

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Potencial antioxidante e compostos fenólicos de  
pêssegos (*Prunus persica* L. Batsch)

SIMONE BERTAZZO ROSSATO

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Potencial antioxidante e compostos fenólicos de  
pêssegos (*Prunus persica* L. Batsch)

Tese apresentada por **Simone Bertazzo  
Rossato** para obtenção do GRAU DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13/07/2009 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fábio Klamt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Gilmar Arduino Bettio Marodin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr<sup>a</sup>. Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vizzotto

Embrapa Clima Temperado

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu esposo que de várias formas contribuíram para a realização e concretização desta etapa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me dado força, saúde e entusiasmo principalmente nestes últimos 18 meses.

Agradeço, com toda sinceridade, aos meus pais que nunca mediram esforços para oferecer as melhores condições para meu crescimento pessoal e profissional. Com certeza, as minhas conquistas, desde as menos difíceis até as mais difíceis foram oportunizadas por vocês. Muito obrigada!!! Vocês são os melhores pais do mundo.

Agradeço ao meu esposo que soube entender minha ausência, irritações, preocupações e angústias por conta do doutorado, nomeação no concurso, muitas aulas, muitas tarefas, pouco tempo. Mas nunca deixou de me apoiar, incentivar, acreditar e esperar que essa tempestade passasse ou ao menos acalmasse. Você mostrou ser um verdadeiro companheiro. Te amo!

Ao professor José Ângelo Silveira Zuanazzi, primeiramente por confiar em mim e no meu trabalho. Também pela compreensão no momento da nomeação em concurso público mesmo com a tese em andamento. E é claro, pelas grandes lições de vida e por sempre, em meio a algumas conversas formais ou informais, incentivar, motivar, despertar. Considero-te uma grande pessoa.

Ao professor José Cláudio Fonseca Moreira, por ter aberto as portas do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, disponibilizando recursos humanos, instalações e materiais para que o trabalho fosse realizado.

À pesquisadora Maria do Carmo Bassols Raseira por transmitir confiança no trabalho, por ceder amostras e auxiliar financeiramente na compra de alguns materiais.

Também agradeço as amigadas que conquistei na Faculdade de Farmácia e Centro de Estudos em Estresse Oxidativo: Maria T. K. Dresch e Virgínia Demarki Kappel. Amizade que começou em meio a alguns experimentos aTRAPalhados das nossas dissertações e teses. Amizade que rendeu muitos ensinamentos, de vida e de pesquisa. Adoro vocês, amigas!

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia que tornavam o ambiente prazeroso, divertido, fértil e variado em conhecimentos, principalmente Carol, Dudu, Marina, Raquel, Tiago, Jean, Rafa.

A Ana Aboy pela amizade, ajuda e paciência em esclarecer as mais diversas dúvidas.

Aos queridos amigos do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, campus Bento Gonçalves que tiveram o poder de reduzir o estresse, angústia, preocupação nestes últimos 18 meses distribuindo amizade, bom-humor, companheirismo: Crisinha, Mara, Regininha, Evandro e Juju. Vocês são amigos muito especiais!

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	01
2	Objetivos.....	02
2.1	Objetivo principal.....	02
2.2	Objetivos específicos.....	02
3	Revisão Bibliográfica .....	03
3.1	Histórico do pêssego.....	03
3.2	Classificação botânica do pêssego.....	04
3.3	Produção de pêssego.....	05
3.4	Consumo de pêssego no Brasil.....	10
3.5	Adubação do pessegueiro.....	10
3.6	Cultivares.....	13
3.7	Cultivares de dupla finalidade.....	13
3.8	Radicais livres e defesas antioxidantes .....	14
3.9	Alimento funcional.....	16
3.10	Compostos fenólicos.....	17
3.11	Atividade antioxidante.....	23
3.12	Medida da atividade antioxidante.....	28
	Capítulo I.....	35
	Capítulo II .....	45
	Capítulo III.....	79
4	Considerações finais.....	95
5	Conclusão.....	97
6	Perspectivas.....	98
7	Referências.....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção brasileira de pêssegos por região (em toneladas).....	06
Tabela 2 Área colhida de pêssego (em hectares) no Rio Grande do Sul e no Brasil.....	07
Tabela 3 Importações brasileiras de pêssego fresco (em toneladas).....	08
Tabela 4 Importações brasileiras de pêssego em calda (em toneladas).....	09
Tabela 5 Quantidades de fósforo e potássio sugeridas após análise do solo para cultivo de pêssego.....	11
Tabela 6 Indicação de adubação fosfatada para o pessegueiro e nectarineira, em função do teor foliar.....	12
Tabela 7 Recomendação de adubação potássica para o pessegueiro e a nectarineira, em função do teor foliar e produtividade esperada.....	13



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biossíntese dos compostos fenólicos.....	18
Figura 2 Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.....	19
Figura 3 Estruturas dos isômeros do ácido clorogênico.....	22
Figura 4 Núcleo fundamental dos flavonóides.....	22
Figura 5 Exemplos de compostos que participam como substratos de reações quimiluminescentes.....	30
Figura 6 Reação de radicais livres com luminol com emissão de luz.....	30
Figura 7 Estrutura química do AAPH e, após termólise, com geração de dois radicais e nitrogênio.....	31
Figura 8 Perfil da intensidade da luminescência do luminol após adição de trolox (↓): (A) 10 nM; (B) 400 nM. Tempo de indução ( $\tau_i$ ) avaliado por extrapolação ao zero de uma reta que tangencia a curva do consumo do trolox .....	32
Figura 9 Estrutura química do BHT e trolox.....	32
Figura 10 Perfil da intensidade da quimiluminescência após adição de trolox (A) e BHT (B).....	33

## RESUMO

### Potencial antioxidante e compostos fenólicos de pêssegos (*Prunus persica* L. Batsch)

Observa-se, atualmente, um aumento no interesse por alimentos funcionais e isto tem levado pesquisadores a investigar o potencial antioxidante de diversas frutas e de diversos compostos fenólicos presentes nos alimentos. As pesquisas a cerca da atividade antioxidante de pêssegos e nectarinas são escassas quando comparada às frutas vermelhas, apesar de aqueles frutos conterem importantes compostos fenólicos, como o ácido clorogênico, que apresenta efeitos potencialmente benéficos à saúde derivados de sua ação antioxidante. Entretanto, dados a respeito do seu conteúdo em frutas, vegetais, alimentos processados e sua distribuição em diferentes tecidos de plantas são escassos. O potencial antioxidante reativo total (TRAP) é um dos métodos mais utilizados para estimar a capacidade antioxidante de amostras *in vitro*. Entretanto, este método apresenta limitações quando a amostra não apresenta a fase *lag* (ou tempo de indução) necessária para obter o valor do TRAP pelo método original. Esse comportamento é obtido em algumas amostras e em substâncias isoladas, mas não em muitos extratos, os quais possuem diversas substâncias antioxidantes. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi otimizar e validar o método TRAP original e propor outro método de avaliação utilizando a Área Sob a Curva (AUC) e empregar essa ferramenta para avaliar o potencial antioxidante de extratos de pêssego (cascas e polpas) de três cultivares e do ácido clorogênico na mesma concentração encontrada no extrato. Para desenvolver esse trabalho, o primeiro passo foi otimizar e validar o método TRAP alternativo utilizando 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) (AAPH) como fonte de radical livre e um cintilador líquido para monitorar a quimiluminescência amplificada pelo luminol após a adição da amostra antioxidante. O método cromatográfico para quantificar o ácido clorogênico foi realizado usando uma coluna C-18 e sistema gradiente de eluição com acetonitrila-água-ácido trifluoracético. A detecção foi realizada por ultravioleta a 327 nm e a identificação do pico foi baseada no tempo de retenção, por co-injeções com a substância de referência e por LC-MS-MS. A principal condição estabelecida para o método TRAP foi a necessidade de estabilização do sistema (7000 segundos) antes da adição do antioxidante a ser testado. Todos os parâmetros da validação mostraram resultados satisfatórios: especificidade, linearidade ( $r > 0,99$ ), precisão (intra e inter-dia – desvio padrão relativo menos que 5%), robustez e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram baixos e similares para ambos os métodos de avaliação. O método cromatográfico para quantificar o ácido clorogênico apresentou boa linearidade ( $r > 0,99$ ), repetibilidade (RSD < 2%) e recuperação (96,3%, RSD = 1,96%) e foi robusto para pequenas variações nos parâmetros testados (RSD < 2%). Os resultados obtidos usando a AUC mostraram que os extratos de cascas e polpas das cultivares

*Maciel, Leonense e Eldorado* apresentaram atividade de seqüestro de radicais livres em todas as concentrações testadas, com uma ação concentração-dependente. A inibição imediata da quimiluminescência e a duração desta inibição foram significativamente maiores no extrato em relação ao composto majoritário (ácido clorogênico) isolado e isto pode ser devido a um efeito sinérgico ou aditivo de outros antioxidantes presentes no extrato. O  $IC_{50}$  para o extrato de pêssego e ácido clorogênico foi 1,19  $\mu\text{g/mL}$  e 8,43  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, quando o TRAP foi avaliado e um  $IC_{50}$  de 0,41  $\mu\text{g/mL}$  e 1,89  $\mu\text{g/mL}$  foi obtido quando o TAR (Reatividade Antioxidante Total) foi avaliado com o extrato de pêssego e com o ácido clorogênico, respectivamente. O ácido clorogênico apresentou uma importante contribuição ao potencial e à reatividade antioxidantes, mas os extratos do fruto contribuem com uma ação antioxidante mais duradoura. A principal vantagem da utilização da AUC para avaliar a atividade antioxidante é a maior precisão desse método e seu uso em amostras que não apresentam fase *lag*, como os extratos de pêssego, os quais apresentaram importante atividade antioxidante e, portanto, podem proporcionar vantagens à saúde de consumidores que ingerem essa fruta.

Palavras-chave: pêssego, atividade antioxidante, TRAP, ácido clorogênico, validação de método.

## ABSTRACT

### Antioxidant Potential and phenolic compounds of peaches (*Prunus persica* L. Batsch)

Increasing recent interest in nutraceuticals and functional foods has led researchers to investigate the antioxidant potential of several fruits and of several phenolic compounds. The researches about antioxidant activity of peaches and nectarines are scarce when compared to red fruits despite of they contain important phenolic compounds as chlorogenic acid, which present potential beneficial effect in humans derived from its antioxidant activity. However, data on its content in fruits, vegetables, foods processing, and its distribution in different tissues of plants is scarce. The total reactivity antioxidant potential (TRAP) method is one of the methods most employed to estimate the antioxidant capacity of samples *in vitro*. However, this method can presents limitations when the sample does not present a lag phase (or induction time) which is necessary to get TRAP value by original method. This behavior is got in some samples and to isolated substances, but not in many extracts which have several antioxidants. In this context, the aim of this work was to optimize and validate the original TRAP method, and to propose another evaluation method utilizing the area under curve (AUC) and to use this tool to evaluate antioxidant potential and reactivity from peach extracts (peels and fleshes) from three cultivars and from chlorogenic acid in the same concentration founded in extract. To developed this work, the first step was to optimized and to validated the alternative method to get TRAP value using 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) (AAPH) as the free radical source and a liquid scintillator counter to monitored the luminol-enhanced chemiluminescence after addition of the antioxidant sample. The chromatographic method to quantify chlorogenic acid was performed using a C-18 column with acetonitrile-water-trifluoroacetic acid gradient elution. The detection was carried out by UV at 327 nm and the peak identification was based on the retention times, by co-chromatography with reference substances and by LC-MS-MS. The main condition established to TRAP method was the need for the stabilization of the system, at 7000 s, before the addition of the antioxidant to be tested. All validations parameters showed satisfactory results: specificity, linearity ( $r > 0.99$ ), precision (intra- and interassay - relative standard deviation were both less than 5 %), robustness, and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were low and similar to both evaluation methods. The chromatographic method to quantify chlorogenic acid presented good linearity ( $> 0.99$ ), good repeatability (RSD  $< 2$  %) and accuracy (96.3%, RSD = 1.96% ) and was robust to small variations in parameters tested (RSD  $< 2$  %). The results obtained using AUC showed that the extracts of peels and fleshes of *Maciel*, *Leonense* and *Eldorado* peach cultivars present free radical scavenging activity in all concentrations tested, with a

concentration-dependent action. The immediate inhibition of chemiluminescence and the duration of this inhibition were significantly higher in the extracts than in the major compound (chlorogenic acid) alone and it can be due to a synergistic or additive effect of other antioxidants present in the extracts. The  $IC_{50}$  for peach extract and chlorogenic acid were 1.19  $\mu\text{g/mL}$  and 8.43  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, when TRAP was evaluated and an  $IC_{50}$  of 0.41  $\mu\text{g/mL}$  and 1.89  $\mu\text{g/mL}$  was found when TAR was evaluated in peach extract and chlorogenic acid, respectively. Chlorogenic acid presented a good contribution to antioxidant reactivity and potential, but the fruit extracts provide better antioxidant action. The main advantage of utilization of AUC to evaluate antioxidant activity is the higher precision of this method and its use in samples that do not present lag phase, as peach extracts which presented important antioxidant activity and therefore, it may provide health-promoting advantages to consumers by intake of this fruit.

