo* e *ex vivo* na liberação de interleucinas pró-inflamatórias. Fischäder *et al.* (2008) estudaram o efeito de compostos orgânicos voláteis (clorobenzeno, estireno e xileno) em células epiteliais de pulmão (A549) e observaram que estes compostos provocam o

aumento da liberação de IL-8, sendo, portanto, considerados compostos com efeito pró-inflamatório. Gonzalez-Quintela *et al.* (2007), estudaram o nível sérico de IL-8 em pacientes submetidos a diferentes níveis de consumo de álcool, observando que os níveis de IL-8 é dependente da dose de álcool, sendo mais elevado em pessoas que ingerem maior quantidade de álcool. Os autores observaram também que as mulheres são mais propensas que os homens.

5. CONCLUSÕES

A polpa de pitanga roxa apresentou resultados de sólidos solúveis, pH, acidez titulável e açúcares totais dentro dos padrões exigidos pela Legislação Brasileira vigente. A referida polpa apresentou, ainda, elevados teores dos compostos bioativos: antocianinas, flavonóides amarelos e polifenóis extraíveis totais, fazendo deste fruto uma boa fonte de antioxidantes naturais.

A oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e a cianidina-3-glicosídeo foram identificadas como compostos majoritários das frações volátil e não volátil da polpa de pitanga roxa, respectivamente. Observa-se que a polpa de pitanga roxa apresenta teor de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona de $85 \pm 4,01$ $\mu\text{g/mL}$ de polpa de pitanga roxa. Quanto ao composto majoritário da fração não volátil, foi observado um teor de cianidina-3-glicosídeo de $340 \pm 4,19$ $\mu\text{g/mL}$ de polpa de pitanga roxa.

É válido ressaltar a importância deste estudo uma vez que a quantificação da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona foi realizada pela primeira vez em um estudo científico.

No experimento com células HGF-1 é possível observar que as duas frações isoladas da polpa de pitanga roxa, quando analisadas separadamente e em combinação das duas, não apresentam efeito tóxico nas células em estudo quando expostas a estas frações durante 6 horas de incubação.

O estudo da expressão do gene de IL-8 mostra uma maior expressão após 6 horas de incubação, sendo, portanto, o tempo de maior liberação da IL-8 por células HGF-1.

Oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e cianidina-3-glicosídeo apresentam efeito antiinflamatório, por inibirem a liberação da IL-8 por células HGF-1.

O baixo pH do suco tropical de pitanga roxa adoçado provocou um decréscimo na atividade da catalase. De uma maneira geral, a oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona e a cianidina-3-glicosídeo não interferem na atividade da catalase e não são capazes de inibir a atividade desta enzima.

O suco tropical de pitanga roxa adoçado provoca um decréscimo no dano do DNA, provando possuir atividade antioxidante *ex vivo*. O mesmo não foi observado após a exposição das células à cianidina-3-glicosídeo e oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona nas concentrações estudadas. A redução no dano do DNA provocada pelo suco tropical de pitanga roxa adoçado não foi devido a presença de cianidina-3-glicosídeo e oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona nas concentrações estudadas.

Faz-se necessário um estudo com maior número de voluntários para se ter uma maior homogeneidade dos resultados com o intuito de verificar os bons resultados observados *in vitro* (experimento com HGF-1 células) em análises *ex vivo* (experimento com células bucais humanas).

REFERÊNCIAS

- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4395–4406, 2007.
- ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- ADEBAJO, A. C.; OLOKI, K. J.; ALADESANMI, A. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. **Journal of Phytotherapy Resource**, v. 3, n. 6, p. 258-259, 1989.
- AL-FARSI, M.; LEE C. Y. Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 977- 985, 2008.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 267, de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e2ad670047457e3d8a4ade3fbc4c6735/RDC_267_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 06 de mar. 2013.
- ARA, T.; KURATA, K.; HIRAI, K.; UCHIHASHI, T.; UEMATSU, T.; IMAMURA, Y.; FURUSAWA, K.; KURIHARA, S.; WANG, P. L. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 1, p. 21-27, 2009.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Antimicrobial and antioxidant activities and toxicity of *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2007.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC–MS, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 385–396, 2004.
- BAGETTI, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009.

- BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C. N.; VIZZOTTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 147-154, 2011.
- BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZZOTTTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2504-2510, 2009.
- BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211–217, 2005.
- BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245–254. 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARTON, B. E. Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 9, n. 4, p. 737-752, 2005.
- BEARA, I. N.; LESJAK, M. M.; JOVEN, E. D.; BALOG, K. J.; ANACKOV, G. T.; ORCIC, D. Z.; MIMICA-DUKIC, N. M. Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoids antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9268–9273, 2009.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JÚNIOR, J. F.; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. FUNEP, Jaboticabal, 2000, 30p.
- BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONISIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR, M. R.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1843-1855, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta conforme consta do Anexo I desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 de janeiro de 2000. Anexo II.
- CALDER, P. C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J. M.; BOURDET-SICARD, R.; FERNS, G. A.; FOLKERTS, G.; FRIEDMANN, P. S.; FROST, G. S.; GUARNER, F.; LEVIK, M.; MACFARLANE, S.; MEYER, P. D.; M'RABET, L.; SERAFINI, M.; EDEN, W.; LOO, J.; DIAS, W.; VIDRY, S.; WINKLHOFER-ROOB, B. M.; ZHAO, J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, supl. 1, p. 1-45, 2009.
- CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia glabra* L.)**. 1991. 86f. Dissertação de Mestrado,

Instituto de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1991.

CAVALCANTE, M. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. **Developments in Food Science**, v. 29, p. 643-650, 1992.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442–2451, 2011.

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Pitanga**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/pitanga.htm>>. Acesso em: 04 dez. 2013.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHEN, Y. F.; YAN, J.; ZHANG, D. Y.; CHEN, L. L. Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on induced secretion of inflammatory cytokines by different cell lines. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 37, n. 6, p. 622-628, 2008.

COCOZZA, F. D. M. **Maturação e conservação de manga 'Tommy Atkins' submetida à aplicação pós-colheita de 1-metilciclopropeno**. 2003. 198f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2002.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOCA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.

COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 851-858, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Trad. BARBOSA, J. B.; De VASCONCELOS, M. M.; VOEUX, P. J.); Robbins – **Patologia Estrutural e Funcional**, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-265, 2009.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. A importância das famílias *Myrtaceae* e *Melastomataceae* na etnomedicina Brasileira. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. 5, p. 47-52, 2005.

DESJARDINS, J.; TANABE, S.; BERGERON, C.; GAFNER, S.; GRENIER, D. Anthocyanin-rich black currant extract and cyanidin-3-O-glucoside have cytoprotective and anti-inflammatory properties. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 12, p. 1045-1050, 2012.

DIAS, A. B. **Caracterização e composição de frutos da pitangueira em municípios baianos**. 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

DONADIO, L. C.; MORO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Pitanga**. In: Frutas Brasileiras. Novos Talentos, Jaboticabal, p. 240-243, 2002.

DOS SANTOS, A. F.; SILVA, S. de M.; ALVES, R. E. Armazenamento de pitanga sob atmosfera modificada e refrigeração: I - transformações químicas em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 36-41, 2006.

EHRNHÖFER-RESSLER, M. M.; FRICKE, K.; PIGNITTER, M.; WALKER, J. M.; WALKER, J.; RYCHLIK, M.; SOMOZA, V. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 14, p. 3451-3459, 2013.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

EL-SHABRAWY, A. O. Essential oil composition and tannin contents of the leaves of *Eugenia uniflora* L. grown in Egypt. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy**, v. 33, n. 3, p. 17-21, 1995.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função sombreamento em mudas de quatro espécies florestais. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

ENGEL, W.; BAHR, W.; SCHIEBERLE, P. Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. **European Food Research and Technology A**, v. 209, n. 3-4, p. 237-241, 1999.

EREN, K.; OZMERIC, N.; SARDAS, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clinical Oral Investigations**, v. 6, n. 3, p. 150-154, 2002.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p.1588-1592, 2000.

FILHO, G. L.; DE ROSSO, V. V.; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 33–39, 2008.

FISCHÄDER, G.; RÖDER-STOLINSKI, C., WICHMANN, G.; NIEBER, K.; LEHMANN, I. Release of MCP-1 and IL-8 from lung epithelial cells exposed to volatile organic compounds. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 359-366, 2008.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P.(Ed). Anthocyanins as food colors. **Academic Press**, p. 181-207, 1982.

