

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR
DE FRUTOS E FOLHAS DO PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

CRISTIAN DA SILVA PORTO

Montes Claros, Minas Gerais

2008

Cristian da Silva Porto

**Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do
pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

Orientador:
Prof. Dr. Geraldo Aclécio Melo

Co-orientadores:
Prof. Dr. Dario Alves de Oliveira
Prof. Dr. Henrique Maia Valerio

Montes Claros, Minas Gerais
2008

Agradecimentos

À Deus por proporcionar novas descobertas em sua rica natureza.

Aos meus familiares por acreditarem e apoiarem meu trabalho.

À Universidade Estadual de Montes Claros.

Ao Professor, orientador Dr. Geraldo Aclécio Melo pela paciência, confiança e ensinamentos fundamentais para a estruturação e finalização deste projeto.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Botânica, Microbiologia e Biotecnologia da Unimontes, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Aos professores Dario Alves de Oliveira e Henrique Maia Valério pela cooperação e atenção.

Aos demais Professores do Curso de Pós Graduação.

Aos meus amigos pelas orações e apoio.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PORTO, Cristian da silva. Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Montes Claros, 2008.

O *Caryocar brasiliense* Camb., da família Caryocaraceae, conhecido popularmente por pequi, é encontrado em quase todo o Cerrado brasileiro, sendo sua principal utilização na culinária e na indústria agrícola para extração de óleos e produção de licores. Contudo, novas pesquisas têm revelado sua importância farmacológica e nutricional dado seu alto teor de compostos antioxidantes. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante de extratos feitos à base de frutos e folhas do pequi, considerando a maneira de obtenção dos antioxidantes e o tipo de princípio ativo responsável por essa ação. Para isso, foram feitas extrações em amostras secas de folhas, mesocarpo e polpa, com a utilização de hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada. Foi realizado fracionamento do extrato etanólico com a utilização de hexano, éter de petróleo e clorofórmio. Em cada extrato foram obtidos os rendimentos e foi avaliada a atividade antioxidante. Em cada fração foram quantificados os níveis de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos e carotenóides, além da atividade antioxidante. Também foram construídos perfis cromatográficos em HPLC de cada fração. Conforme resultados, a atividade antioxidante nas partes estudadas pode ser recuperada nos diferentes solventes utilizados, sendo melhor em etanol, metanol e água destilada. Maiores rendimentos de extratos foram obtidos com etanol e metanol para folha e mesocarpo e com clorofórmio e acetato de etila para a polpa. O extrato etanólico apresentou níveis de compostos fenólicos de 255,24, 265,48 e 9,01 mg/g, de flavonóides de 143,56, 164,23 e 2,23 mg/g, de carotenóides de 421,65, 243,38 e 40,72 µg/g, respectivamente, para frações secas dos extratos de folha, mesocarpo e polpa. Taninos foram observados em baixas concentrações na folha e polpa. Observou-se também relação direta entre níveis de flavonóides, carotenóides e atividade antioxidante nas frações estudadas. Pode-se concluir que a atividade antioxidante do pequi é melhor recuperada em solventes mais polares, sendo indicado o etanol como bom solvente de extração e que provavelmente flavonóides e carotenóides são as principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante do pequi.

Palavras chave: *Caryocar brasiliense* Camb.; pequi, atividade antioxidante, antioxidantes; análise fitoquímica.

ABSTRACT

PORTO, Cristian da Silva. **Antioxidant potential of extracts obtained from fruit and leaves of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).**

The *Caryocar brasiliense* Camb., family Caryocaraceae, known popularly by pequi, is found in almost all the Brazilian Cerrado, with its main use in cooking and in the agricultural industry for oil extraction and production of liqueurs. New research has revealed its pharmacological and nutritional importance given its high content of antioxidant compounds. In this work, it was aimed to assess the potential of antioxidant extracts made from fruit and leaves of pequi, considering the way of obtaining the antioxidants and active principle responsible for this action. For this, extractions were performed on samples of dried leaves, mesocarp and pulp, using hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol and distilled water. Fractionation of ethanol extract was carried out using hexane, petroleum ether and chloroform. In each extract were obtained income and was assessed the antioxidant activity. In each fraction were quantified the levels of total phenolic compounds, total flavonoids, tannins and total carotenoids in addition to the antioxidant activity. It was built in HPLC chromatographic profiles of each fraction. As results, the antioxidant activity can be recovered in different solvents used, and better in ethanol, methanol and distilled water. Higher yields are obtained with extracts of ethanol and methanol for sheet and mesocarp and with chloroform and ethyl acetate to the pulp. The ethanol extract showed levels of phenolic compounds, 255.24, 265.48 and 9.01 mg/g, flavonoids, 143.56, 164.23 and 2.23 mg/g, carotenoids, 421.65, 243.38 and 40.72 µg/g, respectively, for fractions of extracts of dried leaf, mesocarp and pulp. Tannins were found in low concentrations in sheet and pulp. There was a direct relationship between levels of flavonoids, carotenoids and antioxidant activity in fractions studied. In conclusion, the antioxidant activity of pequi is better restored in most polar solvents, and indicated the ethanol as a good solvent for extraction. Probably flavonoids and carotenoids are the main substances responsible for the antioxidant activity of pequi.

Key-word: *Caryocar brasiliense* Camb; pequi, antioxidant activity, antioxidantes; phytochemical analysis.

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	03
2.1. Coleta do material vegetal	03
2.2. Preparo das amostras.....	03
2.3. Preparo dos extratos	04
2.4. Quantificação do rendimento dos extratos	04
2.5. Avaliação da atividade antioxidante	04
2.6. Fracionamento do extrato etanólico	05
2.7. Quantificação dos rendimentos e atividades antioxidantes das frações dos extratos etanólicos	07
2.8. Estudo fitoquímico das frações dos extratos etanólicos	07
2.9. Perfil cromatográfico das frações dos extratos etanólicos	08
2.10. Análise dos dados.....	09
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	09
3.1. Recuperação da atividade antioxidante em folhas e frutos do pequi	09
3.2. Estudo fitoquímico associado à atividade antioxidante em folhas e frutos do pequi	10
3.3. Perfil cromatográfico das frações	12
4. CONCLUSÃO	13
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1: Esquema do procedimento de fracionamento dos extratos etanólicos de folha, mesocarpo e polpa do pequi usando hexano, éter de petróleo e clorofórmio.	14
Figura 2: Rendimentos dos extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) obtidos com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada. Dados em % da massa seca. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).....	15
Figura 3: Atividade antioxidante dos extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.), obtidos com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).	16
Figura 4: Atividade antioxidante em extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) em função da polaridade do solvente de extração.	17
Figura 5: Rendimento das frações do extrato etanólico de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.). (He) - hexano, (Éter) – éter de petróleo, (Cl) – clorofórmica e (Et) – etanol. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).	18
Figura 6: Atividade antioxidante das frações do extrato etanólico de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.). (He) - hexano, (Éter) – éter de petróleo, (Cl) – clorofórmica e (Et) – etanol. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).	19

Figura 7: Atividade antioxidante em função da concentração da fração (■ - Etanólica e ♦ - Clorofórmica.) dos extratos etanólicos de folha (A), mesocarpo (B) e polpa (C) do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.). (D)=atividade antioxidante em função da concentração de quercetina	22
Figura 8: Correlação entre níveis de flavonóides totais (A, B e C) e carotenóides totais (D, F e G) e, atividade antioxidante das frações (■ - Etanólica e ♦ - Clorofórmica.) dos extratos etanólicos de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	23
Figura 9: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico de folhas do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.)	
Figura 10: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico do mesocarpo do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	24
Figura 11: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico do mesocarpo do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	25
Figura 12: Perfil cromatográfico das frações etanólica e clorofórmica do extrato etanólico de folha (A e E), mesocarpo (B e F) e da polpa (C e G) do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.)	26

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Concentração eficiente (CE_{50}) das frações clorofórmica e etanólica do extrato etanólico de folhas, mesocarpo e polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) em comparação ao flavonóide quercetina.....	20
Tabela 2: Níveis de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos, caratenóides totais por grama de fração e atividade antioxidante nas frações hexânica, etérea, clorofórmica e etanólica do extrato etanólico de folha, mesocarpo e polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	21

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Caryocar brasiliense*, da família Caryocaraceae, é conhecido popularmente por pequi, piqui (do tupi, Pyqui, “py” casca e “qui” espinho), piquiá-bravo, amêndoia-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim e suari (SILVA et al., 2001). Abrange todo o Cerrado brasileiro, sendo encontrado principalmente em regiões de cerradão, cerrado denso, cerrado ralo, com distribuição nos Estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (ALMEIDA et al., 1998).

É uma planta semidecídua, heliófita e seletiva xerófita, de formações primárias e secundárias (SANTOS et al, 2004). Suas árvores podem atingir até dez metros, seus troncos são retorcidos, as raízes pivotantes e profundas, o que lhe permite desenvolver em solos rasos, arenosos e pobres em nutrientes, sendo encontrado em regiões semi-áridas e montanhosas (ANTUNES et al., 2004).

O pequizeiro floresce durante os meses de agosto a novembro, com os frutos iniciando a maturação em meados de novembro, podendo ser encontrados até início de fevereiro (ALMEIDA et al., 1998). As flores são normalmente branco-amareladas do tipo pincel (estames), polinizadas por morcegos e insetos. A frutificação ocorre entre novembro a fevereiro (VERA et al., 2005; SANTOS et al., 2004). O fruto é composto por três partes básicas: a casca, porção externa, grossa e esverdeada; o mesocarpo, parte menos consistente, de coloração verde claro, ficando entre a casca e o endocarpo; e o endocarpo, separado em três porções, a polpa (ou putâmens) de coloração amarelada, recobrindo o caroço; o endocarpo espinhoso e, mais internamente, a amêndoia (VIEIRA et al., 2005; MATOS, 2007).

