

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) E AVALIAÇÃO NA PREVENÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Simone LEÔNCIO¹, Marcia Miss GOMES¹, Larissa Canhadas BERTAN¹, Luciano TORMEN¹

Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul
Laranjeiras do Sul – Paraná - Brasil

E-mails: simoneh.leoncio@hotmail.com, marciamissgomes@gmail.com, larissa.bertan@uffs.edu.br, luciano.tormen@uffs.edu.br

Resumo: Neste trabalho foram obtidos extratos da folha de pitanga, *Eugenia uniflora* L., com o intuito de avaliar a capacidade antioxidante e a prevenção da oxidação do ácido linoleico através da medida do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os resultados mostraram que a natureza do solvente influencia significativamente no rendimento do extrato, mostrando tendência de aumento no rendimento com aumento da polaridade do solvente, sendo o extrato em metanol com 28% de rendimento, seguido do extrato em etanol com 22%, e o menor rendimento foi obtido em n-hexano com 7%. O teor de compostos fenólicos variou na faixa de 118 - 25 mg AG/g de extrato, sendo o extrato em etanol que obteve maior teor de fenois. A capacidade antioxidante dos extratos apresentou alta correlação com o conteúdo de fenóis totais, apresentando variação de acordo com o solvente utilizado, sendo que a capacidade antioxidante dos extratos em etanol, acetona e metanol foi na mesma ordem de grandeza do antioxidante sintético BHT. Os extratos em etanol, metanol e acetona se destacaram na prevenção da oxidação do ácido linoleico mesmo quando aplicados na menor concentração (200 ppm), resultados na mesma ordem de grandeza daquele obtido com o antioxidante artificial BHT. O extrato obtido com n-hexano apenas apresentou efeito preventivo na oxidação do ácido linoleico quando aplicado na maior concentração, 1000 ppm. Os resultados mostram o potencial antioxidante das folhas de pitanga na redução da oxidação lipídica sendo mais uma alternativa para indústria em substituição dos antioxidantes artificiais.

Palavras-chave: antioxidante; oxidação de lipídios; folha de pitanga; extratos.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por novos produtos à base de extratos oriundos de fontes naturais em substituição a corantes, conservantes e outros de origem artificial tem levado as pesquisas científicas a procura por princípios ativos inovadores, conduzindo a indústria buscar por plantas nativas. Dentre estas plantas nativas, encontramos a *Eugenia uniflora* L. que vem sendo estudada por ter perspectivas de exploração comercial, devido múltiplos usos para a indústria alimentícia, cosméticos e farmacêutica com aplicação na medicina popular.

A peroxidação lipídica é a principal causa de deterioração dos ácidos graxos presente em alimentos, é a precursora de desenvolvimento de gosto e aroma desagradável, resultando na depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores. A autooxidação dos lipídios está fortemente associada a reação com oxigênio, sendo conhecido como o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras.

Pare se evitar o processo oxidativo em alimentos faz se o uso de antioxidantes químicos, os quais retardam a velocidade e impedem as reações que causam alteração oxidativa no alimento. Atualmente, os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria de alimentos por promover o aumento da vida de prateleira dos produtos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Pitanga, *Eugenia uniflora* L

A arbórea *Eugenia uniflora* L. é uma espécie conhecida popularmente como pitangueira, pertence ao gênero *Eugenia* e da família Myrtaceae, que possui mais de 500 espécies nativas que crescem naturalmente em regiões subtropicais, das quais cerca de 400 se encontram no Brasil e na América Latina (CORADIN, 2011). Seus frutos e folhas, apresentam elevada presença de compostos como flavonóides, taninos, curzerenos, dentre outros, sendo que os taninos e flavonóides são conhecidos como polifenóis, que possuem atividade antioxidante comprovada, são solúveis em água e em solventes orgânicos polares, além de conferirem a adstringência a muitos frutos e plantas (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os extratos da folha da eugenia uniflora L. tem demonstrado ser eficientes no tratamento de diabetes e obesidade, pois age na inibição da digestão de açúcares e gorduras, reduzindo a absorção gastrointestinal destes nutrientes (ALMEIDA *et al.*, 2012). O extrato hidroalcoólico das folhas exibiu ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Echechiria coli*, *Candida krusei*, *C. parapsilosis* *C. tropicali*, além de ter demonstrado atividade antioxidante (DINIZ, 2013).