FRANZOM, R. Frutíferas Nativas do Sul do Brasil. In: 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 2º Simpósio Nacional do Morango, Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS, 2006. **Anais do 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 2º Simpósio Nacional do Morango**, Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2004.

GALHIANE, M. S.; RISSATO, S. R.; CHIERICE, G. O.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L. C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 286-292, 2006.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, In Press, Accepted Manuscript, Available online 1 December 2013.

GESSER, H. C.; PERES, M. A.; MARCENES, W. Condições gengivais e periodontais associadas a fatores socioeconômicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 289-293, 2001.

GIANNAKOUREOU, M. C.; TAOUKIS, P. S. Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 33-41, 2003.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. The effects of diet on inflammation. Emphasis on the metabolic syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 4, p. 677–685, 2006.

GODOY, R. C. B.; MATOS, E. L. S.; AMORIM, T. S.; NETO, M. A. S.; RITZINGER, R.; WASZCZYNSKYJ, N. Avaliação de genótipos e variedades de acerola para consumo in natura e para elaboração de doces. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 197-204, 2008.

GONZALEZ-QUINTELA, A.; CAMPOS, J.; GUDE, F.; PEREZ, L. F.; TOMÉ, S. Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumptions. **Cytokine**, v. 38, n. 1, p. 54-60, 2007.

GUWY, A. J.; MARTIN, S. R.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L. Catalase activity measurements in suspended aerobic biomass and soil samples. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 8-9, p. 669-676, 1999.

HASSIMOTTO, N. M. A.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N. G.; SOUTO, P. C. M. C.; TEIXEIRA, C.; LAJOLO, F. M. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

HELD, S.; SCHIEBERLE, P.; SOMOZA, V. Characterization of α -Terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by *in vitro* studies using oral buccal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8040-8046, 2007.

HIGBY, W.K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLA, L. I.; FASSMANN, A.; STEJSKALOVA, A.; ZNOJIL, V.; VANIK, J.; VACHA, J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 1, p. 30-36, 2004.

HONZEL, D.; CARTER, S. G.; REDMAN, K. A.; SCHAUSS, A. G.; ENDRESS, J. R.; JENSEN, G. S. Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: Generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8319-8325, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IAL- Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020p.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Fruticultura**, 2009. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 04 dez. 2013.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C. Nota científica: compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 123-127, 2009.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L.; BEAMAN, R.; ENDRES, J. R.; SCHAUSS, A. G. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326–8333, 2008.

JOSEPH, J. A.; SHUKITT-HALE, B.; LAU, F. C. Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 5, p. 470–485, 2007.

KAIN, J.; JARLSSON, H. L.; MÖLLER, L. DNA damage induced by micro- and nanoparticles—interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 491-500, 2012.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; AVERY, S.; BALU, S. Evolution of the interleukin. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 375-394, 2004.

KALT, W.; McDONALD, J. E.; DONNER, H. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 390-393, 2000.

KANAZAWA, A.; PATIN, A.; GREENE, A. E. Efficient, highly enantioselective synthesis of selina-1,3,7,(11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1292–1294, 2000.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, N. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 68-75, 2003.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-268, 2005.

KRISHNASWAMY, K. Traditional Indian spices and their health significance. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, supl. 1, p. 265–268, 2008.

KUSKOSKI, M. E.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LABRINEA, E. P.; GEORGIU, C. A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, n. 1, p. 63-68, 2004.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LARRAURI, J. A.; RUPEREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.

- LEE, J. H.; ZHOU, H. Y.; CHO, S. Y.; KIM, Y. S.; LEE, Y. S.; JEONG, C. S. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 10, p. 1318–1327, 2007.
- LEE, M. H.; CHIOU, J. F.; YEN, K. Y. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, n. 2, p. 131-6, 2000.
- LEONG, A. C. N.; KINJO, Y.; TAKO, M.; IWASAKI, H.; OKU, H.; TAMAKI, H. Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 630–635, 2010.
- LI, C.; DU, H.; WANG, L.; SHU, Q.; ZHENG, Y.; XU, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; YANG, R.; GE, Y. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia Section Moutan*) yellow flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8496–8503, 2009.
- LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S.; NASCIMENTO, P. P. Caracterização físico-química e sensorial de pitanga roxa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 382-385, 2000.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.
- LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Strawberry, loquat, mulberry, and bitter melon juices exhibit prophylactic effects on LPS-induced inflammation using murine peritoneal macrophages. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1587–1596, 2008.
- LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. A.; MENEZES, H. C. Estabilidade da polpa de pitanga sob congelamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 553-559, 2005.
- MALAMAN, F. S.; MORAES, L. A. B.; WEST, C.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 85-92, 2011.
- MAOKA, T.; MOCHIDA, K.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; ENJO, F.; OGATA, M.; NOBUKUNI, Y. TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. **Cancer Letters**, v. 172, n. 3, p. 103-109, 2001.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.º. 12**, de 04 de setembro de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 04 de setembro de 2003.