A principal exploração do pequi é o uso de seus frutos na culinária e na indústria agrícola para extração de óleos e produção de licores. Entretanto, são inúmeras as aplicações do fruto, da casca, do óleo, do caule, da flor e das folhas desta planta. Possui madeira de ótima qualidade, pesada e de boa durabilidade, podendo ser empregada como lenha, matéria prima para xilografia, construção civil e naval, dormentes, fabricação de móveis e fonte de carvão. Sua casca é útil na fabricação de tinta, fornecendo amarelo-castanho, usado pelos tecelões em curtumes (BRANDÃO et al., 2002; PEREZ, 2004). Suas flores têm grande beleza podendo ser empregadas em ornamentação. Do fruto, a casca e o mesocarpo verde são aproveitados como ração animal, sendo muito energético e nutritivo (ARAUJO et al., 1994). Os frutos contêm vitamina A, B₁, B₂, C, E, fósforo, cobre e ferro (SANTOS et al., 2004), também apresenta tiamina, proteínas, carboidratos, sais minerais e um gama de metabólitos

secundários (BRANDÃO et al., 2002). Dentro da medicina popular, existem relatos de seu uso em tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco, energéticos e supressores da avitaminose, sem falar da recente aplicação cosmética na fabricação de creme e xampu (ARAUJO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1999). O óleo da polpa tem efeito tonificante, além de atuar contra bronquites, gripes, resfriados e no controle de tumores. Suas folhas são consideradas adstringentes, além de estimular a produção da bílis (CHÉVES, 1997).

Pela importância que a planta tem dentro do ecossistema do Cerrado e para a flora do Brasil como um todo, estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se explorar suas potencialidades. Destacam-se, mais recentemente, estudos sobre o seu potencial antibacteriano (FERREIRA e JUNQUEIRA, 2007; FERREIRA, 2007), antifúngico (MARQUES, 2002), no controle de leshimanioses (PAULA et al., 2006) e antioxidante (RAMOS et al. 2001; SANTOS et al., 2004; PAULA et al., 2006; ROESLER et al., 2007; ARAÚJO et al., 1994; KHOURI et al., 2007; LIMA, 2008; ROESLER et al., 2008). Sob esse último aspecto, estudos têm centrado no uso da polpa e da castanha, que são as partes comestíveis, no combate a danos oxidativos, sobretudo, de doenças cardiovasculares (GLISÓLIA et al., 2007; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SANTOS & BLANT, 1998). Poucos estudos exploram o uso do mesocarpo e das folhas para esse fim. No entanto, Oliva (2006); Barbosa (2008) e Roesler et al. (2008), destacam o potencial destas partes da planta.

Os antioxidantes são compostos com ação direta ou indireta sobre espécies oxidativas, neutralizando ação destas (ANDRADE et al., 2007; GONZALES et al., 2001; ARAÚJO, et al., 2005). Eles podem ser sintéticos ou naturais. Dentre os sintéticos, os mais conhecidos são Hidroxianisol de Butila (BHA), Hidroxitolueno de Butila (BHT) (DUARTE et al., 2006). Dentre os naturais existem os enzimáticos como as enzimas Glutation-Peroxidase, Catalase, Metionina-Redutase e Superóxido-Dismutase (SOUZA et al., 2007) e os não enzimáticos, podendo ser citadas substâncias da classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos, esteróis (ROESLER et al., 2007; MELO et al., 2006; GIL et al., 2005).

O interesse em se obter novas fontes de antioxidantes naturais é crescente e visa, principalmente, substituir do uso dos antioxidantes sintéticos, que conforme alguns autores (BIANCHI e ANTUNES, 1999; DAVID et al., 2002; DEGÁSPARI et al., 2004) podem causar danos a saúde humana como câncer, aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático celular (DEGÁSPARI et al., 2004; MELO et al., 2006). Em adição, estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes naturais de fontes vegetais como fenóis encontrados nos cereais e frutas são os

principais fatores que contribuem com significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas (ROESLER et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

Dentre os compostos antioxidantes encontrados no pequi são destacados os carotenóides, que estão presentes em quantidades consideráveis na polpa, e compostos fenólicos, que de forma semelhante a outras plantas são citados como principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante observada (ROESLER et al., 2008).

Ainda são poucos os estudos envolvendo a ação antioxidante do pequi, sendo que na maioria deles as avaliações foram feitas em extratos brutos. De acordo com Roesler et al. (2007), estudos mais detalhados ainda são necessários para uma melhor avaliação. São necessários estudos que respondam perguntas tais como: qual a parte da planta tem melhor ação quantitativa e qualitativa no combate de radicais livres? Ou que composto(s) é/são realmente de interesse?

Neste contexto, este estudo objetivou-se avaliar o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do pequi, considerando a maneira de obtenção dos antioxidantes e o tipo de princípio ativo responsável por essa ação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material vegetal

Folhas de Pequi foram coletadas no município de Montes Claros-MG, nas proximidades das localidades de Miralta e Morro vermelho. As amostras foram colhidas no início da manhã em 10 indivíduos adultos e em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Botânica/Fisiologia Vegetal da Unimontes, onde foram processadas. As coletas foram realizadas em Novembro do ano de 2007.

Os frutos foram adquiridos no mercado central de Montes Claros, onde se comprou um saco contendo aproximadamente 110 frutos, dos quais foram aproveitados apenas frutos com a casca aparentemente saudável.

2.2. Preparo das amostras

Folhas: as folhas foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, por um período de 5 dias, à temperatura de 45°C. Após secagem foram moídas em moinho Tipo Willey até pulverização (300 mesh). O pó obtido foi acondicionado em recipiente de vidro com tampa e estocado em freezer à -20°C até o preparo dos extratos.

Fruto: os frutos foram cortados separando o caroço, do qual foi retirada a polpa com auxílio de uma faca, e o mesocarpo. A polpa e o mesocarpo foram separados e colocados para secar em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 45°C. Após secagem o material foi triturado em aparelho liquidificador e posteriormente peneirado para obtenção do material triturado (300 mesh). Este foi acondicionado em recipiente de vidro com tampa e armazenado em freezer à -20°C até o preparo dos extratos.

2.3. Preparo dos extratos

Para escolher o melhor solvente na extração dos compostos com a atividade antioxidante foram feitos extratos com utilização dos solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada.

A extração foi realizada em tubo tipo Falcon, onde foi adicionado o material triturado (folha, mesocarpo ou polpa) e o solvente de extração na proporção de 2 gramas de material para 10 mL de solvente. Após adição do solvente os tubos foram agitados manualmente e deixados para extração em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 24 horas, foram centrifugados a 5000 RPM por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi coletado e considerado como extrato. Os extratos foram colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar, à 45°C, sendo em seguida armazenados em freezer (-20°C). Cada extração foi realizada em 3 repetições.

2.4. Quantificação do rendimento dos extratos

O rendimento de cada extrato foi quantificado dividindo-se o peso dos extratos secos pela quantidade de material triturado utilizada para extração (2 g), sendo expresso em porcentagem da massa seca de material utilizado.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante

O método utilizado para medir a ação antioxidante neste estudo, consistiu em avaliar por espectrofotometria a capacidade do extrato em reduzir o radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH[•] que tem coloração púrpura (SOUZA et al., 2007). Neste método, pela ação de antioxidantes presentes no extrato, o DPPH é então reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da coloração púrpura e redução da absorção, podendo a mesma ser monitorada pela leitura em espectrofotômetro a 517 nm. A partir das leituras de absorção obtidas determina-se a

porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (GIL et al., 2005).

No procedimento, os extratos secos foram dissolvidos no respectivo solvente de extração para uma concentração de 10 µg/µL e uma alíquota de 20 µL foram adicionados a 3 mL de solução DPPH na concentração de 40 µg/µL. Após 30 de minutos de reação, sob abrigo de luz, procedeu-se a leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro a 517 nm. Como controle utilizou-se a solução de DPPH na concentração citada anteriormente.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada conforme Melo et al. (2006), pela equação:

$$\%AA = \frac{Abs * Controle - Abs * amostra}{Abs * Controle} \times 100$$

Onde: Abs controle = absorbância do controle (solução de DPPH sem antioxidante) e Abs amostra = absorbância da amostra (extrato) a ser testada.

2.6. Fracionamento dos extratos etanólicos

Após escolha do etanol como melhor solvente de extração para obtenção de antioxidantes nas três partes do pequi utilizadas, foi realizado o fracionamento de extratos etanólicos das três partes da planta no sentido da purificação dos componentes químicos responsáveis pela ação antioxidante observada.

A extração foi realizada em frascos de vidro onde foi adicionado o material triturado (folha, mesocarpo ou polpa) e o solvente de extração na proporção de 200 gramas de material para 1000 mL de solvente. Após um período de 24 horas de extração, realizou-se filtração do material e o filtrado considerado como extrato. Os extratos foram em seguida deixados em estufa de ar circulante a 45° C até que o volume fosse diminuído e, em seguida, foi adicionado água destilada em cada extrato na proporção de 45 ml de água para 105 mL de extrato. Este procedimento foi realizado para que se proporcionasse uma melhor partição durante o fracionamento.

O fracionamento foi realizado por partição líquido-líquido utilizando-se hexano, éter de petróleo e clorofórmio, com procedimento conforme esquematizado na figura 1.

Ao final do fracionamento foram obtidas quatro frações: hexânica, éter de petróleo, clorofórmica e hidroalcoólica residual, para as três partes da planta (folha, mesocarpo e polpa). Cada fração foi acondicionada em frasco de vidro e armazenada ao abrigo de luz até procedimentos seguintes.