De acordo com Ministério da Saúde e Anvisa (2015), os principais constituintes químicos encontrados nas folhas da pitanga foram os taninos, flavonóides e óleo volátil. Estes apresentam atividade antioxidante atribuída principalmente a presença de compostos

da família dos polifenóis. Os polifenóis mais comuns são os tocoferóis e flavonóides, relacionados a estes estão as cumarinas, os derivados do ácido cinâmico, as chalconas, os diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos.

Oxidação de lipídios

Os lipídios são formados por uma mistura de mono, di e triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. Grande parte destas substâncias é oxidável em diferentes graus, de maneira que as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo são os ácidos graxos insaturados (RAMALHO; JORGE, 2006).

A oxidação de lipídios insaturados é iniciada a partir da insaturação das cadeias na presença de oxigênio, sendo uma reação de radicais livres em cadeia. A velocidade da oxidação de lipídios está relacionada ao grau de insaturação do ácido graxo, presença de pró e antioxidantes, condições de armazenamento, como temperatura, umidade, oxigênio e luz (REIS, 2013).

A autooxidação dos lipídios está fortemente associada a reação com oxigênio, sendo conhecido como o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, causando a degradação dos alimentos e alterando as suas características sensoriais durante o processamento e armazenamento (TAKEMOTO *et al.*, 2009).

Uma das formas de se evitar oxidação de óleos e gorduras são os antioxidantes, artificiais ou naturais que atuam eliminando ou diminuindo os radicais livres ou agindo como agentes redutores. No Brasil, as legislações vigentes permitem a adição em óleos e gorduras de BHA e TBHQ, BHT, galatos de propila, dodecila e octila (TAKEMOTO *et al.*, 2009).

METODOLOGIA

Coleta, secagem e moagem das folhas de pitangueira

As folhas da pitangueira, da espécie arbórea *Eugenia uniflora* L., foram colhidas no mês de junho, em uma propriedade rural do município de Laranjeiras do Sul- PR. As folhas foram selecionadas e descartadas as que apresentavam defeitos, foram sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio, 10 mL L⁻¹ por 15 min, imersas em água destilada para o enxágue (repetido três vezes) e removida a água por drenagem.

As folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar à 60°C até massa constante e trituradas em moinho de facas, até obter um material uniforme, sendo utilizadas somente as partículas menores do que 20 mesh, as quais foram armazenadas em vidro âmbar, na temperatura ambiente e estocadas em local escuro.

Obtenção de extratos secos de folhas da pitangueira

O extrato da folha de pitanga foi obtido com extrator Soxhlet utilizando como solventes etanol, metanol, n-hexano e acetona individualmente e com amostra independente de material vegetal. A temperatura do sistema foi ajustada de acordo com a temperatura de ebulição de cada solvente para manter o gotejamento constante dos solventes durante a extração. O tempo de extração foi de aproximadamente 8 horas. Após a extração, o solvente de cada extrato foi removido em evaporador rotativo sob vácuo a 50°C até massa constante.

Caracterização dos extratos

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método *Folin Ciocalteu* de acordo com Bucic-Kojic *et al.*, (2007). A concentração de fenóis foi expressa em mg de ácido gálico (AG) por grama de extrato.

A determinação da capacidade de redução do íon férrico seguiu o método descrito por Rufino *et al.*, (2006). O potencial antioxidante foi expresso em equivalente de padrão Trolox (grama) por grama de extrato.

A determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH, foi realizada pela metodologia proposta por Rufino *et al.*, (2007). A capacidade de sequestro do radical DPPH foi expressa como sendo a massa em grama g de extrato/g de DPPH.

Avaliação da oxidação do ácido linoleico pela medida de TBAR's

A avaliação da oxidação lipídica do ácido linoleico foi realizada através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBAR's, utilizando a metodologia utilizada por Santos (2009).