Key-words: peach, antioxidant activity, TRAP, chlorogenic acid, method validation.

## 1 INTRODUÇÃO

Um fato observado na evolução da dieta alimentar da humanidade é a busca por alimentos saudáveis e de qualidade, onde se destaca o aumento do consumo de frutas e vegetais. Observa-se, atualmente, que os alimentos não são mais considerados simples fontes de nutrientes, mas também fonte de qualidade de vida, saúde, prevenção e longevidade. Neste contexto, os alimentos funcionais representam um mercado promissor e em constante crescimento, que vem despertando o interesse da comunidade científica.

Estudos epidemiológicos têm evidenciado o papel benéfico de frutas e vegetais na dieta para a manutenção da saúde e prevenção de distúrbios. Recentemente, diversos campos da ciência, incluindo epidemiologia, medicina, nutrição e farmácia têm sugerido que compostos com capacidade antioxidante presentes em vegetais e frutas desempenham um importante papel na redução do risco de distúrbios degenerativos, cardiovasculares, neurológicos e diversos tipos de câncer (Kalt *et al.*, 1999).

A importância do consumo de frutas como fontes de compostos com atividade antioxidante tem sido sugerida recentemente por diferentes grupos de pesquisa. Estes compostos incluem flavonóides, antocianos, ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis, entre outros (Kalt *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2002; Cevallos-Casals *et al.*, 2005).

Além do estudo do perfil destes compostos em frutas e vegetais *in natura* e da sua capacidade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, é importante estudar a manutenção e, até mesmo, o aumento do conteúdo e atividade destes compostos por meio de desenvolvimento de novas cultivares, práticas de produção, estocagem pós-colheita e seu processamento, o que pode aumentar as propriedades funcionais deste tipo de alimento, agregando valor ao produto (NICOLI *et al.*, 1997; DEWANTO *et al.*, 2002).

Embora boa parte das frutas seja consumida *in natura*, uma expressiva quantidade também é destinada à indústria para fabricação de compotas, geléias, sucos e polpa congelada, possibilitando o consumo da fruta fora da estação.

Entretanto, pouco é conhecido sobre as propriedades antioxidantes das frutas e vegetais após alguns tipos de processamento.

Dentre os diversos tipos de frutas que são produzidos, o pêssego está entre as preferidas, tanto para consumo *in natura* quanto para indústria. Além de possuir sabor agradável, o pêssego é uma fruta de excelente valor nutritivo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Estudar a atividade antioxidante *in vitro* e compostos fenólicos de cascas, polpas e compotas de pêssego.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver método para análise do potencial antioxidante reativo total (TRAP) em misturas complexas como extratos de plantas;
- Validar método para avaliação do TRAP em extratos de plantas;
- Avaliar o potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR) de extratos de cascas, polpas e compotas de pêssego e verificar o comportamento em relação à concentração;
- Avaliar a contribuição do composto majoritário dos extratos de pêssegos para os índices TRAP e TAR;
- Validar método cromatográfico para análise de ácido clorogênico em cascas, polpas e compotas de pêssego;
- Identificar e quantificar flavonóides presentes nas cultivares estudadas.
- Avaliar o comportamento dos ácidos fenólicos e da atividade antioxidante após processamento dos pêssegos na forma de compotas;
- Avaliar o efeito de uma adubação diferenciada sobre os ácidos fenólicos em cascas e polpas de pêssego.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Histórico

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch), originário da China é considerado frutífera típica de zona de clima temperado. Há séculos vem sendo cultivado no Oriente, na Europa e nas Américas, em latitudes elevadas, entre 30 e 50° Norte e Sul, onde ocorrem, genericamente, desde 500 até 2.000 horas anuais de frio abaixo de 7,2°C. Ao ser introduzido em regiões de latitudes baixas, como 22 ± 2°S, o pessegueiro teve de ser adaptado ao clima subtropical-temperado predominante, pois nessas condições ecológicas, as temperaturas invernais amenas impediram a adequada quebra de endodormência das gemas, e o conseqüente desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas (BARBOSA *et al.*, 1997). Entretanto, de acordo com CITADIN (2002), a necessidade de frio para pessegueiros, sobretudo aqueles que possuem dormência pouco profunda, a exemplo das cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da EMBRAPA-CPACT, poderá ser satisfeita mesmo com temperaturas superiores a 7,2 °C, permitindo seu cultivo em regiões de latitudes mais baixas.

Na América, o pessegueiro foi introduzido pelos conquistadores espanhóis no México e na Flórida em 1565 pela fundação St. Augustine. Pelo fato dessa espécie ser autofértil, *Land races* de pessegueiros desenvolveram-se por toda América do Norte e do Sul. Exemplos incluem os pessegueiros mexicanos conhecidos como *evergreen* que necessitam pouco ou nenhum frio invernal ou aqueles cultivados pelos índios Navajos em áreas remotas do Arizona (RASEIRA; QUESADA, 2000).

Em 1532, Martin Afonso de Souza introduziu o pessegueiro no Brasil por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas na Capitania de São Vicente, correspondendo ao atual Estado de São Paulo, que hoje representa o segundo maior produtor do Brasil, precedido pelo Rio Grande do Sul (AGRIANUAL, 2008).

O primeiro programa de melhoramento do pessegueiro no Brasil, visando a adaptação plena aos ambientes incomuns à cultura, ocorreu no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em fins dos anos quarenta. A partir desta década, as pesquisas para melhoramento continuaram e foram desenvolvidas dezenas de cultivares de qualidades organolépticas e agrônômicas superiores, melhor adaptadas ao clima



paulista (BARBOSA *et al.*, 1997). Em 1953, foi iniciado outro programa por Sérgio Sachs, na então Estação Fitotécnica de Taquari, da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Alguns anos depois, este programa foi transferido para a Estação Experimental de Pelotas (EEP) atual Embrapa Clima Temperado (FELICIANO *apud* RASEIRA, 2000).

Os principais objetivos buscados nos programas de melhoramento, no Brasil, são: adaptação, resistência a doenças, principalmente, podridão parda e bacteriose, época de maturação que propicie melhor escalonamento da colheita, época de floração de forma a escapar às geadas mais fortes, forma, aparência e tamanho dos frutos, firmeza da polpa, vigor, produtividade, resistência a condições de estresse e a resistência a pragas, maior tolerância ao armazenamento e transporte (RASEIRA, 2000; BIASI *et al.*, 2004). Recentemente, percebe-se um aumento do interesse pelos teores de caroteno, vitamina C e polifenóis da fruta (RASEIRA, 2000).

### **3.2 Classificação Botânica**

O pêssego, *Prunus persica* (L.) Batsch, é uma das espécies frutíferas de clima temperado que mais tem sido estudada e adaptada às condições de clima temperado quente ou subtropical. Essa espécie tem hoje grandes áreas de produção comercial, principalmente entre 30 e 45º de latitude Norte e Sul e, entre as espécies de frutas de caroço, é a de maior expressão econômica mundial (RASEIRA; QUESADA, 2000).

Taxonomicamente, o pêssego pertence à família Rosaceae, subfamília Prunoideae, gênero *Prunus*, e subgênero *Amygdalus*. São conhecidas cinco espécies: *Prunus davidiana* (Carr.) Franch., *P. ferganensis* (Kost & Rjab) Kov. & Kost., *P. kansuensis* Rehd., *P. mira* Koehne e *P. persica* (L.) Batsch. Em geral, quando se menciona apenas pêssego ou pessegueiro, refere-se à espécie *P. persica* (L.) Batsch (RASEIRA; QUESADA, 2000).

São conhecidas três variedades botânicas, pertencentes à espécie *Prunus persica* (L.) Batsch: *vulgaris*; *nucipersica* e *platicarpa*. A variedade *vulgaris* inclui a maioria dos cultivares de valor econômico, podendo apresentar polpa branca ou amarela, ter uma consistência fibrosa e pode servir para conserva, consumo fresco ou dupla finalidade. A variedade *nucipersica* produz frutas com epiderme glabra e,

geralmente, muito colorida e conhecidas como nectarineiras. A variedade *platicarpa* produz frutos de forma achatada, conhecidas por pêssegos chatos ou "peentoo" (RASEIRA; QUESADA, 2000).

### 3.3 Produção de pêssego

O pêssego (*Prunus persica* L. Batsh) é a oitava fruta mais produzida no mundo e uma das mais consumidas *in natura*. A produção mundial de pêssegos e de nectarinas foi de 15.346.666 toneladas em 2004 (FAO, 2007). A tabela 1 mostra a produção brasileira de pêssegos por região nos anos de 1997 a 2005.

O Brasil, apesar de apresentar um aumento na área colhida de pêssegos nos últimos anos (Tabela 2), não consegue abastecer o mercado interno (SATO, 2001), devido, principalmente, à sazonalidade da produção, problemas de logística e a alta perecibilidade dos frutos (MATHIAS *et al.*, 2008).

Além de a produção ser sazonal e insuficiente para o abastecimento interno, verifica-se que a produtividade média da persicultura brasileira é baixa. Segundo dados da FAO (2007), o Brasil ocupa o 11º lugar no mundo em área colhida com pessegueiro e nectarineira. Entretanto, a produtividade média brasileira, no ano de 2005, foi de apenas 10,0 t. ha<sup>-1</sup>, o que coloca o país na 21ª posição dentre os de maior produtividade e abaixo da média mundial, que foi de 10,99 t. ha<sup>-1</sup> em 2004.

As tabelas 3 e 4 mostram o volume de importação de pêssego fresco e em calda (em tonelada) de 1997 a 2007. Em 2007, o Brasil importou 10.695 toneladas de pêssegos frescos e 7.054,4 toneladas de pêssegos em calda, oriundos principalmente da Argentina (68,92% e 94,79%, respectivamente). Naquele ano, não houve registro de nenhuma exportação significativa de pêssegos brasileiros (AGRIANUAL, 2009). A produção total de pêssegos em calda no mundo foi de 1.267.420 em 2007/2008 sendo a Grécia e Estados Unidos os maiores produtores (315.000 e 357.420 toneladas, respectivamente) (AGRIANUAL, 2009). Esta forma de processamento é uma alternativa já que os pêssegos possuem um alto metabolismo pós-colheita e, portanto, sua vida útil é curta. O consumo de pêssego em calda no mundo foi de 662.900 toneladas em 2007/2008 sendo os Estados Unidos o maior consumidor (375.000 toneladas), seguido da China (135.800), Espanha (76.000) e Argentina (40.000) (AGRIANUAL, 2009).