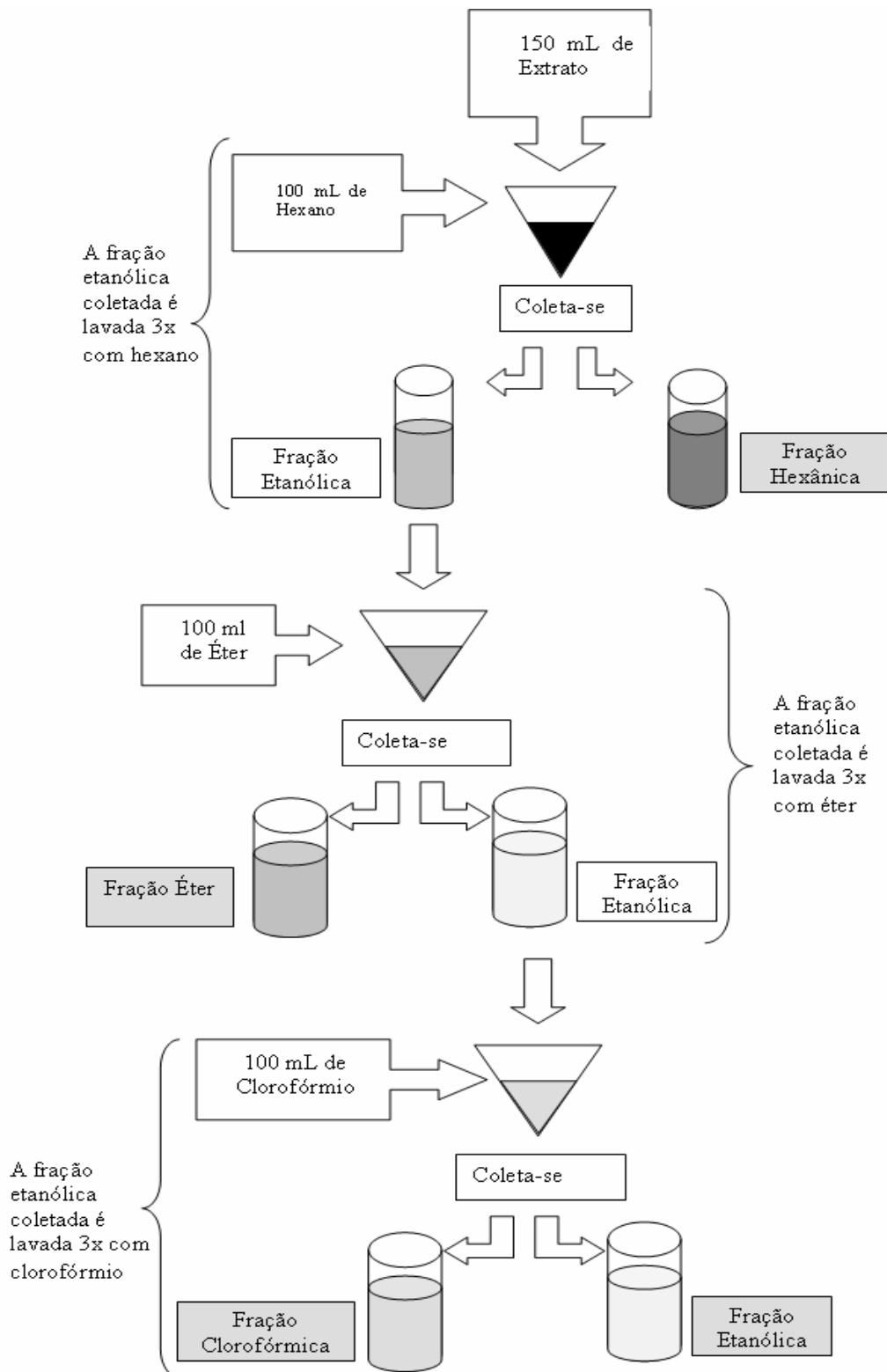


Figura 1: Esquema do procedimento de fracionamento dos extratos etanólicos de folha, mesocarpo e polpa do pequi usando hexano, éter de petróleo e clorofórmio.

2.7. Quantificação dos rendimentos e atividades antioxidantes das frações dos extratos etanólicos

De cada fração obtida, foi retirada uma alíquota de 10 mL que foi colocada em placa petri e colocada para secar em estufa de ar circulante a 45°C. O rendimento foi calculado dividindo-se o peso seco da fração pelo peso correspondente de material utilizado para extração, sendo expresso em porcentagem. A avaliação da atividade foi realizada conforme descrito no item 2,5 para as frações e para uma solução de quercetina.

Para cada fração e para a quercetina, também foi calculada a concentração eficiente (CE50), sendo esta a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. A CE50 foi calculada a partir equações obtidas a partir da regressão quadrática da atividade antioxidante em função da concentração dos antioxidantes no meio de reação.

2.8. Estudo fitoquímico das frações dos extratos etanólicos

Para estudo fitoquímico, as frações secas foram diluídas em etanol para uma concentração de 10 µg/µL e foram avaliados os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos e carotenóides totais conforme metodologias seguintes:

Fenois totais - a quantificação dos compostos fenólicos foi feita segundo metodologia de Follin Ciocalteau, descrita por Swain & Hillis (1959), também em triplicata. Foram preparados tubos de ensaio contendo 3,6 mL de água destilada, aos quais foram acrescidos 30 µL da fração diluída, 250 µL do reagente de Follin Cicalteau. Após três minutos foram adicionados 400 µL de solução supersaturada de Carbonato de Sódio e então o volume foi completado com 750 µL de água destilada, sendo o volume final 5,4 mL. Após uma hora as absorbâncias das soluções foram lidas em pectrofotômetro a 725 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi construída uma curva padrão utilizando a quercetina na faixa de concentração de 5 – 40 µg. A quantidade de compostos fenólicos foi expressa em mg/g de matéria seca.

Flavonóides totais – foram quantificados segundo metodologia de Santos & Blat (1998). Foi preparada previamente uma solução 2% de cloreto de alumínio em metanol. De cada fração diluída foram retirados 20 µL, que foram colocados em tubos de ensaio e aos quais foram adicionados 3 mL de metanol e 100 µL da solução de cloreto de alumínio. Cada tubo foi

agitado e após 30 minutos, ao abrigo de luz, fez-se a leitura das absorbâncias no comprimento de 425 nm. Para a quantificação de flavonóides foi construída uma curva padrão de Quercetina (5 – 40 µg). A quantidade de flavonóides foi expressa em mg/g de matéria seca.

Taninos - a quantificação de taninos seguiu a método de difusão radial (HAGERMAN, 1987). Dez µL de cada fração foram aplicados em cavidades feitas em gel de agarose contendo BSA (Bovine Serum Albumine) e depositado em placas de petri. De acordo com a metodologia, à medida que os taninos presentes na fração difundem-se no gel, estes vão se complexando com a albumina, desenvolvendo um halo de precipitação. As placas foram lacradas com parafilm e colocadas em estufa 30 ± 2 °C por 3 dias. Após este tempo foi feita a medida do halo. A área do halo formado é proporcional à quantidade de tanino presente na fração. Para quantificação, a área do halo obtida foi comparada a uma curva padrão, preparada a partir de soluções de ácido tântico de concentrações conhecidas.

Carotenóides totais - A análise dos carotenóides foi realizada seguindo-se as orientações de Rodriguez-Amaya (2001), com as adaptações necessárias para as análises folhas e frutos do pequi. Tomou-se uma alíquota de 1 mL de fração e adicionou-se 4 mL de acetona. Deixados descansar por 4 horas ao abrigo da Luz. Em seguida foi acrescido a esta solução 5 mL de éter de petróleo e após 2 horas, a porção etérea foi coletada para leitura em espectrofotômetro a 450 nm.

A concentração de carotenóides foi calculada com base na equação:

$$CT = \frac{AbsA \times V \times 10000}{2592M}$$

Onde CT = Carotenóides totais em µg/g de extrato; AbsA = Absorbância da amostra; M = massa de polpa utilizada e V = volume de extração.

2.9 Perfil cromatográfico das frações dos extratos etanólicos

Para avaliar o estado de pureza das frações, bem como registrar um perfil cromatográfico de cada fração para que fosse feita uma comparação entre elas, foram realizadas corridas cromatográficas. Para isso, as frações secas foram diluídas em metanol e 50 µL foram injetados em sistema HPLC (Waters 717 Plus) equipado com coluna Microsorb C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm) e detector por arranjo de diodos. Todas as corridas foram realizadas em gradiente de ácido acético 0,5% em água - solvente A e metanol puro - solvente

B. O gradiente utilizado foi de 0-100% solvente B em 20 minutos. Durante toda corrida o fluxo foi de 1,0 mL/min.

2.10 Análise dos dados

Os dados foram tabelados em Microsoft Office Excel (2007) e analisados no programa estatístico R (R-Core, 2007 – Versão 2.7.1) e com utilização de modelos lineares generalizados, estimados pela anova em teste F. Os intervalos de confiança foram calculados para médias através do teste de Student (teste T).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Recuperação da atividade antioxidante em folhas e frutos do pequi

Foram avaliados 6 tipos de solventes de extração na recuperação da atividade antioxidante em folhas e frutos (mesocarpo e polpa) do pequi. Nas figuras 2 e 3 (pág. 14 e 15) são apresentados os rendimentos obtidos e as atividades antioxidantes, respectivamente, para cada extrato. Quando se analisa a capacidade de extração independendo da parte da planta, observa-se que o etanol e o metanol foram os solventes que apresentavam melhor rendimento. Entretanto, se analisado separadamente, pode ser destacado o hexano, o clorofórmio e o acetato de etila com maiores rendimentos nos extratos de polpa. O elevado rendimento desses solventes, que são menos polares, provavelmente seja em função da elevada composição lipídica da polpa do pequi. Lima (2008) observou uma composição lipídica de 33,40% da massa dessa parte da planta.

Nas três partes analisadas, as maiores atividades antioxidantes foram obtidas pelos extratos etanólicos (98,03 %), metanólicos (97,68%) e aquoso (96,91%). Nos extratos a base de hexano, clorofórmio e acetato de etila os valores observados foram, respectivamente de 2,60%, 42% e 57,87%.