Foram preparadas soluções dos extratos da folha da pitanga dissolvidos em etanol nas concentrações de 1000 e 5000 ppm, e do antioxidante artificial BHT com concentração de 1000 ppm em etanol, além de uma solução controle apenas com etanol. Foi transferido

para tubo de ensaio de vidro 0,8 mL da emulsão de ácido linoleico (1% de ácido linoleico e 1% de Tween 40 em água destilada) e 0,2 mL da solução de extrato, sendo o mesmo realizado para formulação controle e com BHT. As misturas foram homogeneizadas durante 1 minuto em vortex e incubados em estufa com circulação de ar forçado a 50°C por 24 horas e posteriormente foi medida a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico produzidas, sendo o resultado expresso em mmol de malonaldeído.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos extratos da folha da pitangueira

Na Tabela 1 são mostrados os resultados de rendimento, teor de fenóis totais, todos os resultados (exceção do rendimento) são mostrados como sendo a média ($n = 3$) $\pm$ intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

Tabela 1 - Rendimento e teor de compostos fenólicos totais, em diferentes extratos de pitanga.

Tipo do extrato	Rendimento do extrato em porcentagem (m/m)	Fenóis totais (mg AG/g)
Obtido com etanol	22	154 $\pm$ 9
Obtido com n-hexano	7	25 $\pm$ 1
Obtido com metanol	28	118 $\pm$ 7
Obtido com acetona	12	114 $\pm$ 4

Fonte: autoria própria (2023)

Quando se trata de processos industriais o rendimento do material obtido apresenta grande relevância, uma vez que o processo está relacionado a custos e viabilidade econômica. Na análise dos dados da Tabela 1, observamos que cada solvente proporcionou um rendimento diferente de extrato, essas diferenças de rendimento estão diretamente relacionadas com a polaridades dos solventes e as características químicas da amostra. Os resultados mostram que os compostos presentes nas folhas da *Eugenia uniflora L.*, tem maior afinidade com solventes polares, e consequentemente estes solventes permitem obter maior rendimento. Estes resultados podem ser diretamente relacionados com a composição das folhas de pitanga, mostrando que nelas predominam compostos de polaridade intermediária, semelhante a do metanol e etanol, e que compostos de baixa polaridade, semelhantes a

acetona são menos abundantes, e os apolares, semelhantes ao n-hexano têm abundância ainda menor.

Quanto a presença de fenóis, o extrato que apresentou maior teor foi aquele obtido com etanol, com 154 ± 9 mg AG g⁻¹, seguido dos extratos obtidos com metanol e acetona, que apresentaram valores bem próximos, 118 ± 7 e 114 ± 4 mg AG g⁻¹, respectivamente. No entanto, o extrato obtido com n-hexano apresentou 25 ± 1 mg AG g⁻¹, sendo o n-hexano o solvente que menos extraiu fenóis das folhas de pitanga.

Comparando os resultados podemos afirmar que nas amostras existem fenóis com estruturas muito variadas, desde os mais polares até os menos polares. Os resultados obtidos evidenciam que a maioria dos compostos fenólicos presentes têm caráter polar, visto isto também no estudo de Diniz (2013). Portanto nota-se que a variação na concentração de fenóis nos extratos está diretamente relacionada com a estrutura dos compostos fenólicos presentes na amostra, que são extraídos de acordo com a afinidade com o solvente.

Na Tabela 2 são mostrados os resultados para capacidade antioxidante medida pelo método fundamentado no sequestro do radical DPPH (CSR DPPH) e na capacidade de redução do íon ferro (FRAP). Todos os resultados são mostrados como sendo a média ($n = 3$) $\pm$ intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

Tabela 2 - Capacidade de sequestro do radical DPPH (CSR DPPH) e capacidade de redução do íon férrico (FRAP) em diferentes extratos de pitanga.

Extrato	CSR DPPH (g de extrato/g de DPPH)	FRAP (g de Trolox/ g de extrato)
Extrato obtido com etanol	$0,61 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$
Extrato obtido com n-hexano	$2,45 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,00$
Extrato obtido com metanol	$0,46 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,04$
Extrato obtido com acetona	$0,73 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$
BHT	$0,31 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,05$

Fonte: autoria própria (2023)

Os resultados mostram que os extratos com maior conteúdo de compostos fenólicos (Tabela 1), também apresentaram maior atividade antioxidante, independentemente do método utilizado. Os dois métodos forneceram resultados que se correlacionam. Para o método fundamentado no radical DPPH, quanto menor o valor na Tabela 2, maior é a

capacidade de sequestro deste radical, enquanto que em relação a redução do íon ferro (método FRAP) quando maior o valor na Tabela 2, maior é a capacidade antioxidante.

