



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Tema

Determinação de Compostos Fenólicos nas cascas de Citrus sinensis e Mangiferina indica



Autor: MÁRIO MUCINDO USSEVANE JÚNIOR

Maputo, Novembro de 2014



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Tema

Determinação de Compostos Fenólicos nas cascas de Citrus sinensis e Mangiferina indica



Autor: Mário Mucindo Ussevane Júnior

Supervisor: Prof. Doutor Felisberto Pagula

Maputo, Novembro de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Mário Mucindo Ussevane e Cristina Siteo;
aos meus irmãos :Xavier Ussevane, Margarida Ussevane, Adelina Ussevane, Daniel Ussevane,
Rabeca Ussevane, Mariana Ussevane, Abilio Ussevane e Cristina Ussevane

à minha cunhada Cacilda Mandlate

à minha namorada Madalena Bungueia

pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e a ciência do santo, a prudência.

Provérbios 9: 10

Melhor é o fim das coisas do que o princípio delas; melhor é o longânimo do que o altivo do coração.

Eclesiastes 7:8

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao Deus Altíssimo pela vida, graça, inteligência e sabedoria.

Agradeço ao Prof. Doutor Felisberto Pagula, como meu supervisor, pela paciência, apoio, ensinamento na realização deste trabalho.

Agradeço ao corpo docente do departamento de química, nomeadamente Prof. Doutor Carvalho Madivate, Prof. Doutor François Munyemane, Prof. Doutor Victor Skripets, Prof. Doutor Victor Sevastyanov, Prof. Doutora Tatiana Kuleshova, Prof. Doutora Fung Dai Kin, dr. Ercilio Zimila, pelos seus ensinamentos e apoio moral.

Aos meus amigos e colegas Elídio Alfredo, Abel João, Mário Ouana, Leonardo Jossias, Belmiro Guele, Fernando Cuamba, Emerson Machava, João António, Ângelo Mutombene.

O meu especial agradecimento vai ao meu amigo Juvenale Chitovele pelo apoio moral e encorajamento durante a longa caminhada.

Ao meu amigo, assistente dr. Alcides Everildo José Siteo pela amizade, atenção e ensinamentos vai o meu especial agradecimento.

Os meus agradecimentos vão também para todos os funcionários do departamento de química, aos técnicos do Laboratório de Produtos Naturais, principalmente à dr^a Amélia Furvela, ao funcionário do registo académico do Departamento de Química, sr. Macuácuá, ao sr. Ramiro pelo apoio moral e amizade durante o curso.

Aos meus irmãos pelo amor incondicional, compreensão e apoio durante esta caminhada estudantil, e

A todos aqueles que de uma forma directa ou indirecta me ajudaram a atingir esta fase da minha vida, vai aí o meu KHANIMAMBO!

Declaração de honra

Declaro pela minha honra que este trabalho é fruto da minha investigação com o auxílio das fontes bibliográficas citadas ao longo deste trabalho e que foram por mim consultadas.

(Mário M. Ussevane Júnior)

RESUMO

O objectivo do presente trabalho foi de determinar e comparar o teor de compostos fenólicos presentes nas cascas da laranja e da manga.

Compostos bioactivos tais como polifenóis presentes em frutas e vegetais estão recebendo uma crescente atenção devido ao seu potencial antioxidante. O consumo de tais antioxidantes está relacionado com benefícios à saúde incluindo protecção contra doenças cardiovasculares e cancro.

A laranja e a manga fazem parte das frutas mais consumidas em todo o mundo. Estas contêm diferentes compostos fenólicos responsáveis por vários benefícios à saúde humana. As cascas destas frutas formam cerca de 20% de toda a fruta e têm sido descartadas tornando-se assim, uma fonte de poluição.

No presente estudo foi realizada a extracção, identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes na casca da laranja e da manga.

Para a extracção destes compostos foi usado o método de soxhlet com o sistema de solventes EtOH-H₂O (4:1). Observou-se que tanto a casca da laranja assim como a da manga apresentam compostos fenólicos, tendo a manga apresentado um maior teor destes em relação à laranja. Dentre os compostos identificados nas cascas das nossas frutas estão os flavonóides, fenóis, quinonas, saponinas, taninos e triterpenóides.

SIGNIFICADO DAS ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

BHA- butil hidroxianisol

BHT- butil hidroxitolueno

C- Carbono

CF- Compostos fenólicos

DNA- ácido desoxirribonucleico

EAG- equivalente de ácido gálico

EAT- equivalente do ácido tânico

EtOAc- acetato de etilo

EtOH- etanol

F- Flavonóides

HPLC-Cromatografia líquida de alta eficiência

nm-nanometros

P.fr.-Peso fresco

PG- propil galato

RL- Radicais livres

ROS- espécies reactivas do oxigénio

TBHQ- terc-butyl-hidroquinona

UV- ultravioleta

UV-Vis-Ultravioleta e Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de antioxidantes sintéticos e naturais.....	2
Figura 2: Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide.....	7
Figura 3: Estrutura das principais classes de flavonóides.....	10
Figura 4: Exemplo de um fenol simples.....	11
Figura 5: Exemplo de um ácido fenólico.....	11
Figura 6: Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos.....	11
Figura 7: Exemplo de um tanino hidrolisável.....	12
Figura 8: Exemplos de uma acetofenona e de um ácido fenilacético.....	13
Figura 9: Exemplo de uma cumarina.....	13
Figura 10: Exemplo de uma benzofenona e de uma xantona.....	13
Figura 11: Exemplo de um estilbeno.....	14
Figura 12: Exemplo de uma chalcona.....	14
Figura 13: Exemplo de um lignano.....	15
Figura 14: Biossíntese de compostos fenólicos.....	18
Figura 15: Imagem ilustrativa de <i>citrus sinensis</i>	19
Figura 16: Estrutura dos principais flavonóides que ocorrem em <i>citrus sinensis</i>	20
Figura 17 Imagem ilustrativa de <i>mangifera indica</i>	21
Figura 18: Estrutura de dois compostos fenólicos presentes na manga.....	22
Figura 19: Esquema geral seguido para a realização do trabalho.....	25
Figura 20: Fluxograma experimental.....	27

Figura 21: Esquema da quantificação dos compostos.....	31
Figura 22: Gráfico do teor dos compostos fenólicos nas amostras.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de flavonóides, seus componentes e fontes alimentares.....	9
Tabela 2: Grupos de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos.....	12
Tabela 3: Classificação científica de <i>Citrus sinensis</i>	19
Tabela 4: Classificação científica de <i>Mangiferina indica</i>	21
Tabela 5: Reagentes e solventes.....	26
Tabela 6: Interpretação dos resultados com base nas cores	29
Tabela 7: Resultados obtidos nos testes de identificação fitoquímica na casca de <i>Citrus sinensis</i>	33
Tabela 8: Resultados obtidos nos testes de identificação fitoquímica na casca de <i>Mangiferina indica</i>	34
Tabela 9: Teor dos compostos fenólicos em mg de ácido tânico.....	35

NOME DOS COMPOSTOS ENUMERADOS

1. Molécula de flavonóide
2. Quercetina
3. Genisteina
4. Apigenina
5. Catequina
6. Taxifolina
7. Pelargonidina
8. Tirosol
9. Ácido p-hidroxicinâmico
10. Ácido ferúlico
11. Ácido sinápico
12. Tanino hidrolisável
13. 2-hidroxiacetofenona
14. Ácido 2-hidroxifenilacético
15. Escopoletina
16. 2,4,6,3'-Tetrahidroxibenzofenona
17. Mangiferina
18. Resveratrol
19. Chalcona naringenina
20. Niazol
21. Naringina
22. Hesperidina
23. Narirutina

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Preparação das soluções.....	49
ANEXO B. Fórmulas usadas para o cálculo de fenólicos totais.....	51
ANEXO C. Tabelas e Gráficos de absorvâncias de padrões do ácido tânico.....	52
Tabela 1. Padrões de Ácido Tânico.....	53
Tabela 2. Absorvância do conteúdo total dos fenólicos nas amostras.....	53
Figura 1: Gráfico da Absorvância de soluções do ácido tânico vs concentração.....	53
ANEXO D. Material usado.....	54
Figura 2: Moinho.....	54
Figura 3: Estufa.....	54
Figura 4: Rotavapor.....	54
Figura 5: Extractor Soxhlet.....	54

ÍNDICE GERAL

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iii
Declaração de honra	iv
RESUMO	v
SIGNIFICADO DAS ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
NOME DOS COMPOSTOS ENUMERADOS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	3
1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO	4
1.2.1. Geral.....	4
1.2.2. Específicos	4
1.3. Metodologia do trabalho	4
1.3.1. Revisão bibliográfica	4
1.3.2. Amostragem.....	4
1.3.3. Parte experimental	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Compostos fenólicos.....	5
2.1.1. Definição.....	5
2.1.2. Ocorrência e distribuição	6

2.1.3. Nomenclatura.....	7
2.1.4. Classificação	7
<i>Flavonóides</i>	7
<i>Não –flavonóides</i>	10
2.1.5. Actividades biológicas	15
2.1.6. Biodisponibilidade	15
<i>Absorção</i>	15
<i>Metabolismo</i>	15
<i>Eliminação</i>	16
2.1.7. Funções dos CF nas plantas	16
2.1.8. Biossíntese dos compostos fenólicos	17
2.1.8.1. Via do ácido chiquímico	17
2.2. Descrição e Caracterização das frutas do objecto de estudo.....	19
2.2.1. Descrição botânica de <i>citrus sinensis</i>	19
<i>Hesperidina</i>	20
2.2.2. Descrição botânica da <i>mangifera indica</i>	21
<i>Mangiferina</i>	22
III. METODOLOGIAS NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
3.1. Extracção, identificação e quantificação dos compostos fenólicos.....	23
3.1.1. Extracção.....	23
3.1.2. Identificação.....	24
3.1.3. Quantificação	24
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	24
4.1. Aquisição das amostras.....	25
4.2. Secagem e moagem das amostras	25

4.3. Extracção.....	26
4.3.1. Extracção por Soxhlet	26
4.4. Análise qualitativa	28
4.4.1. Ensaio de identificação de flavonóides.....	28
4.4.2. Ensaio de identificação de taninos e fenóis.....	28
4.4.3. Ensaio de identificação de saponinas	29
4.4.4. Ensaio de identificação das quinonas.....	29
4.4.5. Ensaio de identificação de triterpenos e esteróides.....	29
4.5. Quantificação	30
4.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais	30
4.5.1.1. Síntese do reagente de Folin – Ciocalteu	30
4.5.1.2. Procedimento	30
V. RESULTADOS.....	32
5.1. Extracção dos compostos fenólicos	32
5.2. Testes fitoquímicos	32
5.3. Quantificação dos compostos fenólicos.....	35
VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	36
6.1. Extracção dos compostos fenólicos	36
6.2. Identificação dos compostos fenólicos	36
6.3. Quantificação dos compostos fenólicos.....	37
VII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	38
7.1. Conclusões	38
7.2. Recomendações.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

ANEXOS..... 48

I. INTRODUÇÃO

Fitoquímicos são um grande grupo de substâncias não-nutritivas presentes em plantas, que são biologicamente activos e têm um papel importante na interacção das plantas com o seu ambiente assim como revelam ser fontes promotoras de saúde. Vários compostos incluídos neste grupo são considerados antioxidantes, devido ao facto, destes terem capacidade de proteger células e biomacromoléculas neutralizando radicais livres (RL) e, por esta razão, poderem prevenir a degradação oxidativa e certas doenças humanas (cancro, desordens inflamatórias, degeneração neurológica, doenças coronárias, etc). Como consequência, os compostos antioxidantes estão actualmente a ganhar mais interesse e o consumo de alimentos ricos em antioxidantes está aumentando cada vez mais. Vegetais, frutas e outras matrizes das plantas são algumas das mais importantes fontes de antioxidantes naturais (fig.1b) (Fernandez *et al.*, 2010). Compostos fenólicos são substâncias naturais em plantas que são antioxidantes com o potencial de proteger o corpo humano de doenças (Ma *et al.*, 2011).

O crescente interesse nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos em vegetais e frutas deriva de sua forte actividade e baixa toxicidade comparada com antioxidantes fenólicos sintéticos (fig.1a) (Rockenbach, 2008).

Os citrinos são uma importante safra com a sua produção mundial estimada em 155 milhões de toneladas por ano. Laranjas, limões, toranjas e tangerinas representam aproximadamente 98% de culturas industriais, sendo que as laranjas são as que mais se destacam com cerca de 82% do total (Benamrouchea e Madani, 2013).

A manga é uma das frutas tropicais mais importantes no mundo e até 2010 ocupava o quinto lugar no ranking da produção total mundial dentre a maior colheita frutífera (Fernandez *et al.*, 2010).

A manga (*Mangiferina indica*) assim como a laranja (*Citrus sinensis*), podem ser consideradas como uma boa fonte de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos.

As cascas são os principais subprodutos obtidos durante o processamento de várias frutas e foi demonstrado que elas contêm polifenóis (compostos fenólicos), carotenóides, tocoferóis e outros compostos bioativos que possuem vários efeitos benéficos à saúde humana (Ajila *et al.*, 2007).