Na figura 4 (pág. 16) é apresentada a atividade antioxidante dos diferentes extratos em função da polaridade do solvente de extração. Observa-se que existe uma tendência de que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior é a atividade antioxidante do extrato. Este resultado destaca a importância de solventes polares na extração de antioxidantes, bem como é um indicativo da natureza mais polar dos constituintes de extratos do pequi com ação antioxidante.

Nos extratos da polpa, apesar da mesma tendência observada para as outras partes, esta foi menos acentuada. Provavelmente por uma menor composição de compostos polares nesta parte da planta. Os rendimentos dos extratos da polpa observados na figura 2 (pág. 14) confirmam esta idéia. Pode-se observar um maior rendimento nos extratos menos polares, ou seja, a base de hexano (33%), clorofórmio (41,66%) e acetato de etila (42,92%), em contrapartida aos extratos mais polares.

Em diversos estudos relacionados à eficiência antioxidant de extratos vegetais (SOUZA et al., 2007; ROESLER et al., 2007; TAWAHA et al., 2007), são utilizados solventes de maior polaridade como o etanol e o metanol. Provavelmente pela melhor eficiência destes solventes em extraír compostos fenólicos, que são referidos como sendo as principais substâncias com ação antioxidant presente em extratos vegetais.

Dastmalchi et al. (2007) avaliaram a extração de compostos fenólicos e a atividade antioxidant em *Dracocephalum moldavica* com a utilização de solventes com diferentes polaridades. Esses autores observaram maiores níveis de compostos fenólicos e maiores atividades antioxidant, com a utilização de DPPH, para os extratos preparados com solventes de maior polaridade. Dorman & Hiltunen (2004) fracionaram o extrato bruto de *Satureja hortensis* L., elaborado com uso de metanol, água e ácido acético na proporção de 80:20:1. O fracionamento foi realizado numa seqüência de hexano, acetato de etila e n-butanol. A maior atividade antioxidant foi recuperada na fração acetato de etila em detrimento às frações mais polares (butanólica e aquosa). Este resultado ressalta a qualidade da extração feita com metanol, uma vez este solvente recuperou uma faixa ampla de compostos. Com a utilização do etanol, que tem características similares, espera-se que o mesmo possa acontecer.

3.2 Estudo fitoquímico associado à atividade antioxidant em folhas e frutos do pequi

Para conhecer a natureza química dos constituintes dos extratos de folhas e frutos do pequi, responsáveis pela atividade antioxidant observada, o extrato etanólico de cada parte da planta foi fracionado, com posterior avaliação da atividade antioxidant e dos níveis de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos e carotenóides em cada fração. O extrato etanólico foi escolhido para estudo, em detrimento aos demais extratos, em função do seu bom rendimento e atividade antioxidant observada, bem como pela sua facilidade de obtenção no mercado e baixa toxicidade para manuseio.

Nas figuras 5 e 6 (págs. 17 e 18) são apresentados o rendimento e a atividade antioxidante de cada fração obtida. Observa-se um maior rendimento para a fração etanólica (Figura 5 - pág. 17). Entretanto, valores consideráveis são observados para as frações hexânica e clorofórmica. Este resultado ressalta a eficiência do etanol como bom solvente de extração, pois também recupera compostos numa faixa ampla de polaridade. Resultados da atividade antioxidante das frações, confirmam essa observação, uma vez que também foi possível recuperar ação antioxidante mesmo nas frações de menor polaridade (hexânica nas três partes analisadas e, etérea na polpa - Figura 6, pág. 18).

Pela análise de regressão da atividade antioxidante (Figura 7, pág. 19) observa-se dependência da concentração dos extratos. Os melhores ajustes foram de correlação quadrática ($R^2 = 0,99; 0,99$ e $0,91$; e $0,95; 0,91$ e $0,99$ – para, respectivamente, as frações clorofórmica e etanólicos da folha, mesocarpo e polpa. Para a quercetina $R^2=0,99$) (Figura 6A, B, C e D). Este resultado indica que a ação antioxidante dos extratos já aproxima de um máximo em baixas concentrações.

As maiores atividades antioxidantes foram recuperadas nas frações clorofórmica e etanólica dos extratos (Figura 6 – pág. 18). Como também foram estas as frações de maior rendimento, elas foram escolhidas para estudo de sua composição no sentido de se conhecer que tipos de substâncias presentes seriam responsáveis pela atividade observada.

Os resultados da CE₅₀ dessas frações em comparação ao flavonóide quercetina são apresentados na tabela 1 (pág. 20). Observa-se que para as frações clorofórmica do mesocarpo e etanólicas do mesocarpo e folhas apresentam níveis inferiores ao apresentado pelo padrão quercetina. Indicando o potencial dessas frações como antioxidantes.

Na tabela 2 (pág. 21) são apresentados os níveis de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos e carotenóides totais em cada fração das três partes da planta. Observa-se que grande porção dos extratos é representada por compostos fenólicos. Este resultado é um indicativo da importância dos compostos fenólicos como antioxidantes do pequi. Pode ser observada, também, a importância da folha e do mesocarpo como fontes deste tipo de substância representando mais de 20% da massa seca dos extratos. Na polpa, os compostos fenólicos compõem uma menor porção, menos de 1% da massa seca. Níveis significativos de carotenóides também foram observados, com maior destaque para folha e polpa com, respectivamente, 421,65 e 430,72 µg/g de extrato.

Em pequi, Roesler et al. (2007) destaca que compostos fenólicos presentes na casca provavelmente são os responsáveis pela atividade antioxidante observada. Os autores relatam presença, em níveis consideráveis, de ácido gálico, ácido quínico, quercetina e

queracetina 3-O-arabinose nesta parte da planta. Aqui, neste estudo, também foram observados altos conteúdos de flavonóides (Tabela 2 – pág. 21). Conforme resultados representam a maior porção dos compostos fenólicos, podendo representar mais de 50% da massa desses constituintes. Taninos foram detectados apenas na folha e polpa, entretanto, em baixas concentrações.

Compostos fenólicos são importantes antioxidantes que agem seqüestrando radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (RAMALHO e JORGE, 2006). Em extratos vegetais têm sido relacionados à atividade antioxidante em vários estudos, sendo observada uma relação direta com esta característica (MORESCO e BRIGHENTE, 1998; SOUZA et al., 2007; TAWARHA et al., 2007).

Observou-se correlação positiva e significativa entre níveis de flavonóides totais e carotenóides totais das frações clorofórmica e etanólica e atividade antioxidante (Figura 8 – pág. 23). Este resultado indica estas duas classes de substâncias como importantes antioxidantes das folhas e frutos do pequi.

3.3 Perfil cromatográfico das frações

Perfis cromatográficos das frações etanólicas e clorofórmicas são representados nas figuras 9, 10, 11 e 12 (págs. 23, 24, 25 e 26). Observa-se certa semelhança para essas duas frações de folhas e polpa. Em mesocarpo, foi observada diferença entre os perfis das duas frações. No caso de folha e polpa, o resultado indica que as frações podem ser agrupadas em procedimentos posteriores de purificação. Para o mesocarpo seria melhor tratar as frações de modo diferenciado.

Comparando os perfis das frações etanólicas e clorofórmicas entre as partes estudadas (figura 12, pág. 26), observa-se maior semelhança entre frações de folha e polpa. Entretanto, isso não justifica o agrupamento destas frações por se tratar de partes diferentes da planta.

Com relação ao grau de pureza das frações, observa-se um menor número de picos nas frações clorofórmicas. Nas outras frações, ainda é observado um grande número de picos. Procedimentos são necessários para obtenção de frações puras e identificação de compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Conforme resultados anteriores há um indicativo de que sejam, principalmente, carotenóides e flavonóides, entretanto, somente a análise poderá confirmar estes resultados.

4. CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este estudo, os resultados permitem inferir que:

- A atividade antioxidante de folha, mesocarpo e polpa do pequi pode ser recuperada em diferentes solventes. A maior eficiência na recuperação foi, neste caso, obtida com a utilização de etanol, metanol e água destilada;
- Dentre os solventes utilizados na recuperação, etanol e metanol apresentaram melhores rendimentos de extrato para folha e mesocarpo. Em polpa melhores rendimentos são obtidos com hexano, clorofórmio e acetato de etila;
- Em função dos rendimentos e atividade antioxidante, em associação com a menor toxicidade de manuseio, o etanol pode ser indicado na recuperação da atividade antioxidante no pequi;
- Compostos fenólicos representam grande fração dos extratos etanólicos de folhas e mesocarpo do pequi;
- Carotenóides foram observados em níveis consideráveis, com destaque em extratos de folha e polpa;
- Flavonóides representam a maior porção dos compostos fenólicos de folhas e mesocarpo de pequi;
- Existe relação direta entre níveis flavonóides, níveis carotenóides e atividade antioxidante nos extratos estudados;
- Provavelmente Flavonóides e carotenóides são as principais substâncias do pequi com atividade antioxidante.