Os valores da capacidade antioxidante entre os ensaios do radical DPPH e FRAP não apresentaram diferenças significativas entre os solventes com exceção do extrato em n-hexano, o qual apresenta baixa capacidade antioxidante. Essa observação com relação ao n-hexano era esperada visto que este é um solvente apolar e que extrai compostos apolares como terpenos e sesquiterpenos, os quais tem baixa atividade antioxidante e comparados a compostos de polaridade intermediária que são extraídos com solventes como acetona etanol e metanol.

Outro aspecto que deve ser destacado é a capacidade antioxidante destes extratos comparado a algum antioxidante artificial. Neste trabalho foi obtido $0,82 \pm 0,05$ g de Trolox/g de BHT e $0,31 \pm 0,01$ g de BHT/g de DPPH para a capacidade antioxidante do BHT pelo método FRAP e DPPH respectivamente. Estes resultados mostram que a capacidade antioxidante do BHT é maior do que a dos extratos obtidos, mas está na mesma ordem de grandeza, mostrando que os extratos têm viabilidade como antioxidantes naturais, mesmo que não sejam purificados e sejam uma mistura de diferentes compostos.

Avaliação do potencial antioxidante do extrato de folha da *Eugenia Uniflora L.* contra a oxidação do ácido linoleico

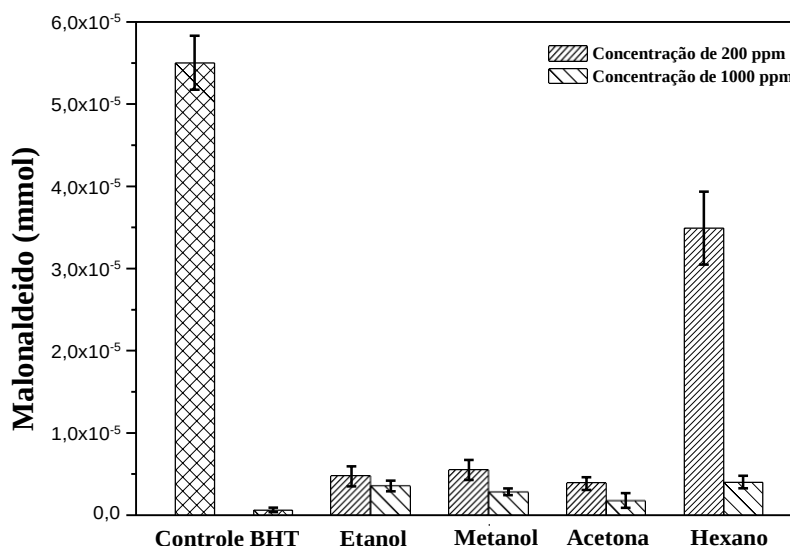
A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico se baseia na quantificação do principal aldeído formado durante a oxidação dos ácidos graxos e outros compostos carbonílicos, o malonaldeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico formando um composto de coloração rosa, que pode ser determinado espectrofotometricamente (PIRES, 2014).

Na Figura 1 é mostrado como oscilou a quantidade de TBARs (expressa sob a forma de malonaldeído) formada na oxidação do ácido linoleico quando exposto aos extratos, sem extrato (controle) e com BHT.

Os resultados mostraram que independente da concentração do extrato, todos reduziram a oxidação do ácido linoleico em relação a formulação controle, principalmente os extratos em etanol, acetona e metanol, os quais já mostraram elevado teor de fenóis e alta capacidade antioxidante. Entretanto, o BHT foi que apresentou melhor resultado, ou seja,

menor quantidade de malonaldeído formado, o que já era esperado, pois apresentou maior capacidade antioxidante.

Figura 1- Quantidade de malonaldeído (mmol) formado a partir do ácido linoleico após incubação com diferentes extratos.



Fonte: autoria própria (2023)

Outro aspecto a ser destacado é que para os extratos em metanol, etanol e acetona não houve grande diferença nos resultados quando comparadas as duas concentrações, mas para o extrato obtido com n-hexano houve grande diferença, sendo que na maior concentração formou menor quantidade de malonaldeído (quantidade próxima a dos outros extratos). Os resultados mostram que ocorreu inibição significativa da oxidação lipídica, mostrando efeito antioxidante efetivo dos extratos.