**Tabela 1: Produção brasileira de pêssegos por região (em toneladas).**

<b>Regiões</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>SE</b>	21.264	23.449	20.651	24.826	55.483	49.882	59.825	61.830	67.612	71.259	n.c.
MG	4.735	5.278	3.746	4.334	7.005	6.157	12.349	14.411	24.524	26.743	26.475
ES	38	38	38	38	40	50	50	50	100	98	95
RJ	0,0	0,0	0,0	0,0	39	39	39	39	39	39	39
SP	16.492	18.133	16.868	20.454	48.399	43.636	47.387	47.330	42.949	44.379	38.537
<b>SUL</b>	81.321	88.554	121.132	121.132	167.153	168.410	160.539	173.890	167.859	128.460	n.c.
PR	6.963	7.947	10.080	10.080	23.102	21.422	18.746	17.863	17.979	14.241	17.814
SC	13.776	18.209	19.371	19.371	34.988	35.691	29.788	33.352	30.760	27.318	n.c.
RS	60.582	62.398	91.681	91.681	109.063	111.297	112.005	122.675	119.130	86.901	94.056
<b>CO</b>	40	35	10	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.c.
MS	21	16	7,7	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.c.
DF	19	19	2,7	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.c.
<b>BRASIL</b>	102.625	112.038	145.968	145.968	222.636	218.292	220.364	235.720	235.471	199.719	185.959

Fonte: AGRUANUAL, 2003; AGRUANUAL, 2007; AGRUANUAL 2008; AGRUANUAL, 2009  
n.c. não consta

**Tabela 2:** Área colhida de pêssego (em hectares) no Rio Grande do Sul e no Brasil.

Safr	Área colhida	
	Rio Grande do Sul	Brasil
Ano		
1996	11.363	17.492
1997	11.860	18.309
1998	14.346	21.723
1999	14.957	22.508
2000	14.344	22.039
2001	15.125	23.134
2002	15.768	23.744
2003	16.343	24.507
2004	15.628	23.864
2005	15.699	23.794
2006	14.706	22.453

Fonte: AGRUANUAL 1998; AGRUANUAL 2003, AGRUANUAL 2005, AGRUANUAL 2007; AGRUANUAL, 2008; AGRUANUAL 2009.

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de pêssego do Brasil. Contribuiu com 52,04% da produção nacional em 2004, 50,6% em 2005, 43,5% em 2006 e 50, 58% em 2007. Os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná contribuíram com 21%, 14% e 9% da produção nacional, respectivamente no ano de 2007. No Estado do Rio Grande do Sul, destacam-se as regiões Sul do estado com 39,5% da produção gaúcha e Serra com 36,2% sendo que na metade Sul do Rio Grande do Sul, 29 municípios produzem pêssegos. Os municípios que apresentam produção superior a 10.000 toneladas são: Pelotas, Canguçu e Bento Gonçalves. Estes municípios contribuem com 34,5% da produção total do Estado (AGRUANUAL, 2009).

**Tabela 3:** Importações brasileiras de pêssego fresco (em toneladas).

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Argentina</b>	2.093	2.537	495	516	917	1.964	2.325	2.284	4.385	8.458	7.371
<b>Espanha</b>	540	1.072	919	1.263	935	931	399	380	1.051	1.237	1.067
<b>Chile</b>	4.305	3.446	1.290	1.155	1.287	1.010	503	803	1.517	2.379	2.072
<b>Uruguai</b>	203	191	106	63,7	48,8	20,8	65,9	104,2	47,0	158	121
<b>EUA</b>	480	97,6	9,1	12,4	0,0	0,0	44,3	57,6	30,4	9,7	63,2
<b>Itália</b>	24,9		80,9	171	0,0	54,3	0,0	84,0	23,7	27,7	0,0
<b>Portugal</b>	67,9	195	112	65,4	0,0	0,0	0,0	5,4	14,1	2,4	0,9
<b>Paraguai</b>	264	221	0,0	28,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Venezuela</b>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Grécia</b>	43,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>França</b>	1,5	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Outros</b>	105	0,0	140	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total</b>	8.128	7.760	3.039	3.274	3.188	3.980	3.337	3.719	7.068	12.271	10.695

Fonte: AGRIANUAL 1998; AGRIANUAL 2003, AGRIANUAL 2005, AGRIANUAL 2007 E AGRIANUAL 2008, AGRIANUAL, 2009.

**Tabela 4:** *Importações brasileiras de pêssego em calda (em toneladas)*

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Argentina</b>	3.079	4.829	4.339	210	548	5.896	4.206	2.340	2.907	11.387	6.687
<b>Espanha</b>	1.727	548	63,2	8,5	5,0	1,8	1,5	2,0	0,0	36,3	127
<b>Chile</b>	380	20,4	99,4	6.031	21,4	0,0	60,0	0,0	37,3	17,7	0,0
<b>China</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,2	0,0	0,0	0,0	222
<b>Grécia</b>	13.906	13.909	12.327	0,0	7.536	1.134	90,4	0,0	0,0	0,0	18,4
<b>Itália</b>	7,6	6,1	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Portugal</b>	0,2	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>África Sul</b>	40,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>EUA</b>	0,4	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Outros</b>	37,0	173	36,5	22,9	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total</b>	19.177	19.495	16.887	6.272	8.117	7.031	4.366	2.342	2.944	11.441	7.054,4

Fonte: AGRIANUAL 1998; AGRIANUAL 2003; AGRIANUAL 2005; AGRIANUAL 2007; AGRIANUAL 2008, AGRIANUAL, 2009.

### **3.4 Consumo de pêssego no Brasil**

O Brasil possui um consumo anual *per capita* de 0,7 kg de pêssego *in natura* e 0,300 kg de pêssego em compota. No Rio Grande do Sul, o consumo anual de pêssego *in natura* é de 850 g *per capita*. Do total produzido anualmente, cerca de 25% destinam-se à fabricação de conservas e o consumo de pêssego em conserva situa-se ao redor de 50 a 60.000 toneladas. Portanto, para atender a demanda interna, tem-se importado pêssegos *in natura* e enlatado (tabelas 3 e 4) (IBGE, 2005, AGRIANUAL, 2007, MEDEIROS; RASEIRA, 2008).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), o consumo *per capita* de frutas no Brasil é baixo (57,00 kg) se comparado a países como Espanha (120,10 kg), Itália (114,80 kg) ou Alemanha (112,00 kg). O consumo de pêssego no Brasil ainda é pequeno se comparado a outras frutas, como banana (7,746 kg/hab/ano), laranja (2,194 kg/hab/ano) ou maçã (5,30 kg/hab/ano). Esse baixo consumo é explicado, em grande parte, pelo reduzido poder aquisitivo da população e também pela falta de esclarecimentos da população sobre suas propriedades como complemento alimentar (IBGE, 2005; AGAPOMI, 2009).

A principal forma de comércio do pêssego no mundo é como conserva. Também é comercializado *in natura*, polpa congelada e como suco (RASEIRA, 2000). Pêssego em calda, segundo a legislação brasileira, é um produto coberto com calda, depois de colocado na embalagem e, após, submetido a um tratamento térmico adequado. Também conhecido popularmente como “compota”, entretanto, compota, segundo a legislação brasileira, é um produto cozido na calda e posteriormente embalado (BRASIL, 1983).

### **3.5 Adubação do pessegueiro**

A cultura do pessegueiro encontra-se difundida desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Isso significa que ela está implantada numa grande variedade de solos, os quais apresentam variações quanto à textura, profundidade, fertilidade e acidez, entre outras características. De modo geral, os solos apresentam acidez elevada, altos teores de elementos tóxicos e baixa fertilidade

natural (MEDEIROS; RASEIRA, 1998). Assim, a calagem e a adubação fazem-se necessárias para garantir produções satisfatórias (MEDEIROS; RASEIRA, 1998).

A calagem para o pessegueiro objetiva elevar o pH do solo para 6,0, visando neutralizar ou reduzir os efeitos tóxicos do alumínio e/ou manganês e proporcionar melhores condições de absorção de alguns nutrientes essenciais como o fósforo (P) (MEDEIROS; RASEIRA, 1998).

Após a calagem, realiza-se uma adubação de pré-plantio. Com essa adubação, visa-se elevar o nível de fósforo e potássio no solo até valores considerados satisfatórios até o início da produção comercial (MEDEIROS; RASEIRA, 1998). As quantidades de  $P_2O_5$  e  $K_2O$  recomendadas na adubação de pré-plantio para a cultura do pessegueiro constam na Tabela 5.

**Tabela 5:** *Quantidades de fósforo e potássio sugeridas após análise do solo para cultivo de pêsego.*

<b>Interpretação de P e K no solo</b>	<b>Adubação fosfatada kg <math>P_2O_5</math> / ha<sup>-1</sup></b>	<b>Adubação potássica Kg <math>K_2O</math>/ ha<sup>-1</sup></b>
Limitante	120	130
Muito baixo	90	100
Baixo	60	70
Médio	30	40
Suficiente	0	20
Alto	0	0

Fonte: MEDEIROS; RASEIRA (1998).



Durante a fase de crescimento das plantas, que vai desde o plantio das mudas até o terceiro ano, recomenda-se usar somente o nitrogênio, o que é chamado de adubação de crescimento. Supõe-se que o fósforo e potássio fornecidos pela adubação de pré-plantio sejam suficientes até o momento em que as plantas entrem em plena produção, por volta do quarto ano (MEDEIROS; RASEIRA, 1998).

Do quarto ano em diante, quando as plantas entram em plena produção, os nutrientes e a quantidade a ser aplicada devem resultar de análise conjunta dos seguintes parâmetros: análise foliar, análise periódica do solo, idade das plantas, crescimento vegetativo, adubações anteriores, produções obtidas e espaçamento (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004) sendo que o principal parâmetro avaliado é a análise foliar. Esta etapa é chamada de adubação de manutenção (MEDEIROS; RASEIRA, 1998).

A análise foliar é efetuada coletando-se as amostras entre a 13ª e 15ª semana após a floração e com base nos resultados, normalmente é recomendada uma adubação com Nitrogênio (N) e com Potássio (K). O Fósforo (P) é normalmente utilizado só antes da implantação do pomar. As indicações de adubação fosfatada e potássica estão indicadas nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 6:** *Indicação de adubação fosfatada para o pessegueiro e nectarineira em função do teor foliar.*

<i>Teor de fósforo na folha (%)</i>	<i>Recomendação em kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha.</i>
Menor que 0,04	80-120
0,04 a 0,09	40-60
Maior que 0,09	0

Fonte: COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO (2004).

**Tabela 7:** *Recomendação de adubação potássica para o pessegueiro e para a nectarineira, em função do teor foliar e produtividade esperada.*

Teor de K na folha (%)	Produtividade esperada (t/ha)		
	Menor que 10	10 a 20 Kg de K <sub>2</sub> O/há	Maior que 20
Menor que 0,54	100	100	100
0,54 a 0,92	80	80	80
0,93 a 1,30	40	60	80
1,31 a 1,68	30	40	60
1,69 a 2,06	20	30	40
2,07 a 2,82	0	20	30
Maior que 2,82	0	0	0

Fonte: COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO (2004).

### 3.6 Cultivares

De modo geral, as cultivares de pessegueiro mais plantadas no Brasil são originárias dos programas de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, em São Paulo e da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS. Há, ainda, cultivares desenvolvidas pela Estação Experimental de Taquari - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A. - EPAGRI - e pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR - além de algumas cultivares de maturação precoce, criadas pela Universidade da Flórida, nos Estados Unidos (RASEIRA; QUESADA, 2000).

### 3.7 Cultivares de Dupla Finalidade

A Embrapa redirecionou o programa de melhoramento genético do pêssigo e obteve cultivares denominadas “duplas finalidades” cujos frutos aliam as qualidades fundamentais para atender ao mercado *in natura* e ao processamento industrial. As cultivares antes desenvolvidas visavam apenas ao segmento industrial - uma vez que a principal região produtora de pêssigos do país estava concentrada onde se inseria o parque industrial processador, ou à mesa (RASEIRA; QUESADA, 2000).

As cultivares de dupla finalidade precisam ter polpa não fundente, rica em sólidos solúveis e com boa aparência, com certa porcentagem de coloração vermelha na epiderme. Frutos desse tipo têm uma vantagem extra, mesmo para consumo *in natura*: a polpa não fundente, firme, resiste melhor ao transporte à distância. Como resultado do trabalho desenvolvido, cinco cultivares foram lançadas pela EMBRAPA Clima Temperado de Pelotas: Eldorado, Maciel, Leonense, Sensação e Granada (RASEIRA, 2000).