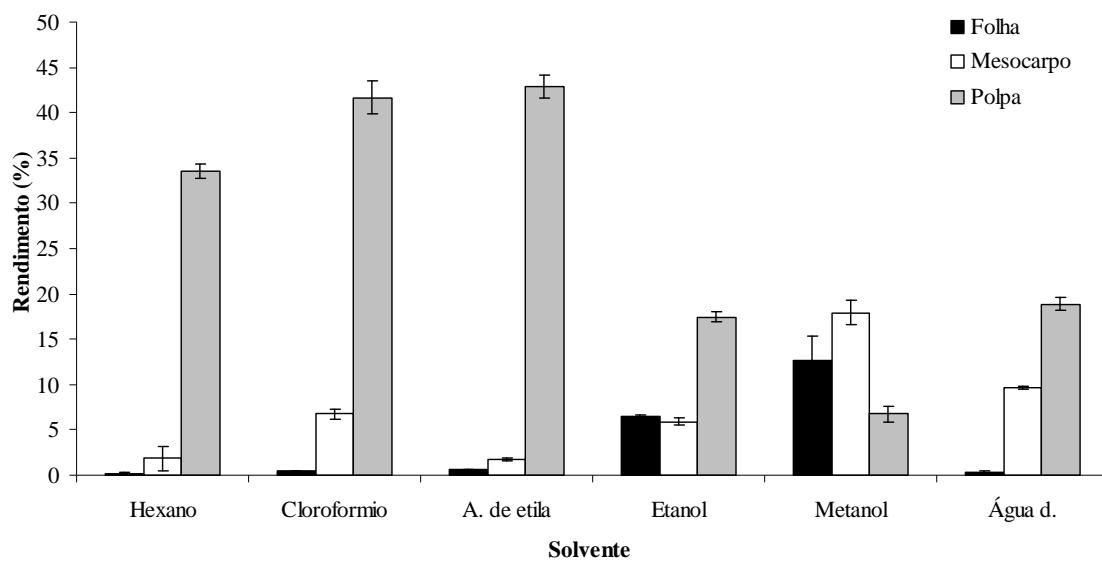


Figura 2: Rendimentos dos extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtidos com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada. Dados em % da massa seca. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

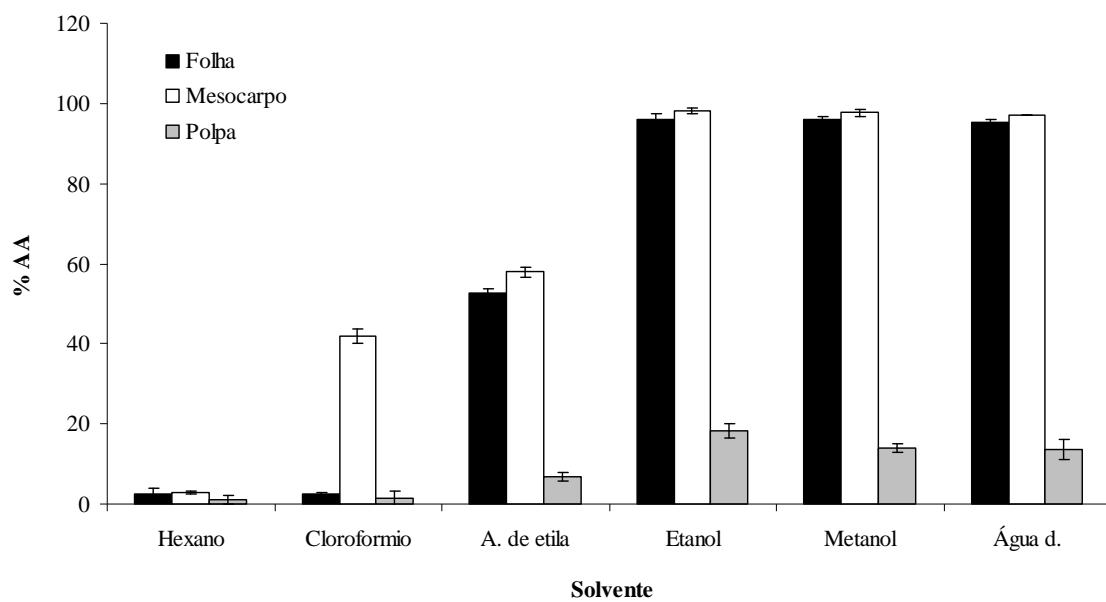


Figura 3: Atividade antioxidante dos extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), obtidos com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

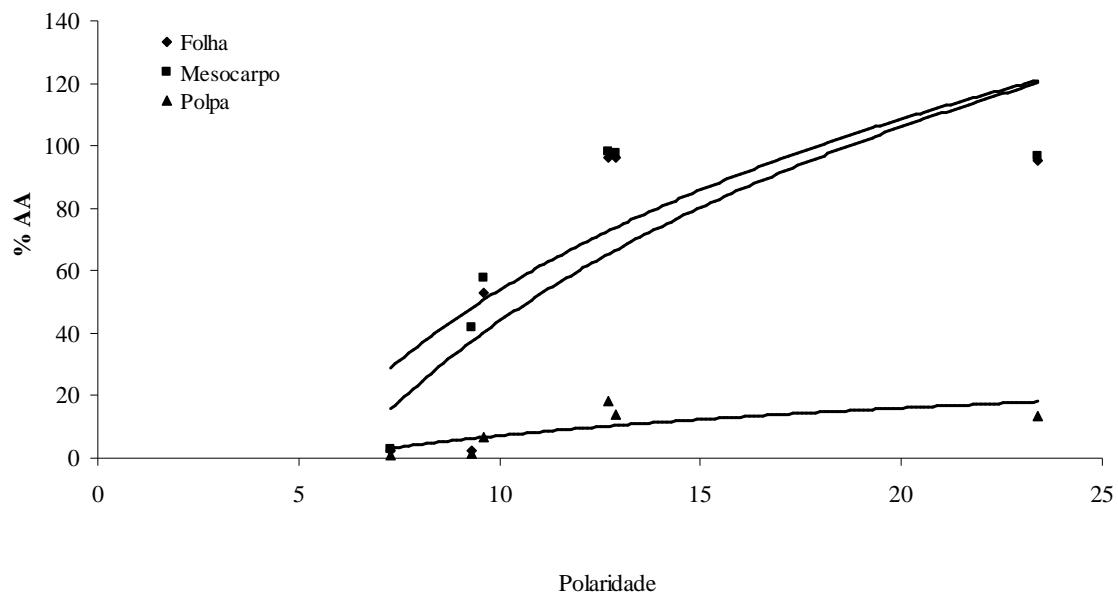


Figura 4: Atividade antioxidante em extratos de folha, mesocarpo e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em função da polaridade do solvente de extração.

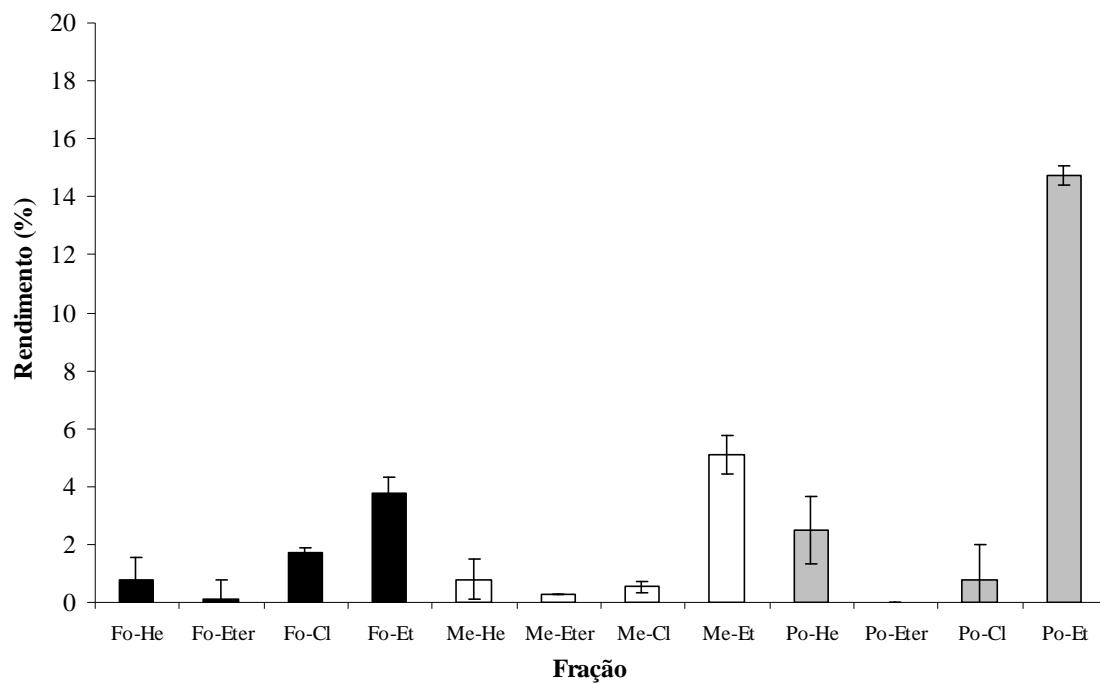


Figura 5: Rendimento das frações do extrato etanólico de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). (He) - hexano, (Éter) – éter de petróleo, (Cl) – clorofórmica e (Et) – etanol. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

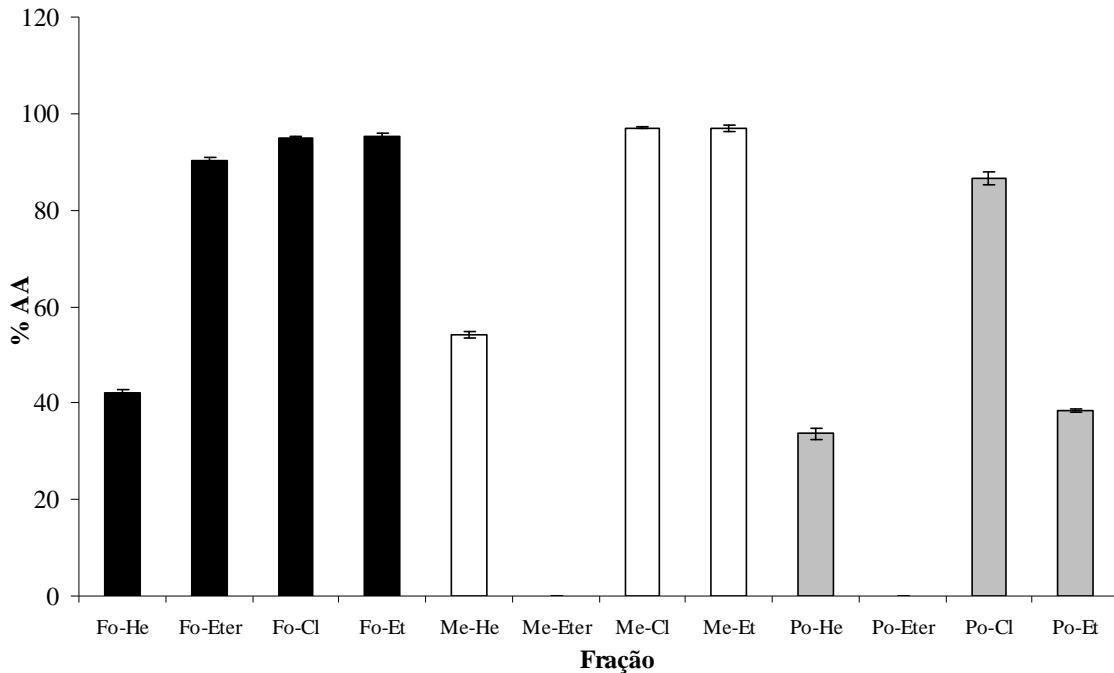


Figura 6: Atividade antioxidante das frações do extrato etanólico de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). (He) - hexano, (Éter) – éter de petróleo, (Cl) – clorofórmica e (Et) – etanol. Barras indicam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