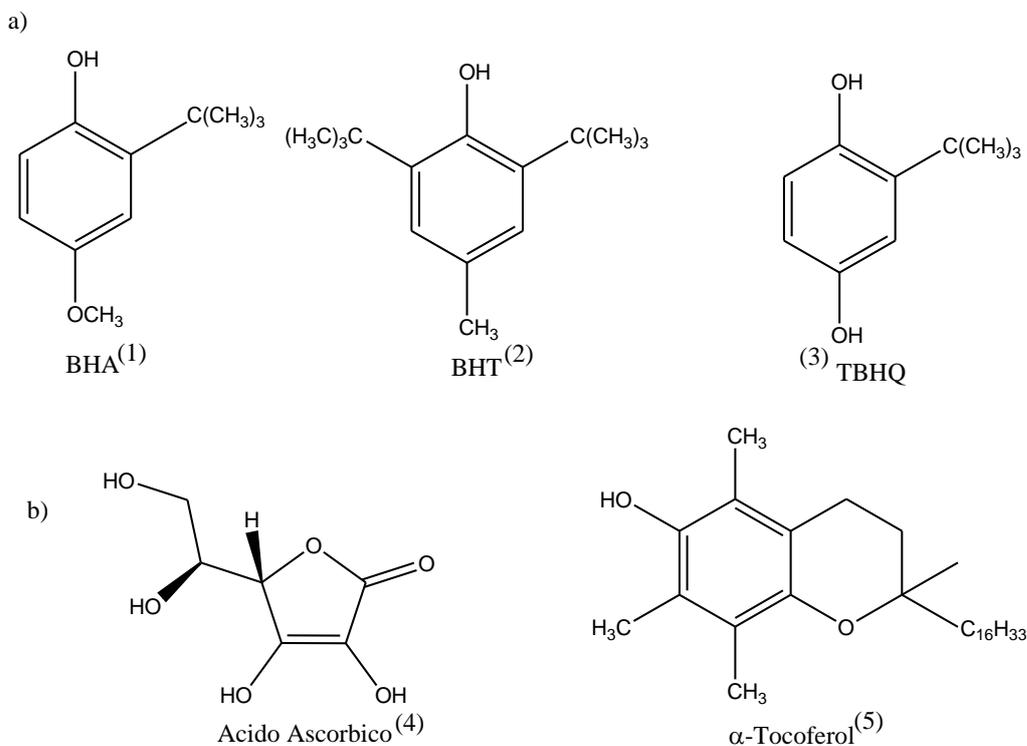


Figura 1. Estruturas de antioxidantes sintéticos (a) e naturais (b)

A triagem fitoquímica possibilita conhecer os compostos químicos e avaliar a presença dos mesmos em uma determinada espécie vegetal. Para dar continuidade à descrição de um grupo de compostos químicos presentes em uma planta, primeiramente faz-se a extração de substâncias químicas com um determinado solvente (Falkenberg *et al.*, 1999).

A avaliação fitoquímica é responsável pelo estudo e análise de metabólitos secundários e a descoberta das funções que os mesmos desempenham nas plantas (Lima *et al.*, 2012).

1.1. JUSTIFICATIVA

O ano de 2011 pode muito bem ser lembrado como um ponto de viragem na economia de Moçambique, com a primeira exportação de carvão a marcar o nascimento de Moçambique como exportador mundial de minerais, e abrindo o caminho para o país assegurar a sua futura sustentabilidade orçamental através das receitas provenientes dos recursos naturais (disponível em www.africanecomiconoutlook.org).

Em 2012, a economia cresceu 7,4% com um contributo diversificado dos vários sectores de actividade, registando uma das maiores taxas de crescimento real a nível mundial. No entanto, Moçambique permanece um dos países mais pobres do mundo e a grande maioria da população rural ainda vive com menos de um dólar por dia e carece de serviços básicos como abastecimento de água potável e acesso a serviços de saúde e escolas (www.ifad.org/operations & Carvalho e Coelho, 2013)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% das pessoas nos países em desenvolvimento ainda dependem de plantas medicinais locais para satisfazerem as suas necessidades primárias de saúde. Como a maioria dos países africanos, Moçambique é um repositório importante de diversidade biológica. Esta diversidade é usada por cerca de 90% da população do país maioritariamente das zonas rurais para satisfazer as suas necessidades de saúde (Ribeiro *et al.*, 2010).

Em Moçambique cerca de 15% do total dos recursos genéticos vegetais (estimado em cerca de 5.500 espécies de plantas) são usados pelas comunidades rurais para fins medicinais e desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde básicos (Krog *et al.*, 2006).

As plantas, em particular as frutas contêm muitas substâncias que apresentam uma gama de propriedades para combater diversas doenças, daí a necessidade de expandir o conhecimento da sua composição bem como dos diferentes constituintes químicos nelas presentes e responsáveis por diversas propriedades benéficas à saúde humana.

A laranja e a manga são algumas das frutas que são fontes de substâncias que exibem por exemplo, actividades anticancerígenas, antiinflamatórias, hemostáticas, que previnem o envelhecimento precoce dentre outras propriedades terapêuticas. Daí o interesse em se fazer este estudo para avaliar o potencial fitoquímico destas frutas.

1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

1.2.1. Geral

- ✓ Determinar os compostos fenólicos presentes nas cascas de *mangiferina indica* e *citrus sinensis*

1.2.2. Específicos

- ✓ Extrair os compostos fenólicos presentes na casca da *mangiferina indica* e *citrus sinensis*
- ✓ Identificar os compostos fenólicos presentes na casca da *mangiferina indica* e *citrus sinensis*
- ✓ Quantificar os compostos fenólicos presentes na casca da *mangiferina indica* e *citrus sinensis*

1.3. Metodologia do trabalho

Este trabalho teve como principais fases metodológicas a revisão bibliográfica, a amostragem e a parte experimental.

1.3.1. Revisão bibliográfica

Com auxílio da revisão bibliográfica foram colhidas informações concernentes à laranja e à manga bem como às actividades farmacológicas, biodisponibilidade e caracterização fitoquímica dos seus constituintes.

1.3.2. Amostragem

15 laranjas doces (*citrus sinensis*) e maduras e 9 mangas (*mangiferina indica*) também maduras foram obtidas em mercados locais da cidade de Maputo, no dia 17 de Janeiro e 15 de Março de 2014 respectivamente. Foram posteriormente levados para o laboratório de produtos naturais do departamento de química para serem acondicionadas num frigorífico.

1.3.3. Parte experimental

A parte experimental consistiu da preparação do material vegetal, que incluiu os processos de: secagem, moagem, extracção dos fitoconstituintes, sua identificação e quantificação e por fim a elaboração do relatório final.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compostos fenólicos

As plantas possuem compostos que não são essenciais à sua sobrevivência, esses por sua vez, são conhecidos por metabólitos secundários.

Esses compostos são responsáveis por ajudarem na adaptação das plantas em ambientes onde se encontram, sendo responsáveis por fontes de substâncias biologicamente activas (Lima *et al.*, 2012).

Entende-se por metabolismo secundário de plantas, o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas. Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta- ambiente (Bezerra, 2008).

Os metabólitos secundários têm como característica uma grande capacidade em relação à produção de substâncias quanto à diversidade contida em uma mesma espécie vegetal. A avaliação fitoquímica é responsável pelo estudo e análise de metabólitos secundários e a descoberta das funções que os mesmos desempenham nas plantas. Esses metabólitos secundários são constituídos de micromoléculas complexas e diversas (Silveira, 2013). Dentre os metabólitos secundários estão os compostos fenólicos (CF) que fazem parte das plantas e em particular das frutas do nosso objecto de estudo.

2.1.1. Definição

Os polifenóis são os mais abundantes antioxidantes na dieta humana. São um grupo de metabólitos secundários ubíquos presentes em plantas superiores que foram identificados como os mais promissores derivados constituintes das plantas, devido ao seu largo espectro de actividade biológica.

Quimicamente podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos OH (Engels *et al.*, 2012 & De la Rosa, 2010).

2.1.2. Ocorrência e distribuição

Segundo De la Rosa (2010), os polifenóis representam uma larga variedade de diversas estruturas a partir de diferentes subclasses, o que torna difícil estimar o conteúdo total de polifenóis em frutas e vegetais. Muitos CF escapam da quantificação por HPLC/UV por causa da presença de compostos não identificados levando assim, à subestimação do conteúdo total de polifenóis. Os frutos com a máxima concentração dos polifenóis são morangos, lichias, e uvas (> 180 mg de equivalente de ácido gálico (EAG) /100 g peso fresco (P.fr)); os vegetais com a máxima concentração são, salsa, alcachofra e couves-bruxelas (> 250 mg de EAG/100 g P.fr); melões e abacates têm a mínima concentração de polifenóis.

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em vegetais e em microorganismos. Dentre os CF pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais encontram-se estruturas como ácidos fenólicos, derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis, ligninas, taninos, e fazem ainda parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (Balasundram *et al.*, 2006).

Os derivados do ácido benzóico são amplamente encontrados nas *gimnospermas* e *angiospermas*. O ácido gálico ocorre em plantas *lignificadas*, as cetonas fenólicas têm distribuição restrita, e os derivados do ácido cinâmico possuem ampla distribuição, podendo ser encontrados como ésteres livres ou heterosídeos. Os ésteres do ácido cafeíco são marcadores taxonômicos em *lamiaceae* (Cheynier *et al.*, 2013).

Os fenóis simples (fenol, pirocateol, resorcinol e floroglucinol) têm distribuição restrita, excepto a hidroquinona, presente em diversas famílias botânicas. São ainda raramente encontrados em bactérias, algas e fungos, mas estão presentes em *líquens-depsídeos* com importante valor farmacêutico (Balasundram *et al.*, 2006 & Cheynier *et al.*, 2013).

Os taninos são divididos em dois grupos, os condensados e os hidrolisáveis.

Taninos condensados são muito abundantes em plantas lenhosas, mas são menos comuns em plantas herbáceas e muitas vezes restritos a tecidos específicos (Ex: camada da semente de *Arabidopsis thaliana* L ou alfalfa). Taninos hidrolisáveis têm uma ocorrência mais restrita do que os condensados, sendo encontrados somente em 15 das 40 ordens de eudicotes (Quideau, 2009).

2.1.3. Nomenclatura

Os CF são quimicamente, um grupo de compostos naturais com características estruturais fenólicas. O termo compostos fenólicos engloba vários subgrupos, e por isso mesmo, a existência de uma nomenclatura variada, pois que apresentam significativas diferenças estruturais (Silveira, 2013).

2.1.4. Classificação

Mais de 8000 compostos fenólicos foram identificados e eles estão amplamente distribuídos por todo o reino plantae e muitos ocorrem em alimentos. Os compostos fenólicos são caracterizados por no mínimo ter um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos.

Várias classes podem ser consideradas de acordo com o número de anéis fenol e a estrutura dos elementos que se ligam a esses anéis (Almeida, 2007).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os *flavonóides* e os *não flavonóides*, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais.

Flavonóides

Os flavonóides (F) são CF que possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (C) entre elas (C₆-C₃-C₆) e uma ponte de oxigénio, como demonstrado na figura 2. Nos compostos tricíclicos, as unidades são denominadas núcleos A, B, C e os átomos de C recebem numeração com números ordinários nos núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de linha (') no núcleo B (Dai e Mumper, 2010 & Balasundram *et al.*, 2006).

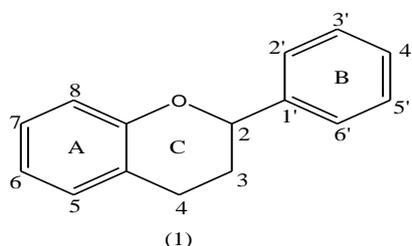


Figura 2. Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide

Os F estão presentes em muitas frutas comestíveis e vegetais, e podem ser divididos em *flavanonas*, *flavonas*, *dihidroflavonóis*, *flavonóis*, *flavan-3-óis*, *antocianidinas*, *isoflavonas* e *proantocianidinas* (Erlund, 2004).

Flavonóis e *flavonas* têm uma dupla ligação entre C₂ e C₃ na estrutura de F e um átomo de oxigênio na posição C₄. Além disso, flavonóis também têm um grupo hidroxilo (OH) na posição C₃.

Dihidroflavonóis têm a mesma estrutura que os flavonóis sem a dupla ligação entre C₂ e C₃.

Flavanonas são representadas pela cadeia saturada de três C e um átomo de oxigênio na posição C₄.

Isoflavonas também têm uma estrutura difenilpropano em que o anel B está localizado na posição C₃. Elas têm estruturas análogas a estrogênios, tais como estradiol, com grupos OH nas posições C₇ e C₄.

Antocianinas são baseadas na estrutura do sal flavilium e são pigmentos das plantas solúveis em água. Elas são encontradas na forma de glicósidos em plantas e alimentos das respectivas agliconas, chamadas antocianidinas. Os açúcares mais comuns encontrados são glucose, rarnnose, xilose, arabinose e fructose, os quais estão ligados principalmente na posição C₃ como glucosídeos e nas posições C₃, C₅ como diglucosídeos. Foi também observada uma glicosilação nas posições C₇, C₃, e C₅.