### 3.8 Radicais livres e defesas antioxidantes

Um radical livre é qualquer espécie de existência independente (por isso, o termo livre) que contém um ou mais elétrons desemparelhados, isto é, elétrons sozinhos ocupando um orbital atômico ou molecular. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HUSAIN *et al.*, 1987). Ainda, existem certas espécies não radicalares que são agentes oxidantes e/ou facilmente são convertidos a radicais (HOCl, HOBr<sup>-</sup>, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Espécies reativas de oxigênio são produtos normais do metabolismo aeróbico, sendo produzidos durante as reações de transferência de elétrons que ocorrem na mitocôndria, cloroplastos e peroxissomas. Além disso, o organismo humano sofre ação constante de EROs e ERNs gerados em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO<sup>•</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peroxila (ROO<sup>•</sup>) e alcóxila (RO<sup>•</sup>); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA,

outros são reativos apenas com lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso, podem gerar espécies danosas (BARREIROS *et al.*, 2006).

Atualmente existe um grande interesse nos estudos dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo (BARREIROS *et al.*, 2006).

Acredita-se que radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) possam contribuir para o desenvolvimento de diversos distúrbios relacionados à idade e, talvez, ao próprio processo de envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SOHAL *et al.*, 2002;) sendo responsáveis por causar estresse oxidativo ou dano oxidativo. Foi demonstrado aumento do dano oxidativo às maiores classes de biomoléculas em pacientes com Alzheimer (BUTTERFIELD, 2002), câncer, aterosclerose, diabetes (HALLIWELL, 2000). Uma vez que danos oxidativos contribuem significativamente ao desenvolvimento de patologias, ações que reduzam estes danos poderiam ser terapêuticamente benéficas (HALLIWELL, 2000); LIU *et al.*, 2002). Se o dano oxidativo é envolvido na origem do distúrbio, então um tratamento antioxidante poderia retardar ou prevenir o seu início (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

ROS são moléculas tóxicas e podem causar danos ao DNA, membranas, cloroplastos e morte celular em casos extremos (DIPLOCK, 1998; MITTLER, 2002). Átomos de hidrogênio adjacentes a ligações insaturadas são sensíveis ao ataque oxidativo. Assim, lipídios insaturados das membranas são os primeiros alvos das reações oxidativas (ESTERBAUER *et al.*, 1991), embora lipoperoxidação também ocorra devido à atividade das lipoxigenases, por exemplo, como parte da resposta das plantas à invasão de patógenos e a algum tipo de ferimento (RUSTERUCCI *et al.*, 1999).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou obtidos a partir da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, como a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido-dismutase (SOD) (SINGH *et al.*, 2001) ou não enzimaticamente como a glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e

ferritina), ácido diidrolipólico e coenzima Q reduzida (CoQH<sub>2</sub>). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e compostos fenólicos presentes em diversas frutas e vegetais (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, ela pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura desta, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral. As proteções conhecidas do organismo contra ERO e ERN abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que são produzidas no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta (BARREIROS *et al.*, 2006).

### **3.9. Alimento Funcional**

A Resolução nº 19 de 30 de Abril de 1999 da ANVISA, sobre o registro de alimentos funcionais, propõe que “alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999). Existem outras definições, mas em geral podem abranger alimentos e bebidas, nos quais algum componente funcional é encontrado ou adicionado. Este componente possui um papel fisiológico específico no corpo, que tem o potencial de conferir benefício à saúde (RANSLEY, 2001).

Os antioxidantes são considerados uma categoria de substâncias não nutrientes, mas com papel fisiológico na manutenção de funções normais do

organismo. Os alimentos que contêm substâncias antioxidantes são promissores de uma qualificação como alimento funcional (RANSLEY, 2001).

### 3.10 Compostos Fenólicos

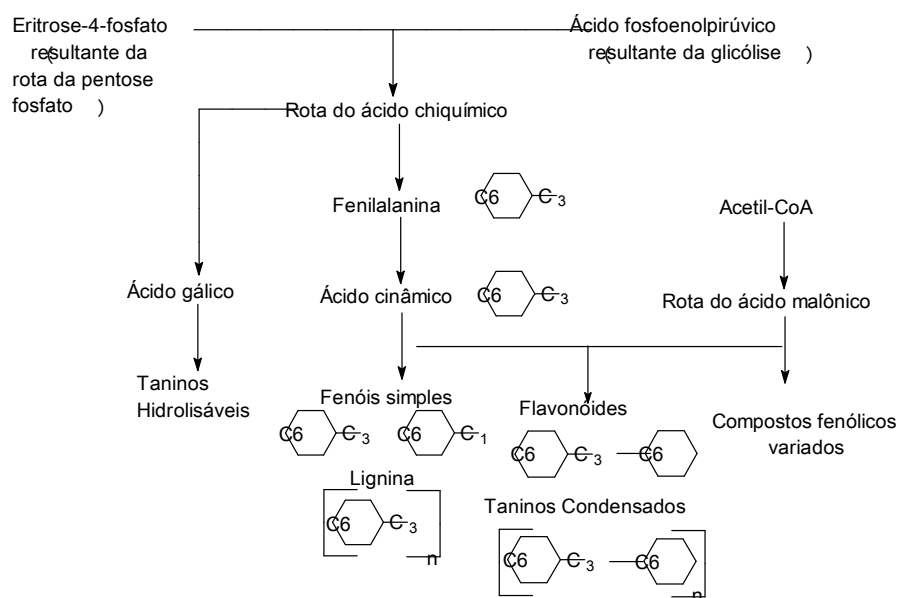
Compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse. São, portanto, encontrados em alimentos como frutas e vegetais consumidos rotineiramente em nossa dieta. Esses compostos contribuem para qualidades sensoriais, como cor, *flavour* (impressão sensorial determinada pelas sensações de sabor e aroma) e sabor de frutas e vegetais frescos e seus produtos. Além disso, muitos fenólicos apresentam atividades antioxidante, antialérgica, anticarcinogênica, antimicrobianas, entre outras (KIM *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico (Figura 1). A rota do ácido chiquímico participa na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais. A rota do ácido malônico, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2004).

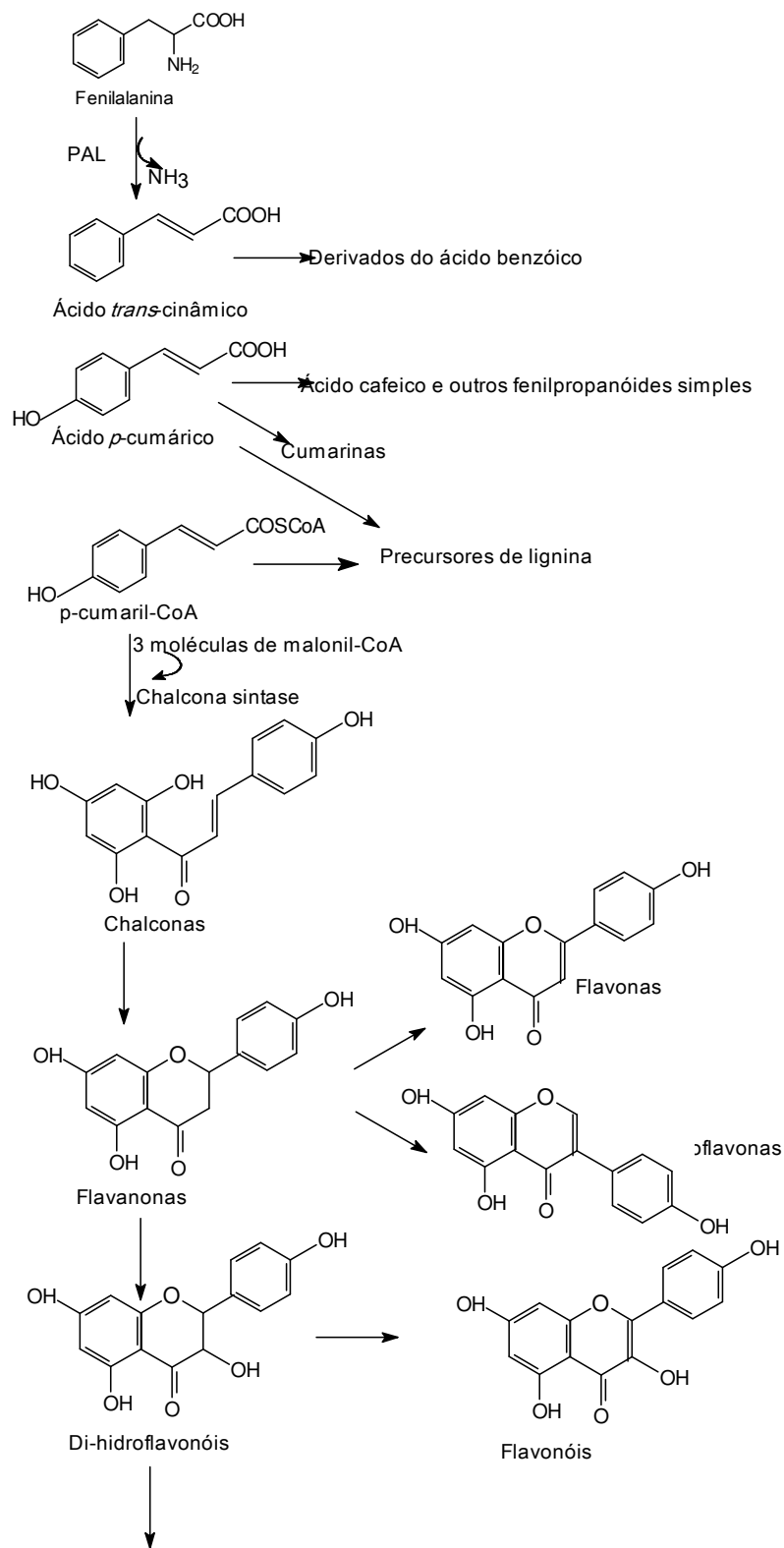
A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos. Um dos intermediários desta rota é o ácido chiquímico, que fornece o nome a essa sequência de reações. A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico (Figura 2). Esta reação é catalisada pela fenilalanina amonialiase (PAL), talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal. A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos

níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos. O ponto de controle parece estar no início da transcrição. A invasão por fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando sua quantidade na planta, o que, então, estimula a síntese de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As reações subseqüentes àquelas catalisadas pela PAL levam à adição de mais grupos hidroxila e outros substituintes. Os ácidos *trans*-cinâmico e *p*-cumárico e seus derivados são compostos fenólicos simples chamados de fenilpropanóides que são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos.