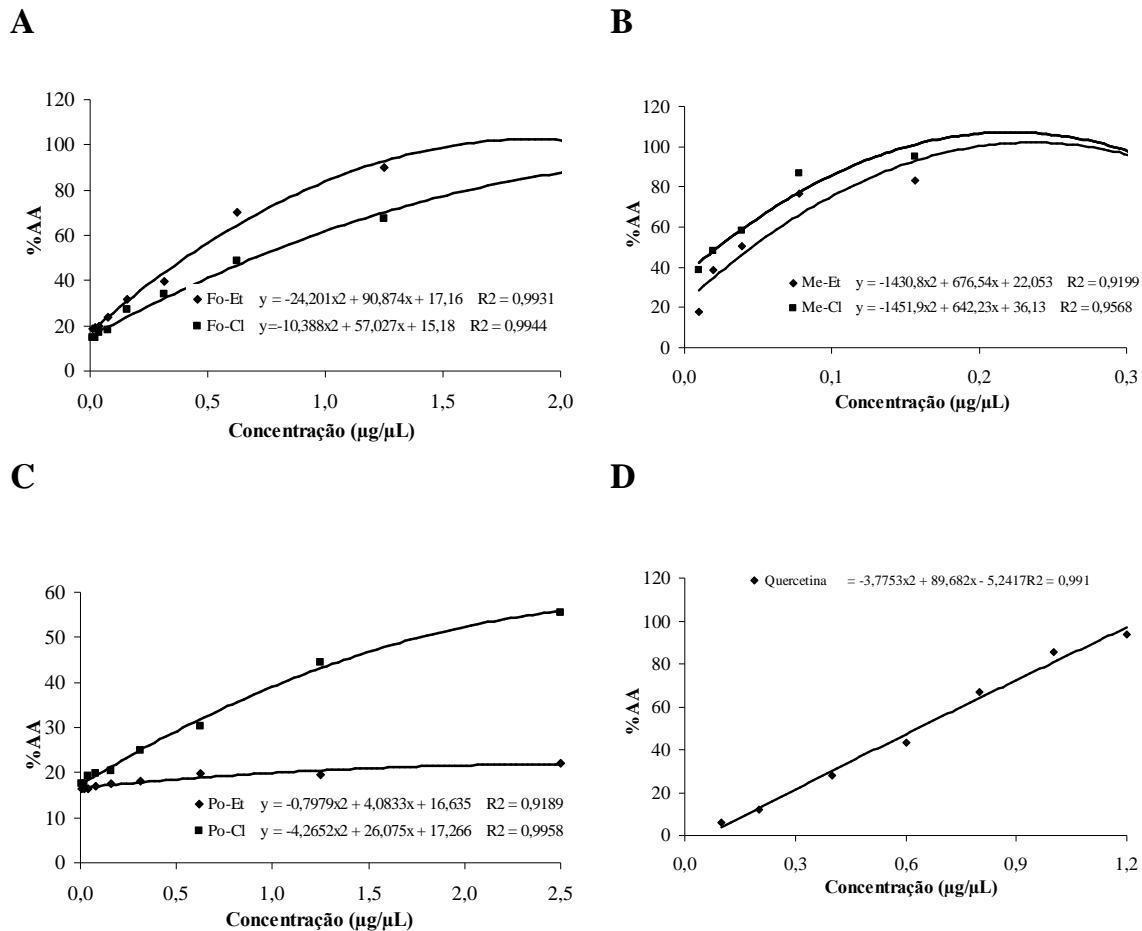


Figura 7: Atividade antioxidante em função da concentração da fração (■ - Etanólica e ♦ - Cloroformica.) dos extratos etanólicos de folha (A), mesocarpo (B) e polpa (C) do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). (D)=atividade antioxidante em função da concentração de quercetina.

Tabela 1: Concentração eficiente (CE_{50}) das frações clorofórmica e etanólica do extrato etanólico de folhas, mesocarpo e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em comparação ao flavonóide quercetina.

Fração	CE_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Mesocarpo – Clorofórmica	0,02
Mesocarpo – Etanólica	0,05
Folha – Etanólica	0,41
Quercetina	0,51
Folha – Clorofórmica	0,70
Polpa - Clorofórmica	1,76
Polpa - Etanólica	4,40

Tabela 2: Níveis de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos, caratenóides totais por grama de fração e atividade antioxidante nas frações hexânica, etérea, clorofórmica e etanólica do extrato etanólico de folha, mesocarpo e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

Parte	Fração	C. fenólicos (mg)	Flavonóides (mg)	Taninos (μg)	Carotenóides (μg)	%AA
Folha	Hexanica	10,04 ± 0,06	3,03 ± 1,02	- -	83,59 ± 2,74	41,98 ± 0,75
	Eter	2,26 ± 0,10	1,69 ± 0,27	- -	84,52 ± 0,20	90,37 ± 0,68
	Cloroformica	120,12 ± 0,10	75,9 ± 0,16	- -	140,21 ± 0,71	95,04 ± 0,19
	Etanolica	122,82 ± 0,15	62,95 ± 3,11	45,81 ± 0,00	113,33 ± 2,06	95,42 ± 0,59
Total		255,24	143,56	45,81	421,65	
Mesocarpo	Hexanica	14,21 ± 0,24	6,85 ± 0,27	- -	32,95 ± 0,20	54,09 ± 4,27
	Eter	- -	- -	- -	- -	- -
	Cloroformica	126,15 ± 0,24	79,03 ± 0,16	- -	63,08 ± 0,90	96,96 ± 0,19
	Etanólica	125,12 ± 1,11	78,36 ± 0,16	- -	147,34 ± 1,41	96,84 ± 0,65
Total		265,48	164,23	- -	243,38	
Polpa	Hexanica	1,23 ± 0,24	- -	- -	60,57 ± 2,06	38,64 ± 1,18
	Eter	- -	- -	- -	- -	- -
	Cloroformica	6,71 ± 0,24	2,23 ± 0,27	19,41 ± 0,00	190,49 ± 1,76	86,52 ± 1,24
	Etanolica	1,07 ± 0,42	- -	- -	179,66 ± 13,70	34,41 ± 0,33
Total		9,01	2,23	19,41	430,72	

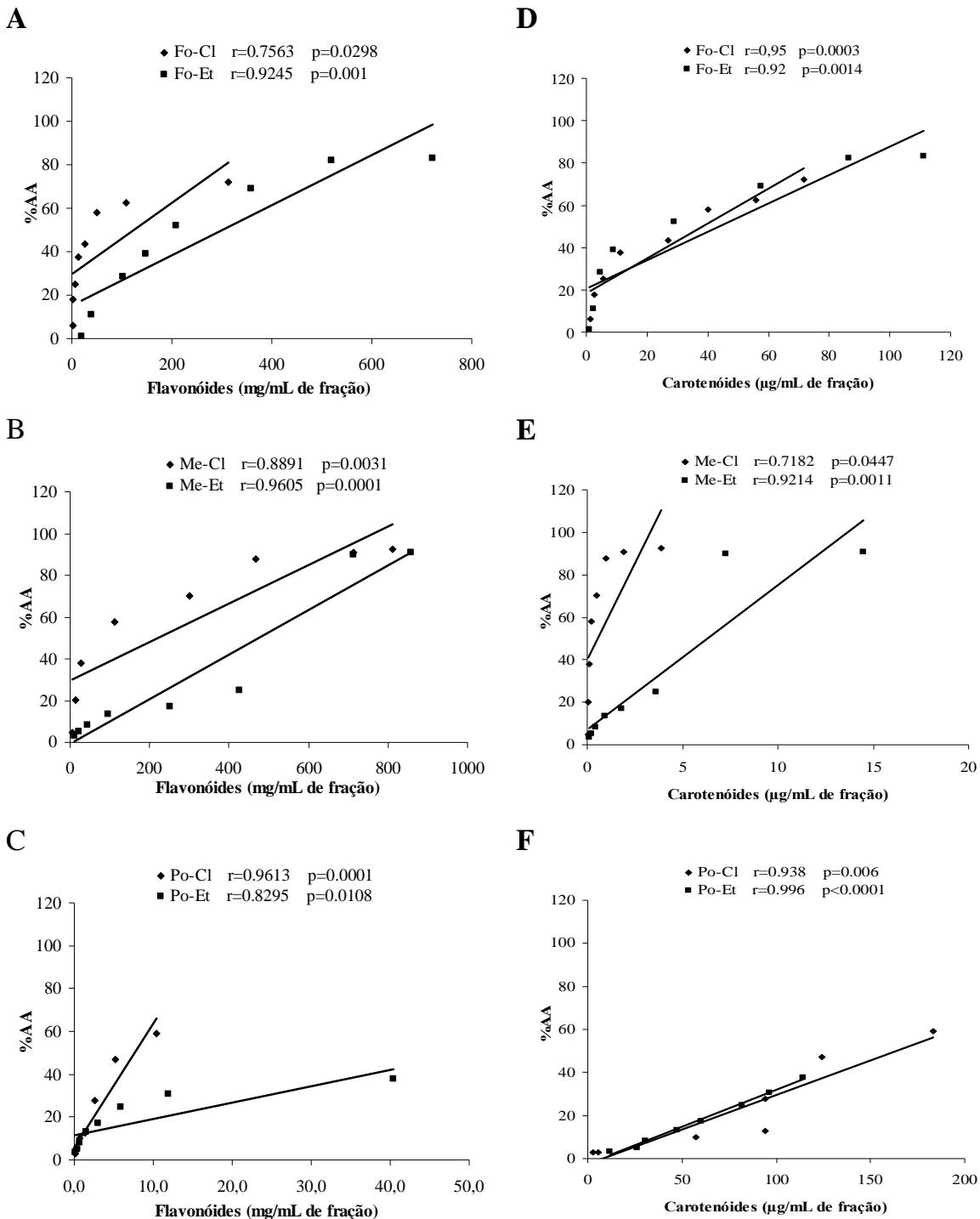


Figura 8: Correlação entre níveis de flavonóides totais (A, B e C) e carotenóides totais (D, F e G) e, atividade antioxidante das frações (■ - Etanólica e ◆ - Clorofórmica.) dos extratos etanólicos de folha (Fo), mesocarpo (Me) e polpa (Po) do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