Flavan-3-óis ou *flavanóis* têm uma cadeia saturada de três C com um grupo OH na posição C₃. Nos alimentos eles estão presentes como monómeros ou como proantocianidinas, que são flavanóis poliméricos (4 a 11 unidades) conhecidos também como taninos condensados. Nos alimentos eles nunca estão glicosilados (Erlund, 2004; Shier *et al.*, 2001; De la Rosa, 2010).

Os principais flavonóides alimentares e suas fontes estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Principais classes de flavonóides, seus componentes e fontes alimentares

Classes	Componentes	Fonte alimentar
Antocianidinas	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Petunidina	Predominam em frutas como: cereja, morango, amora, uva, pitanga, acerola, beringela
Flavanas	Catequina Epicatequina Procianidina Theaflavina	Chás (verde ou preto), lúpulo, nozes, chás, água de coco, vinhos
Flavanonas	Hesperidina Naringenina Fisetina Taxifolina	Quase exclusivamente em frutas cítricas
Flavonas	Apigenina Luteolina Tricetina	Frutas cítricas, cerejas, uvas, cereais, alho, oliva, brócolis, alface, casca de maçã, casca de manga
Flavonóis	Quercetina Rutina Miricetina Kampferol	Vegetais e frutas. A quercetina é a principal representante da classe
Isoflavonóides	Daidzeína Genisteína	Predominam em legumes e particularmente na soja

Fonte. Adaptação de De Oliveira e Bastos, 2011

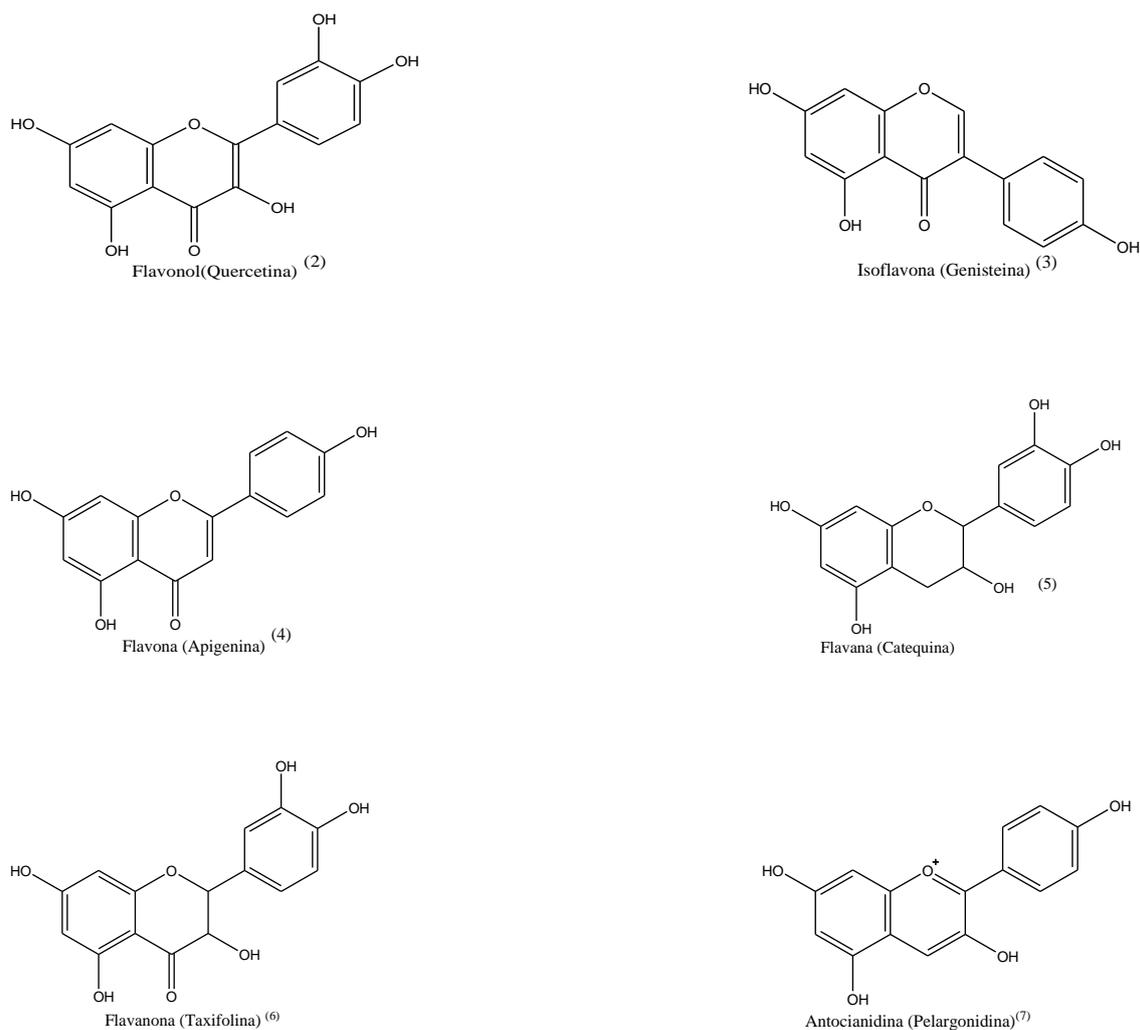


Figura 3. Estrutura das principais classes de flavonóides

Não -flavonóides

Os não-flavonóides são classificados de acordo com o número de carbonos que eles apresentam e compreendem os seguintes subgrupos: *fenóis simples*, *ácidos benzóicos*, *taninos hidrolisáveis*, *acetofenonas* e *ácidos fenilacéticos*, *ácidos cinâmicos*, *benzofenonas*, *cumarinas*, *xantonas*, *estilbenos*, *chalconas* e *lignanós* (Cheynier, 2013 & De la Rosa *et al.*, 2010).

Fenóis simples (C_6), os grupos mais simples, são formados por um anel aromático substituído por um álcool em uma ou mais posições assim como podem ter alguns grupos substituintes, tais como cadeias alcoólicas, na sua estrutura (Cheynier *et al.*, 2013).

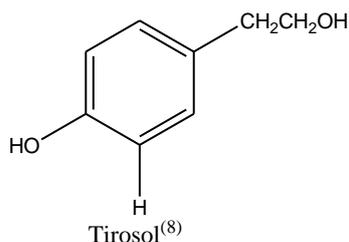


Figura 4. Exemplo de um fenol simples

Ácidos fenólicos (C_6-C_1) com a mesma estrutura que os fenóis simples têm um grupo carboxílico ligado a benzeno (De la Rosa *et al.*, 2010).

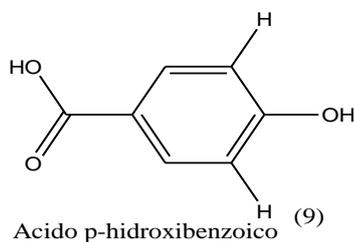


Figura 5. Exemplo de um ácido fenólico

Ácidos hidroxicinâmicos estão incluídos no grupo fenilpropanóide (C_6-C_3). Eles são formados por um anel aromático e uma cadeia de três C. Existem quatro estruturas básicas: os ácidos cumáricos, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos (fig.6a), e ácidos sinápicos (fig.6b). Na natureza, eles são normalmente associados a outros compostos tais como ácido clorogénico, o qual é a ligação entre ácido caféico e ácido quinico. (Silveira, 2013 & Rockenbach, 2008).



Figura 6. Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos (a) ácido ferúlico e (b) ácido sinápico

Na tabela 2 estão apresentados os grupos e fontes de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos.

Tabela 2. Grupos de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos

Grupos	Nome	Fonte
Ácido fenólicos	Ácido gálico	Morango, framboesa, amora
	Ácido protocatequínico	
	Ácido p-hidroxibenzóico	
Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido caféico	Kiwi, cereja, ameixa, maçã, beringela, batata, farinha de milho, café, uva, espinafre, couve
	Ácido clorogénico	
	Ácido ferúlico	
	Ácido cumárico	
	Ácido sinápico	

Fonte: Adaptação de Prado, 2009

Taninos hidrolisáveis são principalmente ésteres de glucose do ácido gálico. São conhecidos dois tipos, que produzem somente ácido gálico na hidrólise, e os elagitaninos, que produzem ácido gálico como produto comum de degradação (Dai e Mumper, 2010 & Wahle *et al*, 2009). Na figura 7 está apresentado um exemplo de um tanino hidrolisável.

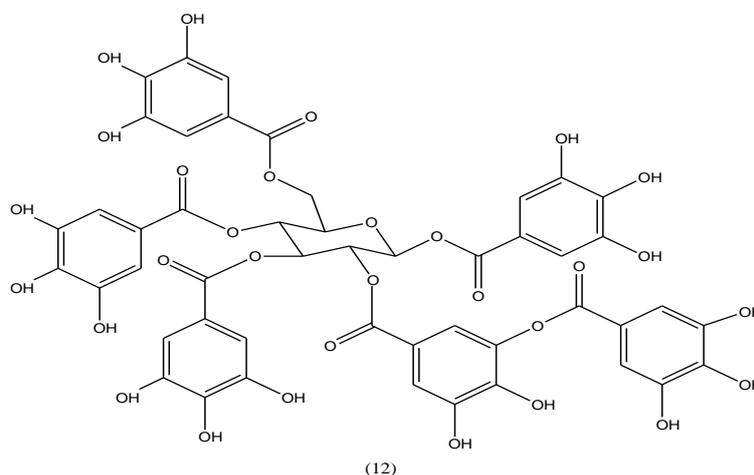


Figura 7. Exemplo de um tanino hidrolisável

Acetofenonas são cetonas aromáticas, e *ácidos fenilacéticos* têm uma cadeia de ácido acético ligado ao benzeno. Ambos têm uma estrutura C₆-C₂ (Shahidi e Naczki, 2006).

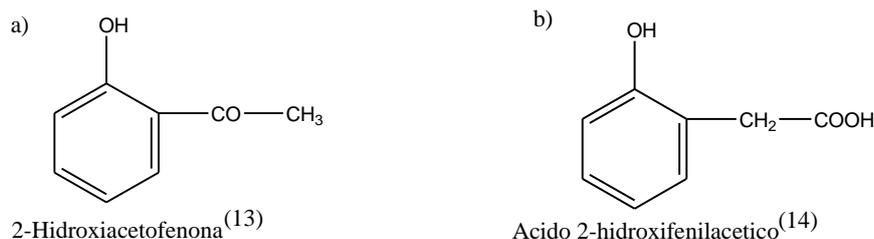


Figura 8. Exemplos de uma acetofenona (a) e de um ácido fenilacético (b)

Cumarinas pertencem a um grupo de compostos conhecidos como benzopironas, que consistem de um anel benzeno ligado a pirona. Elas podem ser encontradas na natureza, combinados a açúcares, como glicosídeos. Elas podem ser categorizadas como furanocumarinos simples, piracumarinas, e cumarinas substituídos no anel pirona (Shahidi e Nacz, 2006 & De la Rosa *et al.*, 2010)

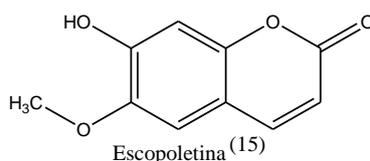


Figura 9. Exemplo de uma cumarina

Benzofenonas e *xantonas* têm a estrutura $C_6-C_1-C_6$. A estrutura básica de benzofenona é uma difenil cetona, e a da xantona é uma 10-oxi-10H-9-oxaantraceno. Mais de 500 xantonas são correntemente conhecidas como existentes na natureza, e aproximadamente 50 delas são encontradas em mangostão com substituintes fenil (Huber, 2012).

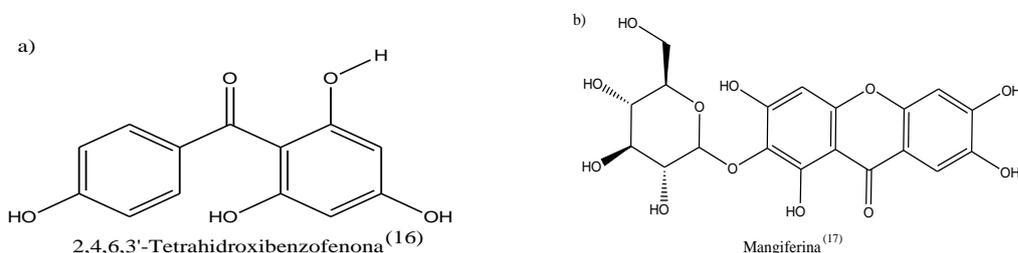


Figura 10. Exemplos de uma benzofenona (a) e de uma xantona (b)

Estilbenos têm um 1,2-difeniletileno como sua estrutura básica ($C_6-C_2-C_6$). Resveratrol, o composto mais conhecido, contém três grupos OH na estrutura básica e é chamado de 3,4,5-trihidroxistilbeno. Em plantas, piceid, o glucósido de resveratrol, é o maior

derivado de resveratrol. Estilbenos estão presentes em plantas como isômeros *cis* ou *trans*. As formas *trans* podem ser isomerizadas para formas *cis* pela radiação UV (Malacrida e Motta, 2005).