Disponível em:

<http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/IN%20N%C2%BA%2012%20de%204%20de%20setembro%20de%202003.htm>. Acesso em: 30 de jan. 2013.

MARGIS, R.; CALDAS, J. F.; FELIZ, D. B.; SALGUEIRO, F.; ARAUJO, D. S. D.; BREYNE, P.; MONTAGU, M. V.; OLIVEIRA, D.; MARGIS-PINHEIRO, M. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity & Conservation**, v. 11, n. 1, p. 149-163, 2002.

MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. 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, 2008.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. α -glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 302-307, 2000.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanis in Fruits, Vegetables and Grains**. CRC Press Inc., Boca Raton, 1993, 362 p.

MEALEY, B. L.; RETHMAN, M. P. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. **Dentistry Today**, v. 22, n. 4, p. 107-113, 2003.

MÉLO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, P. P. Formulação e avaliação físico-química e sensorial de geléia mista de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia* sp). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 33-44, 1999.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 179-183, 2007.

MENICHINI, F.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; CONFORTI, F.; LUCA, D.; STATTI, G. A.; CINDIO, B.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1549-1555, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

MIRANDA-VILELA, A. L.; PEREIRA, L. C. S.; GONÇALVES, C. A.; GRISOLIA, C. K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory

- markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**, v. 29, n. 12, p. 850-858, 2009.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987-996, 2010.
- NAOUM, P. C. **Citocinas e interleucinas**, Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP. 2009. Disponível em: < <http://www.ciencianews.com.br/ciencianews/citocinas.pdf>>, Acesso em: 17 fev. 2012.
- NARDI, G. M.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M.; MONACHEC, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2-3, p. 115-122. 2007.
- NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 165-168, 2009.
- NMORSI, O. P. G.; ISAAC, C.; UKWANDU, N. C. D.; OHANEME, B. A. Pro-and anti-inflammatory cytokines profiles among Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum* malaria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 41-44, 2010.
- OBANDA, M.; OWUOR, P. O.; TAYLOR, S. J. Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, n. 2, p. 209-215, 1997.
- OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- OLIVEIRA, A. L.; KAMIMURA, E. S.; RABI, J. A. Response surface analysis of extract yield and flavor intensity of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) obtained by supercritical carbon dioxide extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 189-194, 2009.
- OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 1-5, 2006.

- OLIVEIRA, L. S.; MOURA, C. F. H.; BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; MIRANDA, M. R. A. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*Malpighia emarginata* D.C) clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7957–7964, 2012.
- OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371–376, 2008.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Reserach Communication**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- PAIK, Y. H.; SCHWABE, R. F.; BATALLER, R.; RUSSO, M. P.; JOBIN, C.; BRENNER, D. A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signalling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1043-1055, 2003.
- PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 21-24, 2003.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGUERO, J.; MARBOT, R. Fruits volatiles of Cayena Cherry (*Eugenia uniflora* L.) from Cuba. **Journal of Essential oil Research**, v. 15, n. 2, p. 70–71, 2003.
- PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1629-1635, 2007.
- PIO, R.; GONTIJO, T. C. A.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J. Características físico-químicas de frutos de pitangueiras em função da altura de inserção na planta. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 1, p. 105-107, 2005.
- PIRES, K. M. P.; MELO, A. C.; LANZETTI, M.; CASQUILHO, N. V.; ZIN, W. A.; PORTO, L. C.; VALENÇA, S. S. Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 1, p. 98-104, 2012.
- PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich Brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. **Plant Foods for Humam Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 195-199, 2008.
- PRIOR, R. L.; GU, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2264-2280, 2005.

PRIOR, R. L.; LAZARUS, S. A.; CAO, G.; MUCCITELLI, H.; HAMMERSTONE, J. F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1270-1276, 2001.