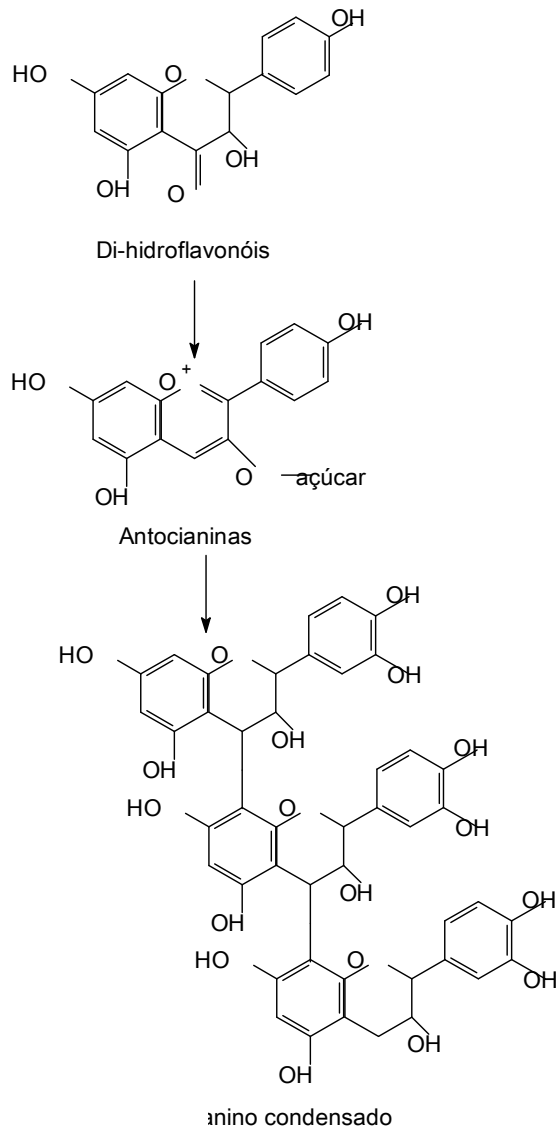


**Figura 1:** Biossíntese dos compostos fenólicos. Fonte: TAIZ; ZEIGER (2004).



**Figura 2:** Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina. Fonte: TAIZ; ZEIGER (2004).



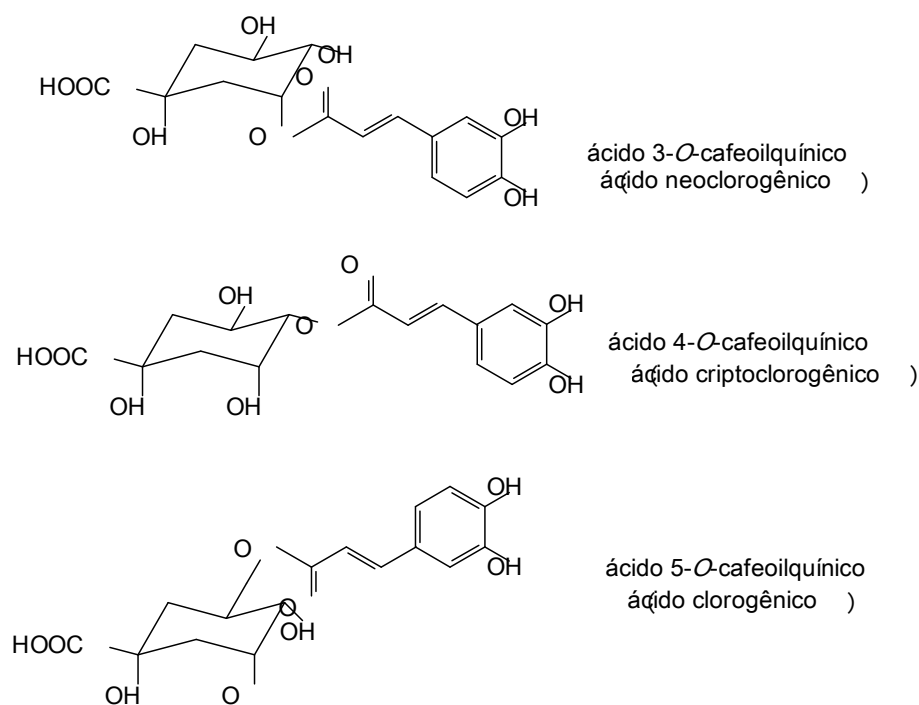


**Figura 2** (continuação): *Esquema da Biossíntese de Compostos Fenólicos a partir da Fenilalanina.* Fonte: TAIZ; ZEIGER (2004).

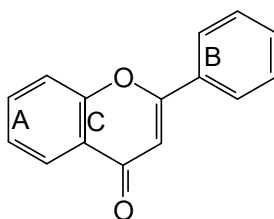
Os ácidos fenólicos são estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Os ácidos fenólicos estão presentes principalmente sob duas formas em alimentos de origem vegetal: na forma livre ou forma conjugada. A forma conjugada é a mais comum, e pode apresentar-se sob a forma de ésteres, glicosídeos e complexos conjugados. (CLIFFORD, 2003).

Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em quase todas as plantas. Ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico são ácidos *trans*-cinâmicos que ocorrem naturalmente em suas formas livres ou como uma família de mono ou di-ésteres com (-) ácido quínico, coletivamente conhecidos como ácido clorogênico que são componentes antioxidantes produzidos por plantas em resposta a condições de estresse tais como infecções por patógenos, danos mecânicos e excessivos níveis de luz ultravioleta ou visível (FARAH; DONANGELO, 2006). As principais classes de ácido clorogênico encontradas na natureza são os ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínicos, cada grupo com pelos menos três isômeros (figura 3). O ácido clorogênico e seus isômeros apresentam propriedades potencialmente benéficas como antioxidante, antiviral e hepatoprotetora (FARAH; DONANGELO, 2006), mas apesar desses efeitos, dados do conteúdo desses compostos em plantas, alimentos e bebidas é escassa. Além disso, a maior parte dos dados existentes incluem os ácidos cafeoilquínicos dentro do conteúdo de fenólicos totais ou somente o conteúdo do ácido 5-cafeoilquínico é medido por ser o ácido clorogênico mais abundante (MARQUES; FARAH, 2009). Acredita-se que a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos, incluindo o ácido clorogênico é por seqüestro dos radicais livres, via doação de hidrogênio (ROBBINS, 2003).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados de origem natural. Podem encontrar-se sob diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas, ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Figura 4). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos por uma linha (') para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8a e 4a, respectivamente (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).



**Figura 3:** Estruturas dos Isômeros do Ácido Clorogênico. Fonte: NAKATANI *et al.* (2000).



**Figura 4:** Núcleo Fundamental dos Flavonóides. Fonte: ZUANAZZI; MONTANHA (2003).

Em função das atividades benéficas à saúde dos compostos fenólicos, estudos são realizados objetivando aumentar o teor de compostos fenólicos através do desenvolvimento de novas cultivares (PRIOR *et al.*, 1998; CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2005) ou com adubações diferenciadas (BUSSI *et al.*, 2003; BRUULSEMA *et al.*, 2004). Entretanto, as práticas de produção que influenciam diretamente nos

níveis de metabólitos secundários ainda não são bem conhecidas. Sabe-se que em plantas deficientes em fósforo, sua biossíntese é inibida. Entretanto, existem poucos estudos a respeito da resposta da qualidade e quantidade destes metabólitos a altos níveis de nutrientes, como o fósforo.

### **3.11. Atividade antioxidante**

Segundo HALLIWELL (2000), “Antioxidante é qualquer composto que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

Antioxidantes são componentes que inibem ou retardam a oxidação de outras moléculas por inibição da iniciação ou propagação das reações de oxidação em cadeia. Existem duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos ou naturais. Em geral, antioxidantes sintéticos são compostos com estruturas fenólicas com vários graus de substituição alquila, enquanto os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminoácidos e aminas) ou carotenóides, além do ácido ascórbico (HUDSON, 1990).

Antioxidantes sintéticos como butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT) são usados como antioxidantes em alimentos, tendo seu uso regulamentado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Portaria 1004 de 11/12/1998, onde os limites máximos estabelecidos são de 0,01g/100g para ambos. Entretanto, eles não podem ser considerados completamente inofensivos, uma vez que podem causar danos ao pulmão (BHT) ou promover a ação de alguns carcinógenos (BHA) (ITO *et al.*, 1986, HOCMAN, 1988). O emprego destes compostos tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade, motivando a busca de uso de antioxidantes naturais que possam atuar, isolados ou sinergicamente com outros aditivos, em substituição aos sintéticos (SHAHIDI, 2000).

As evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante de fontes vegetais se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos. A maioria destes compostos, com exceção do tocoferol, possui grupos funcionais ativos na

posição *orto* enquanto que nos antioxidantes sintéticos citados, esses grupos encontram-se na posição *para* (MADSEN *et al.*, 1997).

Muitos dos antioxidantes naturais exibem uma gama de efeitos biológicos, incluindo antimicrobiano (CHOMNAWANG *et al.*, 2008; FATTOUCH *et al.*, 2008, WANG *et al.*, 2008), antiinflamatório (CHEN *et al.*, 2008), antialérgico (MIYASE *et al.*, 1999), antriproliferativo (MALTZMAN *et al.*, 1989; ROY *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009) e ação vasodilatadora (LOKE *et al.*, 2008; XUE *et al.*, 2008).

Uma associação negativa altamente significativa entre ingestão de polpas de frutas e vegetais e mortalidade por distúrbio isquêmico do coração foi relatada por ARMSTRONG *et al.* (1975). Uma correlação negativa significativa foi também relatada entre consumo de frutas e verduras e mortalidade por distúrbio cerebrovascular em estudo realizado por ACHESON; WILLIAMS (1983).

A proteção que frutas e vegetais proporcionam contra doenças, incluindo câncer e distúrbios cardio e cerebrovasculares, tem sido atribuída a vários antioxidantes contidos nestes alimentos (SCALZO *et al.*, 2005) não só vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno, mas também alguns compostos fenólicos (HANASAKI *et al.*, 1994).

EVANS (1996) comparou a relação estrutura-atividade dos flavonóides com sua ação antioxidante, demonstrando estarem associadas. HOLLMAN (1999) mostrou que flavonóides podem bloquear em grande escala efeitos enzimáticos, inclusive os que estão associados à divisão celular.

A atividade antioxidante é uma propriedade de fundamental importância para a vida. Muitas das funções biológicas, como antimutagenicidade, anticarcinogenicidade, antienvhecimento, entre outras, originam-se desta propriedade (COOK; SAMMAN, 1996).

O conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de frutas variam de acordo com o genótipo específico da planta, ou seja, espécies e variedades dentro das espécies (GIL *et al.*, 2002; IMEH; KHOKHAR, 2002; KIM *et al.*, 2003; WOLFE *et al.*, 2003; SCALZO *et al.*, 2005; FATTOUCH *et al.*, 2008), parte da planta ou do fruto (BOCCO *et al.*, 1998; GIL *et al.*, 2002; WOLFE *et al.*, 2003;

FATTOUCH *et al.*, 2008), também podendo sofrer influência das condições de cultivo, como ambiente e técnicas utilizadas (WANG *et al.*, 1996; PRIOR *et al.*, 1998, CARBONARO *et al.*, 2002; SCALZO *et al.*, 2005).

CARBONARO *et al.* (2002) verificaram um aumento do conteúdo de polifenóis em pêssegos e pêras orgânicos em relação com o método original de cultivo, sugerindo que este aumento seja o resultado do desenvolvimento do sistema de defesa da planta como consequência do cultivo orgânico.

FATTOUCH *et al.* (2008) analisaram o perfil de polifenóis e atividades antioxidante e antimicrobiana em polpas e cascas de maçãs, pêras e marmelo e verificaram que o ácido clorogênico foi o principal composto fenólico encontrado nas polpas das três frutas, mas não nas cascas. Também verificaram significativa diferença no conteúdo de fenólicos totais entre cascas e polpas, principalmente nas maçãs e marmelo, sendo que as cascas apresentaram, no mínimo, o dobro do conteúdo encontrado nas polpas.

WOLFE *et al.* (2003) encontraram que entre as quatro variedades de maçãs estudadas, os conteúdos de flavonóides e fenólicos totais foi maior nas cascas em relação às polpas. Entre as variedades, *Idared* e *Rome Beauty* apresentaram concentração significativamente maior de flavonóides e fenólicos totais em relação à *Cortland* e *Golden Delicious*.

Uma diferença no conteúdo de fenólicos entre duas cultivares de maçãs foi encontrada por FATTOUCH *et al.* (2008), sendo que a *Red Delicious* apresentou um conteúdo de fenólicos aproximadamente três vezes maior que a *Golden Delicious* tanto nas cascas quanto nas polpas e estas diferenças também ocorreram com a atividade antioxidante.

SCALZO *et al.* (2005) encontraram diferenças na atividade antioxidante de morangos cultivados e selvagens, sendo que aproximadamente o dobro de atividade foi encontrado no morango selvagem. Estes pesquisadores também encontraram diferença na atividade antioxidante entre quatro cultivares de maçã e cinco de morango.