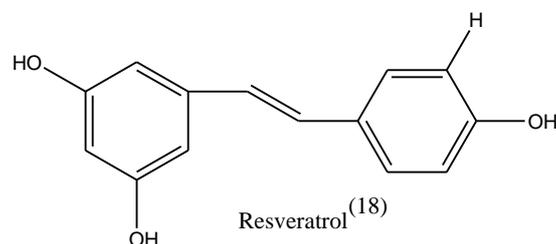


Figura 11. Exemplo de um estilbeno

Chalconas com uma estrutura $C_6-C_3-C_6$ que carecem de um anel-C. Geralmente, as plantas não acumulam chalconas. Depois da sua formação, a chalcona naringenina é rapidamente isomerizada pela enzima chalcona isomerase para formar a flavonona naringenina. As chalconas mais comumente encontradas em alimentos são poretina e o seu 2-O-glucósido, chalconaringenina e arbutina (De la Rosa *et al.*, 2010).

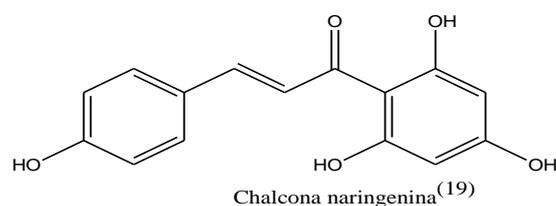


Figura 12. Exemplo de uma chalcona

*Lignan*os são um grande e variado grupo de plantas fenólicas produzidas pela dimerização oxidativa de duas unidades β - β' ligadas a fenilpropanoide (C_6-C_3) e estão amplamente distribuídas no reino plantae (Cheynier *et al.*, 2013).

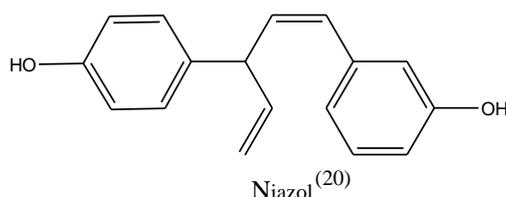


Figura 13. Exemplo de um lignano

2.1.5. Actividades biológicas

Compostos fenólicos exibem um largo espectro de propriedades biológicas tais como: anti-alérgicas, anti-arterogénicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, anti-trombóticas, cardioprotectoras e vasodilatadoras.

Além disso, os CF possuem outras propriedades tais como produção de peróxido de hidrogénio na presença de certos metais, a habilidade de remover electrófilos e inibir reacções de nitroação e quelar metais e, portanto, eles agem bloqueando a iniciação de várias doenças humanas (Cartea *et al.*, 2011 & Cushnie, 2005).

2.1.6. Biodisponibilidade

Biodisponibilidade é um termo proveniente da farmacologia e define a fracção da dose administrada de uma substância que atinge a circulação sistémica e a velocidade com que este processo ocorre. Esta definição abrange vários processos integrados tais como absorção pelo organismo, metabolismo e excreção (eliminação) (De Oliveira e Bastos, 2011 & Jardim, 2010).

A biodisponibilidade é obtida pela medição das concentrações no plasma e na urina dos CF puros ou provenientes de alimentos com composição fenólica conhecida.

Absorção

A absorção de um composto vai depender do quão disponível o mesmo se encontra para a libertação da matriz e ser absorvido no intestino delgado pelos enterócitos.

Nas células intestinais ocorrem duas importantes acções: a deglicosilação dos compostos ligados (pelas enzimas glicosidases presentes na mucosa intestinal) e a glicuronação do CF na forma livre a uma molécula de albumina, acção que influencia na sua capacidade de difusão através das membranas biológicas (Carteia *et al.*, 2011 & Schawanke e Augustin, 2010).

Metabolismo

Após a absorção o composto é transportado para o fígado, onde ainda pode ocorrer a adição de um grupo sulfato ou metilo, ou mesmo de ambos, por acção das enzimas catecol-O-metiltransferase, sulfotransferases, enzimas de fase I e II ou da UDP-glicuroniltransferase. Esta etapa tem a função de diminuir a toxicidade do composto e

aumentar o seu tempo de circulação pelo organismo antes da sua eliminação (Nijveldt *et al.*, 2001; Manach e Donovan, 2004; Germano *et al.*, 2006).

Eliminação

A estrutura ou o tamanho da molécula é um factor que influencia na eliminação de um composto químico. Os CF com elevados pesos moleculares e alto grau de polimerização não sofrem acção enzimática no tracto gastrointestinal e não são absorvidos no intestino delgado, passando ao cólon, onde são hidrolisados ou degradados pelas enzimas da microflora colónica a ácidos fenólicos mais simples. Os compostos de menor peso molecular são eliminados pela urina ou pela bile, podendo os compostos ainda chegar por esta via ao duodeno e sofrer acção das enzimas bacterianas e serem reabsorvidos. Os compostos resistentes à degradação pela microflora colónica (como os taninos hidrolisáveis), são excretados pelas fezes (Manach e Donovan, 2004).

2.1.7. Funções dos CF nas plantas

Como organismos imóveis, as plantas necessitaram de produzir um vasto repertório de substâncias com significado adaptativo de forma a sobreviverem nos diferentes nichos ecológicos terrestres. Estas substâncias, genericamente denominadas metabólitos secundários, têm essencialmente funções de defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas competidoras), de sinalização (atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes), de protecção da radiação ultravioleta (UV) ou de oxidantes (Prado, 2009; Lattanzio *et al.*, 2006; Pimpão, 2009; Cheynier *et al.*, 2013).

Segundo Daayf F (2008), no seu ambiente natural, as plantas estão expostas à radiação ultravioleta-B (280 a 320 nm) do sol, a qual afecta negativamente não só o DNA, mas também proteínas e membranas, levando a uma alteração do metabolismo pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

Com o intuito de se protegerem desta radiação, as plantas sintetizam compostos fenólicos que actuam quer absorvendo a radiação nas camadas epidérmicas dos tecidos, quer regulando o sistema antioxidante nas células ou no próprio organismo (Fernandez *et al.*, 2010).

De acordo com Cheynier *et al.* (2013), uma função importante dos compostos fenólicos, principalmente atribuída aos flavonóides, é a de actuarem como sinalizadores visuais

(pigmentos) em flores para atrair animais polinizadores e em frutos para atrair dispersores de sementes.

Segundo Lattanzio *et al* (2006) a planta sorgo (*Sorghum bicolor*) quando exposta a um eliciador, como um fungo não patogénico, reduz a síntese de antocianinas e aumenta a da fitoalexina 3-desoxiantocianidina, especificamente em redor do tecido eliciado. Defesas induzidas localmente restringem os agentes patogénicos ao local de infecção por um processo chamado resposta hipersensitiva, que causa necrose e morte celular do tecido infectado. As plantas possuem também a capacidade de enviar moléculas voláteis sinalizadoras a partir do local de infecção, que são translocadas para outras partes da planta, ou mesmo para outras plantas, onde vão induzir reacções defensivas. O ácido salicílico foi considerado uma das principais moléculas sinalizadoras endógenas que despoleta o sistema defensivo da planta, num mecanismo designado por resistência sistémica adquirida, que confere uma protecção duradoura contra uma vasta gama de microrganismos (Shahidi e Naczk, 2006).

2.1.8. Biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico ou ainda pela via do ácido malónico. No presente trabalho está descrita a via do ácido chiquímico descrita por Cheynier *et al* (2013).

2.1.8.1. Via do ácido chiquímico

Nesta via o ácido chiquímico (III) é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato (II) e a eritrose-4-fosfato (I). O passo seguinte é a formação do ácido corísmico (não mostrado) que por sua vez gera os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina, e tirosina).

A fenilalanina (IV) é transformada pela PAL (fenilalanina amónio liase) em ácido cinâmico (V), que sofre hidroxilação formando o ácido p-cumárico (VI) que se une a três moléculas de malonato (não mostrado) activado por acetil coenzima A (Acetil-CoA), formando respectivamente p-cumaril-CoA (VII) (este que através de diferentes enzimas origina diferentes compostos fenólicos) e malonil CoA (VIII) que se condensam em estrutura activada que servirá de substrato à acção da enzima chalcona sintase (CHS), originando a chalcona naringenina, precursor de F.

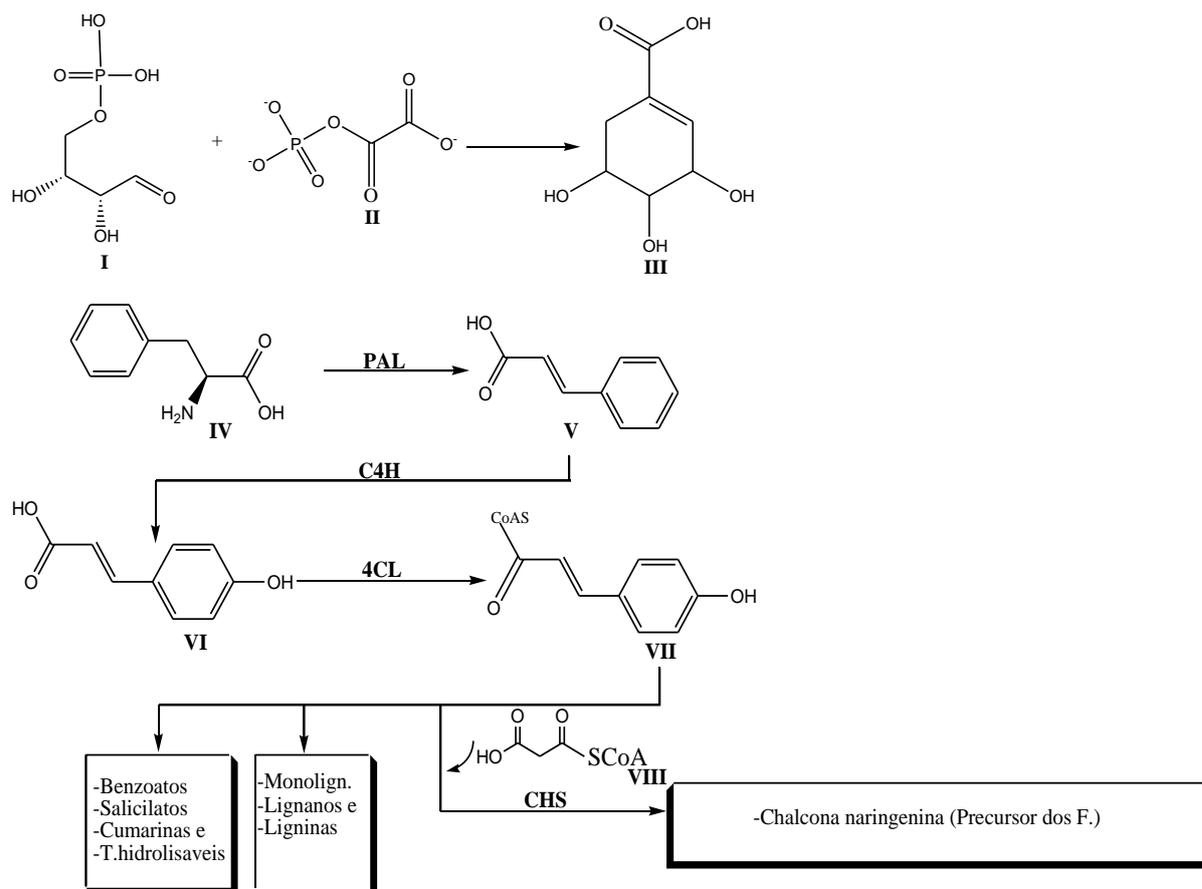


Figura 14: VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO para a Biossíntese dos Compostos Fenólicos. PAL- fenilalanina amônio liase, CHS-chalcona sintase, C4H-cinamato-4-hidroxilase, 4CL- 4-cumaril:CoA-ligase.

Fonte: Adaptação de Cheynier *et al* (2013)

2.2. Descrição e Caracterização das frutas do objecto de estudo

Tabela 3. Classificação científica de *Citrus sinensis*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Rutaceae
Género	<i>Citrus</i>
Espécie	<i>C. sinensis</i>

Fonte: Resende, 2012



a)

b)

Figura 15. Imagem ilustrativa de *Citrus sinensis*: a) plantas e b) e frutos típicos da laranja

Fonte: Donadio, 1999

2.2.1. Descrição botânica de *citrus sinensis*

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore pertencente à família *Rutaceae*, género *Citrus*, espécie *sinensis*. A laranja é um fruto híbrido, criado na antiguidade a partir do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citrus reticulata*) (Benelli, 2010 & Sawalha *et al.*, 2009).