RAFAEL, M.; BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1447-1454, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, A. P.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REIFE, R. A.; SHAPIRO, R. A.; BAMBER, B. A.; BERRY, K. K.; MICK, G. E.; DARVEAU, R. P. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is poorly recognized by molecular components of innate host defense in a mouse model of early inflammation. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 4686-4694, 1995.

REITER, E.; JIANG, Q.; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of α -tocopherol and γ -tocopherol. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 5-6, p. 668-691. 2007.

REQUE, P. M.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. de O.; JONG, E. V. de. Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis, In Press**, 2013.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASIL, M. J. ; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RIVERA, D.; OBON, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo islands: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 73-93, 1995.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 1999. 64p.

ROJAS-BARQUERA, D.; NARVÁEZ-CUENCA, C.E. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colômbia. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2336-2340, 2009.

ROOME, T.; DAR, A.; ALI, S.; NAQVI, S.; CHOUDHARY, M. I. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 514-521. 2008.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; de BRITO, E. D.; PÉREZ-JIMÉNES, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SANTOS, A. F.; SILVA, S. M.; MENDONÇA, R. M. N.; SILVA, M. S.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Alterações fisiológicas durante a maturação de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Interamerican Society of Tropical Horticulture**, v. 46, p. 52-54, 2002.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; GUEDES, G. M. M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 130-132, 2012.

SANTOS, R. M.; FORTES, G. A. C.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 581-586, 2011.

SCALON, S. P. Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 652-655, 2001.

SCALZO, J.; POLITI, A.; PELEGRINI, N.; MEZZETI, B.; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 207-213, 2005.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2; p. 183-186, 1987.

SHAHIDI, F.; MARIAN, N. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC Press: Boca Raton, FL, 2003, 576p.

SILVA, R. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; TORALLES, R. P. Avaliação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região sul do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3-4, p. 392-400, 2011.

SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 0-0, 2006.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SNODDERLY, D. M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Nutrition**, v. 62, supl. 6, p. 1448-1462, 1995.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-78, 2002.

SÓJKA, M.; GUYOT, S.; KOŁODZIEJCZYK, K.; KRÓL, B.; BARON, A. Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Special Issue, p. 100-106, 2009.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Resource**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 2ª Ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005, 640p.

SPADA, P. D. S.; SOUZA, G. G. N.; BERTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 144–151, 2008.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, n. 2, p. 101-107, 2005.

STEPNIEWSKA, Z.; WOLINSK, A.; ZIOMEK, J. Response of soil catalase activity to chromium contamination. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 8, p. 1142-1147, 2009.

STOCLET, J. C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M. H.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, 2004.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Analisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428p.

SUSIN, C.; ALBANDAR, J. M. Aggressive periodontitis in an urban population in Southern Brazil. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 3, p. 468-475, 2005.

SZETO, Y. T.; BENZIE, I. F. F.; COLLINS, A. R.; CHOI, S. W.; CHENG, C. Y.; YOW, C. M. N.; TSE, M. M. Y. A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 578, n. 1-2, p. 371-381, 2005.

SUNG-WON, M.; SU-NOH, R.; DONG-HYUN, K. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. **Internatational Immunopharmacology**, v.10, n. 8, p. 959-966, 2010.

TAKADA, H.; MIHARA, J.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* Lipopolysaccharides. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 295-301, 1991.

TEDESCO, I.; RUSSO, G. L.; NAZZARO, F.; RUSSO, M.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 505-511, 2001.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

TERAO, J. Dietary flavonoids as antioxidants. **Forum Nutritional Basel**, v. 61, p. 87-94, 2009.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 1, p. 52-59, 2000.

TSUDA, T.; HORIO, F.; KITO, J.; OSAWA, T. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-glucoside on ischemia-reperfusion injury in rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, n. 2, p. 361-366, 1999.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Cyanidin 3-O-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 48, n. 4, p. 305-310, 2002.

VANNUCCHI, H.; JORDÃO JÚNIOR, A. F. Vitaminas hidrossolúveis. In J. E. Dutra-de-Oliveira; J. S. Marchini. **Ciências Nutricionais**, São Paulo: Sarvier, p. 191-208, 1998.