O uso de porta-enxertos, que representa uma importante ferramenta agrônômica para o controle da produção e qualidade da fruta e é capaz de alterar os componentes nutricionais foi também estudado por SCALZO *et al.*, (2005) para explorar a possibilidade de aumentar a capacidade antioxidante de pêssegos e damascos. O estudo demonstrou que houve diferença significativa na atividade antioxidante e no conteúdo de fenólicos totais de pêssegos e damascos dependendo do porta-enxerto utilizado. Os dados obtidos sugerem que, quando uma comparação é feita entre dados da literatura, as variedades deveriam ser conhecidas e consideradas e, devido às modificações genéticas que produzem frutas enriquecidas diferentemente, a possibilidade de diferentes manipulações (por meio de programas tradicionais ou avançados de melhoramento biotecnológico ou manipulações genéticas) poderiam ser uma ferramenta poderosa para modificar conteúdo de antioxidante das frutas.

GIL *et al.* (2002) compararam o teor de fenólicos totais, atividade antioxidante, vitamina C e  $\beta$ -caroteno em pêssegos e nectarinas que pertencem à mesma espécie (*Prunus persica* L. Batsh), mas de diferentes variedades botânicas (*vulgaris* e *nucipersica*, respectivamente) e ameixas que pertencem ao mesmo gênero (*Prunus*). Os resultados demonstraram diferenças significativas nos compostos analisados e na atividade antioxidante entre as espécies diferentes, mas de mesmo gênero, entre as variedades da mesma espécie e entre os tecidos da planta.

A interação destes diferentes fatores determinantes da capacidade antioxidante de uma fruta deveria ser melhor esclarecida para caracterização agrônômica do produto e maiores informações ao consumidor (SCALZO *et al.*, 2005).

Recentemente, têm-se verificado um aumento na atenção dos consumidores por aspectos nutricionais e de saúde (conteúdo de vitaminas, elementos minerais, antioxidantes, etc.) de produtos hortícolas (CARBONARO *et al.*, 2002; SCALZO *et al.*, 2005) e esta demanda têm estimulado pesquisadores a desenvolverem seleções de plantas com maiores capacidades antioxidantes e nutracêuticas que o normal (CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2005).

Entre os compostos com atividade antioxidante sob estudos em diversos centros de pesquisa estão os compostos fenólicos, que constituem um grande e heterogêneo grupo de metabólitos secundários de plantas que são amplamente distribuídos no Reino Vegetal (RABABÁH *et al.*, 2005) e podem ser sintetizados em resposta ao *stress* ambiental (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Possuem uma larga variedade de estruturas e são importantes em termos de aparência visual (pigmentação e escurecimento), sabor (adstringência) e propriedades promotoras de saúde (eliminação de radicais livres) (BARBERÁN *et al.*, 2001). Os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos são os principais representantes deste grupo de compostos (RABABÁH *et al.*, 2005).

Investigações sobre a característica estrutural dos compostos que contribuem para esta atividade têm sido investigadas (KROL *et al.*, 1994; FOTI *et al.*, 1996; OM *et al.*, 2008). De modo geral, os compostos fenólicos e, em particular os flavonóides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e carotenóides (GIL *et al.*, 2002). Entretanto, devido à diversidade estrutural dos flavonóides, KROL *et al.* (1994) avaliaram a inibição da quimiluminescência por 14 flavonóides com diferentes substituintes e graus de substituição com o objetivo de estabelecer uma relação estrutura-atividade para esta classe de compostos. Estes autores atribuíram a maior inibição da quimiluminescência às seguintes características químicas dos flavonóides: hidroxila na posição três, duas hidroxilas no anel fenil e ligação dupla entre os carbonos dois e três.

Informações disponíveis sobre o conteúdo de compostos fenólicos em frutas não são sempre completas e muitas vezes são restritas a poucas cultivares ou a um grupo específico de compostos fenólicos, justificando a pesquisa nesta área (BARBERÁN *et al.*, 2001). Há alguns anos, percebe-se o interesse em estudar frutas vermelhas como morango, amora, mirtilo devido a sua riqueza em compostos fenólicos. Entretanto, poucas pesquisas com frutíferas como pêssego, pêra e caqui são realizadas.



### 3.12 Medida da atividade antioxidante

Várias formas de avaliar a atividade antioxidante de frutas, vegetais e fluidos biológicos estão descritas na literatura. KIM *et al.*, (2003), LEE *et al.*, (2003) e SCALZO *et al.* (2005) avaliaram a capacidade antioxidante de frutas utilizando o reagente 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) que é alterado a sua forma de radical monocatiônico colorida (ABTS<sup>+</sup>) por um agente oxidante e esta forma é lida a 734 nm. A adição de antioxidantes reduz a forma catiônica ABTS<sup>+</sup> à sua forma incolor. A extensão de descoloração como porcentagem de inibição de ABTS<sup>+</sup> é determinada como função da concentração e calculada em relação à reatividade do Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E.

BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), GIL *et al.* (2002), CEVALLOS-CASALS *et al.* (2005), FATTOUCH *et al.* (2008) avaliaram a capacidade antioxidante de frutas através da descoloração do DPPH<sup>+</sup> (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), verificada através do decréscimo da absorvância a 515 nm após adição das amostras antioxidantes.

KALT *et al.* (1999), WANG; LIN (2000), KAYANO *et al.* (2002) e RABABAH *et al.* (2005) avaliaram a atividade antioxidante de frutas vermelhas pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). O índice ORAC depende do dano que radicais livres produzem a um padrão fluorescente, tal como fluoresceína, resultando em uma diminuição da intensidade fluorescente, de forma que o grau de alteração é indicativo da quantidade de dano do radical. A presença de antioxidantes resulta na inibição do dano pelos radicais ao composto fluorescente, ocorrendo a preservação da fluorescência original.

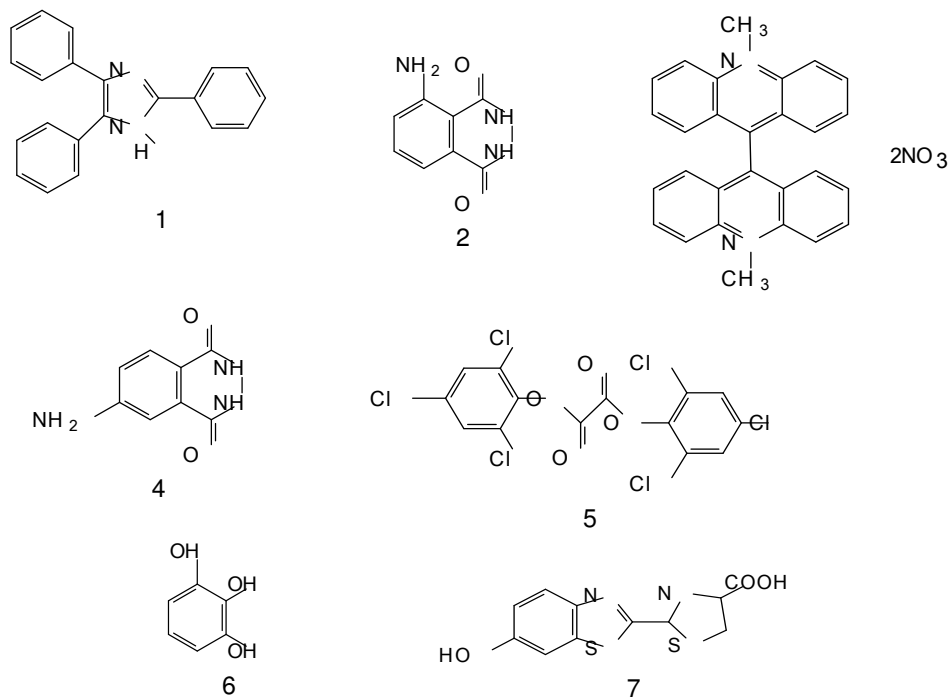
Um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante, de fluidos biológicos, é baseado na quimiluminescência (WAYNER *et al.*, 1985; LISSI *et al.*, 1992; LISSI *et al.*, 1995; HIRAYAMA; TAKAGI, 1997; VISIOLI & GALI, 1997; BAEYENS *et al.*, 1998; DESMARCHELIER *et al.*, 1998; DESMARCHELIER *et al.*, 1999; NGUYEN-KHOA *et al.*, 1999; PASCUAL *et al.* 1999; KRASOWSKA *et al.*, 2000; MARIA *et al.*, 2000; GARCÍA-CAMPAÑA & BAEYENS, 2000; EVELSON *et al.*, 2001; GIROTTI *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2003; CHING *et al.*, 2006; FEDOROVA *et al.*, 2007). Quimiluminescência é a produção de radiação luminosa

eletromagnética (inclusive ultravioleta e infravermelho) por uma reação química. O processo químico de quimiluminescência envolve a absorção, pelos reagentes, de energia suficiente para geração de um complexo ativado, o qual se transforma em um produto eletronicamente excitado, emitindo luz (NERY; BAADER, 2001). A aplicação da quimiluminescência para avaliação do potencial antioxidante de extratos vegetais é menos comum em relação aos demais métodos citados (DESMARCHELIER *et al.*, 1998; DESMARCHELIER *et al.*, 1999), apesar de ser considerado um método simples, sensível e reprodutível (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

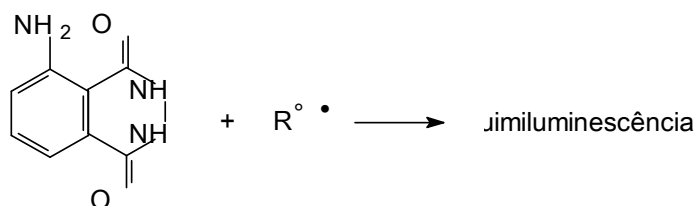
O fenômeno luminescente é conhecido há muito tempo na natureza e as primeiras observações foram relacionadas principalmente a organismos vivos que emitem luz como vaga-lumes, bactérias luminosas, fungos, peixes ou insetos. O fenômeno quimiluminescente como emissão de luz produzida em um meio sintético foi observado pela primeira vez por Radziszewski em 1877 (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000), mas o termo “quimiluminescente” somente foi introduzido em 1888 por Wiedemann com a seguinte definição: “quimiluminescência é a emissão de luz que ocorre junto a processos químicos” (FERREIRA; ROSSI, 2002). Substâncias como luminol, lucigenina, isoluminol, etanodioato de bis (2,4,6-triclorofenila), pirogalol e luciferina participam como substratos de reações quimiluminescentes (Figura 5).

Em solução, a quimiluminescência pode ser empregada em várias análises, como para determinação de íons metálicos, ânions inorgânicos, biomoléculas, substâncias carcinogênicas e drogas em diferentes matrizes ambientais e clínicas (ROBARDS; WORSFOLD, 1992).

Uma das reações mais aplicadas em métodos analíticos envolvendo quimiluminescência é a oxidação do luminol em meio alcalino, cujo mecanismo reacional foi proposto por alguns autores (ROBARDS; WORSFOLD, 1992; ALBERTIN *et al.*, 1998; GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000) (Figura 6).



**Figura 5:** Exemplos de compostos que participam como substratos de reações quimiluminescentes: 1-lofina, 2-luminol 3-lucigenina, 4-isoluminol, 5-etanodioato de bis (2,4, triclórofenila), 6-pirogalol, 7-luciferrina. Fonte: FERREIRA; ROSSI (2002).

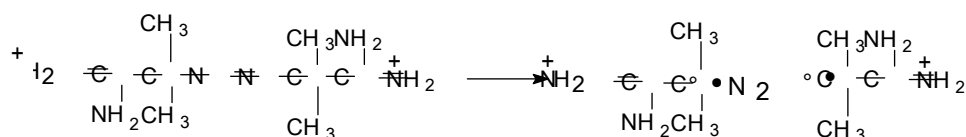


**Figura 6:** Reação de radicais livres com luminol com emissão de luz. Fonte: DAVIJANI (2005).

A quimiluminescência permite, não somente, a avaliação dos produtos finais da reação de constituintes celulares com radicais livres, mas também a observação da cinética da reação. A maioria dos métodos quimiluminescentes usa poucos componentes químicos, os quais são excitados pela reação com radicais, e tem uma emissão de luz amplificada. O luminol é muitas vezes usado com fonte de luz após a

excitação por diferentes tipos de radicais livres, incluindo radicais peróxil (KRASOWSKA *et al.*, 2000).