De todas as árvores frutíferas, uma das mais conhecidas, cultivadas e estudadas em todo o mundo é a laranjeira. Assim como todas as plantas cítricas, a laranjeira é nativa do sudeste da Ásia, mas a região de origem ainda é motivo de controvérsia. A mais antiga descrição de cítricos aparece na literatura chinesa, por volta do ano 2000 a.C. Segundo pesquisadores, a laranja foi levada da Ásia para o norte da África e, posteriormente, para o sul da Europa, onde teria chegado na Idade Média. Por volta dos anos 1500, a laranja chegou nas Américas trazida da Europa (Benelli, 2010).

Estudos feitos por De la Rosa *et al* (2010) & Hegazy e Ibrahim (2012) relatam que as flavononas, flavonas e flavanois são os três tipos de F. que ocorrem em frutas cítricas, mas que os principais F. são hesperidina (fig.16b), narirutina (fig.16c), e naringina (fig.16a).

Shahidi e Naczk (2006) & Cerqueira (2009) ressaltam que a hesperidina é o glicosídeo mais predominante na casca da laranja.

O conteúdo total de polifenóis é maior na casca dos frutos cítricos do que na fruta sem casca (Benelli, 2010).

As estruturas dos F acima citados são demonstradas de seguida.

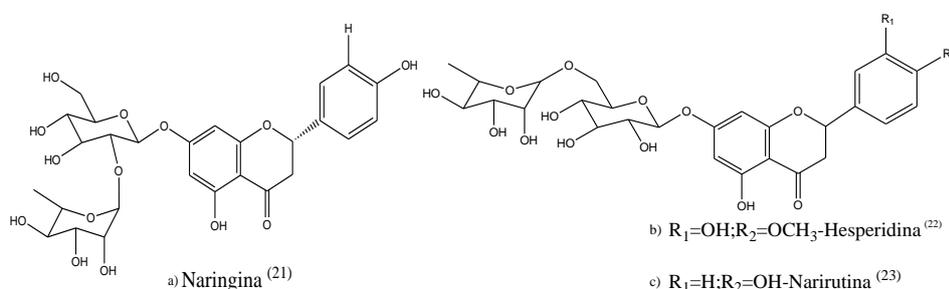


Figura 16. Estrutura dos principais tipos de F. que ocorrem em *citrus sinensis*

Fonte: Adaptação de Crozier *et al.*, 2009.

Hesperidina

A hesperidina é um glicosídeo de flavanona que consiste de uma aglicona e um dissacarídeo ligado. Está presente em um número maior de frutas e vegetais. Até agora, não foram detectados sinais de toxicidade em relação ao seu consumo normal. A hesperidina e os seus derivados têm sido reportados como aqueles que possuem um largo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo actividades anti-hiperglicémicas, antihipercolesterímicas, anti-inflamatórias e antihipertensivos (Zhang *et al.*, 2012).

Tabela 4. Classificação científica de *Mangifera indica*

Reino	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Anacardiaceae
Gênero	<i>Mangifera</i>
Espécie	<i>M. indica</i>

Fonte: Canuto, 2009



a)

b)

Figura 17. Imagem ilustrativa de *Mangifera Indica* a) planta e b) frutos

Fonte: Canuto, 2009

2.2.2. Descrição botânica da *mangifera indica*

A mangueira (*Mangifera indica*) é uma fruteira perene de porte arbóreo, dotada de copa frondosa, pertencente à família *Anacardiaceae*. Oriunda da Índia, a mangueira é actualmente cultivada em diversas partes do globo terrestre, existindo diferentes variedades (Fasoli e Righetti, 2013).

A sua raiz é pivontante, permitindo uma boa sustentação da planta e sobrevivência em períodos de seca. Sua inflorescência é polígama, ou seja, apresenta flores hermafroditas e masculinas na mesma panícula, que dependendo do cultivar, pode produzir frutos com características distintas (Canuto, 2009). Desta forma, o fruto poderá apresentar tamanho e peso variando de poucos gramas a dois quilogramas, além de diferentes formatos

(ovada, oblonga, arredondada), e casca com variações de cores (verde, amarelo e vermelho). Segundo De Araújo (2012) o fruto da mangueira é uma drupa composta por exocarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (caroço), de aparência exótica. A casca é macia e envolve a polpa de coloração amarela, que pode apresentar-se fibrosa de acordo com a cultivar. No interior da polpa encontra-se o caroço que é fibroso, apresentando formas similares, mas de tamanhos diferenciados. Além de serem caracterizados em diversas variedades, os frutos podem ser divididos em dois grupos: o indiano, monoembriônica, fortemente aromática, de coloração atraente e suscetível à antracnose; e o indochinês, poliembriônica, com caroços longos e achatados, pouco aromática e resistentes à antracnose.

De acordo com pesquisas feitas por Huber (2012) estudos recentes têm apontado o uso de cascas de manga como fonte de compostos fenólicos, uma vez que elas contêm um perfil variado de glicosídeos de xantona e de flavonóis. Os principais compostos fenólicos presentes na manga são os ácidos gálico e elágico, bem como galatos, galo taninos, taninos condensados, mangiferina, catequina, epicatequina e ácido benzóico nas sementes, e mangiferina (fig.17a) e quercetina (fig.17b), na forma de aglicona e de glicosídios na casca, evidenciando um maior potencial antioxidante nesta em relação à semente.

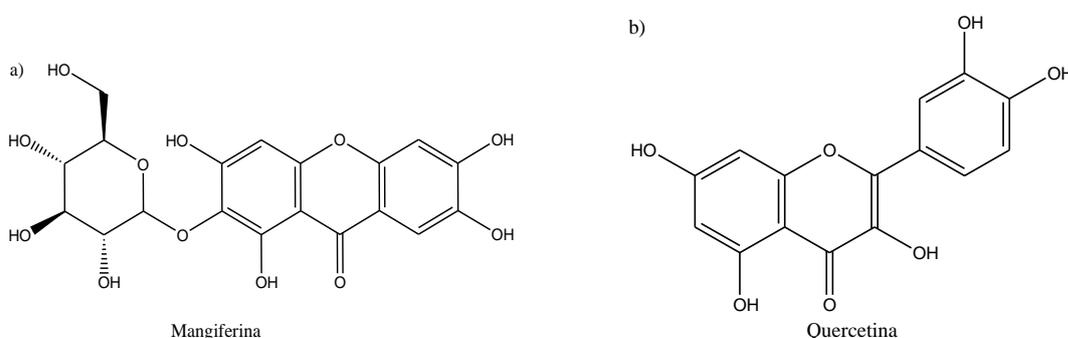


Figura 18. Estruturas de dois CF presentes na casca da manga (*mangifera indica*)

Fonte: Huber, 2012

Mangiferina

De acordo com Montañez *et al* (2014) a *Mangiferina* (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-2-glucopiranosido) é uma xantona c-glucosido, identificado em maior concentração na fruta da manga.

A *Mangiferina* é um flavonóide comumente presente em frutos da família *Anarcadeacea*, a exemplo da manga. Encontra-se, principalmente, nas cascas deste fruto, bem como nas folhas da mangueira. Este flavonoide, é pertencente ao grupo das xantonas ($C_6-C_1-C_6$) composto derivado da *C*-glicosilxantona. Alguns estudos ressaltam que a mangiferina exibe múltiplas actividades biológicas, como por exemplo, excelente actividade antiviral, acção antioxidante e imunoprotectora. A bioactividade da mangiferina está relacionada com sua acção antioxidante, actuando como sequestrador de espécies radiculares e como quelante de metal (De Araújo, 2012).

III. METODOLOGIAS NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

3.1. Extracção, identificação e quantificação dos compostos fenólicos

3.1.1. Extracção

A extracção é uma operação fundamental na fitoquímica, que consiste na separação de um componente ou de um princípio activo de uma mistura, por meio de um solvente. Esta operação é largamente empregada para separar um composto orgânico de soluções ou suspensões aquosas onde se encontra. O procedimento consiste em agitar a mistura com um solvente orgânico imiscível com a água e permitir a separação das camadas. Os diferentes solutos presentes distribuem-se entre as fases, aquosa e orgânica, conforme as solubilidades relativas (Bonner e Castro, 1981).

A extracção dos componentes fenólicos em plantas e frutas é influenciada pela sua natureza química, o método de extracção empregado, tamanho da partícula, tempo e condições de armazenamento, bem como a presença de substâncias interferentes (Khoddami, 2013).

A solubilidade desses compostos é influenciada pelo tipo de solvente utilizado, o grau de polimerização dos compostos fenólicos, bem como a sua interacção com outros constituintes alimentares e formação de complexos insolúveis (De Oliveira e Bastos, 2011).

Os extractos fenólicos de materiais vegetais são sempre uma mistura diversificada de compostos fenólicos solúveis no sistema solvente utilizado. Solventes como metanol, etanol, propanol, acetona e acetato de etilo têm sido utilizados para a extracção de compostos fenólicos. Também é comum o uso de mistura de água e solventes orgânicos (Salas *et al.*, 2010).

3.1.2. Identificação

A pesquisa fitoquímica dá a conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Na falta de pesquisas químicas sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários que são relevantes das mesmas. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por determinada actividade biológica, a investigação deverá ser direccionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (Simões *et al.*, 1999).

Dentre as principais classes de metabólitos secundários, foram realizados testes para a identificação de fenóis, flavonóides, taninos, saponinas, quinonas, esteróides e triterpenóides nas cascas de manga e da laranja.

3.1.3. Quantificação

Métodos espectrofotométricos

Um grande número de métodos espectrofotométricos para a quantificação dos compostos fenólicos em materiais da planta foi desenvolvido. Baseado em diferentes princípios, estes ensaios são usados para determinar vários grupos estruturais presentes nas plantas.

Todos os compostos fenólicos exibem uma absorção intensa na região de UV do espectro e aqueles que são coloridos também absorvem fortemente na região do visível (Lattanzio *et al.*, 2006)

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Nesta parte são apresentados todos os procedimentos desde a amostragem até aos ensaios laboratoriais tendo em conta os objectivos traçados bem como as condições analíticas disponíveis no laboratório de química dos produtos naturais, local onde foram realizados os ensaios.

O esquema que se segue mostra a sequência das actividades seguidas para a realização do presente trabalho.

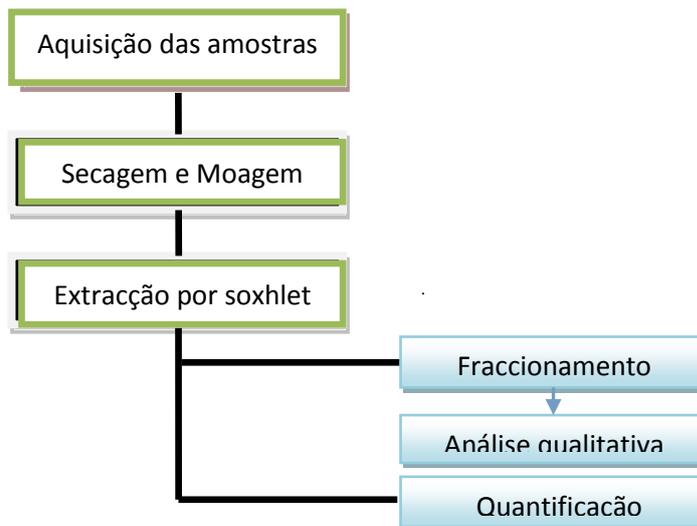


Figura 19. Esquema geral seguido para a realização do trabalho

4.1. Aquisição das amostras

As amostras de manga (*mangiferina indica*) e laranja (*citrus sinensis*) foram obtidas em mercados locais da cidade de Maputo, no dia 17 de Janeiro e 15 de Março respectivamente, e foram posteriormente levados para o laboratório de produtos naturais do departamento de química para serem acondicionadas num frigorífico.

4.2. Secagem e moagem das amostras

Passado o tempo de conservação no frigorífico, as amostras foram descongeladas, descascadas e secas.

As cascas foram secas na estufa de marca *Series 2000* (vide na Figura 3 do Anexo D) a uma temperatura de 50°C durante 48 horas. Depois da secagem, as amostras foram moídas num moinho de marca *IKA - WERKE* (vide na Figura 2 do Anexo D). As amostras foram moídas com o intuito de se reduzir as mesmas até aproximadamente 1mm de diâmetro. Depois de moídas as amostras, uma parte foi submetida a extração e a parte restante conservada em copos de precipitação previamente bem lavados e secos na estufa.

4.3. Extracção

Com o objectivo de se obter resultados precisos e confiáveis, foi necessário o uso de solventes puros. A tabela 5 mostra os reagentes e solventes usados para extracção e os testes fitoquímicos.

Tabela 5. Reagentes e solventes

Reagentes e solventes orgânicos-Grau de pureza	Reagentes inorgânicos
<i>n</i> -Hexano -95%	Solução aquosa de cloreto férrico 5%
Anidrido acético - $\geq 98,5\%$	Solução alcoólica cloreto férrico 1%
Clorofórmio - $\geq 99,8\%$	Solução de ácido clorídrico 10%
Acetato de etilo -99,5%	Solução de ácido sulfúrico 10%
Etanol absoluto 99,7-100%	Solução de amónia 10%
Diclorometano - 99,5%	Solução aquosa de hidróxido de sódio 10%
Solução aquosa de acetato de chumbo 10%	Ácido sulfúrico concentrado, 99%
	Água destilada
	Ácido clorídrico, 37%

4.3.1. Extracção por Soxhlet

A extracção por Soxhlet consiste num processo de extracção exaustiva de um sólido (amostra) previamente moído por meio de um líquido: Faz-se um refluxo contínuo durante um certo tempo até à descoloração do material em extracção contido no interior de um cartucho de material poroso. A extracção dos CF nas duas frutas do nosso objecto de estudo foi feita de acordo com o método descrito por Silva *et al* (2010).