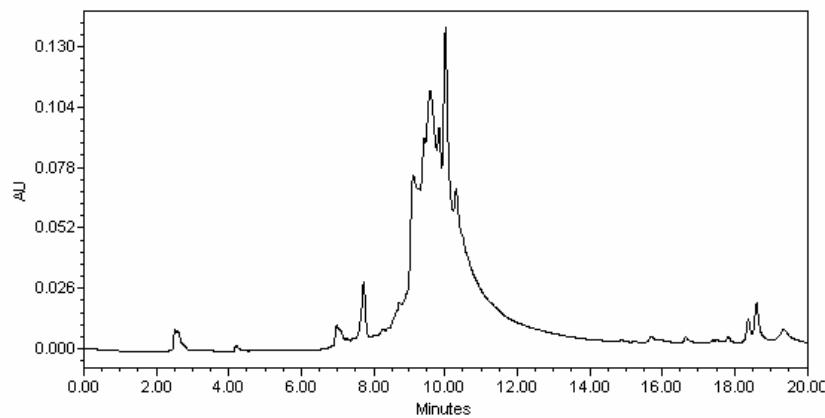
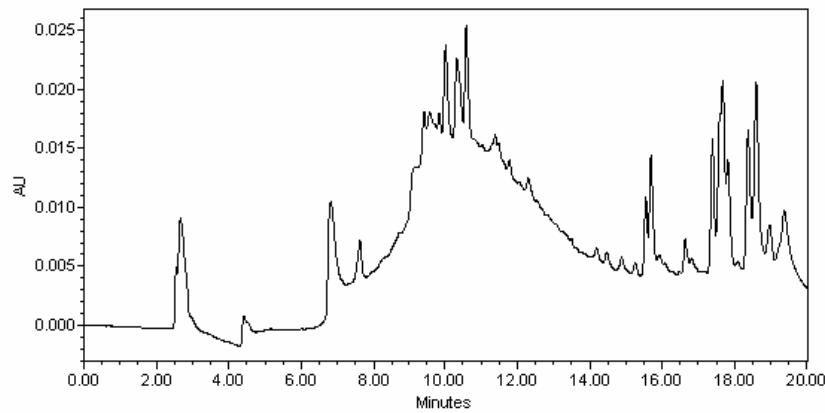
A**B**

Figura 9: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico de folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

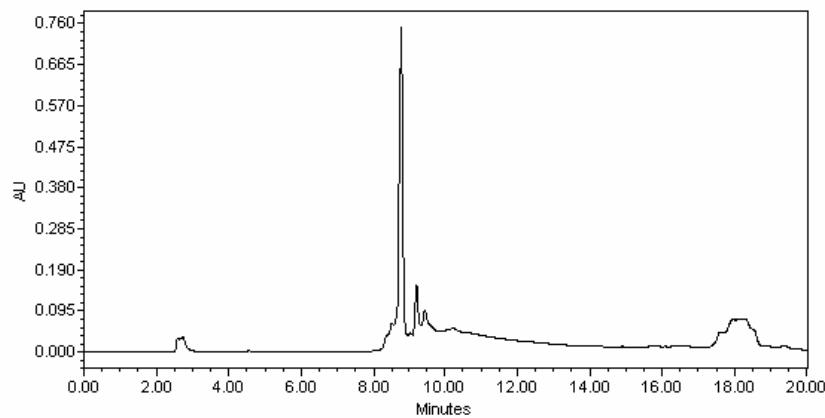
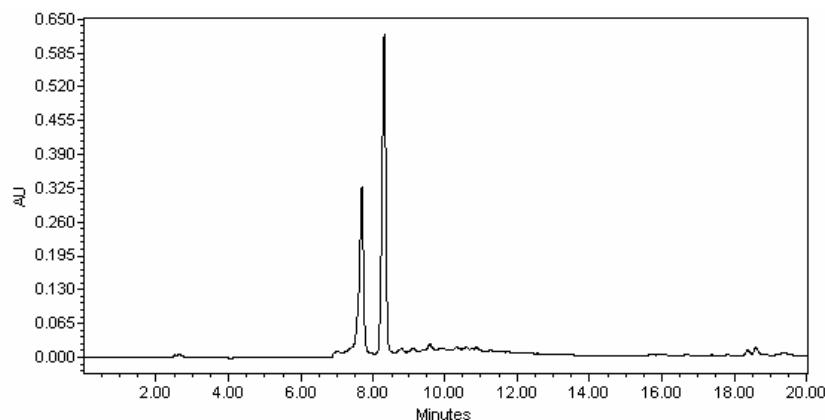
A**B**

Figura 10: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico do mesocarpo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

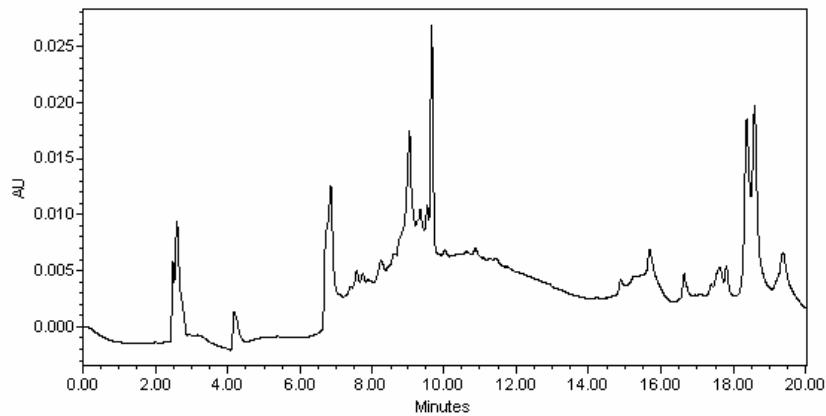
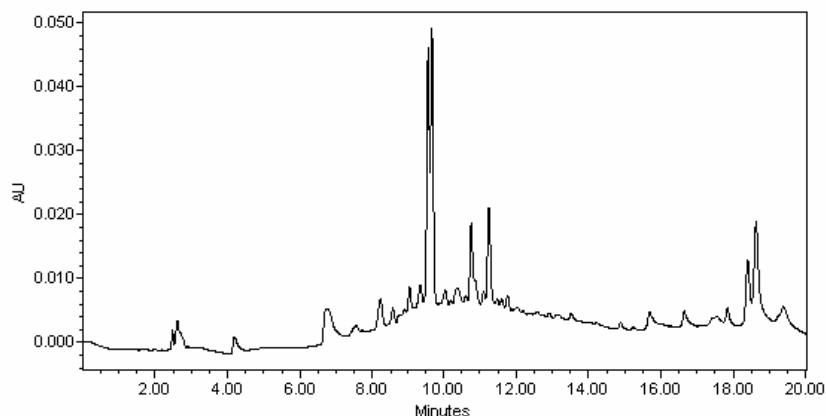
A**B**

Figura 11: Perfil cromatográfico das frações etanólica (A) e clorofórmica (B) do extrato etanólico do mesocarpo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