Com relação a este trabalho vale destacar que os extratos obtidos, que são misturas de muitas substâncias, possivelmente algumas sem atividade antioxidante, apresentou efeito semelhante ao BHT (usados em concentrações semelhantes) que é uma substância pura, usada intensivamente pela indústria alimentícia como antioxidante. Isso mostra que extratos naturais tem grande potencial para uso em alimentos substituindo ou reduzindo a quantidade de antioxidantes artificiais. Entretanto segundo a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006), somente os antioxidantes sintéticos tem limites para seu uso nos produtos alimentícios, já para os antioxidantes naturais não há uma legislação vigente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para o rendimento e atividade antioxidante e compostos fenólicos nos extratos estão diretamente relacionados entre si e com o solvente utilizado. Os extratos em metanol e etanol, foram os que apresentaram maior atividade antioxidante, sendo que os extratos em metanol, acetona e etanol retardaram de maneira semelhante a oxidação do ácido linoleico independente da concentração. Já o extrato em n-hexano apresentou menor teor de compostos fenólicos, menor capacidade antioxidante e apenas mostrou ser efetivo na prevenção da oxidação do ácido linoleico na maior concentração testada (1000 ppm). Tendo em vista a preocupação atual com efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos podem causar ao organismo, observa-se que os extratos de folha de pitanga apresentaram resultados relevantes reduzindo grande parte da deterioração oxidativa, além de poder ser utilizado como suplemento alimentar pela indústria de alimentícia e farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFFS pelo apoio.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. *Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*. Guarapuava (PR), v.8 n.1, p. 177-193, jan./abr. 2012. Disponível em: <https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/viewFile/1326/1744>. Acessada em: 10 ago. 2019.

BRASIL. Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa MAPA nº 51 de 29/12/2006*. Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das Categorias de Alimentos que especifica. Brasília 04 janeiro[2007]. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-51-2006_76049.html#:~:text=Adota%20o%20Regulamento%20T%C3%A9cnico%20de,que%20lhe%20confere%20o%20art. Acessado em: 10 out. 2019.

BUCIĆ-KOJIĆ, Ana *et al.* Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Studyofsolidliquidextractionkineticsoftotalpolyphenols.pdf>. Acessado em: 20 out. 2019.

DINIZ, T. T. G. **Obtenção de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) por extração sequencial em leito fixo usando CO₂ supercrítico, etanol e água.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)

Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 2013. Disponível em:

<http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/912602>. Acessada em: 10 ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA. **Monografia da espécie *Eugenia uniflora* L.**

(pitangueira), Brasília, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/acesso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2017/arquivos/MonografiaEugeniauniflora.pdf>. Acessada em: 20 ago. 2019.

PIRES, M. A. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado.** Dissertação (Mestrado Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos)

Ciência da engenharia de Alimentos) -Universidade Federal de São Paulo. Pirassununga, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-06102014-110832/pt-br.php>. Acessado em 28 out.2019.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*. v. 29, n.4, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/7QPFMbDGVjFgdBGNsCCvhpmp/?format=pdf&lang=en>. Acessado em 20 ago.2019.

REIS, R. C. **Influência da dieta, do uso de antioxidantes e da conservação por congelamento na oxidação lipídica da carne bovina.** Pós graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás /Goiânia - Setembro, 2013. Disponível em:

https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/2013_Renata_Cunha_Seminario2corrig.pdf. Acessado em: 20 ago.2019.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS•+, Comunicado Técnico 128-EMBRAPA; EMBRAPA: Fortaleza, CE Brasil, P.1-4, 2007. Disponível em:

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf. Acessado em 15 nov. 2018.

SANTOS, R. D.; MIGLIORANZA, L. H. S. **Compostos fenólicos de ervas *Lamiaceae* na estabilidade oxidativa da manteiga e avaliação da toxicidade de extrato de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.).** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009. Disponível em:

https://ri.uepg.br/riuepg/bitstream/handle/123456789/856/TESE_RenataDinniesSantos.pdf?sequence=1. Acessado em 10 out.2019.

TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por clae/uv. *Química Nova*. V. 32, n.5, p. 1-6, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/ggcFGQYkDWFTWYRqDKhCYXx/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: 10 out.2019.