Depois da preparação da amostra no laboratório, 3g da amostra de *citrus sinensis* foram submetidas a extracção por Soxhlet (vide figura 5 do anexo D) para a obtenção do extracto bruto. A extracção foi feita com 200mL de um sistema de solventes EtOH-H₂O

(4:1) durante 2h. Passado este tempo, a solução extraída foi colectada em um balão de fundo redondo e levada à evaporação num rota vapor (Buchi, Switzerland, vide figura 4 do anexo D), e depois preparada para a análise dos constituintes fenólicos totais.

Para a extracção dos CF na *mangiferina indica*, foi seguido o mesmo procedimento que o usado para a extracção de CF em *citrus sinensis*.

A figura 20 mostra o fluxograma usado para a realização do processo de extracção.

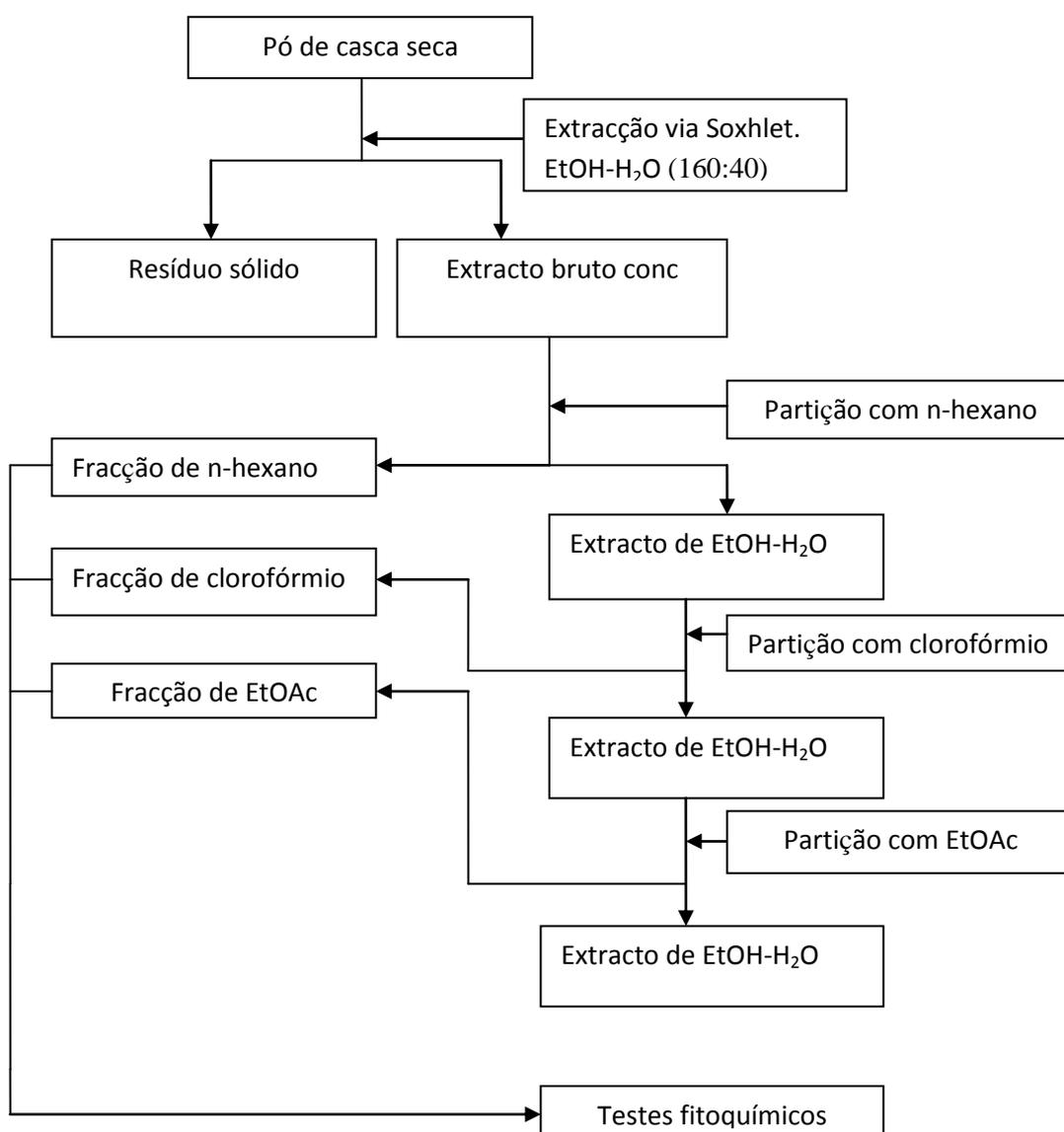


Figura 20. Fluxograma experimental

4.4. Análise qualitativa

Os testes fitoquímicos foram realizados de acordo com os métodos descritos por Matos (1997), Barbosa *et al*, (2004) e De Oliveira e Bastos, (2011).

4.4.1. Ensaio de identificação de flavonóides

4.4.1.1. Teste de cianidina ou de Schinoda

O procedimento deste teste consistiu na adição de aproximadamente 0,5 cm de fita de magnésio e 2 mL ácido clorídrico concentrado a 2 mL de extracto num tubo de ensaio. O fim da reacção deu-se pelo término da efervescência.

4.4.1.2. Teste de cloreto férrico

O procedimento deste teste consistiu na adição de aproximadamente 1 mL da solução de cloreto férrico (FeCl_3) num tubo de ensaio com 1 mL de extracto.

4.4.1.3. Teste do meio alcalino

O teste do meio alcalino consistiu na alcalinização de 1 mL de extracto num tubo de ensaio adicionando cerca de 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH).

4.4.1.4. Teste do meio ácido

O teste do meio ácido consistiu na adição, num tubo de ensaio, de cerca de 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1 mL de extracto.

4.4.2. Ensaio de identificação de taninos e fenóis

4.4.2.1. Teste de cloreto férrico

O teste de cloreto férrico consistiu em adicionar cerca de 2 mL do extracto num tubo de ensaio e, de seguida, a adição de algumas gotas de cloreto férrico, com agitação forte.

4.4.2.2. Teste de acetato de chumbo

O teste de acetato de chumbo [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$] consistiu em adicionar cerca de 2 mL de extracto num tubo de ensaio e, de seguida, a adição de 3 gotas de acetato de chumbo.

4.4.3. Ensaio de identificação de saponinas

4.4.3.1. Teste de espuma

Num tubo de ensaio com cerca de 1 mL de extracto adicionou-se 1 mL de clorofórmio, 2,5 mL de água destilada e logo após filtrou-se para um outro tubo de ensaio. Em seguida agitou-se permanentemente por cerca de 3 minutos.

4.4.4. Ensaio de identificação das quinonas

Para a identificação das quinonas, num tubo de ensaio com cerca de 1 mL de extracto adicionou-se 2 mL de clorofórmio e logo após recolheu-se a fase clorofórmica para outro tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se 3 gotas de hidróxido de sódio.

4.4.5. Ensaio de identificação de triterpenos e esteróides

Num tubo de ensaio evaporou-se até à secura cerca de 2mL de extracto em banho - maria. Dissolveu-se o resíduo com adição de cerca de 3mL de clorofórmio com agitação leve. Em seguida transferiu-se a fase clorofórmica para um outro tubo de ensaio e adicionou-se cerca de 1 mL de anidrido acético. Posteriormente, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico pelas paredes do tubo.

Tabela 6. Interpretação dos resultados com base nas cores

Constituintes	Cor		
		Meio ácido	Meio alcalino
Antocianidinas	Vermelho	Vermelho	Lilás/azul/vermelho/amarelo
Fenóis	Azul-Vermelho		
Flavonoides	Vermelho/castanho	Vermelho	Lilás/azul/vermelho/amarelo
T.condensados	Verde	-----	-----
T.hidrolisaveis	Escuro/azul	-----	-----
Triterpenos	Azul-verde	-----	-----
Quinonas	Rosa	-----	-----
Saponinas	Espuma	-----	-----

Fonte: Adaptação de De Oliveira, 2011

4.5. Quantificação

Para a quantificação dos compostos fenólicos foi feita uma segunda extração, usando -se os mesmos procedimentos como aqueles usados para a primeira extração.

Os métodos espectrofotométricos podem quantificar todos os fenólicos extraíveis ou podem determinar uma substância fenólica específica tal como sinapina ou ácido sinápico, ou uma dada classe de fenólicos tais como ácidos fenólicos. O teste modificado de vanilina, o ensaio de Folin-Denis, o teste de azul de Prússia e o ensaio de Folin-Ciocalteu são os mais frequentemente usados.

4.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais

O método colorimétrico segundo Folin – Ciocalteu é o procedimento mais utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos. Segundo este método, a mistura dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico em meio básico reduz-se ao oxidar os compostos fenólicos, originando azuis de volfrâmio (W_8O_{23}) e molibdénio (Mo_8O_{23}) (Tunchaiyaphum *et al*, 2013).

Para o presente trabalho, o teor dos compostos fenólicos totais nas amostras de *citrus sinensis* e *mangiferina indica*, foi determinado, pelo método de Folin – Ciocalteu.

4.5.1.1. Síntese do reagente de Folin – Ciocalteu

A síntese do reagente de Folin-Ciocalteu seguiu os procedimentos descritos nas comunicações da Comissão Europeia (2010).

Num balão dissolveu-se 100g de tungstato de sódio ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) e 25g de molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) em 700mL de água destilada. Juntou-se à mistura 50mL de ácido fosfórico a 85% e 100mL de ácido clorídrico concentrado. Levou-se à ebulição, mantendo-se sob refluxo durante 10 horas. Juntou-se em seguida 150g de sulfato de lítio ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$) e levou-se de novo à ebulição durante 15 minutos. Arrefeceu-se e adicionou-se água até completar o volume de 1 litro.

4.5.1.2. Procedimento

Num balão de 100mL colocou-se 1mL do extracto aquoso, 50 ml de água destilada, 5mL do reagente de Folin – Ciocalteu, 20 mL de carbonato de sódio a 20% (m/v) e agitou-se. Deixou-se a mistura homogeneizada ao abrigo da luz em repouso por cerca de 30 minutos.

No final a solução foi levada para um espectrofotômetro e a absorvância foi lida a 750nm com percurso óptico de 1 cm. Os testes foram realizados com duas réplicas.

O branco foi preparado com água destilada ao invés do extracto.

Na figura 21 está esquematizado o procedimento para a quantificação dos compostos fenólicos usando o método de Folin – Ciocalteu.

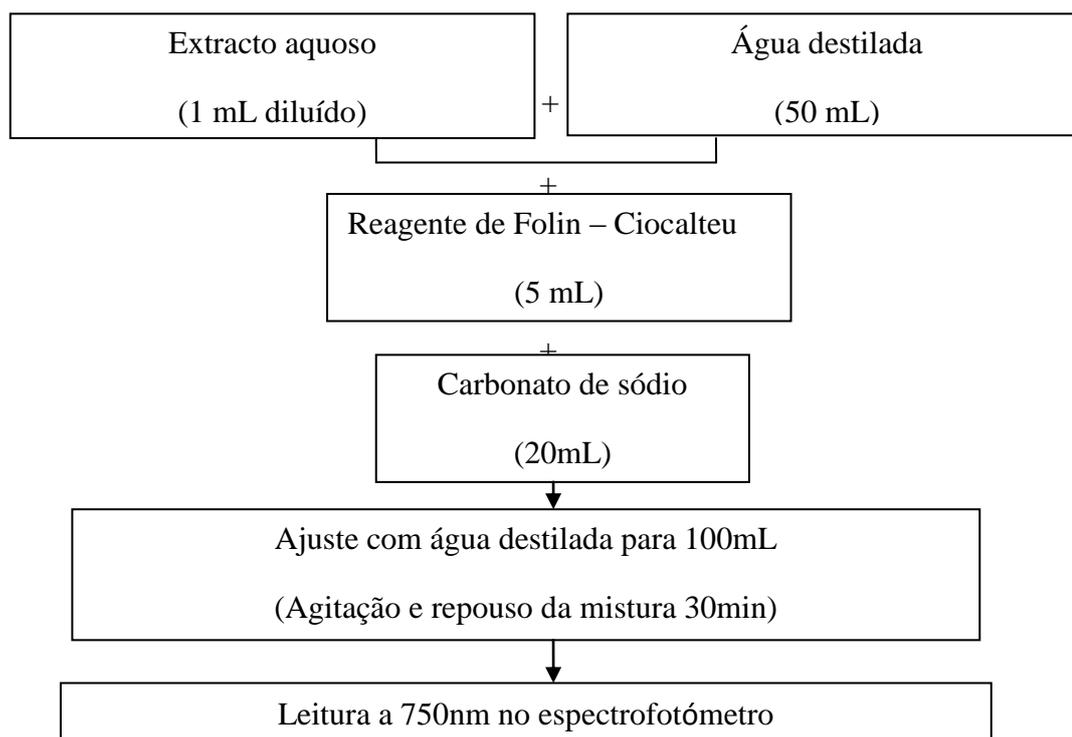


Figura 21. Esquema da quantificação dos compostos fenólicos

O teor dos compostos fenólicos foi determinado por interpolação da absorvância das amostras com uma curva de calibração construída com soluções-padrão de ácido tânico (0, 5, 10, 15 e 20 mg mL⁻¹) a partir de uma solução-estoque de 100mL e expressos como mg de EAT (equivalentes do ácido tânico) por 100mL do extracto. A equação da curva de calibração do ácido tânico, que foi usada para se determinar o teor dos CF é:

$$y=0,052x-0,101$$

onde y é absorvância a 750 nm e x a concentração do ácido tânico.

V. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados da extracção, identificação e quantificação dos compostos fenólicos, obtidos com base nos experimentos realizados e nos métodos já referenciados.

5.1. Extracção dos compostos fenólicos

A extracção com água originou no extracto substâncias sobrenadantes insolúveis após dois dias comprometendo assim todas as análises.

A extracção via Soxhlet usando um sistema de solventes (etanol-água para o nosso caso), mostrou-se adequado visto que o extracto permaneceu inalterado fisicamente durante muito tempo.

5.2. Testes fitoquímicos

Dentre os metabólitos secundários isolados das frutas da laranja e da manga estão: esteróides, fenóis, flavonóides, quinonas, saponinas, taninos e triterpenos.

Nas tabelas 7 e 8 estão apresentados os resultados fitoquímicos obtidos dos extractos de *Citrus sinensis* e *Mangiferina indica* respectivamente.

Tabela 7. Resultados obtidos nos testes de identificação fitoquímica na casca de *Citrus sinensis*

Classe dos metabólitos	Teste fitoquímico	Fracção			
		n –Hexano	Clorofórmio	Acetato de etilo	Hidroalcoólica
Flavonóides	Shinoda	(-)	(+)	(-)	(+)
	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
	NaOH	(-)	(+)	(-)	(-)
	H ₂ SO ₄	(+)	(+)	(+)	(+)
Quinonas	NaOH	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(+)	(+)
Taninos condensados	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(-)	(-)
Taninos hidrolisáveis	FeCl ₃	(+)	(-)	(-)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenóis	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(+)	(+)	(+)	(+)
Triterpenóides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteróides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: (+) Teste positivo (-) Teste negativo

Tabela 8. Resultados obtidos nos testes de identificação fitoquímica na casca de *Mangiferina indica*

Classe dos metabólitos	Teste fitoquímico	Fracção			
		n-Hexano	Clorofórmio	Acetato de etilo	Hidroalcoólica
Flavonóides	Shinoda	(-)	(-)	(+)	(+)
	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
	NaOH	(-)	(-)	(-)	(+)
	H ₂ SO ₄	(+)	(+)	(+)	(+)
Quinonas	NaOH	(-)	(+)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(+)	(+)
Taninos condensados	FeCl ₃	(-)	(+)	(+)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(+)	(-)
Taninos hidrolisáveis	FeCl ₃	(+)	(-)	(-)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenóis	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(-)	(-)
Triterpenóides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteróides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: (+) Teste positivo (-) Teste negativo

5.3. Quantificação dos compostos fenólicos

Neste capítulo são apresentados resultados relativos à quantificação dos CF cuja curva padrão ficou como o descrito na figura 1 do anexo C. De seguida apresenta-se a tabela do teor dos compostos fenólicos em $\mu\text{g/mL}$ de ácido tânico.

Tabela 9. Teor dos compostos fenólicos em $\mu\text{g/mL}$ de ácido tânico

Amostras	$\text{CFT}_{\text{eq AT}}$ (mg/g amostra)
LARANJA	$31,76 \pm 0,98$
MANGA	$59,52 \pm 1,92$

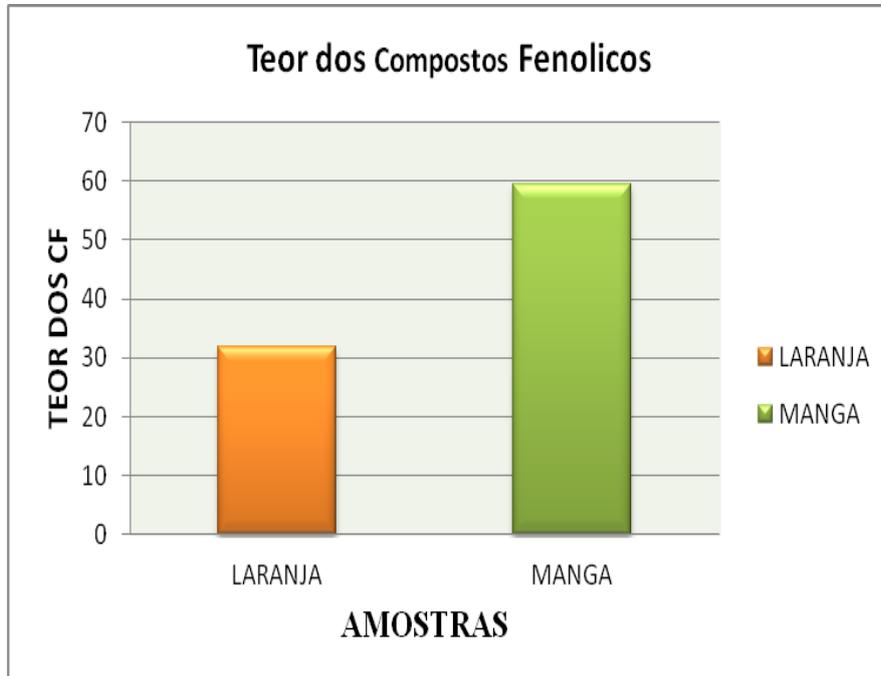


Figura 22. Gráfico do teor dos compostos fenólicos nas amostras

VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Extração dos compostos fenólicos

A extração corresponde a uma fase crítica sendo por isso necessária a escolha de um método fiável.

Não é fácil definir um método adequado para a análise de um diverso grupo de fenólicos principalmente por causa das diferentes estruturas químicas e a sensibilidade dos compostos em relação às condições de extração.

Diversos factores tais como a complexidade da matriz, a variação da solubilidade, a presença de compostos interferentes, longos tempos de extração, bem como as altas temperaturas, podem provocar alterações, como a isomerização ou a oxidação dos compostos fenólicos durante a extração dos mesmos.

O aparecimento de substâncias sobrenadantes nos extractos obtidos com água quente provavelmente tem a ver com a isomerização ou a oxidação dos CF.

De la Rosa e seus colaboradores (2010) defendem que o uso de sistemas de solventes produz um teor elevado de CF comparativamente ao uso de um único solvente.

6.2. Identificação dos compostos fenólicos

Dos resultados obtidos durante a identificação dos CF tem-se que alguns estão de acordo com a literatura enquanto outros não. Por exemplo, nos estudos feitos por Lima et al (2012) usando FeCl_3 para a identificação dos fenóis no extracto hidroalcoólico da casca da manga, a identificação foi positiva.

Segundo Zulkifli *et al.*, (2012) a identificação dos flavonóides na casca da manga deu negativo concordando com o resultado obtido neste trabalho.

El-aal e Halaweish, (2013) usando o ácido tânico como padrão nos seus estudos ressaltam a presença de flavonóides na casca da laranja.

Processos que envolvem a preparação do material vegetal para a extração dos metabólitos secundários podem influenciar ou conduzir a incorrectas identificações.

Vários factores tais como a complexidade da matriz, a variação da solubilidade de CF, a presença de substâncias interferentes, o tempo de extracção e a temperatura podem ter provocado modificações durante a extracção e terem posteriormente conduzido a incorrectas identificações.

Outros factores que poderiam ter contribuído para algumas discórdias entre os resultados deste trabalho e da literatura, são os possíveis artefactos relacionados com a isomerização, hidrólise e oxidação dos CF, produzidas durante a extracção. Estes factores podem ser contornados regulando – se muito bem as temperaturas de extração, e prestando atenção quanto à presença de substâncias interferentes.

6.3. Quantificação dos compostos fenólicos

A presença dos CF num dado alimento pode variar de acordo com a variedade, as condições agrícolas em que foram produzidos, as condições de armazenamento e de processamento do mesmo (Silveira, 2013).

A casca da manga apresentou um teor de CF elevado em mg/g da amostra com $(59,52 \pm 1,92)$ mg/g em relação àquele encontrado na casca da laranja que foi de $(31,76 \pm 0,98)$ mg/g. Estes resultados comparativos estão de acordo com os descritos por Zulkifli *et al.*, (2012). Embora ele tenha utilizado um solvente de extracção diferente do nosso (água quente ao invés do sistema etanol-água), encontrou um valor superior para a casca da manga ($537 \pm 10,01$ mg EAG/g extracto) relativamente àquele da laranja ($277 \pm 10,01$ mg EAG/g extracto).

Já os resultados encontrados por Storck, *et al* (2013), que utilizou metanol como solvente de extracção, diferem dos nossos, uma vez que a quantidade dos CF encontrada na casca da manga ($238,62$ mg/100g EAG) foi inferior àquela encontrada na casca da laranja ($631,29$ mg/100g EAG).

Faller e Fialho (2009), citados por Storck, *et al.*,2013 ao analisarem a quantidade de polifenóis nas cascas da laranja e da manga, encontraram $114,6$ mg/100g e $110,0$ mg /100g respectivamente, ressaltando também quantidades elevadas de CF na casca da laranja em relação a da manga. As diferenças nas quantidades dos CF, devem-se provavelmente à diferentes solventes de extracção utilizados bem como aos padrões usados para a determinação do teor total dos compostos fenólicos.

VII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

7.1. Conclusões

De forma exaustiva foram estudados os compostos fenólicos, suas propriedades, ocorrência e distribuição, funções nas plantas, biossíntese, procedimentos gerais de extracção, identificação e sua quantificação.

a) Os diferentes testes fitoquímicos usados no rastreio dos compostos fenólicos são eficazes, uma vez que confrontando os resultados obtidos no presente trabalho com aqueles descritos na literatura, houve uma concordância em quase todos eles.

b) Neste trabalho a fruta da manga mostrou ser uma boa fonte de compostos fenólicos em relação à fruta da laranja no que refere ao conteúdo total dos fenólicos tendo apresentado um valor superior [(59,52 ± 1,92)mg/g] àquele da laranja [(31,76 ± 0,98)mg/g].

Conclui-se também, no que refere ao conteúdo total dos compostos fenólicos, que o tipo de solvente de extracção, o padrão usado, bem como factores relacionados com o armazenamento, a produção da fruta, o ambiente em que a fruta se encontra podem influenciar.

7.2. Recomendações

Dentre tudo que foi exposto, verifica-se que as pesquisas envolvendo compostos fenólicos devem continuar e recomenda-se:

- a) Aquisição de equipamentos laboratoriais recentes e de qualidade, que permitam a obtenção de resultados puramente científicos.
- b) Aquisição de reagentes de melhor qualidade para obtenção de melhores resultados.
- c) Aquisição de reagentes específicos para ensaios da determinação da capacidade antioxidante.
- d) Estudos envolvendo frutas nativas de Moçambique para a determinação de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A. A. P. (2007). Atividade Antimicrobiana de Extratos e de Compostos Fenólicos e Nitrogenados do Café; Avaliação in vitro e em Modelo Alimentar. Faculdade de Farmacia da UFMG

Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G. e Rao, U. J. S. P. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*. **105**: 982–988

Balasundram, N., Sundram, K. e Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99**: 191–203

Barbosa, W. L. R. Q., Etienne, T., Esabel, C. C. Pinto, L. N., Oliveira, F. Q. e Oliveira, R. M. (2004). Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da UFPA*. **4**.

Benamrouchea, S. L. e Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. **50**. 723– 730

Benelli, P. (2005). Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. osbeck) Mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de Extração. Engenharia de Alimentos. Unisinos.

Bezerra, D. A. C. (2008). Estudo Fitoquímico, Bromatológico E Microbiológico De *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. Denise, Patos – PB

Bonner, W. A. e Castro, A. J. (1981). *Química Orgânica Básica*, quarta edição, Editora Editorial Alhambra, S.A., Madrid, Espanha.

Canuto, K. M. (2009). Propriedades Químicas e Farmacológicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (*Mangifera indica* L.). 1808-9992

Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P. e Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*. **51**: 251-280;

Carvalho, P. G. e Coelho, N. A. (2013). BPI-Estudos económicos e financeiros. Moçambique.

Cerqueira, L. C. R. (2009). Desenvolvimento De Estratégias Analíticas Para Determinação De Flavanons E Psoraleno Por CLAEADAD Em Sucos De Laranjas De Diferentes Procedências. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. e Martens, Stefan. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. **72**: 1-20

Comissão Europeia. (2010): *II (Comunicações)*; *Jornal Oficial da União Europeia*; v – C; n 43; pp 1-60

Crozier, A.; Indu, B. J. e Michael N. C. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.