VASCO, C.; RUALES, J.; KANAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VELÁSQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VÍCTOR, V. M.; MINANO, M.; GUAYERBAS, N. DEL RIO, M.; MEDINA, S.; DE LA FUENTE, M. Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. **Molecular and Cell Biochemistry**, v. 189, n. 1-2, p. 25-31, 1998.

VINSON, J. A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J. CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 2502-2504, 1999.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. P.; BARRA, K.; STRINGHETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WALKER, J. M.; MAITRA, A.; WALKER, J.; EHRNHOFER-RESSLER, M. M.; INUI, T.; SOMOZA, V. Identification of *Magnolia officinalis* L. bark extract as the most potent anti-inflammatory of four plant extracts. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 3, p. 531-544, 2013.

WANG, A. Y.; ZHOU, M. Y.; LIN, W. C. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 958–963, 2010.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTIMEIN, B. O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 546-549, 1988.

WILLER, H.; YUSSEFI-MENZLER, M.; SORESENSEN, N. **The World of Organic Agriculture - Statistics and Emerging Trends 2008**. Germany: IFOAM, Bonn and Switzerland, FiBL, Frick, 2008.

WINKELHOFF, A. J.; LOOS, B. G.; REIJDEN, W. A., VELDEN, U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 11, p. 1023-1028, 2002.

WOLF, D. L.; LAMSTER, I. B. Contemporary concepts in the diagnosis of periodontal disease. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 47-61, 2011.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026–4037, 2004.

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; FALCÃO, J. V.; MIRANDA, S. P. Comportamento da maturação de mamão tainung 1 cultivado em Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 314-316, 2005.

YEE, M.; KIM, A.; ALPAGOT, T.; DÜZGÜNES, N.; KONOPKA, K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 9, p. 684-689, 2012.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-14, 1954.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 585–596, 2005.

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

ZDARILOVÁ, A.; SVOBODOVÁ, A. R.; CHYTILOVÁ, K.; SIMÁNEK, V.; ULRICHOVÁ, J. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1555-1561, 2010.

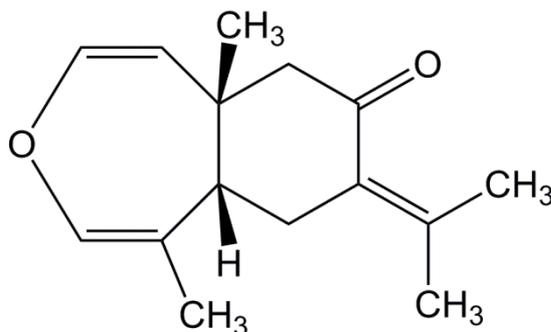
ZHANG, D.; CHEN, L.; LI, S.; GU, ZHIYUAN, YAN, J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a

way different from that of *Escherichia coli* LPS. **Innate Immunity**, .v. 14, n. 2, p. 99-107, 2008.

ZHANG, X.; ZHAO, W.; HU, L.; ZHAO, L.; HUANG, J. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in K562 cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 512, n. 1, p. 96-106, 2011.

APÊNDICE A

Dados referentes à análise de confirmação de identidade da oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona por ressonância nuclear magnética.



Oxidosselina-1,3,7(11)-trien-8-ona: tempo de eluição no cromatógrafo gasoso: 13,517 minutos; óleo amarelo; GCMS: m/z (%) = 232,1462 ($C_{15}H_{20}O_2$; M^+), 232 (28), 217 (4), 150 (18), 135 (44), 122 (82), 96 (60), 95 (58), 79 (37), 68 (100), 67 (40); 1H -NMR (500 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ (ppm) 0.86 [dt, 3 H, CH], 1.17 [s, 3 H, CH], 1.24 [s, 2 H, CH], 1.75 [d, 1 H, CH], 1.89 e 2.27 [2 s, 1 H, CH], 1.96 e 2.21 [2 s, 1 H, CH], 2.84 [s, 1 H, CH], 4.38 [dd, 1 H, CH], 6.08 [s, 1 H, CH], 6.21 [s, 1 H, CH]; ^{13}C -NMR (500 MHz; $(CD_3)_2SO$): δ (ppm) 21.5 [CH], 23.1 [CH], 28.3 [CH], 29.2 [CH], 31.1 [CH], 32.8 [CH], 33.9 [CH], 50.4 e 57.6 [CH], 111.0 [CH], 119.9 [CH], 124.1 [CH], 130.9 [CH], 137.9 [CH], 140.8 [CH], 206.9 [CH].