As fontes geradoras de radicais livres mais utilizadas são o AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro) (KRASOWSKA *et al.*, 2000; POLYDORO *et al.*, 2004) (Figura 7) e o ABAP (2,2'-Azo-bis(amidinopropano) (WAYNER *et al.*, 1985; LISSI *et al.*, 1992; GHISELLI *et al.*, 1995; LISSI *et al.*, 1995; MARIA *et al.*, 2000; KRASOWSKA *et al.*, 2000) sendo que KRASOWSKA *et al.* (2000) mostraram resultados semelhantes com o uso destes dois geradores de radicais livres.

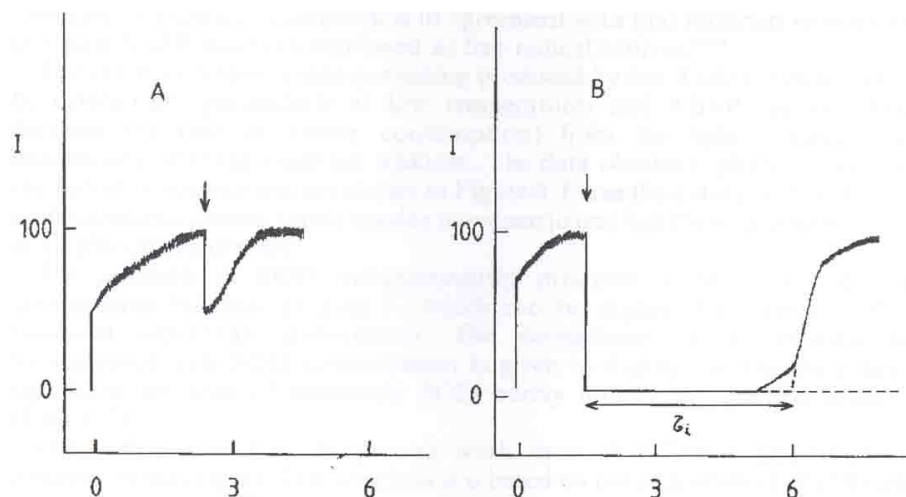


**Figura 7:** Estrutura química do AAPH e, após termólise, com geração de dois radicais e nitrogênio. Fonte: KRASOWSKA *et al.* (2000).

Quando o luminol é incubado na presença de uma fonte de radical livre, uma quimiluminescência constante é observada, a qual pode ser diretamente relacionada à taxa de oxidação do luminol. A adição de substâncias sequestrantes de radicais livres reduz esta intensidade. O tempo para recuperar a luminescência (a certa porcentagem do valor inicial) é relacionado à quantidade total de antioxidantes presentes na amostra adicionada e é chamado tempo de indução, que pode ser comparado com o tempo de indução do padrão trolox, obtendo-se o valor de TRAP para amostras expressos em equivalentes de trolox (DE PEREZ *et al.*, 2000) (Figura 8).

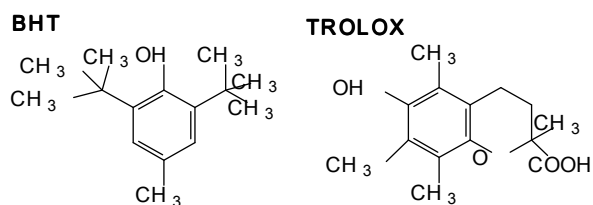
A termólise do AAPH (2,2'-Azo-bis(amidinopropano) induz a luminescência do luminol. A intensidade da luminescência é sequestrada por enzimas como SOD ou por compostos como trolox, butilhidroxitolueno (BHT), compostos fenólicos ou por soro sanguíneo humano. A duração e o perfil deste sequestro é diferente para os diferentes aditivos. Para o trolox, a diminuição da quimiluminescência é imediata,

mas a eficiência deste sequestro decresce com o tempo, ou seja, a ação sequestrante do trolox não é duradoura (LISSI *et al.*, 1992).



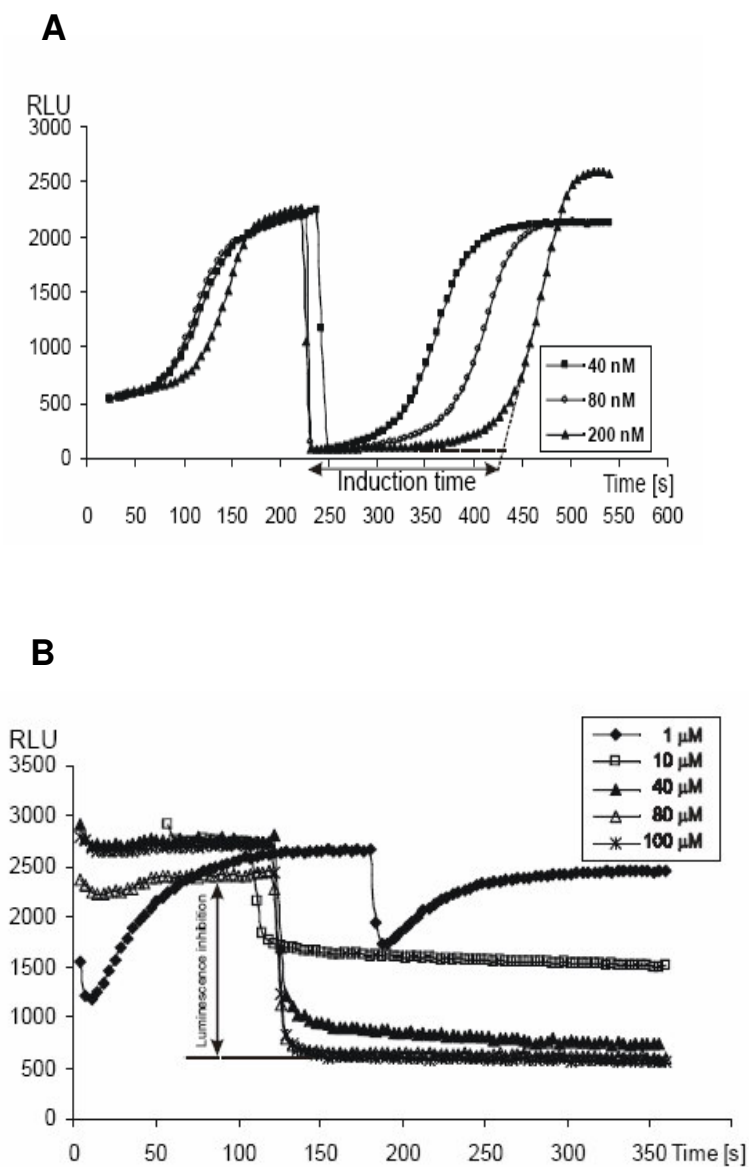
**Figura 8:** Perfil da intensidade da luminescência do luminol após adição de trolox ( $\downarrow$ ): (A) 10 nM; (B) 400 nM. Tempo de indução ( $\tau_i$ ) avaliado por extrapolação ao zero de uma reta que tangencia a curva do consumo do trolox. Fonte: LISSI *et al.* (1992).

KRASOWSKA *et al.* (2000) avaliaram o comportamento antioxidante de trolox e BHT e perceberam que, apesar de possuírem anel fenólico com substituinte OH (Figura 9), o tempo de indução do trolox aumenta linearmente com a concentração, mas este comportamento não se repete com o BHT onde não se verificou esta linearidade (Figura 10).



**Figura 9:** Estrutura química do BHT e trolox. Fonte: KRASOWSKA *et al.* (2000).

Neste mesmo trabalho realizado por KRASOWSKA *et al.* (2000), foi verificado que a intensidade da quimiluminescência do luminol aumenta com o pH. Abaixo de pH 7,0, a luminescência está em um nível bastante baixo e que na faixa de pH entre 7,0 e 10,5, a intensidade de luz aumenta linearmente.



**Figura 10:** Perfil da intensidade da quimiluminescência após adição de trolox (A) e BHT (B). Fonte: KRASOWSKA *et al.* (2000); RLU:Unidade relativa de luz

Apesar de largamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de plasma (WAYNER *et al.*, 1985; VISIOLI; GALLI, 1997; NGUYEN-KHOA *et al.*, 1999;

PASCUAL; REINHART, 1999; GIROTTI *et al.*, 2002), homogenatos (EVELSON *et al.*, 2001), extratos vegetais (DESMARCHELIER *et al.*, 1998; DESMARCHELIER *et al.*, 1999) ou compostos isolados (LISSI *et al.*, 1994; BASTOS *et al.*, 2003), o método de avaliação incluindo a obtenção do tempo de indução apresenta algumas limitações, pois torna-se restrito a amostras com comportamentos específicos. Assim, uma nova forma de avaliação deste método amplamente empregado torna-se de extrema importância, a fim de possibilitar a avaliação do potencial antioxidante independente do perfil quimiluminescente gerado pela amostra adicionada ao sistema gerador de radical livre.

Enquanto o TRAP mede o tempo que a amostra ou o padrão mantém o seqüestro do radical livre, o índice TAR reflete a capacidade e rapidez de uma substância ou de uma mistura delas em participar do processo de transferência de elétrons aos radicais derivados do luminol (DESMARCHELIER *et al.*, 1998), ou seja, mede a capacidade em reagir frente a uma situação de aumento de radicais livres.

## **CAPÍTULO I**

**Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential (artigo publicado na Revista *Analytical Biochemistry*, v. 385, p. 107-114, 2009)**



## **CAPÍTULO II**

**Antioxidant Potential of peels and  
fleshes of peaches from different  
cultivars of peach.**

**(Artigo aceito para publicação no  
*Journal of Medicinal Food*, DOI:  
10.1089/jmf.2008.0267)**

19-Dec-2008

Dear Dr. Rossato:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Antioxidant potential of peels and fleshes of peaches from different cultivars." in its current form for publication in Journal of Medicinal Food.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101. If you prefer to send the copyright form via e-mail please send to [ebicovny@liebertpub.com](mailto:ebicovny@liebertpub.com). Do NOT email these forms to the Editorial office.

Authors who would like their papers to be posted on PMC immediately have the option to make their articles available free on line via Liebert Open Option for a one-time fee. Please contact Karen Ballen at [kballen@liebertpub.com](mailto:kballen@liebertpub.com) or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Medicinal Food, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Sheldon Hendler, Ph.D., M.D.  
Editor-in-Chief, Journal of Medicinal Food  
[shendler@ucsd.edu](mailto:shendler@ucsd.edu)

### **CAPÍTULO III**

**Development and validation of a LC-method for determination of chlorogenic acid in peach (*Prunus persica* L. Batsh.) (artigo a ser submetido ao *Journal of Agricultural and Food Chemistry*)**

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método TRAP, utilizando a área sob a curva (AUC), validado nesse trabalho para a avaliação do potencial antioxidante de extratos contendo diversos compostos mostrou ser uma importante ferramenta para avaliação da atividade “scavenger”, independente do perfil quimiluminescente gerado pela amostra. Os extratos de cascas, polpas e compotas de pêssegos, por apresentarem diversos compostos capazes de sequestrar os radicais livres, foram avaliados quanto ao potencial antioxidante, através da AUC. Os valores de AUC demonstraram que as cascas apresentam capacidade antioxidante significativamente maior em relação às polpas e isto pode ser resultado do maior teor de ácido clorogênico nas cascas e da presença de flavonóides antioxidantes nas cascas. Entretanto, considerando-se que muitos consumidores eliminam a casca no momento do consumo e que a polpa representa cerca de 70% do fruto, o teor de ácido clorogênico consumido é proporcionalmente maior ao ingerir a polpa. Verificou-se que o composto majoritário (ácido clorogênico) isolado contribui para a atividade antioxidante. Entretanto, a ação não é duradoura como nos extratos do fruto, pois esses contêm outros antioxidantes que mantêm a ação por um tempo significativamente maior. Esse fato sugere que o consumo de frutas e vegetais contendo antioxidantes apresenta maior benefício em relação à ingestão de cápsulas contendo o antioxidante de forma isolada.