Cushnie, T.P. e Tim, L. A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**: 343–356

Daayf F, Lattanzio V. (2008). Recent Advances in Polyphenol Research. vol I: Blackwell Publishing Ltd.

Dai, Jin; e Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **15**: 7313-7352

De Araújo, C. R. (2012). Cascas liofilizadas de manga tomy atkins: Teor de fitoquímicos bioativos e potencial antioxidante. Recife.

De la Rosa, L. A., Parrilla, E. A. e Aguilar, G. A. G. (2010). *Fruit and Vegetable Phytochemicals-Chemistry*. Nutritional Value, and Stability. Blackwell Publishing.

De Oliveira, C. A. M. (2011). *Caracterização Química, Avaliação da Atividade In Vitro e Atividade Antifúngica de Pimentas do Género Capsicum spp.* Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição. Teresina.

De Oliveira, D. M. e Bastos, D. H. M. (2011), Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. *Quim. Nova*. **34**: 1051-1056 .

Donadio, L. C. (1999). *Laranja pêra*. Boletim Citrícola. Jaboticabal.SP Funep

El-aal, H.A. A. e Halaweish, F.T. (2013). Food preservative activity of phenolic compounds in orange peel extracts (*Citrus sinensis* L.). **53**

Engels, C., Gänzle, M. G. e Schieber, A. (2012). Fast LC–MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. *Food Research International*. **45**: 422–426

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. **24**: 851–874

Falkenberg, M. D. B., Santos, R. I. e Simões, C. M. O. (1999). *Introdução à Análise Fitoquímica*. Livro: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6ª Edição, UFRGS.

Fasoli, E. e Righetti, P. G. (2013). The peel and pulp of mango fruit: A proteomic samba. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2539–2545

Fernandez, E. H., Romero, M. G., Pancorbo, A. C. e Gutierrez, A. F. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **53**:1130–1160.

Germano, M. P., D'Angelo, V. D., Biasini, T. e Sanogo, R. (2006). Evaluation of antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emética* Vahl. *Journal of Ethnopharmacol*. **23**: 121-127.

Hegazy, A. E., e Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*. **5**: 684-688.

[http:// www.ifad.org/operations/projects/regions/pf/factsheets/mozambique_](http://www.ifad.org/operations/projects/regions/pf/factsheets/mozambique_) Acessado em: 2 de Junho de 2014

<http://www.africanecomiconoutlook.org>. *Perspectivas Económicas em África* acessado em: 5 de Novembro de 2014

Huber, K. (2012). Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera indica* L.): Uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. Universidade de São Paulo – USP – Piracicaba – Brasil.

Jardini, F. A. (2010). Compostos fenólicos da polpa e sementes de Romã (*Punica Unica Granatum*, L.): Atividade Antioxidante Protetora Em Células. *MDCK*. **21**: 509-517.

Khoddami, A. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Department of Plant and Food Sciences, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia.

Krog, M., Falcão, M. P. e Olsen, C.S. (2006). *Medicinal plant markets and trade in Maputo, Mozambique*. Forest & Landscape Working Papers. 16p

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T. e Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry*. Editor: Filippo Imperato.

Lima, W. Q. F., Pereira, T. C. D., Pereira, M. G. M., Brito, N. J. N., Zampieron, R. G. e Da Silva, G. A. (2012). Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. **16**: 678-689.

Ma, X., Wu, H., Liu, L., Yao, Q., Wang, S., Zhan, R., Xing, S. e Zhou, Y. (2011). Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*. **129**: 102–107.

Malacrida, C. R. e Motta, S. (2005). Compostos Fenólicos totais e Antocianinas em suco de uva. **25**: 659-664.

Manach, C. e Donovan, J. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavanoids. *Free Radic. Res.***38**: 771-785.

Matos, F. J. A. (1997). *Introdução à fitoquímica experimental*. 2^a ed. Fortaleza edições UFC. 141 p.

Montañez , G. R., Sánchez, J. A. R., M., Santoyo, C., De la Cruz, G. V., De León, J. A. R. A. e Ocaña, N. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*. **159**: 267–272.

Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E. C., Boelens, P.G., Norren, K. e Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavanoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J.Clin.Nutr.* **74**: 418-425.

Pimpão, R. C. S. (2009). *Compostos Fenólicos e Sua Atividade Antioxidante em Espécies de Juniperus: Análise da Produção Sazonal e Sob Condições de Estresse*. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

Prado, E. (2009). *Composição Fenólica e Actividade Antioxidante de Frutas Tropicais*. Dissertação Apresentada Para a Obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Piraciba. 106p.

Quideau, S. (2009). Chemistry and Biology of Ellagitannins, an Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols. *World Scientific*, London, UK.

Resende, P. A. (2012). *Estudos Morfofisiológicos e Genéticos da Característica Folha Enrolada em Genótipos de Laranjeira Doce*.

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento e Biotecnologia Vegetal. Campinas (SP). 61p.

Ribeiro, A., Romeiras, M. M., Tavares, J. e Faria, M. T. (2010). Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **6**: 33 – 47.

Rockenbach, I. I. (2008). *Compostos Fenólicos, Ácidos Graxos e Capacidade Antioxidante Do Bagaço da Vinificação De Uvas Tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)*. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. 112 p.

Salas, P. G., Soto, A. M., Carreter, A. S. e Gutiérrez, A. F. (2010). *Phenolic-compound-extraction system for fruit and vegetable Samples*. Department of Analytical Chemistry, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

Sawalha, S. M. S., Román, D., Carretero, A. A. S. e Gutiérrez, A. F. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chemistry*. **116**: 567–574.

Schawanke, C. H. A. e Augustin, H. (2010). *Atualizações em Geriatria e Gerontologia III: Nutrição e Envelhecimento*. EDIPUCRS.

Shahidi, F. e Naczk, M. (2006). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. Taylor & Francis e-Library Ed.566p.

Shier, W. T., Shier, A. C., Xie, W. e Mirocha, C. J. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* **39**: 1435–1438.

Silva, M. L. C., Costa, R. Silva, Santana, A. D. S. e Koblitiz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **31**: 669-682.

Silveira, A. L. C. (2013). Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Escola Superior Agrária.

Simões, O. M. C., Schenkel, R. P., Gosmann, G., Mello, P. C. J., Mentz, A. L. e Petrovick, P. R. (1999). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Storck, C. R., Nunes, G. L., De Oliveira, B. B. e Basso, C. (2013). Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: Composição nutricional, aproveitamento na eliminação e análise sensorial de preparações. **43**: 537-543.

Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M. N., e Yoswathana, N. (2013). Extraction of Bioactive Compounds from Mango Peels Using Green Technology. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. **4**: 194-197.

Wahle, K. W. J., Rotondo, D., Brown, I. e Heys, S. D. (2009). Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. Bio-Farms for Nutraceuticals: *Functional Food and Safety Control by Biosensors*, edited by Maria Teresa Giardi, Giuseppina Rea and Bruno Berra.

Zhang , B., Chen, T., Chen, Z., Wang, M., Zheng, D., Wu, J., Jiang, X. e Li, X. (2012). Synthesis and anti-hyperglycemic activity of hesperidin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **22**: 7194–7197.

Zulkifli, K. S., Abdullah, A., Aziman, N. e Kamarudin, W. S. S. W. (2012). Bioactive Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Fruit Peels. *2012 International Conference on Enviroment, Chemistry and Biology*. **49**: 14.

ANEXOS

ANEXO A. Preparação das soluções

Solução padrão de ácido tânico 100µg/mL

Para preparação desta solução pesou-se 1g de ácido tânico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e fez-se o volume.

Da solução acima preparada transferiu-se 1 mL para um balão de 100 mL e fez-se o volume.

Solução padrão de hidróxido de sódio a 0.1N

Para preparar esta solução diluiu-se uma solução comercial de hidróxido de sódio em 1litro de água destilada obtendo-se assim uma solução alcalina de concentração 0,1N.

Solução de cloreto férrico a 1%

Pesou-se 1g de cloreto férrico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e fez-se o volume.

Solução de cloreto férrico a 5%

Pesou-se 5g de cloreto férrico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e fez-se o volume.

Solução aquosa de NaCl a 10%

Pesou-se 5g de NaCl e introduziu-se num copo de Becker para a dissolução. Transferiu-se para um balão de 50 mL e fez-se o volume com água destilada.

Solução aquosa de NaOH a 10%

Pesou-se 10g de NaOH e introduziu-se num copo de Becker e dissolveu-se. Transferiu-se para um balão de 100 mL e fez-se o volume com água destilada.

Solução aquosa de acetato de chumbo [Pb(CH₃COO)₂] a 10%

Pesou-se 10g de acetato de chumbo e introduziu-se num copo de Becker para a dissolução. Transferiu-se para um balão de 100 mL e fez-se o volume com água destilada.

Solução de NH_4OH a 10 %

Numa proveta de 100 mL mediu-se 10g da solução de amónia e introduziu-se num balão volumétrico de 100mL e perpez-se o volume com água destilada.

ANEXO B. Fórmulas usadas para o cálculo de fenólicos totais

1. Determinação do teor total de compostos fenólicos

$$TCF \text{ em g da amostra} = \frac{TCF \text{ eq AT } (\mu\text{g} * \text{mL}^{-1}) * F_{dil} * V_s (\text{mL})}{m}$$

onde:

TCF- Teor de Compostos fenólicos totais

F_{dil}- factor de diluição

V_s- volume da solução preparada

m- massa em gramas da amostra

2. Determinação da média amostral

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

onde:

\bar{x} - média

n- número de determinações

x_i- resultado individual da análise

3. Desvio padrão

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

onde:

s = desvio padrão

4. Determinação de desvio padrão relativo

$$\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$$

onde:

% RSD = percentagem desvio padrão relativo.

ANEXO C. Tabelas e gráfico de absorvância do padrão (ácido tânico) e das amostras.

Tabela 1 . Padrões de ácido tânico

Padrão	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância
P – 1	5	0.101
P – 2	10	0.353
P – 3	15	0.628
P – 4	20	1.060

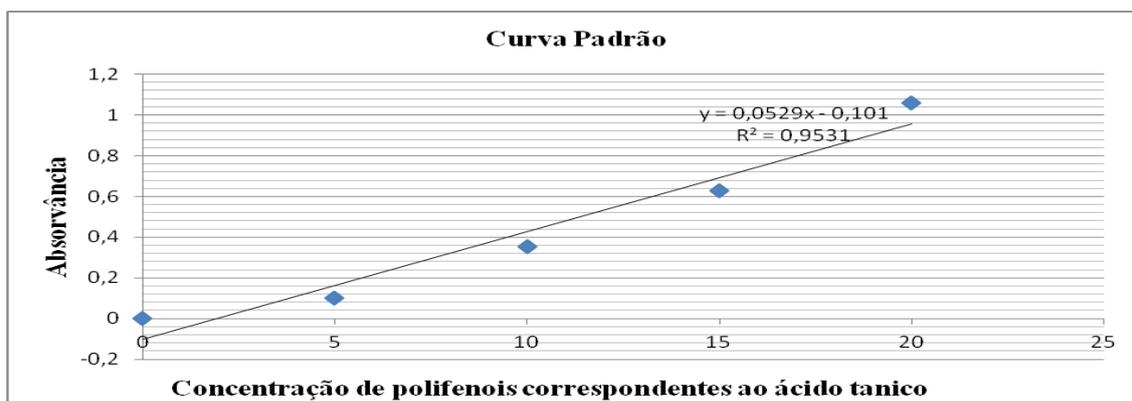


Figura 1. Absorvância de soluções de ácido tânico concernente à concentração das mesmas na curva padrão do ácido tânico

Tabela 2. Absorvâncias e teor total dos compostos fenólicos nas amostras

Amostra	Abs1	Abs2	TCF (mg/L)	TCF (mg/L)	TCF (mg/g)	TCF (mg/g)	M _{TCF} (mg/g)	s	%RSD
Laranja	0,414	0,394	9,735	9,319	32,45	31,06	31,76	0,98	3,10
Manga	0,865	0,822	18,261	17,448	60,87	58,16	59,52	1,92	3,22

ANEXO D. Material usado

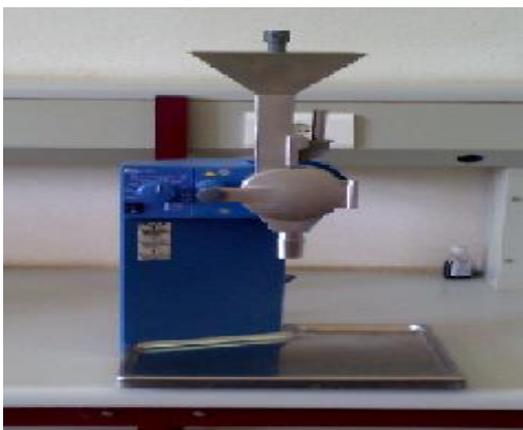


Figura 2. Moinho



Figura 3. Estufa



Figura 4. Rotavapor



Figura 5. Extractor Soxhlet