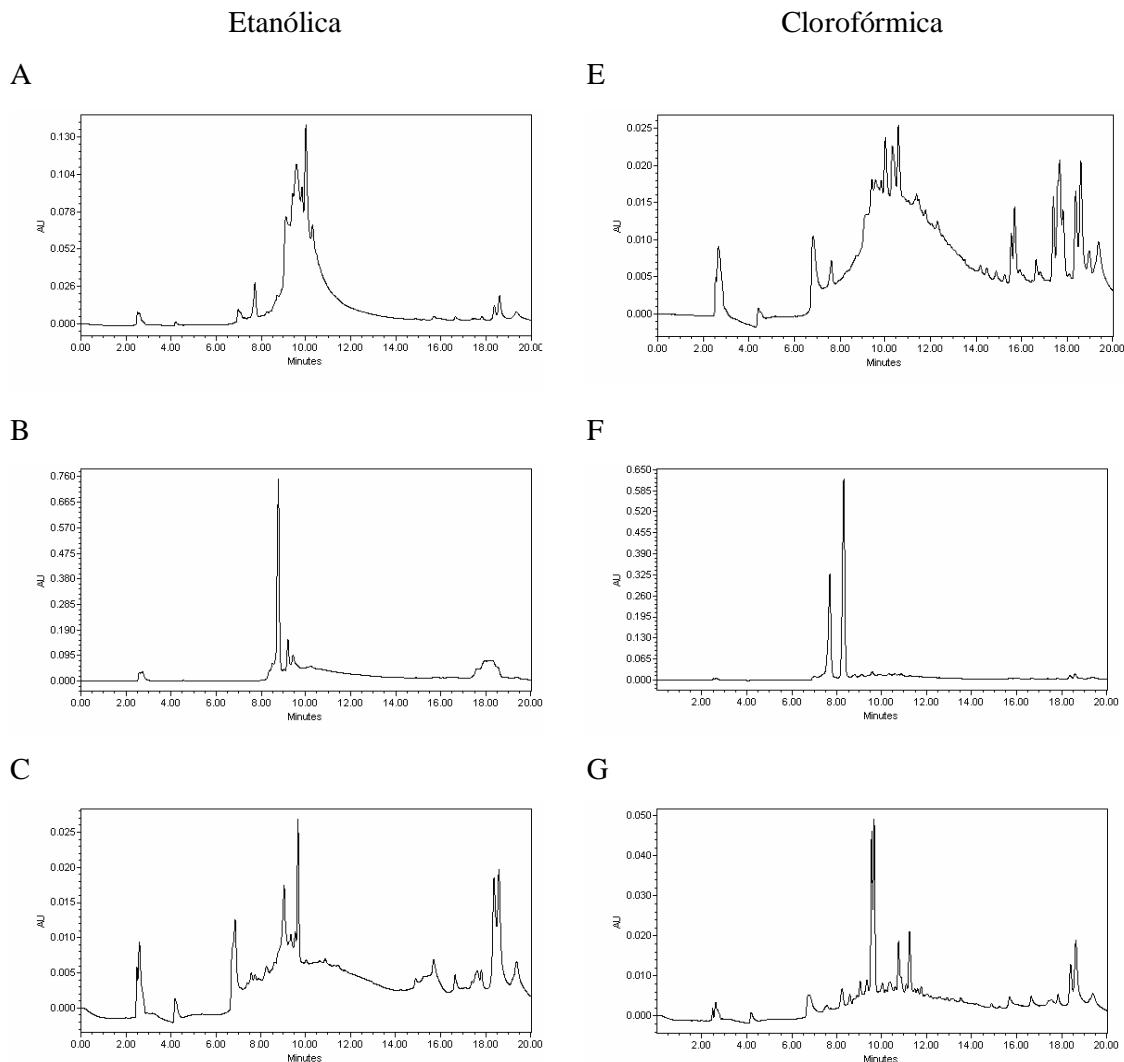


Figura 12: Perfil cromatográfico das frações etanólica e clorofórmica do extrato etanólico de folha (A e E), mesocarpo (B e F) e da polpa (C e G) do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B. & RIBEIRO, J.F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis.** Planaltina. Editora Embrapa-CPAC, 1º Edição, Planaltina. D.F, 1998. P.464.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, G.M. & KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia A. Cunn. Ex G.Don, Leguminosae-mimosoideae*. **Revista brasileira de Farmacologia**. v.17 n. 2, p.231-235, 2007.
- ANTUNES, E.C.; ZUPPA, T.; ANTONIOSI, F.N.R. & CASTRO, S.S. **Utilização do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) como espécie recuperadora de ambientes degradados no cerrado e fornecedora de matéria prima para a produção de biodiesel.** Editora Samambaia, Goiás, p.510. 2004.
- ARAÚJO, C.R.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V. & MARTINS, A.B. prospecção oxidativa de antiácidos refinados. **Revista brasileira de Odontologia**, v.41 n.3, p.112, 2005.
- ARAÚJO, F.D. A review or *Carayocar brasiliense* (Caryocaraceae) – an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. Economic Botany, **The new york botanical Garden**, v.49, n.1, 1994.
- BARBOSA, R.C.M.V. & AMANTE, E.R. Farinha da casca de Pequi (*Caryocar brasiliense*). **Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.2, n.3, p.12-13, 2008.
- BIANCHI, M.L.P. & ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-133, 1999.
- BRANDÃO, M., BUENDÍA, L.J.P. & MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte**, Editora EPAMIG, Belo Horizonte, 1º Edição, p.528, 2002.

CHÉVES, P.O.V. O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Administração Rural). Universidade Federal de Lavras, 1997.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.J.D. & HILTUNEN, L.R. Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. **Jornal LWT**, v.40, p.1655–1663, 2007.

DAVID, J.P.; SANTOS, E.O.; MIRANDA, M.S.; BARREIROS, A.L.B.S; SANTOS, I.D. & DAVID, J.M. Atividade antioxidante da epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.05-06, 2002.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius Raddi*). **Visão acadêmica de Curitiba**, v.5 n.2, p.83-90, 2004.

DORMAN, H.J.D. & HILTUNEN. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, v.88, p. 193–199, 2004.

DUARTE, A. J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I. & MARIA, F.L. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema Caroteno / ácido Linoléico e método de Seqüestro de radicais DPPH. **Revista ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.130-135, 2006.

FERREIRA, A.S. **Aspecto microbiológico da conservação de polpa do pequi (*Cariocar brasiliense* Camb): qualidade, higiene e adaptação de bactérias ao estresse ácido de isolamento de microorganismos com potencial para bioconservação**. Dissertação (Doutorado em Ciências de alimento). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica do Brasil**, v.43, n.1, p.1-13, 1997.

FERREIRA, L.C. & JUNQUEIRA, R.G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) preserves made from a typical Brazilian fruit. **Word J. Microtechnol**, v.10, n.2, p.213-214, 2007.

GIL E.S.; SERRANO, S.H.P.; SOARES, L.A. & REZENDE, K.R. Atividade antioxidante de Extrato Etanólico e Hidroalcoólico de Canjiqueira. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v.2, n.2, p.85-88, 2005.

GLISÓLIA, C.K.; ADRIANO, J.K.; OLIVEIRA, B.B.; RESCK, I.S. & VIELA, A.L. Patente: Cápsulas gelatinosas de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) como suplemento vitamínico, antioxidante e antimutagênico, um novo nutracêutico. Universidade de Brasília, Brasília D.F., 2007.

GONZALES, D.C.; PEREIRA, D.G.; PAVANELLI, D.P.; SILVA, E.V.; ALMEIDA, F.M. & SIVIERO, F. Bioquímica do envelhecimento. **Instituto de química da USP**, 2001.

HERGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannins in plant extracts. **J. Chem. Ecol.**, v.13, p.437-439, 1987.

KHOURI, J.; RESCK, I.S.; FONSECA, M.P.; SOUSA, T.M.M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A.B.B. & GRISOLIA, C.K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of na aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Brazilian Society of Genetics**, v.30, n. 2, p.101, 2007.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêutica, USP, São Paulo, 2008.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L. & SOUZA, J. A. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *colletotrichum truncatum* e *Fusariu oxysporum*. **Revista ciência agrotec**, edição especial, p.410-419, 2002.

MATOS, E.H.S. **Dossiê Técnico: Cultivo do Pequi e Extração do Óleo.** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico CDT/UnB, 2007.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.G.; LEAL, F.L.; CAETANO, A.C.S. & NASCIMENTO, R.J. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p. 1-12, 2006.

MORESCO, H.H. & BRIGHENTE, I.M.C. Monitoramento de extratos de *Psidium cattleyanum* Sabine através de testes antioxidantes. **Sociedade brasileira de química**, v.64, p. 393-396, 1998.

OLIVA, A.C. **Alelopatia de extrato de *Caryocar brasiliense* Camb, sobre geminação, crescimento, aspecto bioquímico e fisiológico em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.** Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Viçosa. M.G, 2006.

OLIVEIRA, T.T.O.; NAGEM, T.J.; SILVA, M.C.; MIRANDA, L.C.G. & TEIXEIRA, M.A. Ação antioxidant de flavonóides modificados. **Revista agropecuária**, v.34, n.5, p.879-883, 1999.

PAULA, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; PICHEITH, C.M.T. & WEFFOR-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Camb leaves hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.625-630, 2006.

PEREZ, E. **Diagnose Fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb, Caryocaraceae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). Universidade Federal do Paraná, 2004.

RAMALHO, V. C. & JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, M.I.L.; UMAKI, M.C.S.; HIANE, P. A. & FILHO, M.M.R. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides próvitamínicos “A” da polpa do piqui (*cariocar brasiliense* Camb). **Revista B.CEPPA**, v.19 n.1, p.23-32, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods.** ILSI Press, Washington DC, 2001.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, B.H., SOUSA, C.A.S. & PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, n.110, p.711–717, 2008.

SANTOS, M. D. & BLANT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista brasileira de Botânica**. v.21, n. 2, 1998.

SANTOS, R.B.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J.LD.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C. & SILVA, A.A.N. Pequizeiro (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Uma espécie promissora do cerrado Brasileiro. **Revista brasileira de farmacologia**, v.16 n.2, p.212, 2004.

SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.; SILVA, J.A. & PEREIRA, A.V. Avaliação do Potencial de Produção do “Pequizeiro-Anão” sob condições naturais na região sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p. 1-5, 2001.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M. & AYRES, M.C. Fenois totais e atividade antioxidante de Cinco plantas medicinais. **Química Nova**. V.30 n.2, p.351-355, 2007.

SWAIN, T. & HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents, **J. Sci. Food Agric.**, v.10, 2007.

VERA, R.; NAVES, R.V.; NASCIMENTO, J.L.; CHAVES, L.J.; LEANDRO, W.M. & SOUZA, E.R.B. Método de Escarificação de Putâmens de *Caryocar brasiliense* Camb. Caracterização física de frutos do piquizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb). **Revista de agropecuária**, v.35, n.2, 2005.

VIEIRA, F.A.; PACHECO, M.V. & LOPES, P.S.N. Método de Escarificação de Putâmens de *Caryocar brasiliense* Camb. **Revista científica de Agronomia**, v.16, n.8, p. 167-169, 2005.

TAWAHA, K.A.; ALALI, F.Q.; GHARAIBEH, M.; MOHAMMAD, M.A. & ELIMAT, T.E. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. **Food Chemistry**, v.104, p.1372–1378, 2007.