O pêssego é uma fruta de alto metabolismo pós-colheita, apresentando uma vida útil curta. Assim, o processamento dessa fruta é uma alternativa para proporcionar a oferta o ano todo. O pêssego em calda é a principal forma de processamento no Rio Grande do Sul e, apesar de apresentar um alto consumo *per capita* em outros países, é pouco consumido no Brasil, apesar da produção de mais de 40.000.000 de latas por ano. As indústrias da região de Pelotas, principal pólo produtor do país, reduzirão a aquisição de pêssegos para industrialização em torno de 40% na próxima safra, o que acarretará problemas para os produtores e para a indústria, pois essa é a fonte de renda de muitas famílias na região. Os resultados quanto à atividade antioxidante nas compotas poderia ser uma alternativa de estimular o consumo desse produto. A diminuição de cerca de 15% do ácido clorogênico nas polpas após o processamento pode não representar uma perda, pois provavelmente esse composto migrou para a água da calda e o consumo do pêssego é, na maioria das vezes, realizado com a calda.

As cascas de pêssego deveriam ser consumidas ou aproveitadas, uma vez que são descartadas nas indústrias que processam essa fruta. O fato de as indústrias removerem a casca com vapor de soda inviabiliza essa utilização, mas muitas famílias realizam esse processo de forma manual, o que possibilitaria o aproveitamento da casca. Os resultados cromatográficos demonstraram a presença de flavonóides importantes na casca que, devido a sua estrutura química, podem atuar na inibição da propagação da reação radicalar por doação de prótons, mas também podem inibir a iniciação da reação, através da quelatação de metais iniciadores das reações, tornando-os mais efetivos em relação aos antioxidantes sintéticos.

## 5 CONCLUSÃO

- 1) O método TRAP utilizando a AUC é uma importante ferramenta para avaliação do potencial antioxidante de misturas complexas, sem a limitação do perfil quimiluminescente;
- 2) O método TRAP utilizando a AUC é mais preciso em relação ao método original utilizando o tempo de indução.
- 3) A ação antioxidante de frutas é mais duradoura do que a de um composto isolado que apresenta atividade antioxidante.
- 4) Existe diferença nos teores de ácidos fenólicos entre cultivares de pêssegos e entre seus tecidos.
- 5) As cascas de pêssego apresentam maior atividade antioxidante em relação às polpas e podem ser usadas como fonte de antioxidantes na dieta e na indústria uma vez que são sub-produtos da indústria de compotas.
- 6) O pêssego apresenta importante atividade antioxidante e pode ser uma forma de benefício à saúde para consumidores dessa fruta.
- 7) As compotas possibilitam o consumo do pêssego durante todo o ano, mantendo importante atividade antioxidante após o processamento.

## **6 PERSPECTIVAS**

- 1) Quantificar os flavonóides identificados em diferentes cultivares e tecidos de pêssegos.
- 2) Avaliar a contribuição dos flavonóides identificados ao potencial antioxidante e à reatividade antioxidante.
- 3) Identificar os taninos presentes nas amostras e avaliar a contribuição destes à atividade antioxidante.
- 4) Avaliar o efeito de outras formas de processamento sobre a composição química de pêssegos.

## 7 REFERÊNCIAS

ACHESON, R. M.; WILLIAMS, D. R. R. Does consumption of fruit and vegetables protect against stroke? **Lancet**, v.321, n.8335: p.1191-1193, 1983.

AGAPOMI. Arte de comercializar-cooperativa comercial e creditícia. Disponível em [www.agapomi.com.br](http://www.agapomi.com.br). Acesso em 08/07/2009.

ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M. A.; BASTOS, E. L.; RÖPKE, E.; SAKAI, P. N.; SANCHES, A. M. M.; STEVANI, C. V.; UMEZU, I. S.; YU, J.; BAADER, W. J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. **Química Nova**, v. 21: p. 772-782, 1998.

ARMSTRONG, B. K.; MANN, J. I.; ADELSTEIN, A. M.; ESKIN, F. Commodity consumption and ischemic heart disease mortality with special reference to dietary practices. **Journal of Chronic Diseases**, v.28: p. 455-469, 1975.

BARBOSA, W.; OJIMA, M.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; RIGITANO, O.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; CASTRO, J.L. Melhoramento do pessegueiro para regiões de clima subtropical-temperado: realizações do Instituto Agrônomo no período de 1950-1990. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. 22p. (Documentos IAC, 52).

BARBOSA, W., CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; SAMPAIO, V. R.; BANDEL, G. Ecofisiologia do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do pessegueiro em região subtropical. Disponível em <http://www.iac.br/fruticultura>. Acesso em 11/10/2005.

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.

BIASI, Luis Antonio; ZANETTE, Flávio; PETRI, Jose Luiz; MARODIN, Gilmar Arduino Bettio. **CULTIVARES DE FRUTEIRAS DE CAROÇO**. In: MONTEIRO, Lino Bittencourt; MIO, Louise Larissa May de; SERRAT, Beatriz Monte; MOTTA, Antonio Carlos Vargas; CUQUEL, Francine Lorena. (Org.). FRUTEIRAS DE CAROÇO. Curitiba PR, 2004, v. 1, p. 05-32.

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

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura. **Portaria n° 274**, de 05.12.1983.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n° 19**, de 30.4.1999.

BRUULSEMA, T. W.; PALIYATH, G.; SCHOFIELD, A.; OKE, M. Phosphorus and phytochemicals. **Better crops**, v. 88, n.2: p. 6-8, 2004.



BUSSI, C.; BESSET, J.; GERARD, T. Effects of fertilizer rates and dates of application on apricot (cv. Bergeron) cropping and pitburn. **Science Horticultural**, v.98: p. 139-147, 2003.

CARBONARO, M.; MATTERA, M.; NICOLI, S.; BERGAMO, P.; CAPPELLONI, M. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50: p.5458-5462, 2002.

CITADIN, I.; RASEIRA, M. C. B.; HERTER, F. G. Avaliação da necessidade de frio em pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24: p. 703-706, 2002.

CHEN, L. G.; YANG, L.L.; WANG, C.C. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46:p.688-693, 2008.

CHOMNAWANG, M.T.; SAKAGAMI, S.S.; NUKOOLKARN, V.S.; GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101:p.330-333, 2005.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900 -2911, 2003.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10. ed. Porto Alegre, 2004. 400p.

DE PEREZ, D.; LEIGHTON, F.; ASPEE, A.; ALIAGA, C.; LISSI, E. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. **Biological Research**, v. 33, n.2: p. 71-77, 2000.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K. K.; LIU, R. H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50: p.3010-3014, 2002.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11: p. 81-128, 1991.

EVANS, C. A. R.; MILLER, J. N.; PAGANGA, J. Structure-activity antioxidant relationship of flavonoids and fenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. Evaluation of total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, n. 2: p. 261-266, 2001.

FAO. Melocotones y nectarinas: producción, área y rendimiento. 2007. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/site/408/DesktopDefault.aspx?PageID=408>> . Acesso em: 26 mar. 2007.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18: p. 23-36, 2006.

FERREIRA, E.; ROSSI, A. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6: p. 1003-1011, 2002.

FOTI, M.; PIATELLI, M.; BARATTA, M. T.; RUBERTO, G. Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidant in a micellar system. Structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44: p.497-501, 1996.

GIL, M. I., BARBERÁN, F. A. T., HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50: p.4976-4982, 2002.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7: p. 601-617, 1995.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16: p.845-850, 1994.

HOLLMAN, P. C. H. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.

HUDSON, B. J. F., Ed. Food Antioxidants, Elsevier Applied Science: London, 1990)

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9: p. 2489-2491, 1987.

IBGE, Produção Agrícola Municipal. Disponível em <http://www.scp.rs.gov.br>. Acesso em 3/10/2005.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis, v. 24: p. 1071-1082, 1986.

KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; FUKUTSUKA, N.; MITANI, T.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of Prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50: p. 3708-3712, 2002.

LIU, R. H. Supplement quick fix fails to deliver. **Food Technology International**, v. 1: p. 71-72, 2002.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative Activity of Spices Extracts. In: RISCH, S. J. e HO, C. (Ed) Spices: Flavor Chemical Society and Antioxidant Properties. Washington: American Chemical Society, p. 176-187, 1997.

MALTZMAN, T. H.; HURT, L. M.; ELSON, C. E.; TANNER, M. A.; GOULD, M. N. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by D-limonene and orange oil. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 781-783, 1989.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113: p. 1370-1376, 2009.

MATHIAS, C.; MAYER, N. A.; MATTIUZ, B.; PEREIRA, F. M. Efeito de porta-enxertos e espaçamentos entre plantas na qualidade de pêssegos Aurora 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n.1: p. 165-170, 2008.

MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília. Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CAPCT, 1998.

MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. **Aspectos da produção e mercado do pêssego no Brasil**. Embrapa-CAPCT, Circular Técnica, 2008.

MIYASE, T.; SANO, M.; NAKAI, H.; MURAOKA, M.; NAKAZAWA, M.; SUZUKI, M.; YOSHINO, K.; NISHIHARA, Y.; TANAI, J. Antioxidants from *Lespedeza homoloba*. (I). **Phytochemistry**, v. 52: p.303-310, 1999.

NGUYEN-KHOA, T.; MASSY, Z.; WITKO-SARSAT, V.; THÉVENIN, M.; TOUAM, M.; LAMBREY, G.; LACOUR, B.; DRUEKE, T.; LATSCHA, D. Critical evaluation of plasma and LDL oxidation-trapping potential in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 56: p. 747-753, 1999.

NERY, A. L. P.; BAADER, W. J. Chemiluminescence of cyclic organic peroxides: generation of electronically excited states in 1,2-dioxetane decomposition, **Química Nova**, v. 24, n. 5: p. 626-636, 2001.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C. R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, v. 114: p. 71-74, 1997.

OM, A.; KIM, J. H. A quantitative structure-activity relationship model for radical scavenging activity of flavonoids, **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n.1: p. 29-37, 2008.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 1998. 481 p.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2002. 435 p.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2003. 544 p.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2007. 516 p.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2008. 502 p.

PÊSSEGO: In **AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2009. 522 p.

RABABAH, T.; EREIFEJ, K. I.; HOWARD, L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentration of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53: p.4444-4447, 2005.

RANSLEY, J. K.; DONNELLY, J. K.; READ, N. W. **Food and nutritional supplements: their role in health and disease**. Berlim: Springer-Verlag, 2001.

RASEIRA, M. C. B.; QUEZADA, A. C. **Pêssego. Produção: aspectos técnicos** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de tecnologia, 2000.

RASEIRA, M.C.B. Melhoramento do pessegueiro. Núcleo de estudos em genética. Universidade Federal de Lavras do Sul. Disponível em <http://www.nucleoestudo.ufla.br>. Acesso em 29/09/2005, 2000.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2: p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. **Analytical Chimica Acta**, v. 266: p.147-173, 1992.

RUSTERUCCI, C.; MONTILLET, J. L.; AGNEL, J. P.; BATTESTI, C., ALONSO, B.; KNOLL, A. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274: p. 36446-36455, 1999.

SATO, G. S. Produção de pêssegos de mesa e para indústria no Brasil. Informações econômicas, São Paulo, v.31, p. 61-63, 2001.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v.44: p.158-163, 2000.

SINGH, R. P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. **Drugs Aging**, v.18, n. 9: p. 685-716, 2001.

SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of angina: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33: p. 575-586, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Armed Editora, 2004.

XUE, B.; LI, Jx.; CHAI, Q.; LIU, Zx. ; CHEN, Lb. Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats. **Phytomedicine**, v.15: p. 759-762, 2008.

WANG, H.; CAO, G. H.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44: p.701-705, 1996.

WANG, S. Y.; LIN, H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48: p. 140-146, 2000.

WANG, H.; ZHAO, M.; YANG, B.; JIANG, Y.; RAO, G. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v.107: p.1399-1406, 2008.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.51:p. 609-614, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003.